

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Búsqueda de exudados de hongos (colección San
Cristóbal-Galápagos) con
potencial fungicida contra el fitopatógeno *Botrytis cinerea***

Evelyn Anahi Atiencia Chamorro

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 20 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Búsqueda de exudados de hongos (colección San
Cristóbal-Galápagos) con
potencial fungicida contra el fitopatógeno *Botrytis cinerea***

Evelyn Anahi Atiencia Chamorro

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph. D.

Quito, 20 de diciembre de 2023

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Evelyn Anahi Atiencia Chamorro

Código: 00212743

Cédula de identidad: 1751371517

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

UNPUBLISHED DOCUMENT

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

RESUMEN

El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* afecta a numerosas especies de plantas, causando daños significativos en la agricultura. El uso de fungicidas sintéticos presenta desafíos como la toxicidad, los residuos químicos y la resistencia de los hongos fitopatógenos, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas naturales y sostenibles. En este estudio, se aisló *Botrytis cinerea* de muestras de rosas y se evaluó la actividad fungicida de exudados de hongos, identificando 19 exudados fúngicos con actividad inhibitoria contra *B. cinerea*. Se encontró que algunos exudados de hongos presentaron un efecto inhibitorio significativo, sugiriendo su potencial como biofungicidas. Específicamente, se identificó molecularmente al hongo que produjo exudados con mayor inhibición el hongo AG-F-H016, identificado como *Aspergillus ochraceopetaliformis*. Como trabajo a futuro se recomienda continuar investigando los metabolitos de este hongo para su posible aplicación en el control de enfermedades en la agricultura.

Palabras clave: Fitopatógeno, exudado, inhibición, hongos, fungicida

ABSTRACT

The phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* affects numerous plant species, causing significant damage in agriculture. The use of synthetic fungicides presents challenges such as toxicity, chemical residues, and resistance of plant pathogenic fungi, which has led to the search for natural and sustainable alternatives. In this study, *Botrytis cinerea* was isolated from rose samples and fungicidal activity of fungal exudates was evaluated, identifying 19 fungal exudates with inhibitory activity against *B. cinerea*. It was found that some fungal exudates presented a significant inhibitory effect, suggesting their potential as biofungicides. Specifically, the fungus that produced exudates with greater inhibition was molecularly identified as the fungus AG-F-H016, identified as *Aspergillus ochraceopetaliformis*. As future work, it is recommended to continue investigating the metabolites of this fungus for its possible application in the control of diseases in agriculture.

Key words: Phytopathogen, exudate, inhibition, fungi, fungicide, fungicide

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	10
2. Métodos.....	13
2.1 Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i>	13
2.2 Bioensayos para la producción de exudados.....	13
2.3 Extracción de exudados de los aislados y ensayos de inhibición	13
2.4 Caracterización morfológica.....	14
2.5 Extracción de ADN y secuenciación	14
3. Resultados	16
3.1 Aislamiento y caracterización de <i>Botrytis cinerea</i>	16
3.2 Biomasa de los aislados fúngicos y pH de los exudados	16
3.3 Ensayos de crecimiento de <i>B. cinerea</i> en exudados de aislados fúngicos.....	16
3.4 Caracterización morfológica e identificación molecular del aislado AG-F-H-016.....	17
3.5 Mínima concentración inhibitoria de los exudados del aislado fúngico AG-F-H016.....	17
4. Discusión	19
4.1 Caracterización del fitopatógeno	19
4.2 Biomasa y pH.....	19
4.3 Ensayos de crecimiento del fitopatógeno frente a exudados fúngicos	20
4.4 Caracterización morfológica e identificación molecular del aislado AG-F-H-016.....	20
4.5 Mínima concentración inhibitoria de los exudados del aislado fúngico AG-F-H016.....	21
5. Conclusión.....	23
6. Tablas	24
7. Figuras.....	25
Referencias bibliográficas (ejemplo estilo APA)	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación molecular del aislado fúngico que produjo exudados con mayor inhibición contra <i>Botrytis cinerea</i>	21
Tabla 2. Mediciones obtenidas del hongo AG-F-H016 comparadas con el hongo <i>Aspergillus ochraceopetaliformis</i>	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Macroscopia y microscopia (40X) de <i>Botrytis cinerea</i>	22
Figura 2. Biomasa de los aislados fúngicos de la colección de Galápagos	23
Figura 3. pH de los exudados de aislados fúngicos.....	23
Figura 4. Evaluación del porcentaje de crecimiento del fitopatógeno <i>B. cinerea</i> frente a exudados de los aislados fúngicos.....	24
Figura 5. Macroscopia y microscopia del aislado fúngico AG-F-H016.....	26
Figura 6. Mínima concentración inhibitoria de los exudados del aislado fúngico AG-F-H016.....	25

1. INTRODUCCIÓN

Botrytis cinerea, un hongo patógeno causante de la podredumbre gris afecta a más de 200 especies de plantas, generalmente, fresa, tomate, pepino y plantas ornamentales. *B. cinerea* es considerado un hongo necrotrófico, es decir, se nutre y parasita al anfitrión mediante la producción de toxinas y otros elementos que causan la destrucción de las células del huésped, aprovechándose de células muertas. (Elbakali, Cobos & Oihabi, 2020). Sin embargo, el fitopatógeno requiere de condiciones óptimas para prosperar como una humedad relativa entre 90 – 100%, temperaturas moderadas entre 19 - 25°C y baja intensidad de luz (Leoch, et al. 2013). Dado que *B. cinerea* es de amplia distribución, es decir, se encuentra en plantas ornamentales, frutas y verduras, es importante conocer sus síntomas; se manifiestan en la primera instancia con la aparición de pudriciones del fruto y marchitamiento de las hojas, pero también puede aparecer pudrición del tallo, raíces y bulbos (Blanco, et al. 2013) ocasionando pérdidas económicas significativas.

