

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

Búsqueda de metabolitos con potencial fungicida en una colección de hongos de la isla San Cristóbal (Gálapagos)

Tesis en torno a una hipótesis o problema de investigación y su contrastación

Melany Mishell Benalcázar Tuga

**Antonio León-Reyes, Ph.D.
Director de Trabajo de Titulación**

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito para la obtención del título de Master en Microbiología

Quito, 11 de enero del 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Búsqueda de metabolitos con potencial fungicida en una colección de hongos de la isla San Cristóbal (Galápagos)

Melany Benalcázar

Nombre del Director del Programa:	Patricio Rojas Silva
Título académico:	Ph. D.
Director del programa de:	Maestría de Microbiología

Nombre del Decano del colegio Académico:	
Título académico:	Carlos Valle
Decano del Colegio:	Ph. D.

Nombre del Decano del Colegio de Posgrados:	Hugo Burgos
Título académico:	Ph. D.

Quito, 11 de enero del 2024

© 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.

Nombre del estudiante: Melany Benalcázar

Código de estudiante: 00322856

C.I.: 0401732847

Lugar y fecha: Quito, 11 de enero del 2024.

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UNPUBLISHED DOCUMENT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 graduation 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>.

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo de investigación a mis padres, mi novio, mi hermana, la familia de parte de mi novio, cada uno de ellos me apoyaron para finalizar este capítulo en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la energía para culminar este trabajo de investigación y tener fuerzas cuando aparecían situaciones difíciles.

A mis padres, porque siempre me han apoyado e incentivado a seguir avanzando en mis estudios.

A mi novio, Danny Benalcázar que estuvo desde el inicio de esta aventura dándome ánimos para continuar y culminar.

A mi hermana que me apoyo en el trabajo, para que pueda seguir estudiando.

A la familia de mi novio, que me apoyaron escuchándome, dándome palabras de aliento, para avanzar en este camino difícil.

A Noelia Barriga, que me entrenó desde un inicio para llevar a cabo este trabajo de investigación, siempre tuvo paciencia y disponibilidad para ayudarme en los problemas que se presentaban.

A Antonio, por aceptar trabajar conmigo a pesar de ser Ing. Química y no tener conocimientos en microbiología, por darme una guía, incentivación, motivación, así como a José Alvares Barreto por ayudarme con los reactivos y equipos de laboratorio en el Laboratorio de Ing. Química y por los aportes que fueron sustanciales, así como las sugerencias de Patricio Rojas Silva.

A el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, por prepararme en técnicas y conocimientos del campo de la microbiología.

A Jael, Brianne, Evelyn, Chema que me ayudaron con el desarrollo de los experimentos.

A mis compañeros de laboratorio Estefy, Chelo, Sol, que estuvieron siempre prestos a ayudarme y enseñarme los protocolos, así como a escuchar y ayudar a solucionar los problemas.

A mis compañeros de maestría que estuvieron ayudándome a estudiar para las pruebas y exámenes, sin ellos hubiera sido muy complicado culminar las materias.

RESUMEN

Los cultivos agrícolas son afectados por fitopatógenos como hongos, virus, bacterias y otros, sin embargo, los hongos son el mayor problema debido a su ciclo de infección y propagación. Generalmente se usan fungicidas sintéticos para su control, pero debido a que producen efectos colaterales, ahora las investigaciones se están enfocando en una alternativa biológica, los cuales pueden usar metabolitos secundarios con acción antifúngica. Un ejemplo modelo es el hongo *Trichoderma* (cepa T22) usado como antagonista de varios fitopatógenos. Es por esto que el objetivo de esta investigación fue probar los metabolitos crudos producidos por hongos de una colección de la isla San Cristóbal (Galápagos), contra 3 fitopatógenos de importancia agronómica *Fusarium*, *Botrytis*, *Alternaria*. En este estudio, se lograron recuperar en total 40 hongos de la colección usando medios PDA, V8, avena, siendo el V8 el mejor medio de reactivación/recuperación de los hongos. Para la producción de metabolitos crudos de los hongos, se usó como control la *Trichoderma* T22 (Control T22). En este proceso, se varió el tiempo de crecimiento e incubación (a 28°C) y dilución de metabolito (5-50%) en el medio, resultando a 4 semanas y 50% como el mejor resultado de inhibición al fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Se ensayaron 40 metabolitos crudos de los hongos, de los cuales tuvieron efecto inhibitorio: 23 para *Fusarium oxysporum*, 26 para *Alternaria alternata* y 19 para *Botrytis cinerea*. De los hongos aislados con metabolitos crudos con efecto inhibitorio positivos, se seleccionó el mejor y se hizo una caracterización molecular, obteniendo a *Clonostachys rosea* para *F. oxysporum* y *A. alternata*, mientras que para *B. cinerea* fue *Aspergillus ochraceopetaliformis*. También se hizo la dilución mínima inhibitoria de los metabolitos crudos de los hongos aislados y se encontró con 1% de dilución ya había efecto inhibitorio. El efecto antifúngico fue dependiente del fitopatógeno. Para la extracción de metabolitos, se sembró en medio arroz y la fracción bioactiva de acetato de etilo, donde presentó el mayor efecto inhibitorio. En conclusión, en la colección de la isla San Cristóbal (Galápagos) se encontraron hongos que produjeron metabolitos crudos con potencial fungicida. Como trabajo a futuro se está estandarizando un protocolo para caracterización química de metabolitos secundarios.

Palabras clave: hongos, fitopatógeno, efecto inhibitorio.

ABSTRACT

Agricultural crops are affected by phytopathogens such as fungi, virus, bacteria and others, however, fungi are the biggest problem due to their cycle of infection and spread. Synthetic fungicides are generally used for its control, but because they produce side effects, research is now focusing on a biological alternative, which can use secondary metabolites with antifungal action. A model example is fungi *Trichoderma* (strain T22) used as antagonist of several phytopathogens. This is why the objective of this research was to test the raw metabolites produced by fungi from a San Cristóbal island (Galapagos) collection, against 3 phytopathogens of agronomic importance *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*. In this study, a total of 40 fungi were recovered from the collection using PDA, V8, oatmeal media, with V8 being the best reactivation / recovery medium of fungi. To produce crude metabolites from fungi, *Trichoderma* T22 (Control T22) is used as a control. In this process, the growing and incubation time (at 28°C) and metabolite dilution (5-50%) in the medium were varied, resulting in 4 weeks and 50% as the best result of inhibition to the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. 40 crude metabolites of fungi were tested, of which they had an inhibitory effect: 23 for *Fusarium oxysporum*, 26 for *Alternaria alternata* and 19 for *Botrytis cinerea*. Of the isolates with crude metabolites with positive inhibitory effects, the best was selected and molecular characterization was made, obtaining *Clonostachys rosea* for *F. oxysporum* and *A. alternata*, while for *B. cinerea* it was *Aspergillus ochraceopetaliformis*. The minimum inhibitory concentration of the crude metabolites of fungi isolates was also determined and it was obtained that the dilution with 1% has inhibitory effect. The antifungal effect was dependent on the phytopathogen. For the extraction of metabolites, it was sown in half rice and the bioactive fraction of ethyl acetate, where presented the greatest inhibitory effect. In conclusion, fungi that produced crude metabolites with fungicidal potential were found in collection of San Cristóbal island (Gálapagos). As future work, a protocol for chemical characterization of secondary metabolites is being standardized.

Key words: fungi, phytopathogen, inhibitory effect.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	14
Metodología y diseño de la investigación.....	17
Obtención de la colección de hongos de la isla San Cristóbal (Galápagos), Hongo modelo y fitopatógenos.....	17
Recuperación y selección de cepas	17
Cultivo de hongo modelo y fitopatógenos.....	18
Búsqueda de condiciones favorables para la producción de metabolitos crudos con Control T22	19
Producción de metabolitos crudos de hongos de la colección de la isla San Cristóbal (Galápagos)	19
Filtración de metabolitos crudos, medición de pH, medición de biomasa de hongo y ensayo de inhibición.....	19
Ensayos preliminares para estandarizar protocolo de extracción y caracterización química de metabolitos crudos de Control T22	21
Caracterización molecular de hongos productores de metabolitos antifúngicos	22
Análisis estadístico	23
RESULTADOS.....	23
Recuperación de cepas con diferentes medios de cultivo: medio PDA, medio V8, dilución en V8 y medio avena	23
Identificación macroscópica y microscópica de los 40 hongos aislados.....	25
Búsqueda de condiciones favorables para la producción de metabolitos crudos con Control T22	32
Ensayos con el fitopatógeno <i>F. oxysporum</i>.....	35
Evaluación de actividad antifúngica de metabolitos crudos de los 40 hongos aislados en contra de <i>F. oxysporum</i>	35
Caracterización morfológica y molecular del hongo aislado que produjo metabolitos crudos con mejor efecto inhibitorio contra <i>F. oxysporum</i>	36
Dilución mínima inhibitoria de metabolitos crudos del hongo aislado AG-F-H040 contra <i>F. oxysporum</i>	38
Ensayos con el fitopatógeno <i>Botrytis cinerea</i>.....	39
Evaluación de actividad antifúngica de metabolitos crudos de los 40 hongos aislados en contra de <i>B. cinerea</i>	39
Caracterización morfológica y molecular del hongo que produjo metabolitos crudos con mejor efecto inhibitorio contra <i>B. cinerea</i>	41
Dilución mínima inhibitoria de metabolitos crudos del hongo aislado AG-F-H016 contra <i>B. cinerea</i>	42
Ensayos con el fitopatógeno <i>Alternaria alternata</i>.....	44
Evaluación de actividad antifúngica de metabolitos crudos de los 40 hongos aislados en contra de <i>A. alternata</i>	44
Caracterización morfológica y molecular de los hongos que produjeron metabolitos crudos con mejor efecto inhibitorio contra <i>A. alternata</i>	45
Dilución mínima inhibitoria de los metabolitos crudos de los hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037 AG-F-H028 y AG-F-H027 contra <i>A. alternata</i>	48
Resumen de los resultados de pruebas inhibitorias contra los tres fitopatógenos.....	50

Ensayos preliminares para estandarizar protocolo de extracción y caracterización química de metabolitos secundarios de Control T22.....	52
Discusión.....	55
Conclusiones.....	62
Referencias.....	64
ANEXOS.....	70
Anexo A: PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE FITOPATÓGENOS EN METABOLITOS CRUDOS.....	70
Anexo B: DISTRIBUCIÓN DE GÉNERO SEGÚN LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA.....	74
Anexo C: BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOS HONGOS AISLADOS IDENTIFICADOS.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Descripción macroscópica y microscópica de los 40 hongos aislados y su posible género.	32
Tabla 2 Detalle de caracterización molecular del hongo aislado AG-F-H040.....	37
Tabla 3 Detalle de caracterización molecular del hongo aislado AG-F-H016.....	42
Tabla 4 Detalle de caracterización molecular de los hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037 AG-F-H028 y AG-F-H027	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Porcentaje (%) de recuperación de hongos de acuerdo con el medio (PDA, V8, Avena) y antibiótico (gentamicina, tetraciclina, rifampicina) utilizado.	24
Figura 2 Identificación macroscópica de los 40 hongos aislados recuperados.	25
Figura 3 Identificación microscópica de los 40 hongos aislados recuperados.	27
Figura 4 Evaluación de crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en medio PDA con metabolitos crudos de Control T22.....	33
Figura 5 Evaluación de crecimiento de <i>F. oxysporum</i> (%) en medio PDA con metabolitos de los 40 hongos aislados... ..	35
Figura 6 Caracterización morfológica del hongo AG-F-H040 que tuvo el mayor porcentaje inhibitorio contra <i>F. oxysporum</i>	37
Figura 7 Dilución mínima inhibitoria de metabolitos crudos del hongo aislado AG-F-H040 contra <i>F. oxysporum</i>	38
Figura 8 Evaluación de crecimiento de <i>B. cinerea</i> (%) en medio PDA con metabolitos crudos de los 40 aislados.....	40
Figura 9 Caracterización morfológica del hongo AG-F-H016 tuvo el mayor porcentaje inhibitorio contra <i>B. cinerea</i>	41
Figura 10 Dilución mínima inhibitoria de metabolitos crudos del hongo aislado AG-F-H016 contra <i>B. cinerea</i>	42
Figura 11 Evaluación de crecimiento de <i>A. alternata</i> (%) en medio PDA con metabolitos crudos de los 40 hongos aislados.....	44
Figura 12 Caracterización morfológica de los hongos (AG-F-H019, AG-F-H037 AG-F-H028 y AG-F-H027) que tuvieron el mayor porcentaje inhibitorio contra <i>A. alternata</i>	47
Figura 13 Dilución mínima inhibitoria de metabolitos crudos de los hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028, AG-F-H027 contra <i>A. alternata</i>	49
Figura 14 Heatmap de la diferencia significativa de crecimiento de los tres fitopatógenos en medio PDA con los metabolitos de los 40 hongos aislados de la colección de la isla San Cristóbal (Galápagos).	52
Figura 15 Evaluación de la bioactividad de las fracciones extraídas de Control T22.....	53
Figura 16 TLC de las fracciones concentrada de metanol, hexano y acetato de etilo probando combinaciones distintas de hexano con acetato de etilo y metanol.....	54

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se registran pérdidas de cultivos por plagas y enfermedades, en particular por hongos, en un rango de pérdidas del 10 al 23% en etapa de sembrado y 10 al 20% en post cosecha de cultivos de importancia como el trigo, arroz, maíz, papa, soja, productos básicos en la alimentación de la población mundial (Stracquadiano et al., 2020). La importancia de un control eficiente de enfermedades de plantas causadas por bacterias, hongos, virus, nemátodos, entre otros, se ha vuelto un tema indispensable al pensar que las pérdidas afectan la seguridad alimentaria (Raymaekers et al., 2020). Los hongos fitopatógenos son los causantes de pérdidas millonarias de cultivos de interés agronómico en todo el mundo. Su propagación se da por el transporte de esporas, a través de fenómenos meteorológicos, movimiento del viento y por vectores como insectos que pueden cubrir amplias áreas geográficas (Mulatu et al., 2021). Los fitopatógenos pueden ser selectivos de hospederos o diversificarse e infectar algunas especies de plantas. Sin embargo, endémicamente, también las cepas pueden volverse patógenas o adquirir genes de virulencia y convertirse en fitopatógenos (Ristaino et al., 2021). La reproducción de forma sexual o asexual los hace microorganismos de fácil adaptación a nuevos ambientes y a su vez a ambientes extremos (Rumidatul et al., 2020). La hibridación interespecífica ayuda a tener una diversidad genética y esto ayuda a tener cambios evolutivos que favorecen a la invasión de hongos (Gladieux et al., 2016).

Una alternativa para combatir los fitopatógenos como los hongos, es el fitomejoramiento, pero no es suficiente (van Zanten et al., 2012), por lo que el uso de pesticidas químicos se ha hecho inevitable como uso preventivo o curativo (Raymaekers et al., 2020). Los fungicidas sintéticos pueden inhibir la síntesis de aminoácidos, proteínas, esteroides, afectar al citoesqueleto y función de proteínas motoras, son inhibidores de desmetilación, afectan la

estructura de la membrana, metabolismo de los ácidos nucleicos, bloquean la mitosis, de la síntesis de quitina, entre otros (Vielba-Fernández et al., 2020).

Otra alternativa son los fungicidas orgánicos, que pueden ser aceites esenciales extraídos de plantas, sin embargo, aún se requieren estudios para valorar efectos tóxicos para los organismos que no son el objetivo del fungicida, efectos secundarios como actividad mutagénica o cancerígena (Vielba-Fernández et al., 2020). También, hay poca disponibilidad de aceites esenciales de plantas o a base de petróleo y sales inorgánicas. Aunque las materias primas no son costosas, la variedad y abundancia de plantas que producen estos aceites dependen del clima, además de la estabilidad de los componentes para ser comercializados (Durán-Lara et al., 2020).

Aunque la aplicación de fungicidas ha generado beneficios para la producción, también hay aspectos negativos como efectos en la salud humana, además de consecuencias para el medio ambiente como contaminación del suelo, agua, afectación para organismos benéficos (Vielba-Fernández et al., 2020). Además, el uso excesivo e intenso de estos fungicidas provocan desarrollo de resistencia de fitopatógeno, haciendo que tuvieron que diversificarse por modo de acción o subiendo las dosis (Raymaekers et al., 2020). Siendo así, que se empezaron a poner reglas estrictas para el uso de pesticidas e incluso se promovió el manejo de pesticidas integrado, indicando que debe hacer un uso controlado de pesticidas e incentivar mecanismos de control naturales de plagas (Torbaty et al., 2021). Es aquí donde se empiezan a buscar agentes de biocontrol, que son organismos o microorganismos, como bacterias, hongos, virus, levaduras, protozoos, que tienen la capacidad de actuar como controladores de plagas. Se entiende que hay dos vías de biocontrol, directo, por el cual los organismos atacan de forma antagónica a los fitopatógenos o por medio de excreción de sustancias, o indirecto, por medio de inducción de resistencia en la planta (Raymaekers et al., 2020). Una alternativa

prometedora de biocontrol directo es el uso de hongos, puesto que las interacciones que tienen con las plantas y con los microorganismos son complejas y además tiene más de una vía de acción, por lo que pueden retardar el desarrollo de resistencia (Yadav et al., 2019). Por otro lado, los metabolitos secundarios de hongos ofrecen una diversidad de compuestos químicos únicos con efectos antifúngicos. Las estructuras químicas que sobresalen en metabolitos secundarios antifúngicos son alcaloides, terpenoides, entre otros (Xu et al., 2021). Un agente de control biológico, es el hongo beneficioso *Trichoderma*. Las especies de *Trichoderma* ayudan al crecimiento de planta, control de plagas y fitopatógenos, a la respuesta al estrés abiótico (Erazo Sandoval et al., 2020) y produce metabolitos secundarios (Mulatu et al., 2021). Un ejemplo es la cepa *Trichoderma harzianum* T22, la cual ha sido evaluada contra *Fusarium culmorum* (Vitti et al., 2022), *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*, demostrando eficacia como agente biocontrol, además de que es una cepa disponible a nivel comercial (Patkowska et al., 2020).

Por otro lado, algunos de los hongos fitopatógenos, que tienen interés agronómico en el Ecuador, son *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*, ya que producen pérdidas en cultivos de exportación importantes como el banano, rosas, brócoli, tomando en cuenta que el Ecuador es el líder en exportación de estos productos y que las exportaciones son un eje fundamental de la economía, como los indica el Ministerio de Producción Comercio Exterior, Inversiones y Pesca (Prado et al., 2023), por lo cual sería importante controlarlos.

Esta investigación tiene como objetivo buscar metabolitos crudos con potencial fungicida obtenidos de una colección de hongos aislados de la isla San Cristóbal en Galápagos, los cuales serían previamente recuperados, evaluados en pruebas de potencial antifúngico contra

fitopatógenos de interés, y realizando una estandarización de un posible protocolo para extraer metabolitos crudos, y que pueden ser caracterizados químicamente en un futuro.

METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Obtención de la colección de hongos de la isla San Cristóbal (Galápagos), Hongo modelo y fitopatógenos

Los hongos utilizados, para ser evaluados como biocontroladores de fitopatógenos, fueron tomados de una colección de la isla San Cristóbal (Galápagos), que fueron aislados previamente de la planta invasora *Rubus niveus* (mora), en la investigación de Barriga (2020) Por otro lado, la cepa control que se usó como controlador biológico fue *Trichoderma harzianum* (T22). Esta cepa, que será denominada Control T22 a lo largo de este estudio, la cual estaba almacenada a -20 °C en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito - USFQ, en el campus Cumbayá, Quito, Ecuador, Cumbayá, Quito, Ecuador.

