

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE FILTRADOS FÚNGICOS FRENTE A**  
***Colletotrichum sp.*, AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS DEL**  
**MANGO (*Mangifera indica L.*)**

Tesis de grado presentada para la obtención del grado de Licenciatura en Bioquímica

ELABORADO POR: Univ. MARISOL LLANOS VARGAS

LA PAZ – BOLIVIA  
2022

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE FILTRADOS FÚNGICOS FRENTE A**  
***Colletotrichum sp.*, AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS DEL**  
**MANGO (*Manguifera indica L.*)**

Tesis de grado presentada para la obtención del grado de Licenciatura en Bioquímica

ELABORADO POR: UNIV. MARISOL LLANOS VARGAS

ASESORAS: CARLA CRESPO MELGAR PhD.  
MARIA TERESA ALVAREZ ALIAGA PhD.

LA PAZ – BOLIVIA  
2022

***Dedicado***

*A la eterna luz de esperanza que vive dentro de todos nosotros.*

### **Agradecimiento (s)**

A Dios y a esta prestigiosa casa de estudios, como es la Universidad Mayor de San Andrés, por haberme acogido durante mi formación profesional.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por permitirme realizar esta tesis de investigación.

A mis queridas asesoras, Dra. Carla Crespo Melgar PhD. y Dra. Maria Teresa Alvarez Aliaga PhD., por su grata colaboración, enseñanzas, guía y comprensión a lo largo del desarrollo y conclusión de este trabajo.

A la Dra. Marisel Mamani Mamani, Jefa de área del laboratorio de Biotecnología Fúngica, por su apoyo, enseñanzas y cálida amistad.

A mis estimados amigos del IIFB por su confianza, amistad y apoyo incondicional durante el proceso de esta investigación.

A mis estimados amigos de carrera, a los cuales siempre los tengo en mente.

A Alexandra Elbakián por el maravilloso portal de Sci – Hub, el pase a las investigaciones del mundo científico.

A mi Madre por su apoyo incondicional.

## Tabla de contenido

### Resumen

### Abstract

1	Planteamiento del problema .....	1
1.1	Justificación .....	2
1.2	Objetivos .....	3
1.2.1	Objetivo general .....	3
1.2.1	Objetivos específicos .....	3
2	Diseño teórico .....	3
2.1	Marco referencial.....	3
2.1.1	Antecedentes generales sobre el problema en estudio.....	3
2.1.2	Descripción del ámbito de estudio .....	4
2.2	Marco teórico.....	5
2.2.1	Cultivo de mango .....	5
2.2.1.1	Aspectos generales del cultivo de mango .....	5
2.2.1.2	Fenología del cultivo de mango .....	5
2.2.1.3	Propiedades nutricionales del mango .....	6
2.2.1.4	Producción de mango en Bolivia .....	7
2.2.2	Plagas y enfermedades que afectan al cultivo de mango .....	7
2.2.2.1	Antracnosis y agente causal .....	9
2.2.2.2	Pérdidas de producción agrícola por <i>Colletotrichum sp.</i> .....	11
2.2.3	Control de plagas y enfermedades .....	12
2.2.3.1	Uso de agentes químicos en Bolivia .....	14
2.2.3.2	Agentes químicos para el control de la antracnosis .....	14

2.2.4	Control biológico de plagas y enfermedades que afectan a cultivos agrícolas .....	15
2.2.4.1	Mecanismos de acción antagonicos desarrollados por BCAs microbianos .....	15
2.2.4.2	Hongos como agentes de control biológico .....	17
2.3	Marco conceptual .....	20
3	Formulación de la hipótesis de investigación .....	21
4	Operacionalización de variables en estudio .....	21
5	Diseño metodológico.....	23
5.1	Población en estudio, ámbito y periodo de investigación .....	23
5.1.1	Población en estudio .....	23
5.2	Tipo de investigación.....	23
5.3	Materiales, métodos, técnicas y procedimientos .....	23
5.3.1	Protocolo de Investigación.....	23
5.3.2	Material biológico.....	25
5.3.3	Activación de cepas fúngicas.....	25
5.3.4	Estudio de agentes de control biológico (BCAs).....	25
5.3.4.1	Evaluación de BCAs con actividad antagonica directa .....	25
5.3.4.2	Caracterización de BCAs.....	26
5.3.4.2.1	Preparación de cultivos monospóricos.....	26
5.3.4.2.2	Caracterización morfológica de cepas fúngicas seleccionadas .....	26
5.3.4.2.3	Determinación de la velocidad de crecimiento de BCAs.....	27
5.3.5	Producción de filtrados fúngicos y evaluación de su actividad antagonica contra <i>Colletotrichum sp.</i> .....	27
5.3.6	Optimización de condiciones de cultivo y producción de filtrados con actividad antagonica.....	27