Las pérdidas económicas a nivel mundial debido a *B. cinerea* son notables, principalmente atribuibles a la disminución tanto en la cantidad como en la calidad de los productos agrícolas afectados. Estas pérdidas, que se estiman entre 10 mil millones y 100 mil millones de dólares anuales, abarcan los costos asociados con el control y la gestión de la enfermedad. (Dean, et al. 2012). Por ejemplo, en viñedos puede causar una reducción del 10-15% en la pérdida de uvas y más de \$1000 millones anuales a nivel global. En el Ecuador, *B. cinerea* ha tenido afectaciones en el sector florícola, de manera que al año se generan pérdidas de alrededor de 1.4 millones de dólares y en la producción de hortalizas y frutas las pérdidas son de al menos 100 millones de dólares. (Plant Disease, 2016). En general, el control inadecuado puede causar la pérdida total de cosecha sensibles, por lo que, las buenas prácticas agrícolas son necesarias para reducir el impacto económico que puede causar este patógeno (Elad et al., 2016)

Los fungicidas sintéticos, como los cúpricos, carbamatos, ditiocarbamatos, benzimidazoles y triazoles, son productos químicos empleados para prevenir y controlar enfermedades en cultivos. Destacan por su eficacia y modos de acción específicos. Entre los más utilizados para el control de *B. cinerea* se encuentran pirimetanil, ciprodini y fludioxonil, según investigaciones recientes (Carisse, 2016; Mithila & Hall, 2021). No obstante, los fungicidas sintéticos presentan problemas tales como toxicidad en organismos no objetivo, asimismo, dejan residuos químicos en alimentos cosechados y la contaminación ambiental es muy persistente (Gupta, Gajbhiye & Gupta, 2008). Por otro lado, el uso repetido puede seleccionar cepas resistentes de hongos fitopatógenos, causando que los fungicidas pierdan efectividad (Damalas & Eleftherohorinos, 2011). Para lo cual algunas alternativas al uso de fungicidas sintéticos son los fungicidas biológicos basados en microorganismos como *Trichoderma* o *Bacillus subtilis* los cuales tienen diversos mecanismos de acción que han demostrado actividad antagónica.

Una alternativa frente a los fungicidas químicos son los fungicidas basados en exudados de hongos, estos cumplen el mismo papel, es decir, funcionan como prevención y control de enfermedades en plantas (Diaz et al., 2020). Estos aprovechan la gran diversidad de compuestos bioactivos que son producidos en las rutas metabólicas de plantas, hongos, bacterias y otros microorganismos. Existen metabolitos como terpenos, fenoles, flavonoides, alcaloides y ácidos orgánicos tienen propiedades antifúngicas por sus efectos sobre la pared celular, membrana o el metabolismo de los hongos fitopatógenos (Damalas & Koutroubas, 2018). Presentan varias ventajas como la alta efectividad, mayor compatibilidad ambiental y menor toxicidad en comparación con muchos productos sintéticos (Morgan et al., 2016). Aunque se requiere investigación para evaluar su desempeño en campo, los fungicidas derivados de exudados de hongos representan una alternativa prometedora para controlar

enfermedades de forma más natural y sostenible, reduciendo los impactos ambientales asociados al uso excesivo de agroquímicos en la agricultura moderna (Cantrell, Dayan & Duke, 2012).

Uno de los hongos más estudiados y utilizados como agente de control biológico es *Trichoderma harzianum* T22, este es una cepa específica de *Trichoderma harzianum*, este hongo antagonico actúa a través de diversos mecanismos como (Huber et al., 2020) la producción de enzimas y metabolitos tóxicos que degradan las paredes celulares o afectan el metabolismo de otros hongos. Además, compete eficientemente con otros microorganismos por espacio y nutrientes (Lorito et al., 2010). Ha demostrado ser efectivo para el control de varios fitopatógenos en diversos cultivos reduciendo la incidencia de la enfermedad en un 25-75%, por estas razones, se ha constituido en un modelo para el estudio y aplicación de hongos antagonicos en el biocontrol de fitopatógenos.

Por otro lado, la colección de hongos fue obtenida a partir de la Isla San Cristóbal (Galápagos). Estas se comenzaron a aislar alrededor del 2015, en donde se obtuvo 500 aislados de hongos diferenciados fenotípicamente, sin embargo, con el tiempo solamente se logró recuperar 40 aislados de hongos. Debido al potencial único de la diversidad fúngica endémica, estos pueden ser una fuente de nuevos fungicidas.

De esta manera, el objetivo general es explorar exudados con potencial fungicida de aislados fúngicos contra *Botrytis cinerea*, y, por otro lado, los objetivos específicos se basan en aislar y caracterizar *B. cinerea* a partir de pétalos de rosa, evaluar biomasa de los aislados fúngicos de la colección de Galápagos, pH y actividad fungicida de exudados de aislados fúngicos pertenecientes a la colección San Cristóbal (Galápagos) y, por último, realizar identificación molecular de los aislados fúngicos con mayor efecto inhibitorio.

2. MÉTODOS

2.1 Aislamiento de *Botrytis cinerea*

El fitopatógeno *Botrytis cinerea* fue aislado a partir de muestras de rosas pertenecientes a las fincas Agrirose y Picuerra ubicadas en Cayambe y Pichincha. Se tomaron muestras de material vegetal que presentaba síntomas típicos de infección por este fitopatógeno, como lesiones necróticas, podredumbre y micelio grisáceo. Las muestras se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1%, después pasaron a un lavado con alcohol al 70% y finalmente dos lavados con agua destilada estéril (González, Valdés & Zalacaín, 2007), cada uno de estos lavados se los hicieron por un minuto cada uno, seguido de esto se colocaron pequeños fragmentos del tejido enfermo en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Potato dextrose agar, BIFCO) con gentamicina. El fitopatógeno se incubó a 25°C. Después de 5-7 días, se observó el desarrollo de colonias con aspecto algodonoso y coloración grisácea típica de *Botrytis cinerea*. El hongo fue posteriormente identificado por sus características macroscópicas y microscópicas.