Los hongos fitopatógenos usados fueron *Fusarium oxysporum* (aislado de banano de la Finca Dello en Guayas), *Botrytis cinerea* (aislado de rosa de la Finca AGRIROSE y Picuerra en Cotopaxi) y *Alternaria alternata* (aislado de Brócoli de la Finca Agrogana en Cotopaxi). Las tres cepas se encontraban almacenadas a -20°C en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito - USFQ, en el campus Cumbayá, Quito, Ecuador

Recuperación y selección de cepas

Se sembraron las cepas de la colección de isla San Cristóbal (Galápagos), las cuales se incubaron a 28°C durante dos semanas para que esporulen y puedan ser observados en microscopía. Se utilizaron cuatro métodos para la recuperación de los hongos: 1) medio PDA

(Potato Dextrose Agar, Difco) con antibiótico (gentamicina); 2) medio PDA y tres antibióticos (gentamicina, tetraciclina y rifampicina); 3) medio avena (Avena YA) y los tres antibióticos mencionados anteriormente; y 4) medio V8 (medio con jugo V8 (Original V8), malta (Difco), maltosa (Difco), aspargina (Difco), carbonato de calcio (Casa de los químicos)) (Chaliha et al., 2020) con los tres antibióticos.

Para los cultivos de hongos no monospóricos (que no pudieron ser recuperados con los métodos antes mencionados), se utilizó el método de diluciones seriadas con medio V8, colocando 1 ml de medio V8 líquido sobre el hongo, y luego frotando con un hisopo para desprender todo el hongo posible. Posteriormente, se tomó 1 ml de esta solución y se colocó en un tubo con 9 ml de medio V8 líquido para realizar diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-9} . Cada dilución (100 μ l) se extendió en una placa con medio V8 (agar) y los tres antibióticos antes mencionados. Una vez que se obtuvieron hongos monospóricos, éstos fueron observados en el microscopio (Leica) y posteriormente se seleccionaron 40 hongos con fenotipos diferentes. De allí, los hongos aislados se mantuvieron con pases en V8 y crecimiento a 28 °C. El planteamiento era usar medios con componentes distintos que permitieran el crecimiento de los hongos y un coctel de antibióticos para evitar el crecimiento bacteriano.

Cultivo de hongo modelo y fitopatógenos

Para el cultivo de la cepa Control T22, se usó un medio con PDA y gentamicina. Esta cepa se cultivó a 28°C durante una semana

En el caso de los fitopatógenos, se cultivaron de la siguiente manera: *F. oxysporum* a 28°C en un medio PDA con gentamicina, *B. cinerea* a 25°C en PDA con gentamicina igualmente, y *A. alternata* a 25°C en un medio de brócoli (Medio PDB, Brócoli seco y Agar (Difco)) con gentamicina y tetraciclina.

Para todas las cepas, se confirmó su esporulación previamente por microscopía para ser utilizadas en los ensayos de inhibición.

Búsqueda de condiciones favorables de la producción de metabolitos crudos con Control T22

Para la producción de metabolitos crudos del hongo modelo Control T22, se tomó un disco de 9 mm de diámetro, con sacabocados y se colocó en 75 ml de medio PDB (Potato Dextrose Broth, Difco) con gentamicina. Esto se llevó a una incubación de 28°C, limitando la entrada de oxígeno, generando estrés (Baazeem et al., 2021). Para encontrar las condiciones favorables de la producción de metabolitos crudos se probó varios tiempos de fermentación en donde se probaba el efecto inhibitorio de cada metabolito crudo cada hasta completar las cuatro semanas. Posteriormente, para ver si existía un mayor efecto inhibitorio, se probó a la octava semana. Por otra parte, se evaluó la dilución de metabolitos crudos producidos por esta cepa, analizando las siguientes diluciones: 0, 10, 25, 50 % de metabolito crudo en el medio de cultivo PDA y así evaluar su efecto inhibitorio.

Producción de metabolitos crudos de hongos de la colección de la isla San Cristóbal (Galápagos)

Una vez que se obtiene el cultivo de los 40 hongos seleccionados, se obtuvieron los metabolitos crudos de cada hongo, usando el mismo protocolo utilizado para Control T22 (tiempo de fermentación y dilución de metabolitos crudos), colocando un disco de 9 mm de diámetro en 75 ml de medio PDB con gentamicina a 28°C. El tiempo de incubación para estos hongos fue de cuatro semanas.

Filtración de metabolitos crudos, medición de pH, medición de biomasa de hongo y

ensayo de inhibición

Luego de las cuatro semanas de fermentación de los 40 hongos aislados, los metabolitos crudos producidos fueron filtrados en media nylon y posteriormente en papel filtro (papel filtro de 0.45 μm) para separar la biomasa del hongo de los metabolitos crudos. Se midió el pH de los metabolitos (tirillas de papel pH), y se ajustó a un rango de 5.6 – 6 para que el pH no fuese un factor inhibitorio que causara interferencia en la respuesta antifúngica. Luego se filtró con filtros de jeringa de 0.22 μm (Polipropileno con membrana PES hidrófila) para eliminar residuos bacterianos y las esporas de los hongos, para solo quedarse con el metabolito crudo. El filtrado del metabolito crudo obtenido se colocó al 50% en medio PDA. Para los ensayos de inhibición se utilizaron como controles los siguientes: Control – (PDA), el medio de cultivo solo contiene medio PDA; Control + (Sintético), el medio de cultivo contiene PDA y el fungicida sintético Captan (control sintético); Control T22, el medio de cultivo contiene PDA y los metabolitos crudos de la cepa T22 (control biológico).

En estos ensayos de inhibición se colocó un disco de 9 mm del fitopatógeno en el centro de cada caja que contiene el medio de cultivo + metabolito crudo evaluado, y las cajas de los controles. Para calcular el porcentaje de inhibición, cada metabolito crudo evaluado se comparó con el Control – PDA, tomando medidas diarias de crecimiento hasta que el fitopatógeno creciera en toda la caja de dicho control. El tiempo de crecimiento de cada fitopatógeno en este control fue el siguiente: para *F. oxysporum* fue de 8 a 9 días, *B. cinerea* fue de 9 a 11 días y *A. alternata* fue de 15 – 17 días, se usó como base la metodología descrita en (Kamat et al., 2020). Al usar este protocolo se asegura que el hongo fitopatógeno este en contacto directo con los metabolitos crudos y las moléculas de éstos puedan ejercer el efecto inhibitorio y tener difusión homogénea de los metabolitos crudos en el medio.

Una vez, que se obtuvieron los resultados de porcentaje de crecimiento de los 40 metabolitos crudos de los hongos aislados contra cada fitopatógeno, se seleccionó el metabolito crudo que tuvo mayor efecto inhibitorio. Se realizaron ensayos para encontrar la dilución mínima inhibitoria de los metabolitos crudos con mayor efecto inhibitorio para cada fitopatógeno, utilizando las siguientes diluciones: 0,1,10,25 y 50%.

Ensayos preliminares para estandarizar protocolo de extracción y caracterización química de metabolitos crudos de Control T22

Se sembró tres discos de 9 mm de Control T22 en arroz (200 gr) (Mulatu et al., 2021) en 5 Erlenmeyers de 1L, se incubó a 28°C por cuatro semanas, hasta que el hongo produzca metabolitos crudos. Posteriormente, la mezcla de arroz con metabolitos crudos fue lavada con metanol, colocando metanol en el Erlenmeyer hasta llegar a un volumen de 1L, y se dejó 24 horas en tiempo de contacto. Luego la mezcla de metabolitos crudos extraídos y metanol se filtró en tela y algodón, y se repitió el lavado dos veces (Hosseyini-Moghaddam & Soltani, 2014). Se usa metanol para separar los metabolitos secundarios intracelulares del micelio. Posteriormente, el extracto se concentró en el rotavapor (BUCHI) hasta obtener polvo y se evaluó la actividad del concentrado para comprobar que los metabolitos con bioactividad fúngica se encontraban en el extracto de metanol. Luego se realizó una separación bifásica con hexano y acetato de etilo (Angel et al., 2016). Para esta separación bifásica, el polvo se diluyó en 500 ml de agua destilada y se mezcló con 500 ml de hexano. El tiempo de contacto fue de 24 horas, se separó con embudo de separación, obteniendo 2 fases, una fase acuosa y una fase de hexano (metabolitos crudos). La fase de hexano se concentró en rotavapor para ser evaluada su actividad (Nitish Rattan Bhardwaj & J. Kumar, 2017). Por otra parte, la fase acuosa fue sometida a una extracción con acetato de etilo, para extraer metabolitos crudos afines con la polaridad del acetato de etilo y que pudiesen tener actividad. Se mezcló 500 ml

de acetato de etilo con los 500 ml de dicha fase acuosa, con un tiempo de contacto 24 horas. Esta mezcla, se separó con embudo de separación obteniendo, de igual manera, dos fases, la fase acuosa y la fase de acetato de etilo (metabolitos crudos). La fase de acetato de etilo se concentró en rotavapor y también se evaluó actividad (R. A. A. Khan et al., 2020). Se usaron como controles los siguientes: Control (PDA), Metanol puro (Metanol), Acetato de etilo puro (Acetato de etilo), Hexano puro (Hexano). Las fracciones extraídas probadas: extracto concentrado con solvente metanol (Excon. -Metanol), extracto concentrado con solvente hexano (Excon. -Hexano), extracto concentrado con solvente acetato de etilo (Excon. - Acetato de etilo).

También, se hicieron pruebas de cromatografía de capa fina para ver dilución y ver la polaridad de las moléculas de las fracciones concentradas extraídas con los solventes mencionados anteriormente, variando concentración de mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol (Ahluwalia et al., 2014). Se usaron las siguientes relaciones: hexano: acetato de etilo (4:1), hexano: acetato de etilo (1:1), acetato de etilo 100%; acetato de etilo: metanol (4:1) y acetato de etilo: metanol (1:1).

Para el ensayo de actividad fúngica, se extendió 100 uL de la fracción extraída con cada solvente de los metabolitos secundarios del Control T22 en cajas Petri y se colocó un disco 9 mm de *F. oxysporum* en el centro. Se comparó el crecimiento con el Control PDA para calcular el porcentaje de inhibición.

Caracterización molecular de hongos productores de metabolitos antifúngicos

El ADN fúngico de las cepas seleccionadas, fue extraído con el kit Power Soil (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se amplificaron dos genes de referencia, ITS (Internal Transcribed Space) y Actina. ITS se amplificó para todas las cepas seleccionadas y Actina sólo para los hongos de género *Clonostachys* (género identificado por microscopía).

Para la región ITS se usaron el par de primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (Stracquadiano et al., 2020), y para Actina se usaron los primers ACTF (5'-TCCAACCGTGAGAAGATGAC-3') y ACTR (5'-GCAATGATCTTGACCTTCAT-3') (Arzanlou et al., 2009). La reacción de PCR fue desarrollada en el termociclador LABNET MULTIGENE con los siguientes parámetros: Para ITS, una temperatura inicial de desnaturalización fue a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 94°C por 45 segundos, annealing a 52°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos y extensión final a 72°C por 15 minutos. Para Actina, una temperatura inicial de desnaturalización fue a 94°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, annealing a 60°C por 20 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron secuenciados por MACROGEN en Korea usando el método de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con NCBI Blast.

Análisis estadístico

Se utilizó ANOVA y Tuckey para analizar la diferencia significativa entre el tiempo de fermentación y la dilución de metabolitos crudos, ANOVA y Dunnet para la comparación de medias del porcentaje de crecimiento entre el Control PDA y metabolitos crudos de hongos en el programa Graphpad Prism 10.0.1. Para los gráficos de porcentaje de crecimiento se usó el programa Rstudio y para el heatmap se usó el programa Graphpad Prism.

RESULTADOS

Recuperación de cepas con diferentes medios de cultivo: medio PDA, medio V8, dilución

en V8 y medio avena

Se quiso probar diferentes medios de cultivo y antibióticos, para ver cual combinación era la mejor para recuperar los aislados de la colección de la isla San Cristóbal (Galápagos). En la Figura 1 se puede observar los diferentes porcentajes de recuperación con cada una de las combinaciones y medios usados.

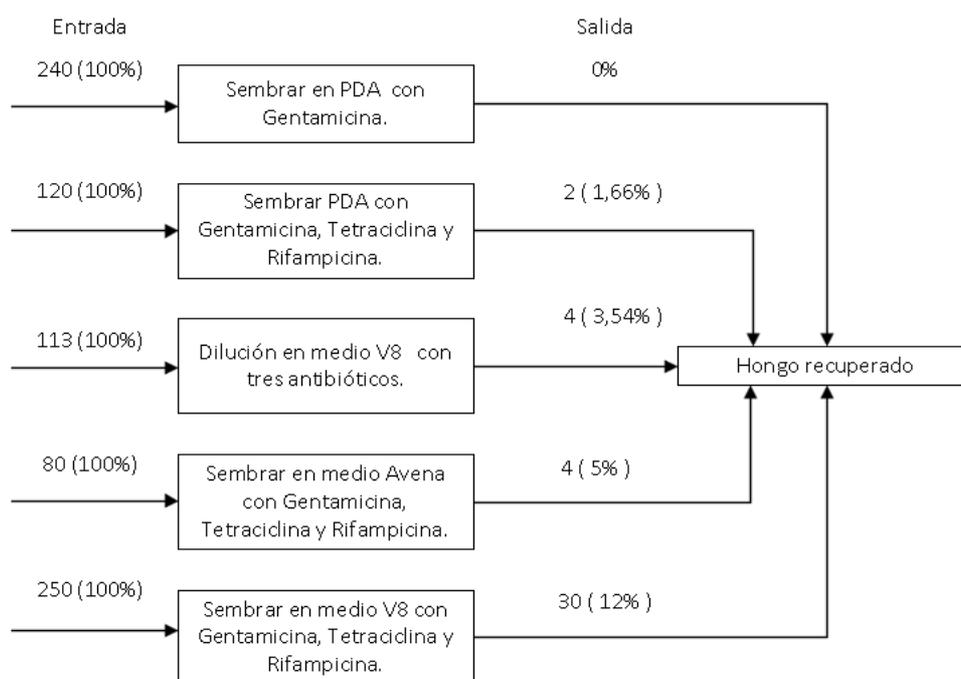


Figura 1 Porcentaje (%) de recuperación de hongos de acuerdo con el medio (PDA, V8, Avena) y antibiótico (gentamicina, tetraciclina, rifampicina) utilizado.

Inicialmente se sembraron 400 aislados de la colección de la isla San Cristóbal (Galápagos), como resultado se puede ver que, de los 240 hongos sembrados en el medio PDA, no se obtuvo ningún aislado recuperado; de los 120 hongos sembrados en el medio PDA con los tres antibióticos (gentamicina, tetraciclina y rifampicina), solo se recuperaron 2 hongos (que representa al 1,7% de recuperación); de los 80 hongos sembrados en el medio avena con los

tres antibióticos, solo se recuperaron 4 hongos (5%); de los 250 hongos sembrados en el medio V8 con 3 antibióticos, se recuperaron 30 hongos (30%), indicando que esta última combinación fue la mejor para recuperar hongos. Por otra parte, se quiso probar un último método, para ver si se podía recuperar los hongos que no pudieron ser recuperados con los anteriores métodos. Este método fue hacer una dilución en medio V8 con los tres antibióticos, sin embargo, solo se pudieron recuperar 4 hongos (3.54%). En total, se recuperaron 40 hongos aislados con los diferentes medios, los cuales fueron usados en esta investigación. Hay que tomar en cuenta que algunos hongos fueron sembrados en las diferentes combinaciones, hasta encontrar el método adecuado para recuperar el hongo.

Identificación macroscópica y microscópica de los 40 hongos aislados

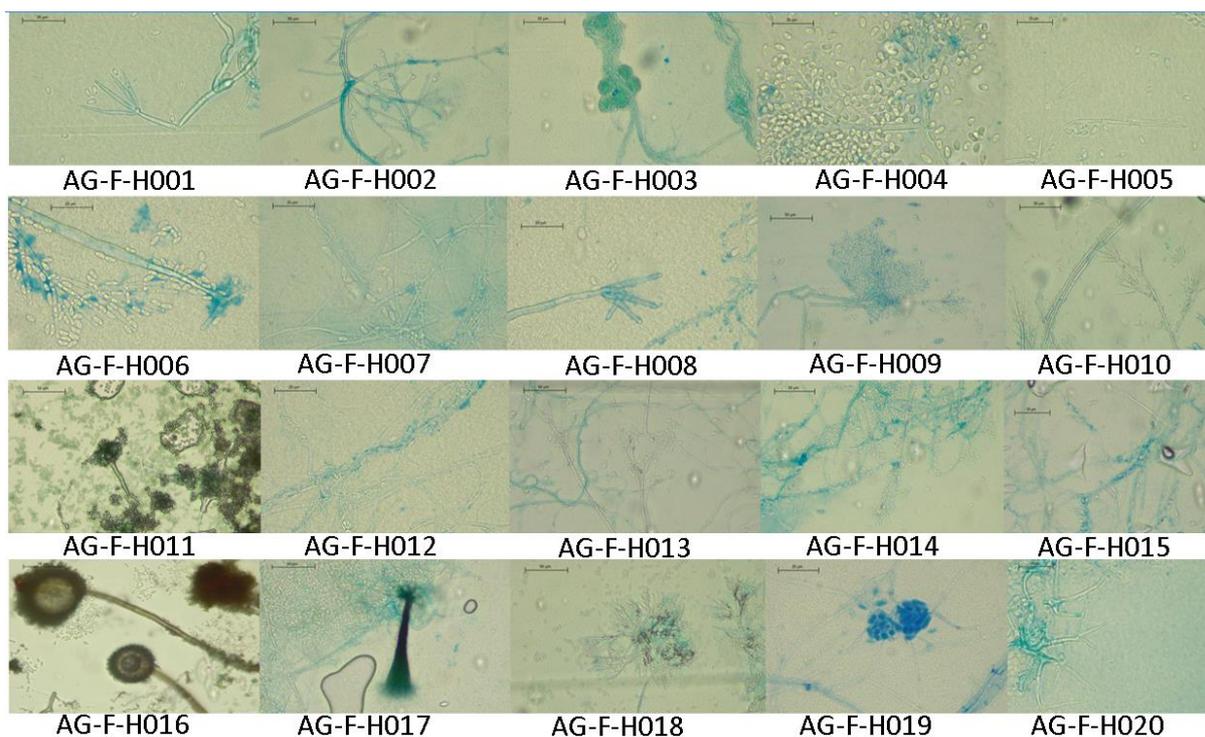
A continuación, en la Figura 2, se muestran las macroscopías de los 40 hongos aislados, que muestran las diferencias en crecimiento, color de micelio, formación de estructuras como esclerocios, entre otros.



Figura 2 Identificación macroscópica de los 40 hongos aislados recuperados.