<b>5.3.6.1</b>	Efecto de la fotoinducción en la producción de filtrados fúngicos con actividad antagónica.....	27
<b>5.3.6.2</b>	Efecto del co-cultivo en la producción de filtrados fúngicos con actividad antagónica	28
<b>5.3.6.3</b>	Efecto de la concentración de fuente de carbono sobre la producción de filtrados fúngicos con actividad antagónica.....	28
<b>5.3.6.4</b>	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de filtrados fúngicos con actividad antagónica.....	28
<b>5.3.6.5</b>	Efecto del tiempo de cultivo en la producción de filtrados fúngicos con actividad antagónica.....	29
<b>5.3.6.6</b>	Efecto de la concentración de filtrados fúngicos y su actividad antagónica.....	29
<b>5.3.6.7</b>	Obtención de filtrados fúngicos y evaluación de su actividad antagónica contra <i>Colletotrichum sp.</i> .....	29
<b>5.3.6.7.1</b>	Determinación de la actividad antagónica de BCAs y filtrados fungicos contra <i>Colletotrichum sp.</i> .....	30
<b>5.3.7</b>	Estudio de filtrados fúngicos seleccionados por su actividad antagónica contra <i>Colletotrichum sp.</i> .....	30
<b>5.3.7.1</b>	Cuantificación de proteínas solubles totales en filtrados fúngicos .....	30
<b>5.3.7.2</b>	Determinación de actividad enzimática de filtrados fúngicos .....	31
<b>5.3.7.2.1</b>	Actividad proteolítica de filtrados fúngicos .....	31
<b>5.3.7.2.2</b>	Actividad celulolítica de filtrados fúngicos .....	31
<b>5.3.7.2.3</b>	Actividad quitinolítica de filtrados fúngicos .....	32
<b>5.3.7.3</b>	Determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales en filtrados fúngicos .....	32
<b>5.3.8</b>	Evaluación de la actividad antagónica de metabolitos fungicos volátiles contra <i>Colletotrichum sp.</i> .....	33
<b>5.3.8</b>	Determinaciones analíticas .....	33
<b>5.3.8.1</b>	Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	33

5.3.8.2	Nitrógeno total .....	34
5.4	Procesamiento de los datos.....	35
5.4.1	Recolección.....	35
5.4.2	Elaboración .....	35
5.4.3	Análisis estadístico.....	35
6	Resultados y discusiones .....	36
6.1	Cepas fúngicas viables .....	36
6.2	Cepas fúngicas con actividad antagónica directa frente a <i>Colletotrichum sp.</i> .....	38
6.3	Características de BCAs seleccionados .....	43
6.4	Actividad antagónica de filtrados fúngicos frente a <i>Colletotrichum sp.</i> .....	47
6.4.1	Efectividad antagónica de filtrados fúngicos producidos en condiciones de cultivo optimizadas.....	50
6.4.1.1	Efecto de la agitación y la fotosensibilidad en la producción de filtrados fúngicos...50	
6.4.1.2	Co-cultivo con <i>Colletotrichum sp.</i> en la producción de filtrados fúngicos .....	54
6.4.1.3	Actividad de filtrados fúngicos producidos a diferentes concentraciones de glucosa 57	
6.4.1.4	Actividad de filtrados fúngicos producidos con diferentes fuentes de nitrógeno .....	60
6.4.1.5	Actividad antagónica de filtrados fúngicos obtenidos en diferentes tiempos de cultivo .....	63
6.4.1.6	Actividad antagónica a diferentes concentraciones de los filtrados fúngicos frente a <i>Colletotrichum sp.</i> .....	65
6.4.1.7	Filtrados fúngicos de las cepas <i>Aspergillus sp.</i> CP17 y <i>Penicillium sp.</i> CP34 respecto a su composición química.....	67
7	Conclusiones .....	74
8	Referencias bibliográficas.....	75
9	ANEXOS .....	98