2.2 Bioensayos para la producción de exudados fúngicos

Se trabajó con 40 aislados de la colección de las Galápagos, que estaban almacenado a -20°C en el Laboratorio de Agrobiotecnología y Alimentos en la Universidad San Francisco de Quito, Cumbayá, Ecuador. Los aislados fúngicos se mantenían con pases mensuales en medio de cultivo V8. Se colocó un disco de 9mm de los aislados fúngicos en Erlenmeyers con 75 ml de medio PDB (Potato Dextrose Broth, DIFCO) con gentamicina (150 ul) por triplicado, y se los dejó en fermentación a 28°C por un mes (Sarkar, et al. 2021).

2.3 Extracción de exudados fúngicos e inhibición

Transcurrido el tiempo de la fermentación se hizo un filtrado de los exudados con nylon en donde se obtiene la biopelícula del hongo y esta fue secada y pesada, asimismo, se filtró nuevamente con papel filtro de 0.45 μm , se midió el pH y ajustó a 6 – 7; finalmente se pasa a un filtrado con jeringa (0.22 μm). Para los ensayos de inhibición, se preparó medio PDA con 400 μl de gentamicina y 150 μl de tetraciclina, al cual se le agregó 60 ml (50 %) del exudado del aislado fúngico, se dejó secar y se colocó un disco (9 mm) de *Botrytis cinerea* en el centro de cada placa. Para este procedimiento se debe tener en cuenta a los controles, primero el control PDA que solamente contenía el medio PDA, el control fungicida sintético que fue Captan y el control biológico que fue *Trichoderma harzianum* T22, estos fueron mezclados con medio PDA donde se colocó el disco (9 mm) del fitopatógeno como se mencionó anteriormente. Éstas se incubaron a 28°C midiendo diariamente el crecimiento radial (mm) del fitopatógeno para determinar el efecto inhibitorio de los exudados. Para calcular el porcentaje de inhibición, se siguieron los siguientes pasos: primero, se restó el diámetro del exudado del hongo al diámetro del control. Luego, este resultado se dividió por el diámetro del control. Por otro lado, para calcular el porcentaje de crecimiento, se restó 1 menos el porcentaje de inhibición.

2.4 Caracterización morfológica

Una vez obtenido el hongo aislado, se utilizó cinta adhesiva transparente para tomar una muestra del hongo y colocarla en un portaobjetos de vidrio. La muestra se observó en un microscopio Leica DM750 con aumento en 100X, se tomó fotografías y medidas de sus estructuras y fueron comparadas con *Aspergillus ochraceopetaliformis*.

2.4 Extracción de ADN y secuenciación a partir de hongos con efecto inhibitorio

La extracción de ADN genómico de las muestras fúngicas se realizó utilizando el kit comercial PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente,

se tomaron aproximadamente 100 mg de micelio fúngico y se colocaron en los tubos de extracción provistos en el kit. Se agregaron las soluciones C1, C2 y C3 para lisar las células fúngicas y liberar el ADN. Tras centrifugaciones para separar y descartar restos celulares, el ADN se unió a una matriz de sílice. Esta matriz se lavó con soluciones provistas en el kit para eliminar inhibidores e impurezas. Finalmente, el ADN fúngico puro se eluyó de la matriz con solución de elución y se almacenó a -20°C . Se realizó una amplificación por PCR con un máster mix de buffers, dNTPs, MgCl_2 , primers 4 y 5, Taq polimerasa y ADN molde provisto en el kit de Quiagen, se corrió por el termociclador LABNET MULTIGENE con el protocolo de amplificación con programa TEF1, donde se dio por los siguientes parámetros, en donde la desnaturalización inicial fue de 94°C por 4 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45s, una amplificación a 52°C por 30s, extensión a 72°C por 45s y una extensión final a 72°C por 15 min. De esta manera, los productos obtenidos fueron secuenciados por MACROGEN en Corea, donde se realizó un secuenciamiento con Sanger, en donde se amplificó las regiones IT1 (Internal Transcribed Spacer) utilizando los cebadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Posterior al secuenciamiento, las secuencias se compararon con la herramienta NCBI BLAST (Centro Nacional de Información Biotecnológica) obtener el género y la especie del hongo.

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento y caracterización morfológica de *Botrytis cinerea*

El fitopatógeno *Botrytis cinerea* presenta colonias inicialmente grises que se tornan gris oscuro con el pasar de los días, de aspecto algodonoso, aterciopelado o polvoriento en medio PDA, el reverso es de color pardo grisáceo. En medio PDA crece rápidamente, alcanzando 9 cm en 10 días a 25°C. Microscópicamente se observan conidióforos hialinos o ligeramente pigmentados y septados como se observa en la Figura 1. Los conidios son hialinos, unicelulares, elípticos u ovoides. Asimismo, se disponen en racimos densos sobre los conidióforos.

3.2 Biomasa de los aislados fúngicos y pH de los exudados

Así mismo, con los resultados evidenciados en la Figura 2 y 3, obtenidos a partir de la biomasa y pH, por un lado, en la Figura 2, la biomasa evidencia que es dependiente del aislado fúngico, mientras que el pH indica que los exudados de los aislados fúngicos son capaces de realizar cambios en el pH del medio, tomando en cuenta que el control tenía un pH de 5.8 y los exudados cambiaban a un rango de pH de 6 a 7.

3.3 Ensayos de crecimiento de *B. cinerea* en exudados de aislados fúngicos

Los ensayos de crecimiento demostraron (Figura 4) que existen diferentes exudados que presentan diferencia significativa inhibitoria, sin embargo, el exudado AG-F-H002 y el exudado AG-F-H010 en lugar de inhibir el crecimiento del fitopatógeno, estimuló su crecimiento. Los siguientes exudados encontrados en la misma figura, no tienen diferencia significativa, mientras que 19 exudados encontrados después de las líneas entrecortadas pueden inhibir con respecto al control PDA, no obstante, el exudado de AG-F-H016 tuvo mayor efecto inhibitorio contra *B. cinerea* comparado con el control biológico ya que el control obtuvo un crecimiento de 100% en el día 11 y el exudado exudado AG-F-H016 obtuvo un crecimiento

del 27% fitopatógeno. De esta manera, (Figura 5, a.) en las diferentes concentraciones, el control biológico al 1% tuvo un crecimiento de 87,2%, el 10% un crecimiento de 64.1%, el 25% un crecimiento de 42.4% y el que mayor efecto inhibitorio en cuanto al crecimiento del fitopatógeno fue la concentración al 50% debido a que tuvo 38.3% de crecimiento. Por otro lado, el exudado AG-F-H016 en concentraciones de 1% obtuvo 61.041% de crecimiento, al 10% obtuvo 58.21%, al 25% un 47.13% y finalmente a una concentración de 50% tuvo un crecimiento de 27.09% del fitopatógeno, lo cual comparado con el control fungicida sintético al tener un crecimiento de 25.1% indica que tiene actividad antifúngica. Asimismo, se realizaron pruebas estadísticas de tukey y ANOVA donde se obtuvo un $p < 0.05$ indicando que todos los resultados (Figura 6, a.) son significativamente diferentes.