En la Figura 2, se puede apreciar que están presentes hongos filamentosos, esporulantes, polvosos (ejemplo AG-F-H016), formadores de esclerocios (ejemplo AG-F-H034), y que forman y toman colores diferentes cuando están esporulados. Dentro de estas macroscopías, se puede observar que hay un hongo con micelio verde, 23 hongos con micelio blanco, 10 con micelio amarillo, 3 con micelio negro, 1 con micelio morado, y 1 con micelio combinado blanco con verde. De acuerdo con su crecimiento y color de micelio, se podría tener una idea del género al que pueden pertenecer, sin embargo, es necesario la microscopía para confirmar posibles géneros y molecular para confirmar especie.

Siguiendo con la caracterización, se realizó microscopía para identificar el género de los hongos aislados las cuales se pueden observar en la Figura 3, donde se puede apreciar las estructuras características de cada género.



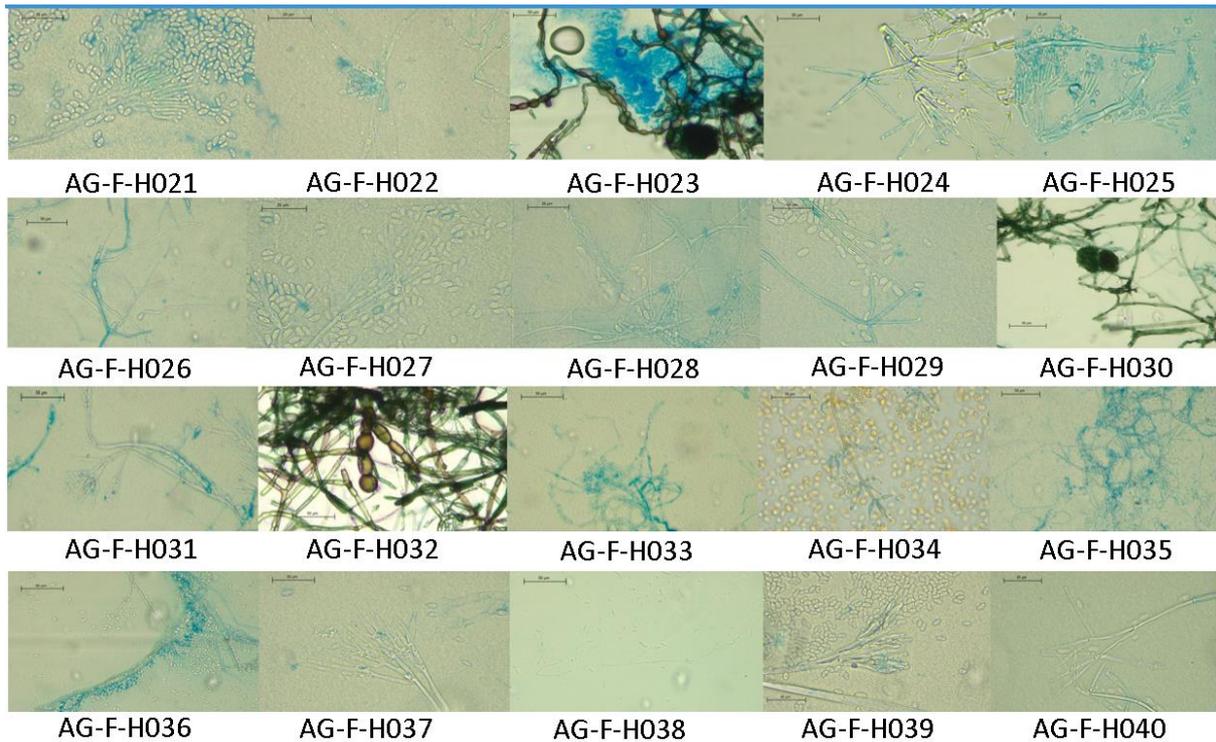


Figura 3 Identificación microscópica de los 40 hongos aislados recuperados.

Como se observa en la Figura 3, las morfologías de los 40 hongos aislados son diferentes a pesar de tener estructuras características de un solo género, por ejemplo, el código AG-F-H004 y AG-F-H005, pertenecen al género *Clonostachys* pero el número de fiálides cambia de 4 a 3 respectivamente, indicando que podrían ser especies o cepas diferentes.

En la Tabla 1, se encuentran los 40 hongos aislados especificando el género identificado según microscopia con características fenotípicas.

Código	Género	Descripción	
		Microscopía	Microscopía
AG-F-H001	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de fiálides verticiliadas (4) y conidias ovaladas.
AG-F-H002	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de fiálides verticiliadas (5) con conidias ovaladas
AG-F-H003	<i>No identificado</i>	Micelio blanco	Presencia de bolsas ovaladas
AG-F-H004	<i>Clonostachys</i>	Micelio amarillo con esclerocios.	Presencia de fiálides verticiliadas (4) con conidias ovaladas
AG-F-H005	<i>Clonostachys</i>	Micelio amarillo con esclerocios.	Presencia de fiálides verticiliadas (3) con conidias ovaladas.
AG-F-H006	<i>Clonostachys</i>	Micelio amarillo con esclerocios.	Presencia de fiálides verticiliadas (4) con conidias ovaladas
AG-F-H007	<i>No identificado</i>	Micelio blanco	Hifas con ramificaciones cortas
AG-F-H008	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de fiálides verticiliadas (4) con conidias ovaladas
AG-F-H009	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco con esclerocios de color	Presencia de fiálides verticiliadas (4) con conidias ovaladas

AG-F-H010	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco con esclerocios de color	Presencia de fiálides verticiliadas (5) con conidias ovaladas
AG-F-H011	<i>Aspergillus</i>	Micelio verde y polvoso	Presencia de estípites, vesículas circulares, globosas, conidias circulares
AG-F-H012	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de conidias ovaladas
AG-F-H013	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco con esclerocios de color	Presencia de fiálides verticiliadas (4) con conidias ovaladas
AG-F-H014	<i>Clonostachys</i>	Micelio amarillo	Presencia de fiálides verticiliadas (4) con conidias ovaladas
AG-F-H015	<i>Fusarium</i>	Micelio morado	Presencia de conidias ovaladas con ramificaciones cortas
AG-F-H016	<i>Aspergillus</i>	Micelio polvoso, tomate	Presencia de estípites, vesículas circulares, globosas, conidias circulares
AG-F-H017	<i>Graphyium</i>	Micelio amarillo	Presencia de sinemas, conidias ovaladas
AG-F-H018	<i>No identificado</i>	Micelio blanco con esclerocios de color amarillo	Presencia de fiálides agrupadas en un mismo centro y conidias ovaladas

AG-F-H019	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de bolsas ovaladas agrupadas
AG-F-H020	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de fiálides verticiliadas (3) con conidias ovaladas
AG-F-H021	<i>Clonostachys</i>	Micelio amarillo con esclerocios de color amarillo	Presencia de fiálides peniciliadas con conidias ovaladas
AG-F-H022	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de conidias ovaladas
AG-F-H023	<i>Lasiodiplodia</i>	Micelio negro	Presencia de hifas con estructuras similares a cadenas
AG-F-H024	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de fiálides peniciliadas con conidias ovaladas
AG-F-H025	<i>Clonostachys</i>	Micelio amarillo	Presencia de fiálides peniciliadas con conidias ovaladas
AG-F-H026	<i>Fusarium</i>	Micelio blanco	Presencia de conidias ovaladas con ramificaciones cortas
AG-F-H027	<i>Clonostachys</i>	Micelio amarillo	Presencia de fiálides verticiliadas (5) con conidias ovaladas
AG-F-H028	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de conidias ovaladas

AG-F-H029	<i>Clonostachys</i>	Micelio amarillo	Presencia de fiálides verticiliadas (4) con conidias ovaladas
AG-F-H030	<i>Lasiodiplodia</i>	Micelio negro	Hifas de color café con estructuras parecidas a bolsas de color negro
AG-F-H031	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de fiálides verticiliadas (4)
AG-F-H032	<i>Lasiodiplodia</i>	Micelio negro	Hifas de color café con estructuras ovaladas
AG-F-H033	<i>No identificado</i>	Micelio blanco	Estructuras ovaladas e hifas
AG-F-H034	<i>No identificado</i>	Micelio blanco con esclerocios de color naranja o café	Fiálides con conidias ovaladas y circulares
AG-F-H035	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de fiálides verticiliadas (3) con conidias ovaladas
AG-F-H036	<i>Clonostachys</i>	Micelio amarillo	Presencia de fiálides verticiliadas (4) con conidias ovaladas
AG-F-H037	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de fiálides peniciliadas con conidias ovaladas
AG-F-H038	<i>Fusarium</i>	Micelio blanco	Conidias ovaladas alargadas como bananas

AG-F-H039	<i>Penicillium</i>	Micelio verde con blanco	Presencia de fiálides peniciliadas con conidias ovaladas
AG-F-H040	<i>Clonostachys</i>	Micelio blanco	Presencia de fiálides verticiliadas (3) con conidias ovaladas

Tabla 1 Descripción macroscópica y microscópica de los 40 hongos aislados y su posible género.

En la Tabla 1, se encuentran los 40 hongos aislados, de los cuales 25 pertenecen el género *Clonostachys* (62,5%), 3 al género *Fusarium* (7,5%), 3 al género *Lasioidiploidia* (7,5%), 2 pertenecen al género *Aspergillus* (5%), 1 al género *Penicillium* (2.5%), 1 al género *Graphium* (2,5%) y 5 no identificados (12,5%).

Búsqueda de condiciones favorables para la producción de metabolitos crudos con Control T22

Se probaron diferentes tiempos de fermentación y diferentes diluciones de metabolitos crudos, para ver si esto influenciaba en el efecto inhibitorio de los metabolitos crudos del Control T22. Adicionalmente, se observó si existía un cambio en el pH de los metabolitos crudos y la biomasa seca durante el tiempo de fermentación y los resultados se pueden ver en la Figura 4.

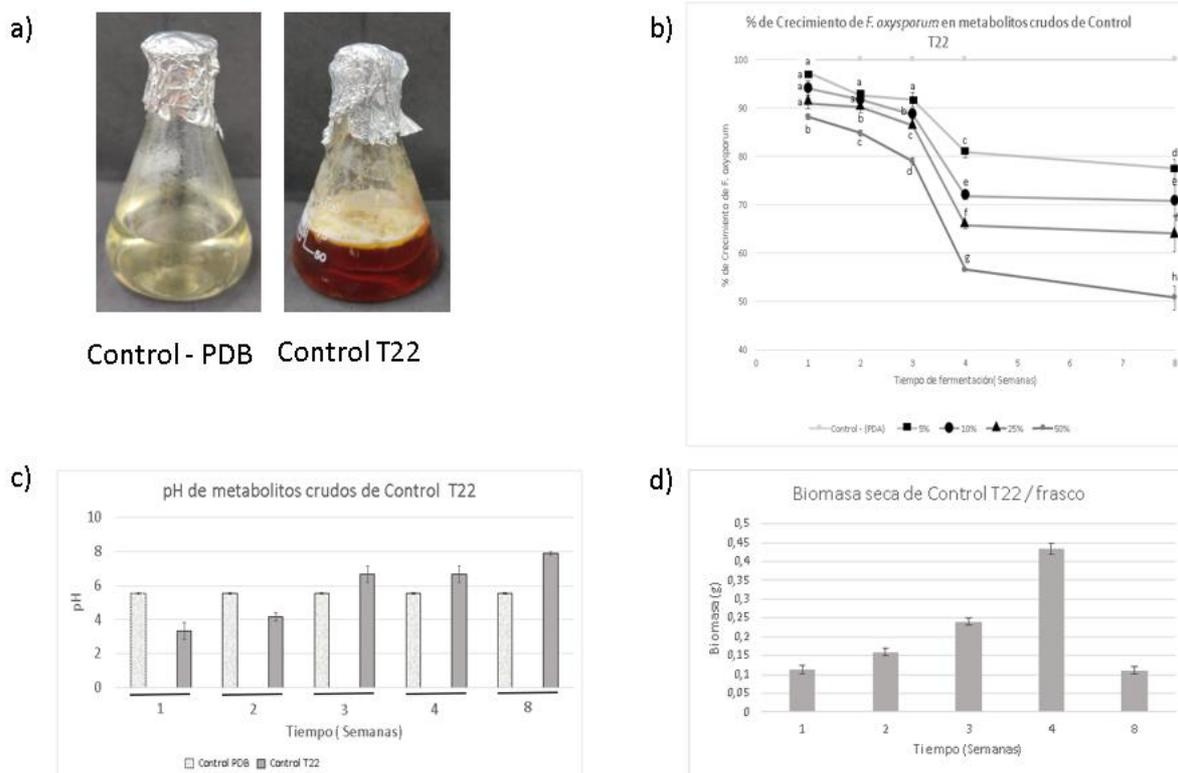


Figura 4 Evaluación de crecimiento de *F. oxysporum* en medio PDA con metabolitos crudos de Control T22. a) Metabolitos crudos de Control T22 en contraste con el Control PDB sin metabolito. b) Evaluación del crecimiento de *F. oxysporum* (%) en medio PDA con metabolitos crudos en distintas diluciones de Control T22, c) Evaluación del pH de los metabolitos crudos en el medio PDB, donde línea blanca corresponde a las mediciones del Control PDB y línea gris a las mediciones del Control T22, y d) medición de la biomasa, durante las 8 semanas de fermentación de Control T22. Las letras sobre las barras indican la diferencia estadística (Tuckey $p < 0.05$), se realizaron 3 repeticiones.

Para esta optimización se usó solamente al fitopatógeno *F. oxysporum* para ser evaluado contra los metabolitos crudos del Control T22. Se observa en la Figura 4a la diferencia de color del medio entre el Control PDB y el Control T22 cuando produce metabolitos (4

semanas), cambiando de color amarillo a naranja. En el caso de la Figura 4b se puede apreciar que, el porcentaje de crecimiento de *F. oxysporum* va disminuyendo conforme a que la dilución del metabolito crudo de Control T22 y el tiempo de fermentación van aumentando hasta llegar a las cuatro semanas. En el caso del tiempo de fermentación, se hizo una prueba adicional a las ocho semanas para ver si el porcentaje de crecimiento del fitopatógeno seguía disminuyendo significativamente, o si se mantenía, pero se observó que, a pesar de que sí disminuyó este porcentaje, no fue representativo con relación a las cuatro semanas evaluadas. En el caso de la dilución de metabolito crudo, se puede ver que, en todas las diluciones (5% al 50%), durante las tres primeras semanas, hay cambios pequeños en el % de crecimiento, pero a la cuarta semana, se ve un cambio abrupto en este crecimiento. Posterior a las cuatro semanas, las diluciones de 5, 10 y 25% muestran posiblemente que el % de crecimiento se va a mantener constante, sin embargo, en la dilución 50% si se ve una disminución del 48 % de crecimiento del fitopatógeno.

En la Figura 4c, se puede ver que el pH de los metabolitos crudos del Control T22 aumenta a pH 8 en la octava semana de fermentación, considerando que el medio tiene un pH inicial de 5.6 (Control PDB). En la Figura 4d, se pueden ver los cambios de biomasa del hongo Control T22 durante el tiempo de fermentación, donde, a la primera semana, la biomasa fue de 0.11 g y a la cuarta semana fue de 0.43g, mostrando un aumento. Sin embargo, de acuerdo con la octava semana disminuye la cantidad de biomasa a 0.1g. Por tal motivo, de acuerdo a todos los resultados antes mencionados, se escogió la cuarta semana y la dilución de metabolito crudo al 50% como la mejor combinación para continuar con la evaluación de los demás metabolitos crudos de los 40 hongos aislados.

Ensayos con el fitopatógeno *F. oxysporum*

Evaluación de actividad antifúngica de metabolitos crudos de los 40 hongos aislados en contra de *F. oxysporum*.

Una vez, que se encontraron las condiciones óptimas, las mismas fueron utilizadas para los 40 hongos aislados, observándose los resultados del porcentaje de crecimiento de *F. oxysporum* en los metabolitos de los 40 hongos aislados en la Figura 5.

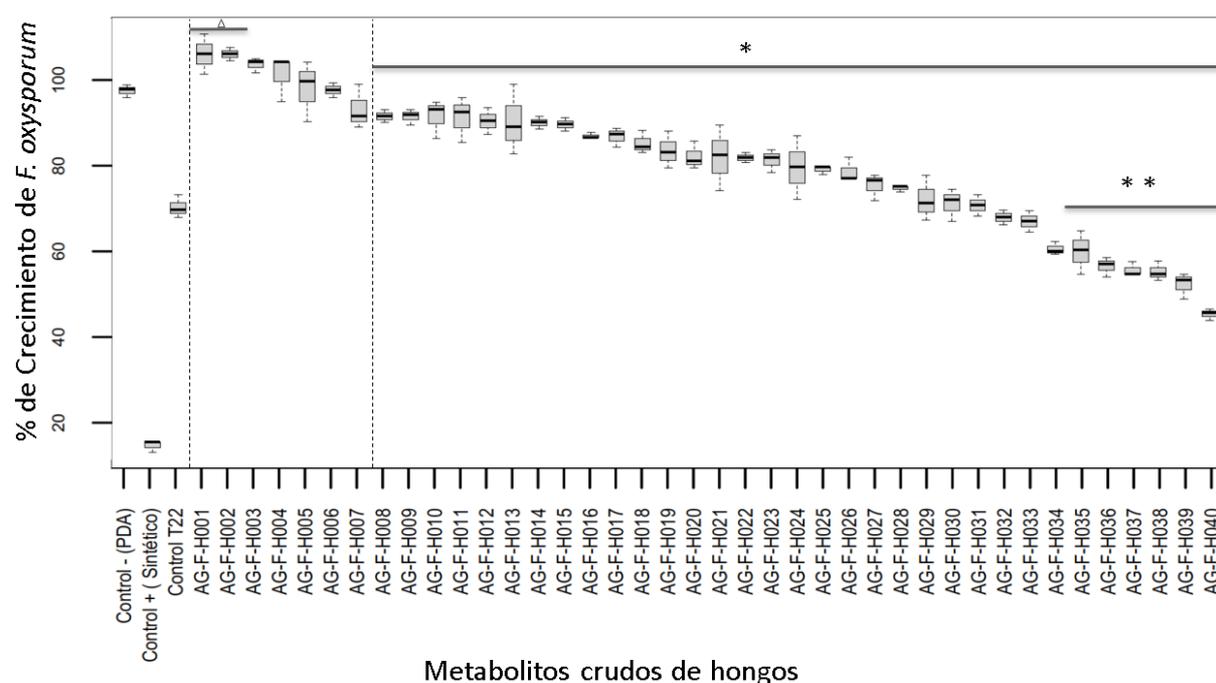


Figura 5 Evaluación de crecimiento de *F. oxysporum* (%) en medio PDA con metabolitos de los 40 hongos aislados. * Diferencia significativa con efecto inhibitorio respecto al Control – (PDA), ** Diferencia significativa con efecto inhibitorio respecto a Control T22, Δ Diferencia significativa con efecto de estimulación de crecimiento respecto al Control – (PDA). (Dunnet $p < 0.05$), realizando tres repeticiones de cada metabolito crudo.