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Producción de mango en Bolivia.....	7
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de fungicidas según su composición .....	13
<b>Tabla 3.</b> Clasificación toxicológica de plaguicidas, según la OMS .....	13
<b>Tabla 4.</b> Mecanismos de acción en el control biológico de fitopatógenos .....	16
<b>Tabla 5.</b> Fenólicos totales presentes en filtrados fúngicos de <i>Aspergillus sp.</i> CP17, <i>Penicillium sp.</i> CP34 y <i>Barkleyanthus salicifolius</i> .....	68
<b>Tabla 6.</b> Actividad enzimática específica de filtrados fúngicos de <i>Aspergillus sp.</i> CP17 y <i>Penicillium sp.</i> CP34 .....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Fenología del mango.....	86
<b>Figura 2.</b>	Relación entre el ciclo de vida <i>Anastrepha fraterculus</i> y la diseminación de <i>Colletotrichum sp.</i> agente causal de la antracnosis. ....	8
<b>Figura 3.</b>	Ciclo de antracnosis en mango.....	10
<b>Figura 4.</b>	Sintomatología de la antracnosis en mango.....	11
<b>Figura 5.</b>	Cepas fúngicas, relación entre cepas fúngicas viables y cepas fúngicas no viables respecto al total .....	37
<b>Figura 6.</b>	Actividad antagónica directa de cepas fúngicas contra <i>Colletotrichum sp.</i> ....	41
<b>Figura 7.</b>	Efecto antagónico de BCAs en hifas de <i>Colletotrichum sp.</i> .....	41
<b>Figura 8.</b>	Características macro-microscópicas de BCAs seleccionados .....	43
<b>Figura 9.</b>	Identificación macro-microscópica de <i>Colletotrichum sp.</i> .....	44
<b>Figura 10.</b>	Cinética de crecimiento de BCAs .....	45
<b>Figura 11.</b>	Cinética de crecimiento de <i>Colletotrichum sp.</i> agente causal de la antracnosis ...	46
<b>Figura 12.</b>	Actividad antagónica de filtrados fúngicos producidos en cultivo batch a.....	48
<b>Figura 13.</b>	Porcentaje de inhibición de filtrados fúngicos producidos por: <i>Aspergillus sp.</i> CP12, CP17 y CP18 contra <i>Colletotrichum sp.</i> .....	52
<b>Figura 14.</b>	Porcentaje de inhibición de filtrados producidos por BCA: <i>Penicillium sp.</i> CP34 contra <i>Colletotrichum sp.</i> .....	53
<b>Figura 15.</b>	Porcentajes de inhibición de filtrados fúngicos producidos por BCAs: <i>Aspergillus sp.</i> CP12, CP17, CP18 y <i>Penicillium sp.</i> CP34 bajo el efecto de co-cultivo.....	55
<b>Figura 16.</b>	Porcentajes de inhibición de filtrados fúngicos producidos por: <i>Aspergillus sp.</i> CP12, CP17 y CP18 contra <i>Colletotrichum sp.</i> durante 15 días de cultivo bajo la influencia de diferentes concentraciones de glucosa,.....	58
<b>Figura 17.</b>	Porcentajes de inhibición de filtrados producidos por BCA: <i>Penicillium sp.</i> CP34 contra <i>Colletotrichum sp.</i> durante 15 días de cultivo, bajo la influencia de diferentes concentraciones de glucosa .....	59

<b>Figura 18.</b> Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno [NH <sub>4</sub> Cl - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - urea] en la actividad antagónica de filtrados fúngicos producidos por <i>Aspergillus sp.</i> CP17 y <i>Penicillium sp.</i> CP34 contra el desarrollo de <i>Colletotrichum sp.</i> ....	61
<b>Figura 19.</b> Relación entre la cinética de crecimiento y la actividad antagónica de filtrados fúngicos de BCAs.....	64
<b>Figura 20.</b> Actividad antagónica de filtrados fúngicos de las cepas <i>Aspergillus sp.</i> CP17, <i>Penicillium sp.</i> CP34 y fungicida agrícola Ramcaf contra el desarrollo de <i>Colletotrichum sp.</i> .....	66
<b>Figura 21.</b> Actividad antagónica de metabolitos volátiles producidos por BCAs frente a <i>Colletotrichum sp.</i> .....	64

## TABLA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Curva de calibración de albúmina sérica bovina, determinación de proteínas solubles totales.....	98
<b>Anexo 2.</b> Curva de calibración de tirosina, determinación de actividad proteolítica.....	98
<b>Anexo 3.</b> Curva de calibración de glucosa, determinación de actividad celulolítica.....	99
<b>Anexo 4.</b> Curva de calibración de N – acetil glucosamina, determinación de actividad quitinolítica.....	99
<b>Anexo 5.</b> Curva de calibración de ácido gálico, determinación de la concentración de grupos fenólicos.....	100
<b>Anexo 6.</b> Codificación de cepas fúngicas .....	101
<b>Anexo 7.</b> Actividad antagónica directa de cepas fúngicas .....	102