3.4 Caracterización morfológica e identificación molecular

En la macroscopia obtenida del aislado fúngico AG-F-H016 (Figura 7) se observa un color amarillento con todos beige, mientras que en el reverso es un color anaranjado. Por otro lado, la microscopia en 100X se realizaron mediciones de las conidias, vesícula, estípites y médula (Tabla 2) comparadas con *Aspergillus ochraceopetaliformis* indicando que están dentro del rango establecido por la literatura.

Se realizó una identificación molecular a partir de la región ITS, lo cual indica que AG-F-H016, el aislado fúngico que presentó mayor inhibición contra *B. cinerea*, pertenece a *Aspergillus ochraceopetaliformis*, la cual se evidencia en la Tabla 1 en la sección de tablas.

3.5 Mínima concentración inhibitoria de los exudados del aislado fúngico AG-F-H016

En las diferentes concentraciones (1%, 10%, 25% y 50%) del control biológico y el exudado AG-F-H016, evidenciaron un cambio morfológico (Figura 5). En donde el control PDA muestra un hongo con crecimiento radial de color grisáceo, y lo mismo fue para el control

fungicida sintético, en las diferentes concentraciones del control biológico, además del hongo circular alrededor del disco, se evidencia crecimiento en otros sitios de la caja Petri, es decir, el crecimiento no es uniforme. En cuanto al aspecto del fitopatógeno en el exudado AG-F-H016, este tomó una coloración blanquecina, y en la concentración al 1% y 10% también se observa un crecimiento no uniforme en comparación a la concentración al 25% y 50%.

4. DISCUSIÓN

4.1 Caracterización del fitopatógeno

La caracterización y aislamiento de *Botrytis cinerea* es fundamental para comprender su comportamiento y encontrar posibles soluciones para su control. El aislamiento de este hongo fitopatógeno a partir de muestras de rosas con síntomas típicos de infección, como lesiones necróticas y micelio grisáceo, demuestra su presencia y su impacto en la agricultura (Fernández, et al. 2015). En la Figura 1, refleja la apariencia de *B. cinerea* en medio PDA, el cual es blanco grisáceo con aspecto polvoriento y con el tiempo se vuelve marrón grisáceo oscuro, de manera que esto refleja que el hongo aislado puede ser *Botrytis cinerea* por las características de crecimiento del micelio. De modo que para confirmar se realizó caracterización microscópica de este fitopatógeno, con sus colonias grises en donde los resultados obtenidos se compararon con literatura, menciona que los conidióforos contienen una ramificación dicotómica, conidios de forma elíptica y se agrupan por racimos, por otro lado, las hifas son delgadas, tabicadas y hialinas y sus esclerocios son de color oscuro (Plesken, et al. 2015) y como se observa en la Figura 1 de la microscopia de *B. cinerea*, se observan las mismas estructuras sugiriendo que puede ser *B. cinerea*. Este aislamiento y caracterización son pasos iniciales importantes para comprender la biología y la patogenicidad de *Botrytis cinerea*, lo que a su vez puede conducir al desarrollo de estrategias de control más efectivas y sostenibles.

4.2 Biomasa y pH

La dependencia de la biomasa del aislado fúngico sugiere que la producción de exudados con actividad inhibitoria no está directamente relacionada con la cantidad de biomasa del aislado

fúngico, lo que indica que la actividad antifúngica no está determinada por la cantidad de aislado fúngico presente, sino por la naturaleza de los compuestos producidos (Sarkar, et al. 2021). Por otro lado, al ajustarse el pH demuestra que existen componentes que cambian el pH. Según la literatura, los exudados pueden poseer ácidos orgánicos tales como el ácido cítrico, glucónico, entre otros que acidifican el medio, asimismo, puede poseer metabolitos alcalinizantes como el amoníaco que incrementa el pH del medio (Kellner, et al. 2005). Las variaciones del pH por los exudados influyen en la solubilidad y disponibilidad de nutrientes y la fisiología microbiana (Tejesvi, et al. 2007).

4. 3 Ensayos de crecimiento del fitopatógeno frente a exudados fúngicos

La evaluación de la actividad fungicida de *Trichoderma harzianum* T22 ha demostrado tener un efecto inhibitorio contra *Botrytis cinerea*. Según diversos estudios este restringe el crecimiento micelial de *B. cinerea in vitro* y reduce la severidad de infecciones por moho gris en invernadero (Singh, et al. 2014). Además, la presencia de 19 exudados con actividad inhibitoria significativa, lo que sugiere su potencial como biofungicidas. Además, el exudado del aislado fúngico AG-F-H016 presentó un crecimiento de 27% por lo que es el exudado con mayor efecto inhibitorio frente al fitopatógeno *B. cinerea*.

Enfocándose en el género *Aspergillus* al cual pertenece el hongo que produjo el exudado con mayor efecto inhibitorio se encontró que especies como *A. clavatus* y *A. giganteus* poseen actividades antifúngicas contra *B. cinerea* en donde la severidad de la enfermedad se ha reducido en un 60% (García, et al. 2012).

En este caso, en la especie *Aspergillus ochraceopetaliformis* el hongo que produjo exudados con mayor efecto inhibitorio, se han descrito 2 metabolitos con actividad antifúngica (Rathaiah, et al. 2016), lo que apoya haber encontrado esta especie con potencial fungicida. La mayoría de las investigaciones sobre *A. ochraceopetaliformis* se han enfocado en su capacidad de producir enzimas como amilasas y proteasas, no obstante, es una especie poco estudiada (Kaur & Padmavathi, 2014).