En la Figura 5, se puede observar que, los metabolitos crudos obtenidos de 33 hongos aislados, tuvieron un efecto inhibitorio significativo contra *F. oxysporum* cuando se lo comparó contra el Control – (PDA). observando un rango de % de crecimiento entre 45% y 91%. Por otra parte, con referencia al Control – (C) (control sintético), ninguno de los metabolitos crudos tuvo un efecto inhibitorio semejante. Adicionalmente, con referencia al Control T22, se observó que los metabolitos crudos de 6 hongos tuvieron diferencia significativa, observando un rango de crecimiento entre 45% al 60%, siendo el metabolito crudo del hongo AG-F-H040, el cual tuvo diferencia significativa con un % de crecimiento del fitopatógeno del 45% (efecto inhibitorio 55%). Finalmente, también se puede observar que existen metabolitos crudos que ayudaron a estimular el crecimiento de *F. oxysporum* hasta un 7% más que el Control –(PDA) (AG-F-H001 (107.49 %), AG-F-H002 (107,49%), AG-F-H003 (104,94%), AG-F-H003(102,49%)

Caracterización morfológica y molecular del hongo aislado que produjo metabolitos crudos con mejor efecto inhibitorio contra *F. oxysporum*.

En la Figura 6, se describe al aislado AG-F-H040 que fue el que tuvo mejor efecto inhibitorio contra el fitopatógeno *F. oxysporum*. Este aislado es un hongo filamentoso, con formación de conidióforos primarios y conidias.

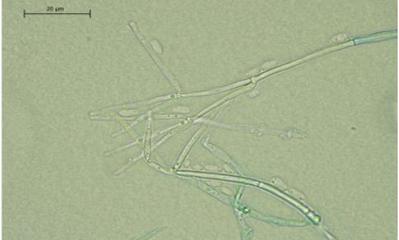
Código	Macroscopía		Microscopía
	Lado de arriba	Lado de abajo	
AG-F-H040	 <p>Micelio blanco con formación de estructuras circulares tomas, textura parecida al terciopelo.</p>	 <p>Color claro de micelio en medio V8.</p>	 <p>Presencia de hifas septadas, conidióforos primarios o verticilados, presenta 3 fiálides (n=17) de $29,06 \pm 4,99$ μm de largo y $2,40 \pm 0,3$ μm de ancho y conidias (n=60) de $7,6 \pm 0,93$ μm de largo y $3,26 \pm 0,44$ μm de ancho.</p>

Figura 6 Caracterización morfológica del hongo AG-F-H040 que tuvo el mayor porcentaje inhibitorio contra *F. oxysporum*.

El micelio tiene una forma aterciopelada de color blanco cuando se hace crecimiento en medio V8. La estructura microscopía es característica del género *Clonostachys*. Además, se detalla los promedios de las medidas de largo y ancho de las fiálides y conidias.

Se caracterizó al hongo AG-F-H040 como puede verse en la

Código	Nombre científico	Región	Longitud de la secuencia	Cobertura	Valor E	% de Identidad	Genbank Número de acceso
AG-F-H040	<i>Clonostachys rosea</i>	ITS	591 bp	97%	0.0	99.83%	EU326187.1

Tabla 2, donde se detalla los resultados de caracterización molecular.

Código	Nombre científico	Región	Longitud de la secuencia	Cobertura	Valor E	% de Identidad	Genbank Número de acceso
AG-F-H040	<i>Clonostachys rosea</i>	ITS	591 bp	97%	0.0	99.83%	EU326187.1

Tabla 2 Detalle de caracterización molecular del hongo aislado AG-F-H040.

Dilución mínima inhibitoria de metabolitos crudos del hongo aislado AG-F-H040 contra *F. oxysporum*.

Adicional, también se realizó ensayos para encontrar la dilución mínima inhibitoria de los metabolitos crudos del hongo aislado AG-H-040 contra el fitopatógeno *F. oxysporum*, lo cual se puede ver en la Figura 7.

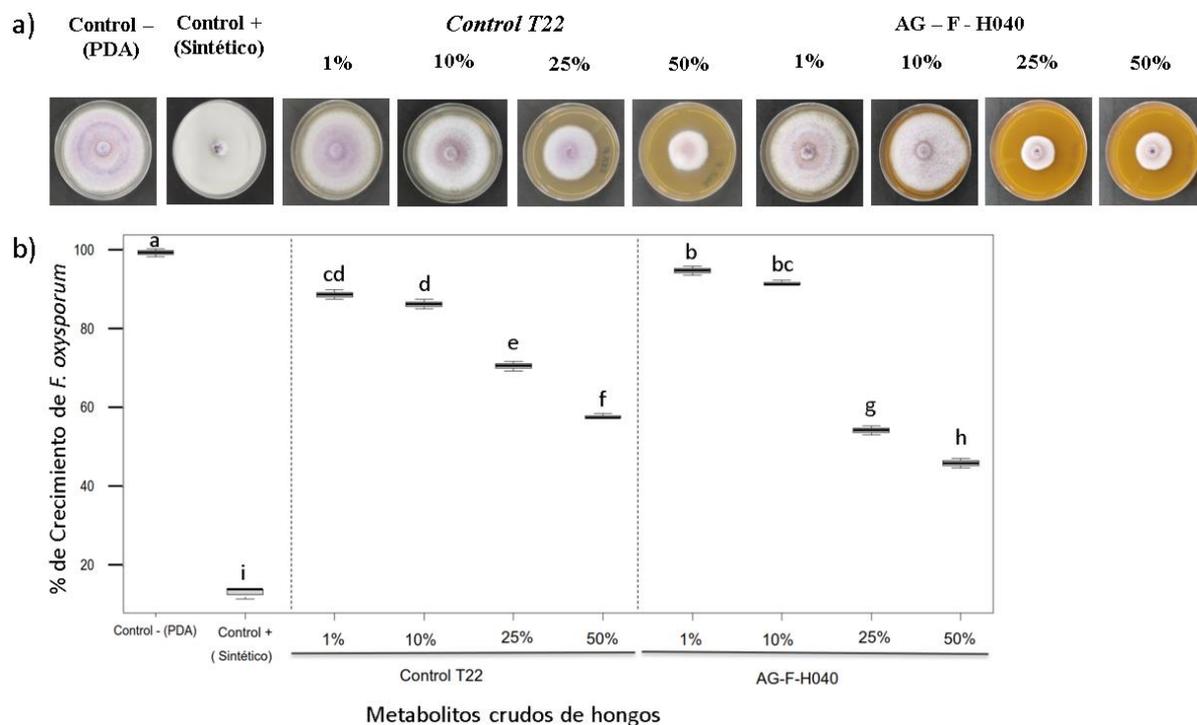


Figura 7 Dilución mínima inhibitoria de metabolitos crudos del hongo aislado AG-F-H040 contra *F. oxysporum*. a) Imágenes del ensayo de dilución mínima inhibitoria, contrastando el Control - PDA, Control (Sintético), Control T22 en el rango de dilución de 1% a 50% y los

metabolitos crudos de AG-F-H040. b) Evaluación de crecimiento de *F. oxysporum* (%) en medio PDA con metabolitos crudos de Control T22 y AG-F-H040 a 0,1,10,25 y 50%, las letras sobre las cajas indican la diferencia estadística (Tuckey $p < 0.05$).

Cualitativamente, se puede observar en la Figura 7a, que si hay diferencias en el crecimiento de *F. oxysporum* en el Control – PDA con relación a las diluciones probadas tanto del Control T22 como de los metabolitos crudos de AG-F-H040, sin embargo, la mayor diferencia se observa en las diluciones de 25 % y 50% de ambos hongos (Control T22 y AG-F-H040). Si se analiza los resultados obtenidos mediante estadística en la Figura 7b, se observa que todas las diluciones de metabolitos crudos tanto de Control T22 como AG-F-H040 son significativamente diferentes, donde se puede observar que los metabolitos crudos de Control T22 y AG-F-H040 tienen efecto inhibitorio desde la dilución del 1%, con un crecimiento de 94,49% y 88,44% respectivamente. También, se analizaron las otras diluciones de los metabolitos crudos de Control T22 y AG-F-H040; en la dilución del 10% con un crecimiento de 86,06% y 91,33% respectivamente, en la dilución del 25% con un crecimiento de 70,51% y 54,33% respectivamente y en la dilución del 50% con un crecimiento de 57,77% y 46,06% respectivamente siendo que los metabolitos crudos de AG-F-H040 tienen mayor efecto inhibitorio que el Control T22 a 1, 25 y 50%.

Ensayos con el fitopatógeno *Botrytis cinerea*

Evaluación de actividad antifúngica de metabolitos crudos de los 40 hongos aislados en contra de *B. cinerea*.

Los metabolitos crudos de los 40 hongos aislados también se probaron contra *B. cinerea* y pueden verse los resultados en la Figura 8.

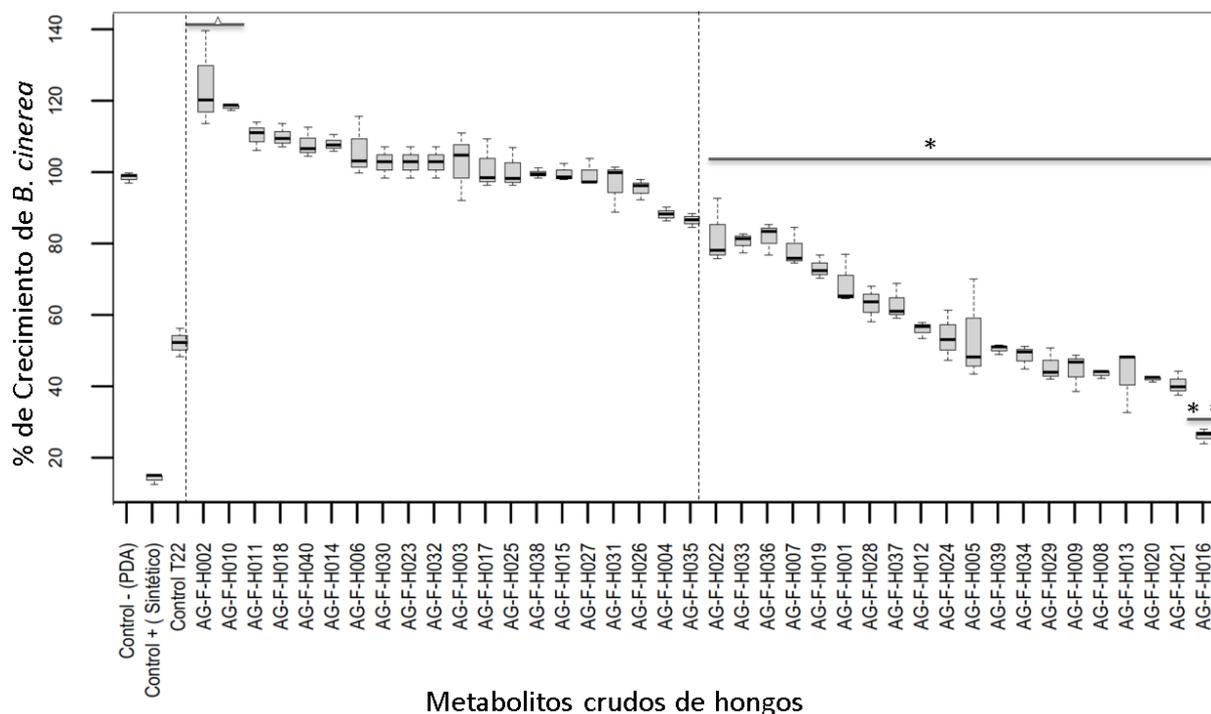


Figura 8 Evaluación de crecimiento de *B. cinerea* (%) en medio PDA con metabolitos crudos de los 40 hongos aislados. * Diferencia significativa con efecto inhibitorio respecto al Control – (PDA), ** Diferencia significativa con efecto inhibitorio respecto a Control T22, Δ Diferencia significativa con efecto de estimulación de crecimiento respecto al Control – (PDA) (Dunnet ($p < 0.05$)), realizando tres repeticiones de cada metabolito crudo.

En la Figura 8 se puede ver que, los metabolitos crudos de 20 hongos aislados tuvieron efecto inhibitorio con respecto al Control – (PDA), con una variación de porcentaje de crecimiento desde 25 al 78%. Por otra parte, con respecto al Control – (C), ninguno tuvo mejor efecto inhibitorio. Adicionalmente, con respecto al Control T22 sólo 1 metabolito crudo (AG-F-H016) tuvo diferencia significativa, con un % de crecimiento del fitopatógeno del 25% (efecto inhibitorio 75%). Finalmente, también se puede observar que existen metabolitos crudos que ayudaron a estimular el crecimiento de *B. cinerea* hasta un 24% más que el Control –(PDA) (AG-F-H002 (124,82%), AG-F-H010 (118,52%).

Caracterización morfológica y molecular del hongo que produjo metabolitos crudos con mejor efecto inhibitorio contra *B. cinerea*.

En la Figura 9, se describe al aislado AG-F-H016 que fue el que tuvo mejor efecto inhibitorio contra el fitopatógeno *B. cinerea*. Este aislado es un hongo polvoso, esporulante.

Código	Macroscopia		Microscopia
	Lado de arriba	Lado de abajo	
AG-F-H016	 Textura arenosa, polvoso de color café claro.	 Color café oscuro de micelio en medio V8.	 Se aprecian conidias sin color, vesícula, médula de color café, así como el estípote. El estípote (n=19) de 428, 59 ± 105 um de largo y 8,48 ± 0,66 um de ancho, vesícula (n=30) de 37,88 ± 5,68 um de diámetro, médula (n=1) de 10,50 um de largo x 5,37 um de ancho y las conidias (n=30) de 2,49 x 2,49 ± 0,21 um.

Figura 9 Caracterización morfológica del hongo AG-F-H016 tuvo el mayor porcentaje inhibitorio contra *B. cinerea*,

En la Figura 9, se puede ver el aislado AG-F-H016 con crecimiento polvoso, amarillo en medio V8 y en la microscopía se observan las estructuras características del género *Aspergillus*, donde se pueden ver como vesículas y esporas circulares, estípote y las médulas. Además, se detalla los promedios de las medidas de largo y ancho de cada estructura.

En la

Código	Nombre científico	Región	Longitud de la secuencia	Cobertura	Valor E	% de Identidad	Genbank Número de accesoión
AG-F-H016	<i>Aspergillus ochraceopetaliformis</i>	ITS	606bp	99%	0.0	100%	MH857406.1

Tabla 3, se detalla la caracterización molecular del aislado AG-F-H016.

Código	Nombre científico	Región	Longitud de la secuencia	Cobertura	Valor E	% de Identidad	Genbank Número de acceso
AG-F-H016	<i>Aspergillus ochraceopetaliformis</i>	ITS	606bp	99%	0.0	100%	MH857406.1

Tabla 3 Detalle de caracterización molecular del hongo aislado AG-F-H016.

Dilución mínima inhibitoria de metabolitos crudos del hongo aislado AG-F-H016 contra *B. cinerea*.

Adicional se realizó ensayos para encontrar la dilución mínima inhibitoria de los metabolitos crudos del hongo aislado AG-F-H016 contra el fitopatógeno *B. cinerea* lo cual se puede observar en la Figura 10.

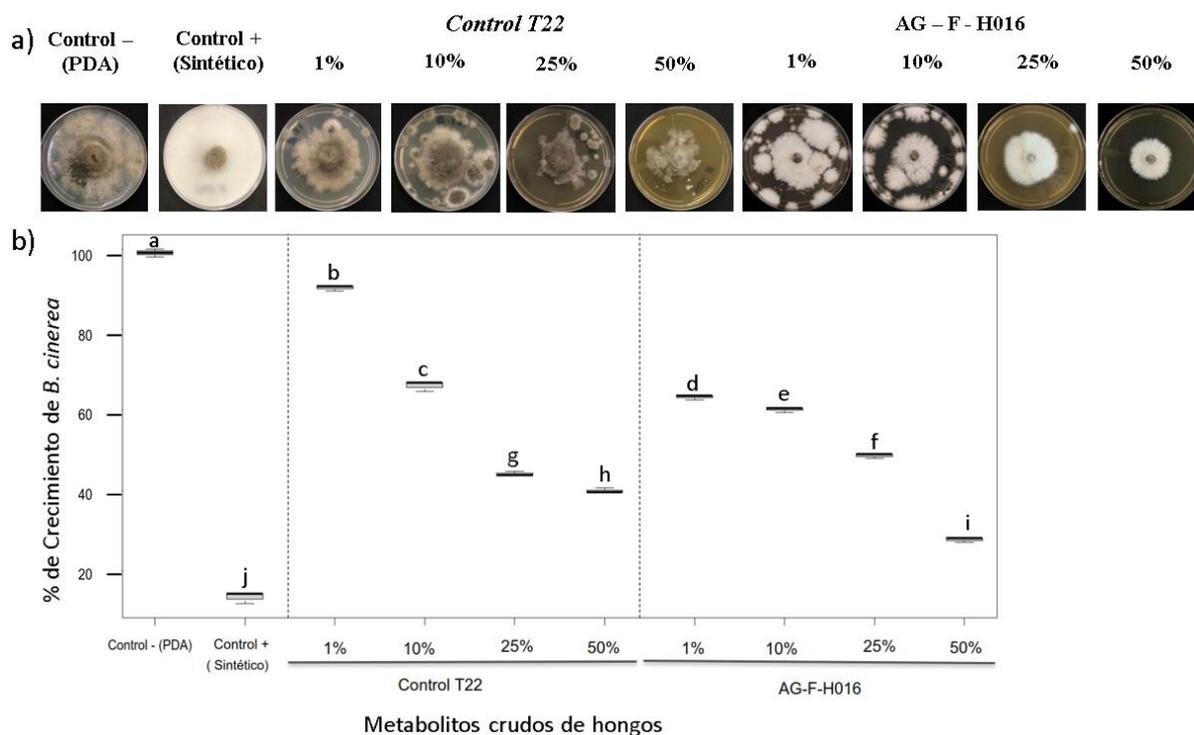


Figura 10 Dilución mínima inhibitoria de metabolitos crudos del hongo aislado AG-F-H016 contra *B. cinerea*. a) Imágenes del ensayo de dilución mínima inhibitoria, contrastando el Control - PDA, Control (Sintético), Control T22 en el rango de dilución de 1% a 50% y los metabolitos crudos de AG-F-H016. b) Evaluación de crecimiento de *B. cinerea* (%) en medio PDA con metabolitos crudos de Control T22 y AG-F-H016 a 0,1,10,25 y 50%, las letras sobre las cajas indican la diferencia estadística (Tuckey $p < 0.05$).

Cualitativamente, se puede observar en la Figura 10a, que si hay diferencias en el crecimiento de *B. cinerea* en el Control – PDA con relación a las diluciones probadas, sin embargo, la mayor diferencia se observa en las diluciones de 25 % y 50% tanto para el Control T22 y los metabolitos crudos del aislado AG-F-H016. Si se analiza los resultados obtenidos mediante estadística en la Figura 10b, se observa que todas las diluciones de metabolitos crudos tanto de Control T22 como AG-F-H016 son significativamente diferentes. Sin embargo, el efecto inhibitorio de los metabolitos es mayor al 50%, tanto para el Control T22 y AG-F-H016. La dilución mínima inhibitoria es del 1% para el Control T22 y AG-F-H016, con un porcentaje de crecimiento de 87,20% y 61,03% respectivamente. Se analizan el % de crecimiento en las otras diluciones de los metabolitos crudos de Control T22 y AG-F-H040 en la dilución del 10% con un crecimiento de 64,13% y 58,21% respectivamente, en la dilución del 25% con un crecimiento de 42,4% y 47,12% respectivamente y en la dilución del 50% con un crecimiento de 38,26% y 27,09% respectivamente siendo que los metabolitos crudos de AG-F-H040 tiene mayor efecto inhibitorio que el Control T22 a 1,10, 50%.