## **TABLA DE ABREVIATURAS**

AFP	: Péptido antifúngico.
BCA	: Agente de control biológico.
BSA	: Albumina sérica bovina.
CMC	: Carboximetil celulosa.
CPD	: Caldo papa dextrosa
D.O.	: Densidad óptica.
DNS	: Ácido 3,5 dinitrosalicílico.
DQO	: Demanda química de oxígeno.
Esp/mL	: Esporas por mililitro.
FP	: Fotoperiodo.
Glc	: Glucosa.
LB	: Luz blanca.
LR	: Luz roja.
LA	: Luz amarilla.
LV	: Luz verde.
LP	: Luz violeta.
MIP	: Manejo integrado de plagas.
NAG	: N-acetil glucosamina.
PGPR	: Del inglés plant growth promoting rhizobacteria (rizobacteria promotora del crecimiento vegetal).
PGPF	: Del inglés Plant growth-promoting fungi (hongos promotores del crecimiento vegetal).
pH	: Potencial de hidrogeniones.
PDA	: Agar papa dextrosa.
rpm	: Revoluciones por minuto.

**ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE FILTRADOS FÚNGICOS FRENTE  
A *Colletotrichum sp.*, AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS DEL MANGO  
(*Manguijera indica L.*)**

La agricultura es indispensable para la alimentación. Sin embargo, se encuentra en constante amenaza por enfermedades y plagas, debido al impacto del cambio climático. El cultivo de mango es afectado por enfermedades fúngicas. *Colletotrichum sp.* agente causal de la antracnosis en cultivos agrícolas, disminuye severamente la producción de mango. El control fitosanitario de *Colletotrichum sp.* emplea fungicidas químicos, que generan efectos perjudiciales a la salud humana y ambiental. Por ello, los biopesticidas constituyen una alternativa amigable para el manejo de enfermedades en los cultivos. En el presente estudio se evaluaron 35 cepas fúngicas, de las cuales 4 fueron seleccionadas: *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18, y *Penicillium sp.* CP34, y clasificadas como agentes de control biológico por su actividad antagonica frente a *Colletotrichum sp.* con porcentajes de inhibición superiores al 60%. Además, durante su cultivo producen metabolitos volátiles con actividad antagonica frente a *Colletotrichum sp.* (64 – 69 %). En cultivo líquido, se obtuvieron filtrados fúngicos con actividad antagonica leve (51- 56 %). Sin embargo, a través optimizaciones de condiciones de cultivo [fotoperiodo (12 h/d), agitación (120 rpm) y suplementación del caldo papa con 20 g/L glucosa y 19 g/L de cloruro de amonio] se obtuvieron filtrados fúngicos con actividad antagonica superior contra *Colletotrichum sp.* alcanzando el 88-91 % de inhibición ( $p < 0.05$ , ANOVA). Los filtrados fúngicos de *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34, presentan compuestos fenólicos (32 y 90 mg GAE/mL, respectivamente) y baja actividad enzimática hidrolítica. El presente estudio destaca el aprovechamiento de la diversidad microbiana del altiplano boliviano para el desarrollo de bioinsumos agrícolas como alternativa biológica para el control de enfermedades fúngicas.

**Palabras clave:** *Colletotrichum sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, filtrados fúngicos, actividad antagonica, agentes de control biológico.

**ANTAGONIC ACTIVITY OF FUNGAL FILTRATES AGAINST *Colletotrichum sp.*,  
CAUSAL AGENT OF MANGO ANTHRACNOSIS (*Mangifera indica* L.)**