4.4 Caracterización morfológica e identificación molecular del aislado AG-F-H-016

Al realizarse una macroscopia del aislado fúngico AF-G-H016 el cual fue aislado a partir de la mora en la Isla San Cristóbal (Galápagos), evidenció una apariencia de color beige amarillenta, y el reverso de la caja con un color anaranjado, sin embargo, al realizarse una microscopia en 100X se realizaron mediciones de las conidias, vesícula, estípite y médula, y estas fueron comparadas con la especie *Aspergillus ochraceopetaliformis*. De manera que se encuentran en el rango de lo esperado (Visagie, et al. 2014), confirmando la especie de *Aspergillus*.

La identificación molecular a partir de la secuencia ITS es necesario para entender su potencial como agentes de control biológico. En este estudio, la secuenciación de la región ITS permitió identificar molecularmente al hongo *Aspergillus ochraceopetaliformis* como el que presentó mayor inhibición contra *Botrytis cinerea*. Este fue reportado a partir de muestras de suelo en la India, pero también ha sido aislado de la rizosfera de plantas de banano (Saparrat et al. 2022), lo cual indica que parece ser un hongo ambiental. Al encontrarse este hongo en las moras de la Isla San Cristóbal (Galápagos) puede ser un hallazgo peculiar ya que este puede estar interactuando con la microbiota o micobiota de las moras colonizando la materia orgánica en descomposición sin causar daño a las frutas directamente, asimismo, su presencia podría

deberse a dispersión, por ejemplo, a través de partículas del suelo o insectos que han llevado sus esporas a la superficie de los frutos en donde este hongo ha desarrollado algún nivel adaptativo (Brown & Hovmoller, 2002).

Para su amplificación se deberían utilizar más primers como genA y CaM, los cuales han demostrado amplificar secuencias del género *Aspergillus* (Visagie, et al. 2014) para confirmar que sea esta especie. El genA codifica para una proteína del hongo *Aspergillus* spp., este contiene zonas conservadas que permite la identificación del género (Balajee, et al. 2007), mientras que el gen CaM es una proteína multifuncional que también muestra zonas variables que son informativas para diagnóstico para especies de *Aspergillus* (Samson, et al. 2007).

4.4 Mínima concentración inhibitoria de los exudados de los aislados del aislado fúngico AG-F-H016

Los exudados fúngicos pueden llegar a alterar la morfología tal y como se evidenció en los resultados, pero también afecta al desarrollo de otros aislados debido a la presencia de diversas sustancias bioactivas. Los exudados contienen metabolitos extracelulares secretados, tales como antibióticos y toxinas volátiles que inducen cambios morfológicos en hongos fitopatógenos, incluyendo anomalías en la germinación de conidios o abundante ramificación, lo que explica los saltos formados por *B. cinerea* (Spadaro, et al. 2013). Asimismo, se puede generar una pigmentación alterada ya que algunos metabolitos pueden inhibir o inducir vías de biosíntesis de pigmentos en otros hongos, causando cambios de coloración en sus colonias (Santos, et al. 2012).

5. CONCLUSIÓN

En este estudio, se logró aislar *Botrytis cinerea* a partir de pétalos de rosa pertenecientes a las florícolas Agrirose y Picuerra ubicadas en la provincia Pichincha, asimismo, la biomasa y pH son dependientes del hongo y exudado del aislado fúngico respectivamente. Por otro lado, se estableció 19 exudados fúngicos con diferencia significativa inhibitoria que pueden ser considerados contra *B. cinerea*. Sin embargo, un exudado presentó mayor potencial fungicida contra el fitopatógeno *B. cinerea*, en este caso se trata del exudado del aislado fúngico AG-F-H016 el cual se identificó como *Aspergillus ochraceopetaliformis*.

6. TABLAS

Tabla 1. identificación molecular del aislado fúngico que presentó mayor inhibición comparado contra *B. cinerea*.

Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value
<i>Aspergillus ochraceopetaliformis</i>	1114	1114	99%	100%

Tabla 2. Mediciones obtenidas del hongo AG-F-H016 comparadas con el hongo *Aspergillus ochraceopetaliformis*

	Obtenido	Literatura
Conidias	2.4 μm	2.3 μm
Vesícula	37.87 μm	25 – 45 μm
Estípite	428.59 largo x 8.48 ancho μm	260 – 1300 largo x 8 – 10 ancho μm
Médula	10.5 x 5.37 μm	10 – 20 x 3.5 – 6 μm

7. FIGURAS

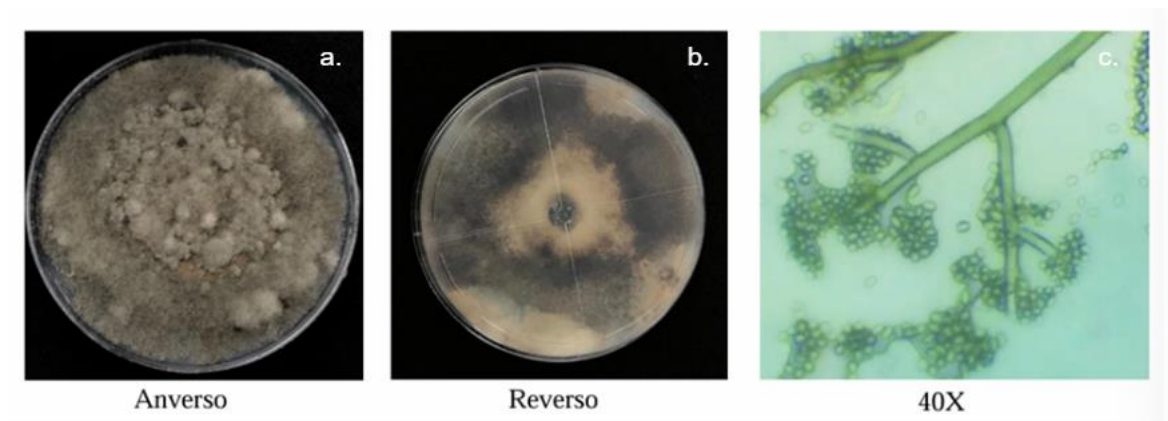


Figura 1. Macroscopia y microscopia (40X) de *Botrytis cinerea*, a. anverso de la caja Petri, b. reverso de la caja Petri y c. microscopia en 40X.