Ensayos con el fitopatógeno *Alternaria alternata*

Evaluación de actividad antifúngica de metabolitos crudos de los 40 hongos aislados en contra de *A. alternata*.

En vista de la importancia del fitopatógeno *A. alternata* al igual que los otros dos fitopatógenos probados, también se evaluó el efecto inhibitorio de los metabolitos crudos de los 40 hongos aislados contra *A. alternata* en la Figura 11.

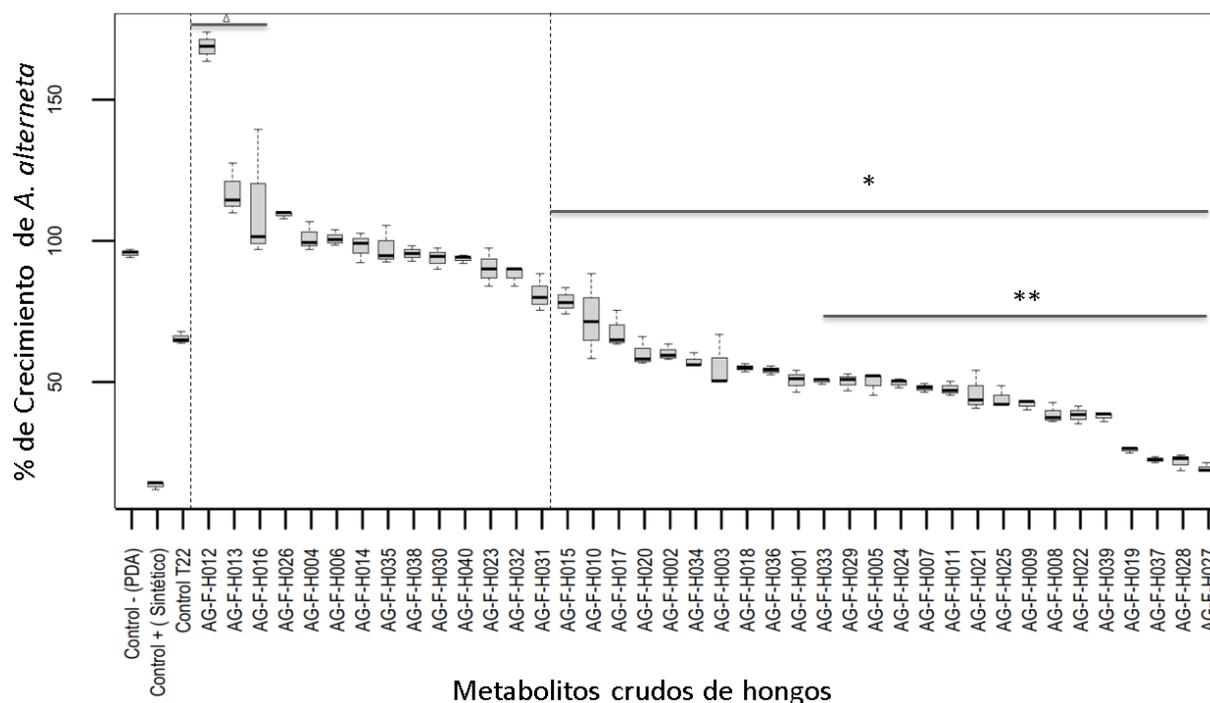


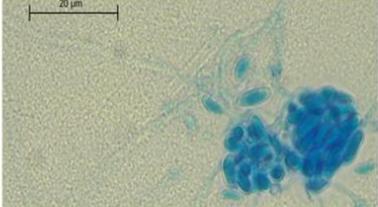
Figura 11 Evaluación de crecimiento de *A. alternata* (%) en medio PDA con metabolitos crudos de los 40 hongos aislados. * Diferencia significativa con efecto inhibitorio respecto al Control – (PDA), ** Diferencia significativa con efecto inhibitorio respecto a Control T22, Δ Diferencia significativa con efecto de estimulación de crecimiento respecto al Control – (PDA) (Dunnet ($p < 0.05$), realizando tres repeticiones de cada metabolito crudo).

En la Figura 11, se observa que, los metabolitos crudos de 26 hongos aislados tienen un efecto inhibitorio con respecto al Control – (PDA), teniendo un rango de porcentaje de crecimiento del 19 al 81%. Por otra parte, ninguno de los metabolitos crudos tuvo diferencia significativa con respecto a Control – (C). Adicionalmente, los metabolitos crudos de 20 hongos aislados presentan diferencia significativa con respecto al Control T22, con un rango de % de crecimiento entre 19% y 81%. De estos 20 metabolitos crudos, 4 metabolitos, que pertenecen a los hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028, AG-F-H027, causan un % de inhibición de 73,35, 77,12, 77,78 y 80,19% respectivamente. Finalmente, en estos ensayos también existieron metabolitos crudos que estimulan el crecimiento de *A. alternata* hasta un 74% más que el Control –(PDA) (AG-F-H012 (174,55%), AG-F-H013 (121,21), AG-F-H016 (116,28))

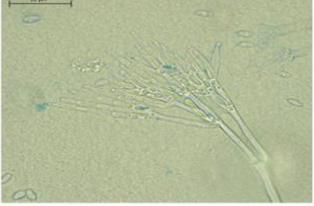
Caracterización morfológica y molecular de los hongos que produjeron metabolitos crudos con mejor efecto inhibitorio contra *A.alternata*

La caracterización de los 4 hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037 AG-F-H028 y AG-F-H027, que tuvieron el mayor efecto inhibitorio contra el fitopatógeno *A. alternata* están organizados en los literales a – d, respectivamente en la Figura 12.

a)

Código	Macroscopia		Microscopia
	Lado de arriba	Lado de abajo	
AG-F-H019	 <p>Micelio blanco, textura parecida al terciopelo.</p>	 <p>Color claro de micelio en medio V8.</p>	 <p>Presencia de hifas y formaciones circulares acumuladas. También se encontró conidióforos secundarios o peniciliados con fiáldes (n=10) de $12,05 \pm 3,67$ um de largo y $2,40 \pm 0,3$ um (n=10) de ancho y conidias (n=60) de $4,93 \pm 0,53$ um de largo y $2,68 \pm 0,43$ um.</p>

b)

Código	Macroscopia		Microscopia
	Lado de arriba	Lado de abajo	
AG-F-H037	 <p>Micelio blanco, textura parecida al terciopelo.</p>	 <p>Color claro de micelio en medio V8.</p>	 <p>Presencia de hifas, con conidióforos peniciliados con fiáldes (n=11) de $12,71 \pm 4,25$ um de largo y $2,56 \pm 0,35$ um de ancho y conidias (n=60) de $5,01 \pm 0,40$ um de largo y $2,65 \pm 0,15$ um.</p>

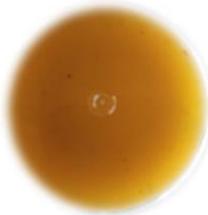
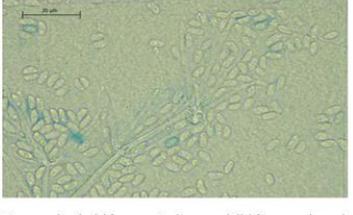
c)	Código	Macroscopía		Microscopía
		Lado de arriba	Lado de abajo	
	AG-F-H028	 Micelio blanco, textura parecida al terciopelo.	 Color claro de micelio en medio V8.	 Presencia de hifas septadas, con conidióforos primarios o verticilados con fiálides (n=12) de $28,42 \pm 6,22$ um de largo y $2,44 \pm 0,29$ um de ancho y conidias (n=60) de $7,51 \pm 0,65$ um de largo y $3,27 \pm 0,41$ um.
	AG-F-H027	 Micelio amarillo.	 Color claro de micelio en medio V8.	 Presencia de hifas septadas, conidióforos primarios y conidióforos secundarios. Las medidas fueron tomadas de fiálides peniciliadas (n=52) de $13,77 \pm 5,02$ um de largo y $2,61 \pm 0,45$ um de ancho y conidias (n=60) de $5,79 \pm 0,52$ um de largo y $2,77 \pm 0,33$ um.

Figura 12 Caracterización morfológica de los hongos (AG-F-H019, AG-F-H037 AG-F-H028 y AG-F-H027) que tuvieron el mayor porcentaje inhibitorio contra *A. alternata*.

Los hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037 AG-F-H028 y AG-F-H027, pertenecen al género *Clonostachys*, sin embargo, se puede ver en macroscopía, diferencias en el color de micelio, en la textura, así como en las microscopías pueden verse estructuras diferentes. En la Figura 9, se puede apreciar que los cuatro hongos aislados de *A. alternata* son hongos filamentosos, con formación de conidióforos primarios y secundarios, presencia de conidias ovaladas, fiálides.

En la

Código	Nombre científico	Región	Longitud de la secuencia	Cobertura	Valor E	% de Identidad	Genbank Número de acceso
AG-F-H019	<i>Clonostachys rosea</i>	ITS	578bp	99%	0.0	100%	EU326187.1
AG-F-H027	<i>Clonostachys rosea</i>	ITS	459bp	100%	0.0	100%	MH259861.1
		ACT	276bp	99%	7e-134	98,91%	MH102067.1
AG-F-H028	<i>Clonostachys rosea</i>	ITS	598bp	99%	0.0	99.66%	EU326187.1
AG-F-H037	<i>Clonostachys rosea</i>	ITS	587bp	99%	0.0	99.83%	KY977607.1
		ACT	271bp	100%	1e-131	98,89%	MH102067.1

Tabla 4, se detalla la caracterización molecular de los hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037 AG-F-H028 y AG-F-H027.

Código	Nombre científico	Región	Longitud de la secuencia	Cobertura	Valor E	% de Identidad	Genbank Número de acceso
AG-F-H019	<i>Clonostachys rosea</i>	ITS	578bp	99%	0.0	100%	EU326187.1
AG-F-H027	<i>Clonostachys rosea</i>	ITS	459bp	100%	0.0	100%	MH259861.1
		ACT	276bp	99%	7e-134	98,91%	MH102067.1
AG-F-H028	<i>Clonostachys rosea</i>	ITS	598bp	99%	0.0	99.66%	EU326187.1
AG-F-H037	<i>Clonostachys rosea</i>	ITS	587bp	99%	0.0	99.83%	KY977607.1
		ACT	271bp	100%	1e-131	98,89%	MH102067.1

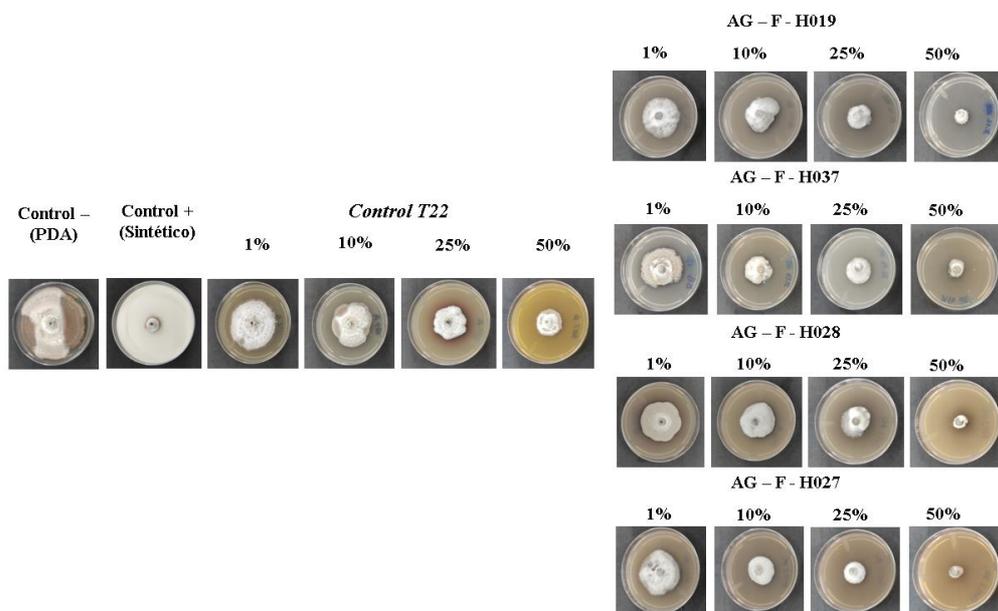
Tabla 4 Detalle de caracterización molecular de los hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037 AG-F-H028 y AG-F-H027

La longitud de ITS y ACT varía entre hongos aislados. El porcentaje de identidad mas bajo es de 98.89 % del marcador de actina para el código AG-F-H037.

Dilución mínima inhibitoria de los metabolitos crudos de los hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037 AG-F-H028 y AG-F-H027 contra *A. alternata*.

Adicional, se realizó ensayos para encontrar la dilución mínima inhibitoria de los metabolitos crudos de los hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037 AG-F-H028 y AG-F-H027 que tuvieron mejor efecto inhibitorio contra el fitopatógeno *A. alternata*.

a)



b)

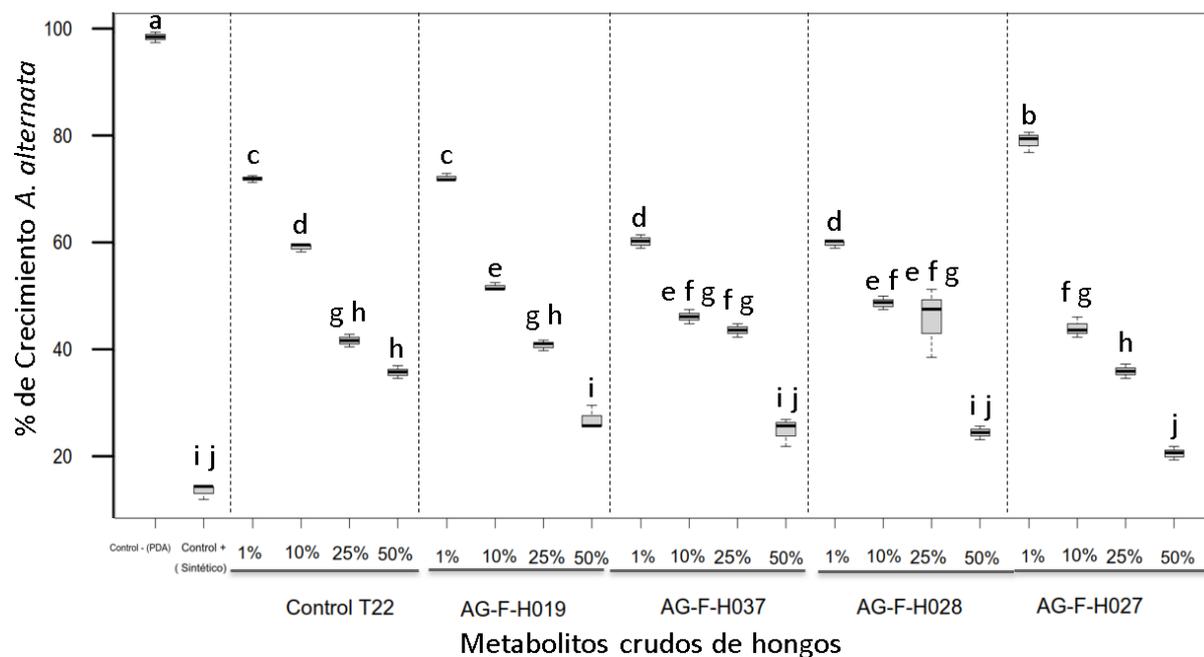


Figura 13 Dilución mínima inhibitoria de metabolitos crudos de los hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028, AG-F-H027 contra *A. alternata*. a) Imágenes del ensayo de dilución mínima inhibitoria, contrastando el Control - PDA, Control (Sintético), Control T22 en el rango de dilución de 1% a 50% y los metabolitos crudos de AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028, AG-F-H027. b) Evaluación de crecimiento de *A. alternata* (%) en medio PDA con metabolitos crudos de Control T22, AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028 y AG-F-H027 a 0,1,10,25 y 50%, las letras sobre las cajas indican la diferencia estadística (Tuckey $p < 0.05$). Cualitativamente, se puede observar en la Figura 13a, que si hay diferencias en el crecimiento de *A. alternata* en el Control - PDA con relación a las diluciones probadas, sin embargo, la mayor diferencia se observa en las diluciones de 25 % y 50% tanto para el Control T22 y los metabolitos crudos de los hongos aislados AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028, AG-F-H027. Si se analizan los resultados obtenidos mediante estadística en la Figura 13b, se observa que todas las diluciones de metabolitos crudos tanto de Control T22 como AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028, AG-F-H027 son significativamente diferentes. La dilución

mínima inhibitoria es del 1% para el Control T22, AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028 y AG-F-H027, con un porcentaje de crecimiento de 72,31, 72,53%, 60,52 %, 60,08 y 79,39% respectivamente. También, se analizaron el % de crecimiento en las otras diluciones de los metabolitos crudos de Control T22, AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028 y AG-F-H027, en la dilución del 10% con un crecimiento de 59,36, 51,93, 46,35, 48,92 y 44,20% respectivamente, en la dilución del 25% con un crecimiento de 41,83, 40,98, 43,78, 45,92 y 36,05% respectivamente, en la dilución del 50%, con un crecimiento de 35,85, 27,04, 24,89, 24,46 y 20,61% respectivamente. En el 50% de dilución el efecto inhibitorio de los metabolitos crudos de AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028 y AG-F-H027 es mayor que el Control T22.

Resumen de los resultados de pruebas inhibitorias contra los tres fitopatógenos

Por otra parte, se hizo un heatmap (Figura 14), donde se resume el grado de diferencia significativa del efecto de los metabolitos crudos de los 40 hongos aislados, donde las columnas representan a los fitopatógenos *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *A. alternata* y las filas a los metabolitos crudos evaluados. El color rojo (-4) representa la mayor diferencia significativa con respuesta inhibitoria al fitopatógeno, el color verde (3) representa un efecto de estimulación del crecimiento. Los códigos de los hongos que produjeron los metabolitos crudos, están diferenciados por color de acuerdo al género que pertenecen, siendo: azul para *Clonostachys*, gris para *Fusarium*, naranja para *Lasioidiploidia*, morado para *Aspergillus*, rosado para *Penicillium*, verde para *Graphium* y negro para los hongos no identificados.