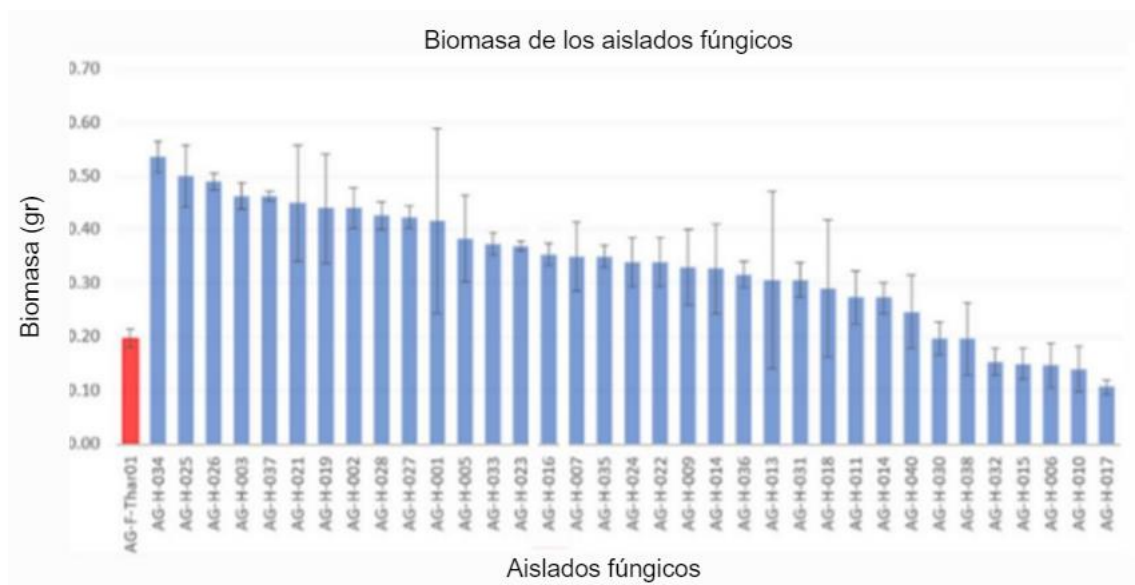


Figura 2. Biomasa de los aislados fúngicos de la Colección de Galápagos. AG-F-Thar01 (Control biológico en la barra roja).

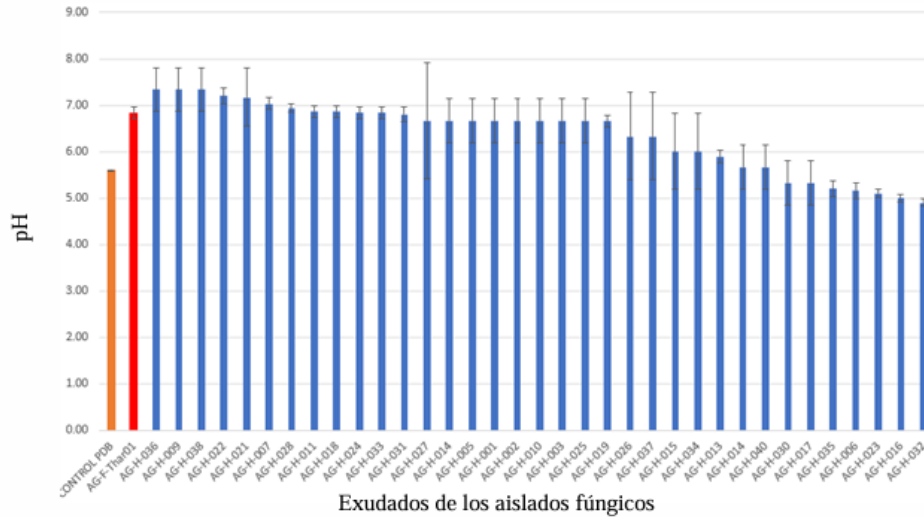


Figura 3. pH de los exudados de aislados fúngicos de la colección de las Galápagos. En color tomate se encuentra el control PDB, AG-F-Thar01 (Control biológico)

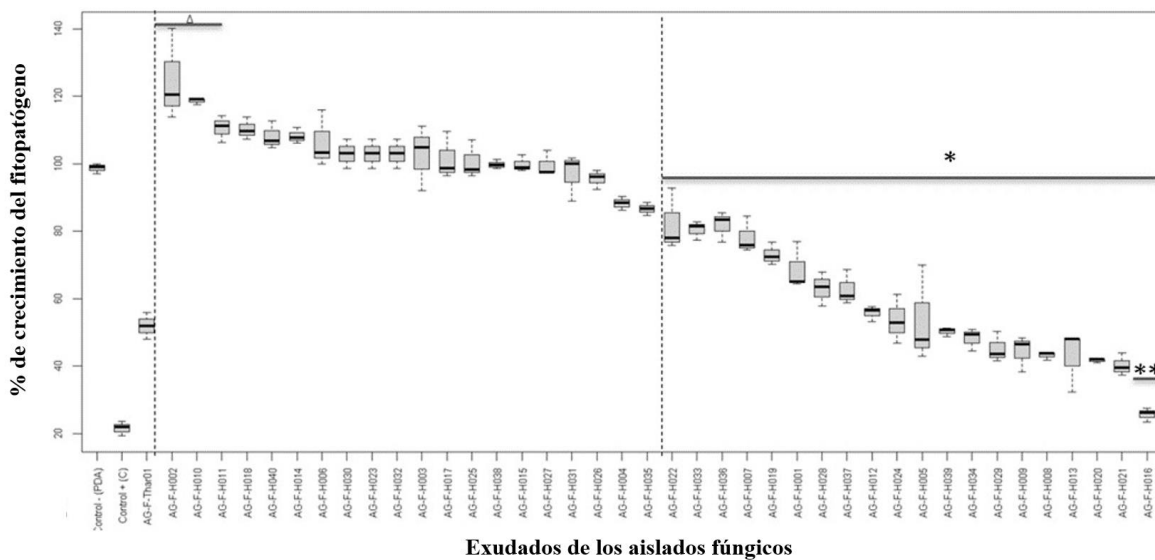


Figura 4. Evaluación del porcentaje de crecimiento del fitopatógeno *B. cinerea* frente a exudados de los aislados fúngicos. En la izquierda, los 3 primeros son los controles, primero se encuentra el control PDA, seguido del control del fungicida sintético (Captan) y el

exudado del AG-F-Thar01 (*Trichoderma harzianum* T22). En el centro se encuentran 2 exudados marcados con un triángulo los cuales ayudan a crecer al fitopatógeno. Los **exudados** de la izquierda marcados con un asterisco tienen diferencia significativa comparada con el control PDA, mientras que el exudado marcado con dos asteriscos tiene mayor inhibición comparado con el control biológico. Prueba estadística Dunnet y ANOVA con un $p < 0.05$.

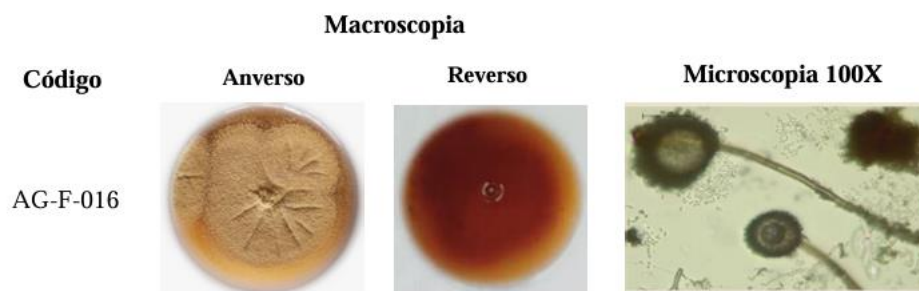


Figura 6. Macroscopia y microscopia del aislado fúngico AG-F-H016, seguido de la microscopia a 100X del mismo.