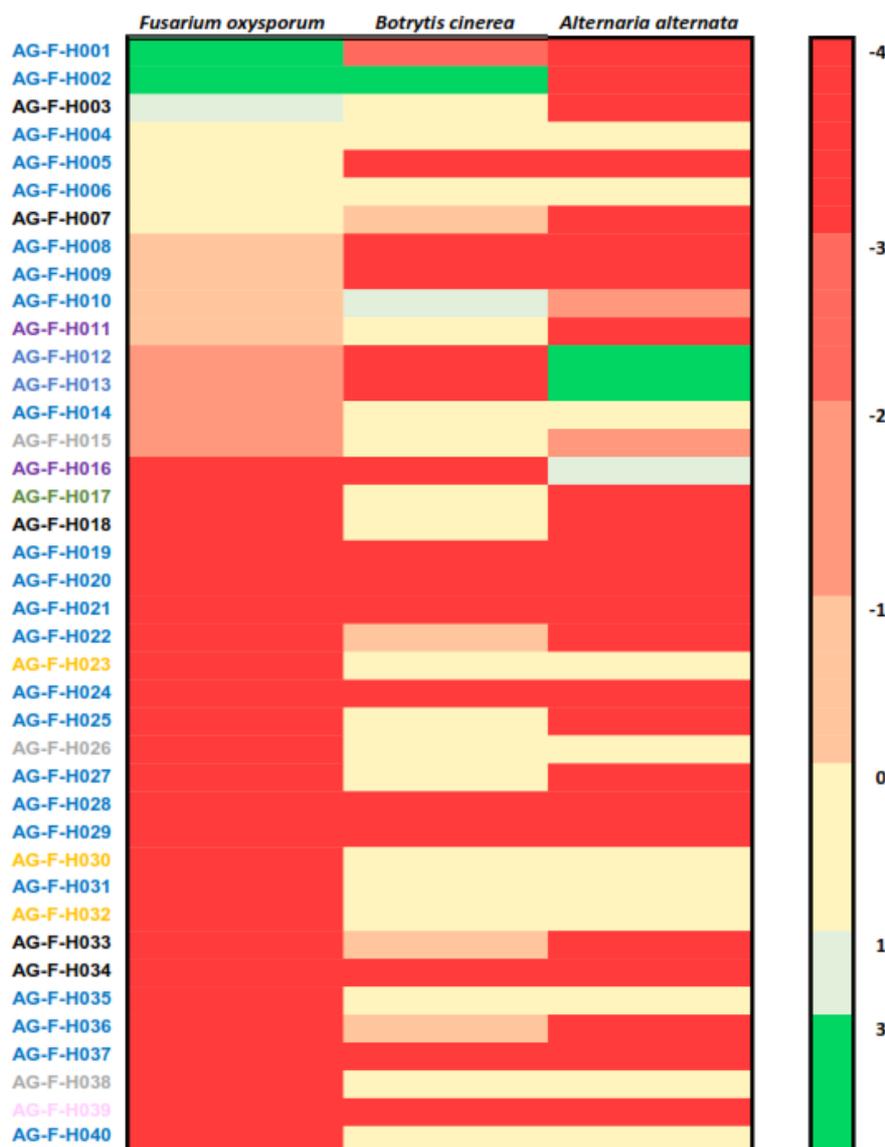


Figura 14 Heatmap de la diferencia significativa de crecimiento de los tres fitopatógenos en medio PDA con los metabolitos de los 40 hongos aislados de la colección de la isla San Cristóbal (Galápagos).

Gráfico generado en Graphpad prism.

Como puede verse en la Figura 14, el efecto fungicida de cada metabolito es diferente frente a los tres fitopatógenos, de acuerdo a las diferencias significativas con respecto al Control –

(PDA). Hay metabolitos crudos de hongos que tienen efecto inhibitorio con diferencia significativa de -4 para los tres fitopatógenos como el código AG-F-H021, AG-F-024, AG-F-029, AG-F-034, AG-F-037. Hay candidatos que tienen efecto inhibitorio solo para un fitopatógeno como el código AG-F-H040 contra *F. oxysporum*. También, se encontró hongos aislados como AG-F-H016 que tiene efecto inhibitorio contra *B.cinerea* y efecto de estimulación de crecimiento para *A. alternata*. Si se observa el efecto de los metabolitos crudos de los cuatro hongos aislados con mejor efecto inhibitorio de *A. alternata* (AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028, AG-F-H027), se puede ver que los metabolitos crudos del aislado AG-F-H027 no tuvieron diferencia significativa para *B. cinerea*, mientras que los metabolitos crudos de los tres hongos aislados restantes tuvieron efecto inhibitorio de -4 para *F. oxysporum*, sin embargo no son los mejor para este fitopatógeno.

Ensayos preliminares para estandarizar protocolo de extracción y caracterización química de metabolitos secundarios de Control T22

Se hizo la extracción química de los metabolitos secundarios producidos por Control T22 usando solventes como metanol, acetato de etilo y hexano. Se probó la actividad antifúngica de cada fracción extraída de los metabolitos crudos de Control T22 con los diferentes solventes contra *F. oxysporum*.

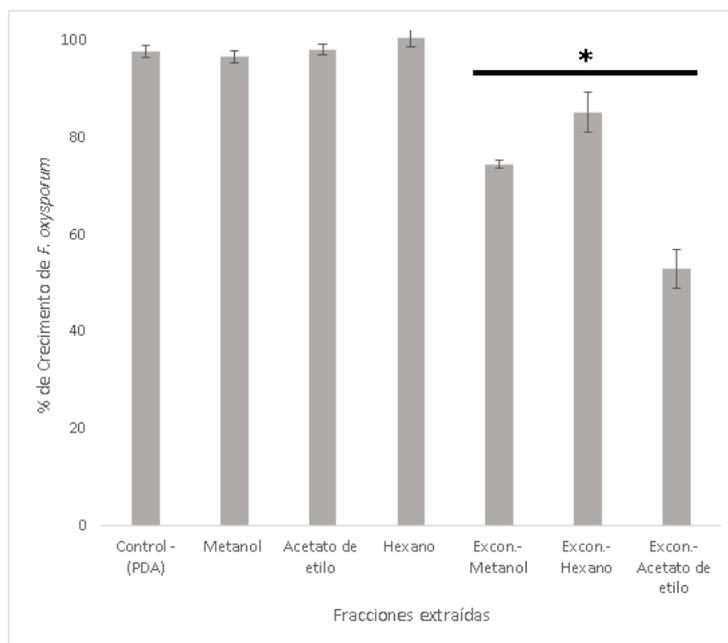


Figura 15 Evaluación de la bioactividad de las fracciones extraídas de Control T22

En la Figura 15, se puede apreciar que los controles de metanol, hexano y acetato de etilo no tienen efecto inhibitorio, indicando que los solventes no influyen en el crecimiento del fitopatógeno. Por otra parte, todas las fracciones concentradas de metabolito de Control T22 tuvieron diferencia significativa con respecto al Control PDA. Al probarse el extracto obtenido con metanol (Excon-Metanol), este tuvo un % de crecimiento de fitopatógeno de 75%. Esto quiere decir que sí se logró extraer metabolitos crudos con actividad antifúngica con metanol. Posteriormente, al hacer la separación bifásica del extracto concentrado con metanol, se obtuvo que el extracto concentrado de hexano (Excon-Hexano) causó un 88,77% en porcentaje de crecimiento de fitopatógeno, mientras que el extracto concentrado con acetato de etilo (Excon-Acetato de etilo) tuvo un 56,12% en porcentaje de crecimiento, indicando que hay moléculas con efecto inhibitorio que fueron extraídas con hexano, pero en su mayoría extraídas con acetato de etilo.

En la Figura 16 se observan las TLC en donde se probó en una mezcla de solventes: hexano : acetato de etilo (HEX:EA – 4:1), hexano : acetato de etilo (HEX:EA – 1:1), acetato de etilo puro, acetato de etilo : metanol (EA:MeOH – 4:1) y , acetato de etilo : metanol (EA:MeOH – 1:1) con las fracciones concentradas Excon- metanol que se le denominará M, Excon – hexano que se le denominará H y Excon – acetato de etilo que se le denominará A.

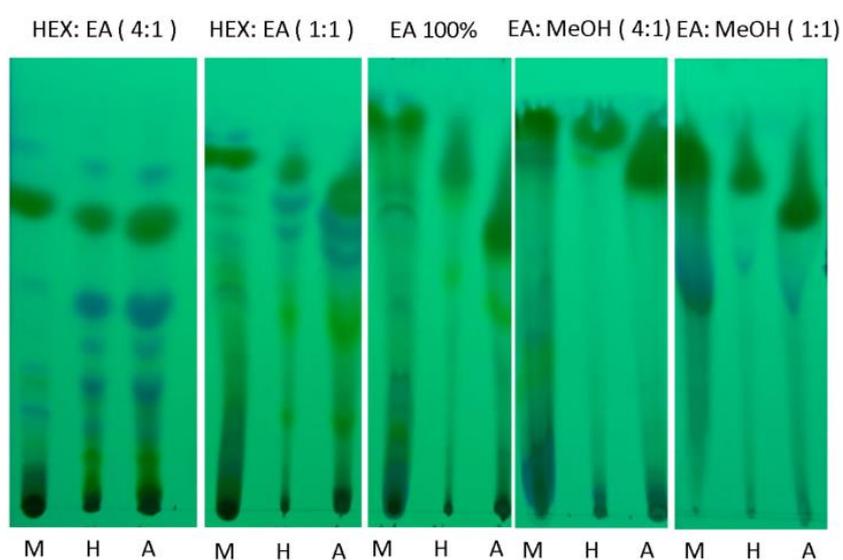


Figura 16 TLC de las fracciones concentrada de metanol, hexano y acetato de etilo probando combinaciones distintas de hexano con acetato de etilo y metanol.

Se puede ver en la Figura 16, que en la mezcla de hexano y acetato de etilo (HEX:EA 4:1) hay una mejor separación de las moléculas, sin embargo, se ve que las moléculas se repiten en el extracto con metanol (M), con hexano (H) y con acetato de etilo (A), indicando que aún hay moléculas en el extracto de hexano, que también están en el extracto de acetato de etilo. También, puede verse la presencia de moléculas polares y no polares.

DISCUSIÓN

Los resultados encontrados de la Figura 1 se pueden comparar con otras investigaciones, en donde se encontró que el crecimiento de los hongos es fuertemente dependiente de los recursos disponibles del sustrato (Lakhdari et al., 2023). Aunque el PDA es el medio convencional para cultivo de hongos, al tener una colección antigua y que requería de más nutrientes disponibles, se buscó una mejor opción, usando así el medio V8 y el medio avena. En otro estudio, se encontró que el jugo V8 por sus fuentes de glucosa junto con el carbonato de calcio eran fuertes factores que influenciaban el crecimiento de más micelio de hongos biotróficos (Chaliha et al., 2020). El uso de medio avena, se dio porque en una investigación previa se indicó que los cereales son muy susceptibles a enfermedades de hongos (Kahla et al., 2023), lo que indicaría que los recursos que ofrece la avena o los cereales son apetecibles para los hongos, por ello en los resultados de esta investigación también el medio avena resultó un buen candidato para la recuperación de hongos. Una vez que se recuperaron los hongos, se hizo caracterización microscópica y macroscópica, debido a que, en la investigación de Barriga (2020), se indicó haber encontrado hongos filamentosos, esporulantes, entre otros, mostrando diversidad. Los géneros encontrados encontrados en esta investigación fueron: *Clonostachys*, *Fusarium*, *Lasioidiploidia*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Graphium* que se pueden ver en la Figura 3 y detallados en la Tabla 1. El género de *Closnostachys* se describe como hongos saprofiticos, filamentosos que pueden tener estructuras como conidios o clamidosporas, dependiendo del pH del medio en el que crecen con conidióforos verticilliados o penicilliados. Se encuentran predominantemente en América del Sur y se han encontrado en hojas, raíces, suelos (Sun et al., 2020). La investigación antes mencionada apoya el hecho de haber encontrado varios hongos de género *Clonastachys* y que fueron aislados de hojas de mora infectadas. En cuanto al género *Fusarium*, son hongos filamentosos con estructuras de

hifas y conidios, encontrados en vegetales, suelos, son necrotróficos y biotróficos (Torbati et al., 2021). El género *Aspergillus* puede ser reconocido fácilmente en microscopia por sus esporas circulares y las vesículas, además es un género presente en cultivos agrícolas, en ambientes marinos, se adapta fácilmente a los cambios bruscos de pH y adicionalmente se lo hace responsable de la pudrición de fruta (Saif et al., 2021). El género *Penicillium* también se lo encuentra en fruta y su morfología consiste en esporas ovaladas (Saif et al., 2020). Tanto *Graphium* y *Lasidioploida*, son géneros encontrados en enfermedades en cultivos de frutas tropicales (Zakaria, 2022). *Graphium* es un género de hongo filamentoso, su estructura se caracteriza por sinemas oscuros produciendo conidios unicelulares, similares a tronchos de árbol (El Feghaly et al., 2012). El género *Lasiodiplodia* tiene especies consideradas como fitopatógenas de cultivos, ya que su crecimiento es rápido, es filamentoso, en un inicio crece blanco o gris y luego se torna negro, en microscopia se ve que tiene hifas septadas y esporas en forma de elipse segmentadas en la mitad (Huda-Shakirah et al., 2022). La variedad de morfologías de los géneros mencionados se puede observar en la Figura 2 y Figura 3.

Para la búsqueda de alternativas biológicas antifúngicas, se debía comparar con los controles biológicos ya existentes como *T. harzianum*, para poder observar la efectividad de los metabolitos crudos de los hongos aislados contra los fitopatógenos.

Varios estudios han demostrado la capacidad antifúngica de *T. harzianum* contra *Fusarium* sp. (Lakhdari et al., 2023), por lo que ver efecto inhibitorio de la cepa Control T22 contra *F. oxysporum*, es un resultado apoyado por hallazgos anteriores. Por otra parte, en la Figura 4d, puede verse el aumento de biomasa hasta la cuarta semana. Ya se había encontrado que el tiempo de cultivo es un factor importante para el desarrollo de conidios de *Trichoderma* (Mulatu et al., 2021), por lo que tiene sentido que con el avance del tiempo haya mayor producción de biomasa. En el mismo estudio de Lakhdari et al del 2023 indican que el

máximo crecimiento de *Trichoderma* fue hasta los 28 días, lo que sugeriría que la disminución de biomasa se debe a que el hongo alcanzó su máximo crecimiento y al tener limitados nutrientes empezó a morir, por ello a las ocho semanas la biomasa disminuye. En la Figura 4c, se aprecia cambios de pH, primero hay una disminución y luego aumento del mismo. El método de cultivo en este caso fue en medio líquido con acceso limitado de oxígeno, lo que indicaría un proceso de fermentación por ello el cambio de pH puede ser debido a la posible producción de ácidos orgánicos (Rumidatul et al., 2020), que hace que el microambiente formado genere estrés en el hongo y produzca los metabolitos secundarios. Al probar los 40 hongos aislados contra los 3 fitopatógenos, resultados que pueden verse en las Figura 5, Figura 8, Figura 11 y Anexo A, se encontraron distintas respuestas inhibitorias, donde la especie *Clostridium rosea* produjo metabolitos crudos que inhiben a *F. oxysporum* y *A. alternata*, incluso a diluciones mínimas inhibitorias de 1% de metabolitos crudos como puede verse en la Figura 7 y Figura 13. *C. rosea* pertenece al filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, clase *Sordariomycetes*, subclase *Hypocreomycetidae*, orden *Hypocreales* (Sun et al., 2020).

Según Karlsson et al. (2015), en el género *Clonostachys* hay especies que pueden micoparasitar, usar la biomasa de los hongos muertos y ejercer efecto antagónico contra hongos por medio de secreción de enzimas y metabolitos crudos como peptabois, gliotoxinas, viridinas, y también pueden promover el crecimiento de plantas o inducir resistencia. Dentro de este género está la especie *C. rosea*, la cual se puede encontrar en el suelo, fresas, rosas, hojas y flores, como principales fuentes (Sun et al., 2020).

En el Anexo C, se detalla los metabolitos secundarios de *C. rosea* y su actividad, donde 10 de ellos tiene actividad contra hongos, respaldando el hecho de que se haya encontrado metabolitos crudos, producidos por *C.rosea* que tengan un efecto inhibitorio contra hongos,

además comparando con los metabolitos secundarios de Control T22, comparten familias de metabolitos secundarios como alcaloides y ácidos grasos (Guo et al., 2022).

Por otro lado, se ha visto que existen cepas de *C. rosea*, que presentan diferentes morfologías entre ellas como verticiliada o peniciliada. Sin embargo, comparando las medidas de microscopía de *C. rosea* encontradas en la investigación de Schroers et al. (1999), con las medidas de los hongos aislados AG-F-H040, AG-F-H019, AG-F-H037, AG-F-H028, AG-F-H027, se encontró que las medidas se encuentran dentro del rango. La variedad de morfologías que pueden verse en las Figura 6 y Figura 12, podría atribuirse al estrés de los microambientes que se generan en las cajas de cultivo, como exceso de CO₂, exceso de luz, factores externos como cambios de temperatura que obliguen a los hongos a adaptarse en ambientes hostiles, estos factores externos envían señales que serían recibidas por la maquinaria morfológica del hongo y se traduciría en cambios morfológicos que pueden apreciarse en la microscopía (Lin et al., 2015).

La variedad de estas morfologías no es atribuida al cambio de pH, puesto que todos los hongos aislados se mantuvieron en medio V8, pero se sugiere que el cambio de morfologías y pigmentaciones puede ser atribuida a la presencia de micovirus como sucede en el estudio de Jiang et al. (2019), donde la presencia de micovirus afectaban la esporulación y desarrollaban morfologías anormales, además de efectos como hipovirulencia (Jiang et al., 2019), indicando que la presencia de micovirus pudo afectar las morfologías de los hongos aislados y el efecto inhibitorio.

En la Figura 14 y Anexo B puede verse en resumen los géneros y como cambia el efecto inhibitorio con relación al fitopatógeno, donde se explica la distribución de géneros de acuerdo a la diferencia significativa y al fitopatógeno. La diferencia de efecto inhibitorio entre géneros podría explicarse por el mecanismo de defensa de los tres fitopatógenos, por los

metabolitos secundarios diversos de los hongos. En otras investigaciones se ha encontrado efectos antifúngicos diferentes dependiendo del hongo productor del metabolito y del fitopatógeno y de la cepa (Kamat et al., 2020). Por lo que los resultados encontrados indican que cada género, especie de hongo puede producir metabolitos secundarios con diferentes frentes de ataque para los fitopatógenos y los convierte en un atractivo versátil por que los hace a algunos específicos y a otros generalistas como puede verse en la Figura 14.

Varias investigaciones sustentan a *C. rosea* como un biocontrolador porque libera enzimas degradadoras de pared celular (quitinasas, glucanasas, proteasas), antibióticos, toxinas. *C. rosea* cuenta con β -1,3-glucanasa que destruye la pared celular de los hongos; tiene serinas proteasas que degradan la cutícula del nemátodo, entre los metabolitos secundarios se menciona los peptaibióticos que presentan efecto antifúngico y también glistopreninas politerpenoides que actúan contra la formación del apresorio de hongos fitopatógenos (Karlsson et al., 2015). Incluso hay ensayos en los que *C. rosea* ha tenido éxito en contra de *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Botrytis* sp (Sun et al., 2020). *C. rosea* hablando en términos moleculares contiene policetido sintasas, transportadoras de casets de unión ATP, involucrados en la producción de metabolitos y protección contra xenobióticos como medicamentos, lo que permitiría el uso de *C. rosea* en cultivos agrícolas junto con pesticidas (Karlsson et al., 2015).

Por otra parte, la especie *Aspergillus ochraceopetaliformis* produjo metabolitos crudos que inhiben a *B. cinerea*, también a diluciones mínimas inhibitorias de 1% de metabolitos crudos como puede verse en la Figura 10.

Esta especie pertenece al género *Aspergillus* el cual se ha caracterizado por tener especies productoras de metabolitos secundarios bioactivos, como alcaloides, terpenoides, esteroides que han presentado actividad antibacteriana (Hu et al., 2020), pero de los metabolitos

secundarios encontrados en este género, el 8% corresponde a metabolitos con potencial antifúngico (Hagag et al., 2022). En el género *Aspergillus* se han encontrado metabolitos prometedores que tiene efecto antifúngico, contra *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Botrytis sp.*, *Colletotrichum sp.*, entre otros (X.-J. Li et al., 2012). En el caso de la especie *Aspergillus ochraceopetaliformis*, se sabe que usualmente se encuentra en restos marinos. Se comparó con las medidas de las estructuras de *Aspergillus ochraceopetaliformis* con las encontradas en la investigación de Visagie et al. (2014), encontrándose que las medidas están dentro del rango. No es una especie común que se encuentra fácilmente, por lo que, los metabolitos secundarios no se han investigado ampliamente, sin embargo, en el Anexo C, se detalla algunos de los metabolitos secundarios encontrados de esta especie, donde dos de ellos han presentado actividad antifúngica. Los metabolitos de esta especie han sido evaluados en pruebas antiinflamatorias, antibacteriales y antifúngicas, contra patógenos de seres humanos como *C. albicans*, *C. tropicalis*, teniendo efecto inhibitorio contra éstos (Asmaey et al., 2021).

Luego de obtener los resultados del potencial antifúngico de los metabolitos crudos de los hongos aislados y tener la identificación de los hongos aislados con mejor efecto inhibitorio, el siguiente paso es conocer cuáles son las moléculas protagonistas del efecto antifúngico. Sin embargo, en esta investigación, se llegó a ensayos preliminares para estandarizar el protocolo de extracción para caracterizar de forma química a los metabolitos crudos de el hongo Control T22.

El método utilizado de fermentación en sólido, en este caso arroz, favoreció la producción de metabolitos con actividad fungicida, donde, en otro estudio se indica que al usar arroz se busca imitar el medio natural en el que la *Trichoderma* crece, esporula y produce metabolitos de interés (Mulatu et al., 2021). Al usar el arroz se obtuvo un mejor rendimiento de

producción de metabolitos y de los metabolitos con potencial fungicida que se requería. La importancia de usar el arroz es que brinda componentes de carbono como almidones, celulosa, hemicelulosa, nitrógeno, que ayudan a un mejor crecimiento de *Trichoderma*. Una vez que se obtuvo en medio sólido una producción masiva de metabolitos secundarios, éstos se extrajeron con metanol, hexano y acetato de etilo. Se pudo notar que el metanol pudo extraer los compuestos con actividad, pero cuando se utilizó la separación bifásica con hexano y acetato de etilo, la fracción que tuvo más eficiencia fue la de acetato de etilo como se puede ver en la Figura 15. En otras investigaciones ya se había encontrado la fracción de acetato de etilo como la más eficiente, probando extractos de Control T22 contra *F. oxysporum* (Kumar et al., 2021). Por otra parte, se usó metanol para extraer los componentes extracelulares y una separación bifásica con hexano y acetato de etilo con la finalidad de ir separando las moléculas no polares y polares, comprobando en la TLC las moléculas obtenidas en cada fracción. La secuencia de las mezclas indica una dirección de polaridad baja a alta polaridad, el objetivo de hacer esta combinación es ir separando la mezcla de compuestos activos en función a la polaridad, para posteriormente separarlos en la columna de cromatografía y poder evaluar la fracción más activa (Kumar et al., 2021). Se puede ver en la TLC de la Figura 16 una separación de componentes, en los tres extractos, pero también se observó que hay moléculas que parecen compartirse en las dos fracciones de hexano y acetato de etilo. Según las pruebas de inhibición y las investigaciones encontradas, esto se debe a que pueden ser diferentes metabolitos secundarios extraídos por cada solvente o la dilución de los compuestos activos podría variar (Kumar et al., 2021). En el protocolo de caracterización aún falta fraccionar los compuestos, para encontrar las moléculas responsables del principio activo con potencial fungicida.

CONCLUSIONES

Se recuperaron 40 hongos aislados de la colección de la isla San Cristóbal (Galápagos), donde el medio de cultivo V8 fue el medio con mayor porcentaje de recuperación.

En los 40 hongos aislados se encontraron, de acuerdo a la identificación microscópica, los siguientes géneros: *Clonostachys*, *Lasiodiplodia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Graphium*.

Las condiciones de tiempo de fermentación y dilución de metabolitos crudos se optimizaron evaluando los metabolitos crudos de Control T22 contra *F. oxysporum*, obteniendo condiciones óptimas a cuatro semanas y 50% de dilución de metabolitos crudos.

Hubo variación en el pH y biomasa conforme avanzaba el tiempo de fermentación, en el caso del pH aumentó a lo largo de las ocho semanas, mientras que la biomasa aumentó las cuatro primeras semanas, pero a partir de la cuarta semana disminuyó.

Los hongos aislados, que produjeron metabolitos crudos contra *F. oxysporum* y *A. alternata* fueron identificados como *Clonostachys rosea* y el aislado que produjo metabolitos contra *B. cinerea* fue identificado *Aspergillus ochraceopetaliformis*.

El protocolo para extraer los metabolitos de Control T22 para una futura caracterización química fue darle a la cepa un crecimiento en arroz y extracción con metanol y separación bifásica con hexano y acetato de etilo, resultando la fracción con mayor bioactividad la del acetato de etilo, sin embargo, en las TLC no se ve un fraccionamiento eficiente de las moléculas.

REFERENCIAS

- Ahluwalia, V., Kumar, J., Rana, V. S., Sati, O. P., & Walia, S. (2015). Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity. *Natural Product Research*, 29(10), 914–920. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.958739>
- Ahluwalia, V., Walia, S., Sati, O. P., Kumar, J., Kundu, A., Shankar, J., & Paul, Y. S. (2014). Isolation, characterisation of major secondary metabolites of the Himalayan *Trichoderma koningii* and their antifungal activity. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 47(9), 1063–1071. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.829715>
- Angel, L. P. L., Yusof, M. T., Ismail, I. S., Ping, B. T. Y., Mohamed Azni, I. N. A., Kamarudin, N. H., & Sundram, S. (2016). An in vitro study of the antifungal activity of *Trichoderma virens* 7b and a profile of its non-polar antifungal components released against *Ganoderma boninense*. *Journal of Microbiology*, 54(11), 732–744. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6304-4>
- Arzanlou, M., Kema, G. H. J., Waalwijk, C., Carlier, J., De Vries, I., Guzmán, M., Vargas, M. A., Helder, J., & Crous, P. W. (2009). *Molecular Diagnostics in the Mycosphaerella Leaf Spot Disease Complex of Banana and for Radopholus similis*.
- Asmaey, M. A., Abatis, D., Abdel-Razek, A. S., Lambrinidis, G., Chinou, I., Fokialakis, N., Tsafantakis, N., Shaaban, M., & Aligiannis, N. (2021). Ochraceopyronide, a Rare α -Pyrone-C-lyxofuranoside from a Soil-Derived Fungus *Aspergillus ochraceopetaliformis*. *Molecules*, 26(13), 3976. <https://doi.org/10.3390/molecules26133976>
- Baazeem, A., Almanea, A., Manikandan, P., Alorabi, M., Vijayaraghavan, P., & Abdel-Hadi, A. (2021). In Vitro Antibacterial, Antifungal, Nematocidal and Growth Promoting Activities of *Trichoderma hamatum* FB10 and Its Secondary Metabolites. *Journal of Fungi*, 7(5), 331. <https://doi.org/10.3390/jof7050331>
- Chaliha, C., Kalita, E., & Verma, P. K. (2020). Optimizing In vitro Culture Conditions for the Biotrophic Fungi *Exobasidium vexans* Through Response Surface Methodology. *Indian Journal of Microbiology*, 60(2), 167–174. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00846-6>
- Durán-Lara, E. F., Valderrama, A., & Marican, A. (2020). Natural Organic Compounds for Application in Organic Farming. *Agriculture*, 10(2), 41. <https://doi.org/10.3390/agriculture10020041>
- El Feghaly, R. E., Sutton, D. A., Thompson, E. H., Fu, J., Wickes, B. L., Al-Zubeidi, D., Storch, G. A., & Burnham, C.-A. D. (2012). *Graphium basitruncatum* fungemia in an immunosuppressed child post stem-cell transplantation. *Medical Mycology Case Reports*, 1(1), 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2012.05.003>
- Erazo Sandoval, N. S., Echeverría Guadalupe, M. M., Jave Nakayo, J. L., León Reyes, H. A., Lindao Córdova, V. A., Manzano Ocaña, J. C., & Inca Chunata, N. M. (2020). Effect of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) and *Trichoderma harzianum* (Rifai) on *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 42, e47522. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v42i1.47522>
- Ghisalberti, E. L., & Rowland, C. Y. (1993). Antifungal Metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 56(10), 1799–1804. <https://doi.org/10.1021/np50100a020>

- Gladieux, P., Feurtey, A., Hood, M. E., Snirc, A., Clavel, J., Dutech, C., Roy, M., & Giraud, T. (2016). THE POPULATION BIOLOGY OF FUNGAL INVASIONS. In *Invasion Genetics* (pp. 81–100). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119072799.ch5>
- Guo, R., Li, G., Zhang, Z., & Peng, X. (2022). Structures and Biological Activities of Secondary Metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Marine Drugs*, 20(11), 701. <https://doi.org/10.3390/md20110701>
- Hadi, M., Arab Sorkhi, M. R., Kashefi, B., Sobhanipur, A., & Shamsi, M. H. (2013). Investigation antifungal activity of some medicinal plant extracts on growth and spore germination of *Penicillium digitatum* Sacc. In vitro. *Middle East Journal of Scientific Research*, 17(12), 1701–1708. <https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2013.17.12.1250>
- Hagag, A., Abdelwahab, M. F., Abd El-kader, A. M., & Fouad, M. A. (2022). The endophytic *Aspergillus* strains: A bountiful source of natural products. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 132, Issue 6, pp. 4150–4169). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jam.15489>
- Hosseyeni-Moghaddam, M. S., & Soltani, J. (2014). Bioactivity of endophytic *Trichoderma* fungal species from the plant family Cupressaceae. *Annals of Microbiology*, 64(2), 753–761. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0710-1>
- Huda-Shakirah, A. R., Mohamed Nor, N. M. I., Zakaria, L., Leong, Y.-H., & Mohd, M. H. (2022). *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. *Scientific Reports*, 12(1), 8966. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13057-9>
- Hu, H.-C., Li, C.-Y., Tsai, Y.-H., Yang, D.-Y., Wu, Y.-C., Hwang, T.-L., Chen, S.-L., Fülöp, F., Hunyadi, A., Yen, C.-H., Cheng, Y.-B., & Chang, F.-R. (2020). Secondary Metabolites and Bioactivities of *Aspergillus ochraceopetaliformis* Isolated from *Anthurium brownii*. *ACS Omega*, 5(33), 20991–20999. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02489>
- Jangir, M., Pathak, R., Sharma, S., & Sharma, S. (2018). Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biological Control*, 123, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.018>
- Jeerapong, C., Phupong, W., Bangrak, P., Intana, W., & Tuchinda, P. (2015). Trichoharzianol, a New Antifungal from *Trichoderma harzianum* F031. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(14), 3704–3708. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01258>
- Jiang, Y., Wang, J., Yang, B., Wang, Q., Zhou, J., & Yu, W. (2019). Molecular Characterization of a Debilitation-Associated Partitivirus Infecting the Pathogenic Fungus *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00626>
- Kahla, A., Verhecke-Vaessen, C., Delpino-Deelias, M., Gutierrez-Pozo, M., Medina, A., Magan, N., & Doohan, F. (2023). Acclimatisation of *Fusarium langsethiae*, *F. poae* and *F. sporotrichioides* to elevated CO₂: Impact on fungal growth and mycotoxin production on oat-based media. *International Journal of Food Microbiology*, 394, 110176. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110176>
- Kamat, S., Kumari, M., Taritla, S., & Jayabaskaran, C. (2020). Endophytic Fungi of Marine Alga From Konkan Coast, India—A Rich Source of Bioactive Material. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00031>
- Karlsson, M., Durling, M. B., Choi, J., Kosawang, C., Lackner, G., Tzelepis, G. D., Nygren, K., Dubey, M. K., Kamou, N., Levasseur, A., Zapparata, A., Wang, J., Amby, D. B., Jensen, B., Sarrocco, S., Panteris, E., Lagopodi, A. L., Pöggeler, S., Vannacci, G., ...

- Jensen, D. F. (2015). Insights on the Evolution of Mycoparasitism from the Genome of *Clonostachys rosea*. *Genome Biology and Evolution*, 7(2), 465–480. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu292>
- Khan, I. H., & Javaid, A. (2020). In vitro biocontrol potential of *Trichoderma pseudokoningii* against *Macrophomina phaseolina*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 24(4), 730–736. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1494>
- Khan, R. A. A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., & Xie, B. (2020). Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Bacteria and Root-Knot Nematode. *Microorganisms*, 8(3), 401. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030401>
- Kumar, R., Kundu, A., Dutta, A., Saha, S., Das, A., & Bhowmik, A. (2021). Chemo-profiling of bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* for biocontrol of Sclerotinia rot and plant growth promotion. *Fungal Biology*, 125(3), 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.07.009>
- Lakhdari, W., Benyahia, I., Bouhenna, M. M., Bendif, H., Khelafi, H., Bachir, H., Ladjal, A., Hammi, H., Mouhoubi, D., Khelil, H., Alomar, T. S., AlMasoud, N., Boufafa, N., Boufahja, F., & Dehliz, A. (2023). Exploration and Evaluation of Secondary Metabolites from *Trichoderma harzianum*: GC-MS Analysis, Phytochemical Profiling, Antifungal and Antioxidant Activity Assessment. *Molecules*, 28(13), 5025. <https://doi.org/10.3390/molecules28135025>
- Li, L., Liu, Q., Xue, H., Bi, Y., Raza, H., Zhang, R., Carelle, J. K., Peng, H., Long, H., & Prusky, D. (2022). Acetylsalicylic acid (ASA) suppressed Fusarium rot development and neosolaniol (NEO) accumulation by activating phenylpropane metabolism in muskmelon fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 163(3), 625–639. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02502-0>
- Lin, X., Alspaugh, J. A., Liu, H., & Harris, S. (2015). Fungal Morphogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(2), a019679–a019679. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019679>
- Liu, S.-Y., Lo, C.-T., Shibu, M. A., Leu, Y.-L., Jen, B.-Y., & Peng, K.-C. (2009). Study on the Anthraquinones Separated from the Cultivation of *Trichoderma harzianum* Strain Th-R16 and Their Biological Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7288–7292. <https://doi.org/10.1021/jf901405c>
- Li, X.-J., Zhang, Q., Zhang, A.-L., & Gao, J.-M. (2012). Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an Endophytic Fungus Associated with *Melia azedarach*, and Their Antifungal, Antifeedant, and Toxic Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(13), 3424–3431. <https://doi.org/10.1021/jf300146n>
- Mohamad, O. A. A., Li, L., Ma, J.-B., Hatab, S., Xu, L., Guo, J.-W., Rasulov, B. A., Liu, Y.-H., Hedlund, B. P., & Li, W.-J. (2018). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Endophytic Bacterial Populations From Chinese Traditional Medicinal Plant Licorice and Characterization of the Bioactive Secondary Metabolites Produced by *Bacillus atrophaeus* Against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00924>
- Monteiro, V. N., do Nascimento Silva, R., Steindorff, A. S., Costa, F. T., Noronha, E. F., Ricart, C. A. O., de Sousa, M. V., Vainstein, M. H., & Ulhoa, C. J. (2010). New Insights in *Trichoderma harzianum* Antagonism of Fungal Plant Pathogens by Secreted Protein Analysis. *Current Microbiology*, 61(4), 298–305. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9611-8>

- Mulatu, A., Alemu, T., Megersa, N., & Vetukuri, R. R. (2021). Optimization of Culture Conditions and Production of Bio-Fungicides from *Trichoderma* Species under Solid-State Fermentation Using Mathematical Modeling. *Microorganisms*, *9*(8), 1675. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081675>
- Nitish Rattan Bhardwaj, & J. Kumar. (2017). Characterization of volatile secondary metabolites from *Trichoderma asperellum*. *Journal of Applied and Natural Science*, *9*, 954–959.
- Patkowska, E., Mielniczuk, E., Jamiołkowska, A., Skwaryło-Bednarz, B., & Błażewicz-Woźniak, M. (2020). The Influence of *Trichoderma harzianum* Rifai T-22 and Other Biostimulants on Rhizosphere Beneficial Microorganisms of Carrot. *Agronomy*, *10*(11), 1637. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111637>
- Pourakbar, L., Moghaddam, S. S., Enshasy, H. A. El, & Sayyed, R. Z. (2021). Antifungal Activity of the Extract of a Macroalgae, *Gracilariopsis persica*, against Four Plant Pathogenic Fungi. *Plants*, *10*(9), 1781. <https://doi.org/10.3390/plants10091781>
- Prado, J. J., Viceministro De Comercio, L.-P., Legarda, D., Lima, C. V., Bayas, E., Iza, C., & Robayo, M. (2023). *Informe Mensual*. www.produccion.gob.ec
- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., & Cammue, B. P. A. (2020). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. *Biological Control*, *144*, 104240. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240>
- Reghmit, A., Benzina-tihar, F., López Escudero, F. J., Halouane-Sahir, F., Oukali, Z., Bensmail, S., & Ghozali, N. (2021). *Trichoderma* spp. isolates from the rhizosphere of healthy olive trees in northern Algeria and their biocontrol potentials against the olive wilt pathogen, *Verticillium dahliae*. *Organic Agriculture*, *11*(4), 639–657. <https://doi.org/10.1007/s13165-021-00371-1>
- Ristaino, J. B., Anderson, P. K., Bebbler, D. P., Brauman, K. A., Cunniffe, N. J., Fedoroff, N. V., Finegold, C., Garrett, K. A., Gilligan, C. A., Jones, C. M., Martin, M. D., MacDonald, G. K., Neenan, P., Records, A., Schmale, D. G., Tateosian, L., & Wei, Q. (2021). The persistent threat of emerging plant disease pandemics to global food security. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(23). <https://doi.org/10.1073/pnas.2022239118>
- Rumidatul, A., Rahmawati, N., & Sunarya, S. (2020). Production of Secondary Metabolites and its Antibacterial and Antioxidant Activity During the Growth Period of Endophytic Fungi Isolated from Gall Rust Sengon Plants. *Pharmacognosy Journal*, *13*(2), 325–331. <https://doi.org/10.5530/pj.2021.13.42>
- Saif, F. A., Yaseen, S. A., Alameen, A. S., Mane, S. B., & Undre, P. B. (2020). Identification of *Penicillium* Species of Fruits Using Morphology and Spectroscopic Methods. *Journal of Physics: Conference Series*, *1644*(1), 012019. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1644/1/012019>
- Saif, F. A., Yaseen, S. A., Alameen, A. S., Mane, S. B., & Undre, P. B. (2021). Identification and characterization of *Aspergillus* species of fruit rot fungi using microscopy, FT-IR, Raman and UV–Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *246*, 119010. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119010>
- Sanae, H., Sylvie, R., Christophe, G., Sylvie, D., & Bernard, B. (1995). Trichorzins HA and MA, Antibiotic Peptides from *Trichoderma harzianum*. II. Sequence Determination. *The Journal of Antibiotics*, *48*(11), 1254–1261. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.1254>
- Sangeetha, C., & Krishnamoorthy, A. (2021). Production of Volatile Organic Compounds of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on Coinoculation with the Metabolites of