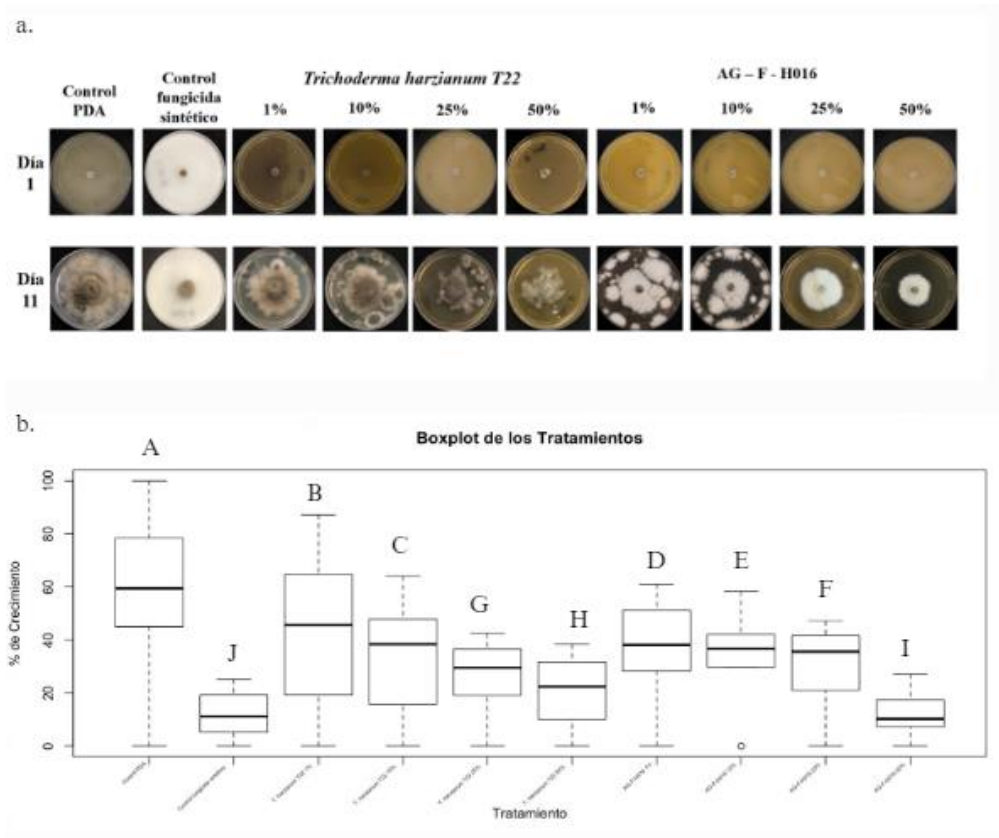


Figura 5. a. Mínima concentración inhibitoria, donde en la izquierda el control PDA, control fungicida sintético captan y las concentraciones de los exudados del control biológico, 1%, 10%, 25% y 50%, seguido del exudado AG-F-H016 con las mismas concentraciones 1%, 10%, 25%, 50%. En la primera fila se encuentra el día 1 y en la segunda fila se encuentra el día 11 de incubación, b. Bloxplot de la mínima concentración inhibitoria, control PDA, control fungicida sintético captan y diferentes concentraciones del control biológico, 1%, 10%, 25% y 50%, seguido del exudado de AG-F-H016 con las mismas concentraciones 1%, 10%, 25% y 50%. Prueba estadística tukey y ANOVA con un $p < 0.05$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atanasova, et al. (2013). *Comparative transcriptomics reveals different strategies of Trichoderma mycoparasitism*. BMC Genomics, 14, 121.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-121>
- Balajee, S., et al. (2007). *Characterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of Aspergillus fumigatus across North America*. Eukaryotic Cell 6:1392–1399.
- Blanco, B., Vincenti, E., Powell, A., & Cantu, D. (2013). *Tomato transcriptome and mutant analyses suggest a role for plant stress hormones in the interaction between tomato and Botrytis cinerea*. Frontiers in plant science, 4, 142.
- Brown, J. & Hovmoller, M. (2002). *Epidemiology: Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease*. Science, 297(5581): 537-541.
- Cantrell, C., Dayan, F. & Duke, S. (2012). *Natural products as sources for new pesticides*. Journal of natural products, 75(6), 1231-1242.
- Carisse, O. (2016). *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer
- Damalas, C. & Eleftherohorinos, G. (2011). *Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 8(5), 1402-1419.
- Damalas, C. & Koutroubas, S. (2018). *Current status and recent developments in biopesticide use*. Agriculture, 8(1), 13.
- Dean, R., et al. (2012). *The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology*. Molecular plant pathology, 13(4), 414-430.
- Diaz E., et al. (2020). *Secondary Metabolites from Microorganisms: Alternative for Environmentally Friendly Pest Management in Agricultural Systems*. Antibiotics 2020, 9, 870.
- Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A. M., & Stewart, A. (2016). *The Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (pp. 413–486). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_17
- Elbakali, A., Muñoz, L., Cobos, J., & Oihabi, A. (2020). *Botrytis cinerea FROM inoculation to disease management in crops: A review*. Agronomy, 10(12), 2010.
- Elmer, P. & Reglinski, T. (2006). *Biosuppression of Botrytis cinerea in grapes*. Plant pathology, 55(2), 155-177.

- Erazo, N. et al. (2020). *Effect of Pleurotus ostreatus (Jacq.) and Trichoderma harzianum (Rifai) on Meloidogyne incognita (Kofoid & White) in tomato (Solanum lycopersicum Mill)*. Biological Sciences, 42, e4722 – e47522
- Fernández, D. et al. (2015). *First report of grey mould of strawberry caused by Botrytis cinerea in Argentina*. Journal of Berry Research, 5(3), 175-179.
- García, R., et al. (2012). *Evaluación de hongos endófitos antagonistas de patógenos postcosecha como potenciadores de las defensas en tomate*. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 13(2), 262–267.
- González, M., Valdés, V., & Zalacaín, A. (2007). *Aislamiento e identificación de Botrytis cinerea en cultivares de rosas (Rosa sp.) en la sabana de Bogotá*. Fitopatol. Colomb, 31, 37-42.
- Gupta, S., Gajbhiye, V., & Gupta, R., (2008). *Soil dissipation and leaching behavior of a neonicotinoid insecticide thiamethoxam*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 80(5), 431-437.
- Huber, D., et al. (2020). *Modern Biocontrol of Agricultural Plant Pathogens Using Trichoderma*. J Fungi (Basel), 6(4), 221.
- Kellner, H., et al. (2005). *Patchiness and co-existence of antagonistic basidiomycetes in a heterogeneous environment*. FEMS Microbiology Ecology, 52(2), 161-173.
- Kaur, M., & Padmavathi, T. (2014). *Effect of Aspergillus terreus on growth of root rot pathogen Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Archives Of Phytopathology And Plant Protection, 47(18), 2257-2264. (Otro estudio sobre actividad antagónica en A. terreus)
- Keller, N., Turner, G., & Bennett, J., (2005). *Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics*. Nature Reviews Microbiology, 3(12), 937–947. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Lerach, M., et al. (2013). *Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to Botrytis cinerea*. Applied and environmental microbiology, 79(1), 159-167.
- Lorito, M., et al. (2010). *Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(14), 6264-6269.
- Mithila, J., Hall, J.C. (2021). *Fungicides – Synthetic*. Encyclopedia of Food Chemistry. 374-379. Elsevier
- Monteiro, S., Barreto, M., & Pires, E. (2005). *Antifungal activity of the methanolic extracts and compounds from leaves of Sideroxylon obtusifolium*. Braz J Med Biol Res, 38, 399-404.

- Morgan, K., et al. (2016). *Bioefficacy of plant metabolites for organic crop protection against major economical pests and diseases*. *GM Crops & Food*, 7(2), 84-93.
- Plesken, C., et al. (2015). *Botrytis cinerea infection in grapevine flowers: defense reaction, latency, and disease expression*. *Plant signaling & behavior*, 10(2), e989994.
- Rathaiiah, Y., Sarma, V., & Sahay, H. (2016). *Aspergillus ochraceopetaliformis (Trichocomaceae), a new species from soil in India*. *Mycosphere*, 7(8), 1102–1108. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/7/8/6> (Artículo original que describe la especie *A. ochraceopetaliformis*).
- Santos, M., et al. (2012). *Transformation of Aspergillus niger Using the Homologous amdR Gene*. *Current Microbiology*, 64(4):336-44.
- Sarkar, M., et al. (2021). *Antagonistic metabolites of Trichoderma afroharzianum restricting the mycelial growth of Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, 257, 126693.
- Singh, A., et al. (2014). *Effect of fungal antagonists on growth and sclerotial viability of Sclerotinia sclerotiorum associated with vegetable crops*. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 47(6), 758-771.
- Spadaro, D., et al. (2005). *Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens*. *Crop Protection*, 24(7), 601-613.
- Shoresh, M., Harman, G., & Mastouri, F. (2010). *Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents*. *Annual review of phytopathology*, 48, 21-43.
- Souza, J., et al. (2020). *Fungal metabolites with efficacy against phytopathogens*. *Phytochemistry Reviews*, 19(2), 277–300. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09631-6>
- Tejesvi, M., et al. (2007). *Genetic diversity and antifungal activity of species of Pestalotiopsis isolated as endophytes from medicinal plants*. *Fungal Diversity*, 24(1), 37-54.
- Van Zanten, M., et al. (2012). *Modulation of ethylene- and heat-controlled hyponastic leaf movement in Arabidopsis thaliana by the plant defence hormones jasmonate and salicylate*. Springer – Verlag. 235, p. 677 - 685
- Yohalem, D., Passey, T., & Fisher, J. (2003). *The economic impacts of grey mould [Botrytis cinerea] on the Australian wine industry (No. 03/08)*. Canberra, Australia: ABARE eReport.