- Chaetomium globosum. *Madras Agricultural Journal*, 108, 1–4.
<https://doi.org/10.29321/MAJ.10.000508>
- Stracquadiano, C., Quiles, J. M., Meca, G., & Cacciola, S. O. (2020). Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in Liquid Medium. *Journal of Fungi*, 6(4), 263. <https://doi.org/10.3390/jof6040263>
- Sun, Z.-B., Li, S.-D., Ren, Q., Xu, J.-L., Lu, X., & Sun, M.-H. (2020). Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of Applied Microbiology*, 129(3), 486–495. <https://doi.org/10.1111/jam.14625>
- Torbati, M., Arzanlou, M., & da Silva Santos, A. C. (2021). Fungicolous *Fusarium* Species: Ecology, Diversity, Isolation, and Identification. *Current Microbiology*, 78(8), 2850–2859. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02584-9>
- van Zanten, M., Ritsema, T., Polko, J. K., Leon-Reyes, A., Voeselek, L. A. C. J., Millenaar, F. F., Pieterse, C. M. J., & Peeters, A. J. M. (2012). Modulation of ethylene- and heat-controlled hyponastic leaf movement in *Arabidopsis thaliana* by the plant defence hormones jasmonate and salicylate. *Planta*, 235(4), 677–685. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1528-3>
- Vielba-Fernández, A., Polonio, Á., Ruiz-Jiménez, L., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2020). Fungicide Resistance in Powdery Mildew Fungi. *Microorganisms*, 8(9), 1431. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091431>
- Vinale, F., Ghisalberti, E. L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S., & Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02599.x>
- Vitti, A., Bevilacqua, V., Logozzo, G., Bochicchio, R., Amato, M., & Nuzzaci, M. (2022). Seed Coating with *Trichoderma harzianum* T-22 of Italian Durum Wheat Increases Protection against *Fusarium culmorum*-Induced Crown Rot. *Agriculture*, 12(5), 714. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050714>
- Xu, K., Li, X.-Q., Zhao, D.-L., & Zhang, P. (2021). Antifungal Secondary Metabolites Produced by the Fungal Endophytes: Chemical Diversity and Potential Use in the Development of Biopesticides. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.689527>
- Yadav, A. N., Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Singh, B., Chauhan, V. S., Rastegari, A. A., Hesham, A. E.-L., & Gupta, V. K. (2019). Metabolic Engineering to Synthetic Biology of Secondary Metabolites Production. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 279–320). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00020-7>
- Zakaria, L. (2022). Fungal and Oomycete Diseases of Minor Tropical Fruit Crops. In *Horticulturae* (Vol. 8, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8040323>
- Zhao, D.-L., Zhang, X.-F., Huang, R.-H., Wang, D., Wang, X.-Q., Li, Y.-Q., Zheng, C.-J., Zhang, P., & Zhang, C.-S. (2020). Antifungal Nafuredin and Epithiodiketopiperazine Derivatives From the Mangrove-Derived Fungus *Trichoderma harzianum* D13. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01495>

ANEXOS

Anexo A: PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE FITOPATÓGENOS EN METABOLITOS CRUDOS

Porcentaje de crecimiento de *F. oxysporum* con los metabolitos crudos de los 40 hongos aislados.

A continuación, se detallan los promedios del porcentaje de crecimiento de *F. oxysporum* en los metabolitos crudos y la diferencia estadística expresada en letras.

Códigos	Promedio	Desviación estándar	Diferencia estadística
Control - (PDA)	98,67	1,25	ABCD
Control + (C)	13,49	1,12	S
AG-F-Thar01	70,66	2,24	K L M N
AG-F-H001	107,49	3,93	B
AG-F-H002	107,49	1,31	B
AG-F-H003	104,94	1,48	AB
AG-F-H004	102,40	4,53	ABC
AG-F-H005	99,20	5,99	ABCD
AG-F-H006	98,80	1,47	ABCD
AG-F-H007	94,22	4,37	ABCDE
AG-F-H008	92,54	1,26	BCDEF
AG-F-H009	92,46	1,48	BCDEF
AG-F-H010	92,44	3,77	BCDEF
AG-F-H011	92,22	4,48	CDEF
AG-F-H012	91,44	2,62	CDEFG
AG-F-H013	91,22	6,88	CDEFG
AG-F-H014	91,00	1,26	CDEFG
AG-F-H015	90,63	1,28	CDEFG
AG-F-H016	87,79	0,61	DEFGH
AG-F-H017	87,63	1,93	DEFGHI
AG-F-H018	86,04	2,30	EFGHI
AG-F-H019	84,32	3,65	EFGHIJ
AG-F-H020	82,89	2,73	EFGHIJK
AG-F-H021	82,73	6,40	EFGHIJK
AG-F-H022	82,63	1,04	EFGHIJK
AG-F-H023	82,04	2,24	EFGHIJK
AG-F-H024	80,25	6,24	FGHIJKL
AG-F-H025	79,65	0,82	GHIJKLM

AG-F-H026	79,31	2,44	GHIJKLM
AG-F-H027	75,90	2,60	HIJKLM
AG-F-H028	75,19	0,55	IJKLM
AG-F-H029	72,52	4,46	JKLMN
AG-F-H030	71,55	3,23	KLMN
AG-F-H031	71,19	2,08	KLMN
AG-F-H032	68,26	1,47	LMNO
AG-F-H033	67,24	2,11	MNOP
AG-F-H034	60,68	1,33	OPQ
AG-F-H035	60,08	4,28	OPQ
AG-F-H036	56,56	1,92	OPQR
AG-F-H037	55,70	1,43	PQR
AG-F-H038	55,21	1,95	PQR
AG-F-H039	52,15	2,58	QR
AG-F-H040	45,06	1,09	R

Porcentaje de crecimiento de *B. cinerea* con los metabolitos crudos de los 40 hongos aislados.

A continuación, se detallan los promedios del porcentaje de crecimiento de *B.cinerea* en los metabolitos crudos y la diferencia estadística expresada en letras.

Códigos	Promedio	Desviación estándar	Diferencia estadística
Control - (PDA)	98,67	1,25	CDEFGH
Control + (C)	21,57	1,73	S
AG-F-Thar01	51,90	3,27	NOPQ
AG-F-H002	124,82	11,17	B
AG-F-H010	118,52	0,75	B
AG-F-H011	110,58	3,26	ABC
AG-F-H018	110,22	2,73	ABC
AG-F-H040	108,05	3,42	ABC
AG-F-H014	108,21	1,92	ABC
AG-F-H006	106,35	6,86	ABCD
AG-F-H030	102,92	3,58	BCDE
AG-F-H023	102,92	3,58	BCDE
AG-F-H032	102,92	3,58	BCDE
AG-F-H003	102,65	7,92	BCDE

AG-F-H017	101,46	5,75	BCDE
AG-F-H025	100,60	4,69	BCDEF
AG-F-H038	99,77	1,15	CDEFG
AG-F-H015	99,76	2,03	CDEFG
AG-F-H027	99,56	3,14	CDEFG
AG-F-H031	96,83	5,65	CDEFGH
AG-F-H026	95,51	2,40	CDEFGHI
AG-F-H004	88,24	1,60	DEFGHJ
AG-F-H035	86,54	1,57	EFGHIJK
AG-F-H022	82,13	7,60	FGHIJK
AG-F-H033	80,44	2,27	HIJKLM
AG-F-H036	81,75	3,72	GHIJK
AG-F-H007	78,20	4,49	IJKL
AG-F-H019	72,99	2,73	KJLM
AG-F-H001	68,76	5,76	KLMN
AG-F-H028	63,03	4,13	LMNO
AG-F-H037	62,75	4,24	LMNOP
AG-F-H012	55,76	1,85	MNOPQ
AG-F-H024	53,61	5,87	NOPQ
AG-F-H005	53,54	11,73	NOPQ
AG-F-H039	50,18	1,12	OPQ
AG-F-H034	48,15	2,70	OPQ
AG-F-H029	45,15	3,76	OPQ
AG-F-H009	44,30	4,35	PQ
AG-F-H008	43,20	1,00	QR
AG-F-H013	42,69	7,41	QR
AG-F-H020	41,67	0,54	QR
AG-F-H021	40,15	2,73	QR
AG-F-H016	25,65	1,63	RS

Porcentaje de crecimiento de *A. alternata* con los metabolitos crudos de los 40 hongos aislados.

A continuación, se detallan los promedios del porcentaje de crecimiento de *A. alternata* en los metabolitos crudos y la diferencia estadística expresada en letras.

Códigos	Promedio	Desviación estándar	Diferencia estadística
Control - (PDA)	98,67	1,25	CDEF

Control + (C)	27,29	1,23	PQRS
			HIJKL
AG-F-Thar01	67,47	1,75	
AG-F-H012	174,55	4,45	A
AG-F-H013	121,21	7,73	B
AG-F-H016	116,28	19,82	B
AG-F-H026	112,88	1,07	BCD
AG-F-H004	104,37	4,31	BCDE
AG-F-H006	104,17	2,38	BCDE
AG-F-H014	101,18	4,40	BCDEF
AG-F-H035	100,76	5,97	CDEF
AG-F-H038	98,61	2,27	CDEF
AG-F-H030	96,91	3,18	CDEF
AG-F-H040	96,67	1,25	CDEF
AG-F-H023	93,30	5,69	DEFG
AG-F-H032	90,72	2,92	EFG
AG-F-H031	83,71	5,55	FGH
AG-F-H015	81,02	3,98	FGHI
AG-F-H010	74,85	12,71	GHIJ
AG-F-H017	69,95	5,53	HIJK
AG-F-H020	62,04	4,29	IJKLM
AG-F-H002	62,04	2,36	IJKLM
AG-F-H034	59,07	2,20	JKLMN
AG-F-H003	57,47	8,13	JKLMNO
AG-F-H018	56,60	1,16	JKLMNO
AG-F-H036	55,74	1,34	JKLMNO
AG-F-H001	51,91	3,37	KLMNO
AG-F-H033	51,69	0,68	KLMNO
AG-F-H029	51,65	2,65	KLMNO
AG-F-H005	51,16	3,29	KLMNO
AG-F-H024	51,09	1,39	KLMNO
AG-F-H007	49,18	1,34	LMNO
AG-F-H011	48,85	2,15	LMNO
AG-F-H021	47,35	5,98	LMNOP
AG-F-H025	45,40	3,25	MNOPQ
AG-F-H009	43,12	1,30	MNOPQR
AG-F-H008	39,62	3,06	NOPQRS
AG-F-H022	39,34	2,68	NOPQRS
AG-F-H039	38,68	1,33	OPQRS
AG-F-H019	26,65	0,88	QRS
AG-F-H037	22,88	0,88	RS
AG-F-H028	22,22	2,46	S
AG-F-H027	19,81	1,37	S

Anexo B: DISTRIBUCIÓN DE GÉNERO SEGÚN LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA

Se organizó los géneros en función del efecto de los metabolitos en función de la diferencia significativa y el fitopatógeno como puede verse en la Tabla. En las columnas se separan por diferencia significativa siendo -4 con mayor efecto inhibitorio, y el grado de diferencia va disminuyendo hasta llegar a 0, el 1 indica diferencia significativa, pero con efecto promotor de crecimiento. En cada valor se indica el número de hongos aislados que corresponden a cada género y por filas se separa por fitopatógeno.

Hongo fitopatógeno	Significancia						
	-4	-3	-2	-1	0	1	3
Fusarium							
	14 <i>Clonostachys</i>	3 <i>Clonostachys</i>		3 <i>Clonostachys</i>	3 <i>Clonostachys</i>	2 <i>Clonostachys</i>	1 No identificado
	3 No identificado	1 <i>Fusarium</i>		1 <i>Aspergillus</i>	1 No identificado		
	2 <i>Fusarium</i>						
	3 <i>Lasiodiplidia</i>						
	1 <i>Penicillium</i>						
	1 <i>Graphium</i>						
Botrytis							
	13 <i>Clonostachys</i>			2 <i>Clonostachys</i>	8 <i>Clonostachys</i>	1 <i>Clonostachys</i>	1 <i>Clonostachys</i>
	1 No identificado			2 No identificado	2 No identificado		
	1 <i>Aspergillus</i>				3 <i>Fusarium</i>		
	1 <i>Penicillium</i>				3 <i>Lasiodiplidia</i>		
					1 <i>Aspergillus</i>		
					1 <i>Graphium</i>		
Alternaria							
	16 <i>Clonosatchys</i>		1 <i>Fusarium</i>		5 <i>Clonostachys</i>	1 <i>Clonostachys</i>	2 <i>Clonostachys</i>
	5 No indentificado		1 <i>Clonostachys</i>		1 <i>Fusarium</i>	1 <i>Aspergillus</i>	
	1 <i>Aspergillus</i>				3 <i>Lasiodiploidia</i>		
	1 <i>Penicillum</i>						
	1 <i>Graphium</i>						

Distribución de géneros en función de la diferencia significativa del efecto inhibitorio de los metabolitos crudos de cada aislado.

En la tabla, se puede ver que, para los tres fitopatógenos el género *Clonostachys* predomina con metabolitos crudos con efecto inhibitorio, pero también hay varios metabolitos del mismo género que no presentan diferencia significativa en cuanto efecto inhibitorio comparado con

el Control PDA y hay uno o dos metabolitos crudos que promueven el crecimiento. Hay una variabilidad en el desempeño de los géneros *Fusarium*, *Lasioidiploidia*, *Aspergillus* y *Graphium*, indicando que el mecanismo de cada fitopatógeno es diferente. Por ejemplo, los metabolitos crudos producidos por *Graphium*, indican en *F. oxysporum* y *A. alternata* un efecto inhibitorio con diferencia significativa de -4, y en *B. cinerea* no tiene diferencia significativa. Por otro lado, los metabolitos crudos del género *Penicillium* indican efecto inhibitorio con diferencia significativa de -4 en los tres fitopatógenos.

Anexo C: BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOS HONGOS AISLADOS IDENTIFICADOS Y CONTROL T22

Búsqueda bibliográfica de metabolitos producidos por *C. rosea*

Una vez, que se identificaron los hongos aislados, se investigó en literatura los metabolitos secundarios. Se muestra los metabolitos secundarios nombrados como molécula química, bioactividad y las referencias donde se encontró esta información. En esta tabla se muestra los metabolitos secundarios producidos por *C. rosea*, según fuente bibliográficas. Aquí se puede ver que, 10 tienen actividad fungicida, lo que muestra interés para esta investigación.

Molécula bioquímica	Agrupación	Actividad	Referencia
Dihidro-3-(2H)-tiofenona	Compuestos varios	Actividad antifúngica	(Hadi et al., 2013)
a-Metilo 4-O-metil-D-manosido	Compuestos varios	Actividad antifúngica	(Monteiro et al., 2010)
1-Tetradecanamina, N, N-dimetil-	Alcaloide	Actividad antifúngica	(Jangir et al., 2018)
Ácido hexadecanoico, éster 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etílico	Ácido graso	Actividad antifúngica	(I. H. Khan & Javaid, 2020)
Ácido 9 – hexadecenoico	Ácido graso	Actividad antifúngica	(Pourakbar et al., 2021)
Ácido erúcido	Ácido graso	Actividad antifúngica	(L. Li et al., 2022)
Ácido 8,11 – octadecadienoico, éster métilico	Compuestos varios	Actividad antifúngica	

Ácido 9-octadecenoico, éster metílico, (E) -	Ácido graso	Actividad antifúngica	(Mohamad et al., 2018)
13 – Docosenamida (Z)-	Alcaloide	Actividad antifúngica	(Reghmit et al., 2021)
17-Pentatriaconteno	Compuestos varios	Actividad antifúngica	(Sangeetha & Krishnamoorthy, 2021)

Búsqueda bibliográfica de metabolitos producidos por *Aspergillus ochraceopetaliformis*

De igual manera, se muestra los metabolitos secundarios nombrados como molécula química, bioactividad y las referencias donde se encontró esta información de *Aspergillus ochraceopetaliformis*. En este caso se han encontrado 2 metabolitos secundarios que tienen actividad antifúngica.

Metabolito secundario	Agrupación	Actividad	Referencia
6-O-alfa-D-ribofuranósido	Compuestos varios	Actividad antibacteriana y antifúngica	(Asmaey et al., 2021)
2 - hidroxidiplopterol	Terpenoides	Actividad antibacteriana y antifúngica	(Asmaey et al., 2021)

Búsqueda bibliográfica de metabolitos producidos por Control T22

Se hizo una búsqueda literaria para comparar los metabolitos de *C. rosea*, *A. ochraceopetaliformis* y ControlT22 (*T. harzianum* T22), y se encontró grupo en común de alcaloides y ácidos grasos.

Metabolito secundario	Agrupación	Actividad	Referencia
T22azaphilone	Policétido	Actividad antifúngica	(Vinale et al., 2009)
1-hydroxi-3-metil-antraquinona	Policétido	Actividad antifúngica	(Vinale et al., 2009)
1,8-Dihidroxi-3-metil antraquinona	Policétido	Actividad antifúngica	(Vinale et al., 2009)
Keto triol 3	Policétido	Actividad antifúngica	(Ghisalberti & Rowland, 1993)

Keto diol 7	Policétido	Actividad antifúngica	(Ghisalberti & Rowland, 1993)
Keto diol 6	Policétido	Actividad antifúngica	(Ghisalberti & Rowland, 1993)
Keto diol 8	Policétido	Actividad antifúngica	(Ghisalberti & Rowland, 1993)
Triacetate 9	Policétido	Actividad antifúngica	(Ghisalberti & Rowland, 1993)
Triol 10	Policétido	Actividad antifúngica	(Ghisalberti & Rowland, 1993)
Acetal diol 2	Policétido	Actividad antifúngica	(Ghisalberti & Rowland, 1993)
Trichoharzianol	Policétido	Actividad antifúngica	(Jeerapong et al., 2015)
1,7-Dihidroxi-3-hidroximetil-9,10 - antraquinona	Policétido	Actividad antifúngica	(Liu et al., 2009)
1,5-Dihidroxi-3-hidroximetil-9,10 - antraquinona	Policétido	Actividad antifúngica	(Liu et al., 2009)
Emodin	Policétido	Actividad antifúngica	(Liu et al., 2009)
ω -hidroxipaquibasin	Policétido	Actividad antifúngica	(Liu et al., 2009)
Trichorzin_HA_I	Péptido	Actividad antifúngica	(Sanae et al., 1995)
Trichorzin_HA_II	Péptido	Actividad antifúngica	(Sanae et al., 1995)
Trichorzin_HA_III	Péptido	Actividad antifúngica	(Sanae et al., 1995)
Trichorzin_HA_V	Péptido	Actividad antifúngica	(Sanae et al., 1995)
Trichorzin_HA_VI	Péptido	Actividad antifúngica	(Sanae et al., 1995)
Trichorzin_HA_VII	Péptido	Actividad antifúngica	(Sanae et al., 1995)
Trichorzin_MA_I	Péptido	Actividad antifúngica	(Sanae et al., 1995)
Trichorzin_MA_II	Péptido	Actividad antifúngica	(Sanae et al., 1995)
Trichorzin_MA_III	Péptido	Actividad antifúngica	(Sanae et al., 1995)
Harzianopiridona	Alcaloides	Actividad antifúngica	(Ahluwalia et al., 2015)
Nafuredin C	Lactonas	Actividad antifúngica	(Zhao et al., 2020)

6-Pentil-2H-pira-2-one	Lactonas	Actividad antifúngica	(Ahluwalia et al., 2015)
------------------------	----------	-----------------------	--------------------------