The impact of climate change, diseases and pests threat agriculture which is essential for food supply. Mango cultivation is affected by fungal diseases. *Colletotrichum sp.* causes the disease anthracnose in agricultural crops and affects severely mango production. Chemical fungicides are used for phytosanitary control of *Colletotrichum sp.* despite of harmful effects on human and environmental health. Therefore, biopesticides are a friendly alternative for managing crops diseases. In this study, 35 fungal strains were evaluated, from which 4 were selected: *Aspergillus sp.* CP12, CP17 and CP18, and *Penicillium sp.* CP34, and classified as biological control agents due to their antagonistic activity against *Colletotrichum sp.* exhibiting an inhibition greater than 60%. In addition, during the cultivation volatile metabolites with antagonistic activity (64 – 69%) against *Colletotrichum sp.* are produced. In liquid culture, fungal filtrates with limited antagonistic activity (51-56%) were obtained. However, through culture conditions optimization [photoperiod (12 h/d), agitation (120 rpm) and addition of 20 g/L glucose and 19 g/L ammonium chloride to potato broth, fungal filtrates with superior antagonistic activity against *Colletotrichum sp.* were obtained reaching 88-91% inhibition ( $p < 0.05$ , ANOVA). Phenolic compounds (32 and 90 mg GAE/mL) and low hydrolytic enzymatic activity were detected in fungal filtrates of *Aspergillus sp.* CP17 and *Penicillium sp.* CP34. This study reveals the potential of the microbial diversity for developing bioinputs to be employed as biological agents against fungal diseases of mango crops.

**Keywords:** *Colletotrichum sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, fungal filtrates, antagonistic activity, biological control agents.

## 1 Planteamiento del problema

Según “The Economist” hasta marzo del 2000, desde 1960 la población humana, había incrementado un 90%, mientras que la producción agrícola un 25%, estos datos señalaban que la producción agrícola debía de incrementar un 39% considerando un incremento de 1.5 millones de personas hasta el año 2020 para lograr cubrir la demanda alimenticia. Sin embargo, el incremento de la producción agrícola es limitada por la presencia de plagas y enfermedades en cultivos, siendo que estas ocasionan pérdidas anuales del 42% en todo el mundo (Fermin et al., 2000). En Bolivia, la producción agrícola se duplicó en las dos últimas décadas (INE, 2019), no obstante el rendimiento productivo de los cultivos es limitado por enfermedades y plagas. Entre estos, los cultivos frutícolas son los más propensos a sufrir el ataque de patógenos como insectos, nemátodos, virus, bacterias y hongos, siendo que los patógenos fúngicos poseen un mayor impacto sobre los cultivos al distribuirse en mayores áreas (Khazada et al., 2018).

La antracnosis es una fitoenfermedad que provoca extensas pérdidas económicas, por la infección de hongos del género *Colletotrichum* que afecta a un número importante de hortalizas, legumbres, cereales y muchos cultivos tropicales en todo el mundo (Arauz, 2000; Gutiérrez-Alonso et al., 2001; Hoz et al., 2016; Khazada et al., 2018; F. Liu et al., 2016). Habitualmente, su control es realizado al emplear plaguicidas químicos como los fungicidas; sin embargo, se conoce que su vasto e irracional uso ocasiona efectos nocivos en contra de la salud humana, animal y ambiental (OMS, 2016), además de contribuir al desarrollo de resistencia contra estos por parte de patógenos vegetales que termina por limitar más el rendimiento productivo de los cultivos y afectando a la economía de productores y consumidores.

Todo lo anteriormente mencionado repercute en una problemática y crea la necesidad de desarrollar alternativas amigables para el control de plagas y enfermedades. Entre estas el control o regulación biológica es una alternativa planteada desde hace mucho tiempo, que implica el uso de enemigos naturales o el de sus metabolitos bioactivos en el control de plagas y enfermedades, al poseer la habilidad de suprimir el desarrollo de plagas (Driesche et al., 2007; Hoyos, 2011; Narayanasamy, 2013). En Bolivia, el control biológico es un término poco conocido por la población agricultora (FUNDESNAP, 2012). Por ello, hoy en día se realizan estudios en el desarrollo de bioplaguicidas a partir de metabolitos bioactivos de



microorganismos y plantas que puedan suprimir el desarrollo de patógenos vegetales, constituyendo una alternativa innovadora y específica.

### **1.1 Justificación**

La alta distribución de plagas en cultivos de interés económico es una problemática que compromete a la seguridad alimentaria, llegando a provocar pérdidas significativas en el rendimiento productivo y, por ende, estableciendo una limitante en la producción agrícola. Los fitopatógenos como *Colletotrichum sp.*, hongo de distribución cosmopolita, afectan a un número importante de cultivos en todo el mundo, de los cuales el cultivo de mango es uno de los más afectados efectuando pérdidas entre el 40 y 60%, y de hasta del 90% en caso de no seguir un control fitosanitario eficaz. *Colletotrichum sp.* es el agente causal de la antracnosis, una fitoenfermedad que se caracteriza por desarrollar manchas foliares y la momificación de inflorescencias y de frutos, disminuyendo la calidad y el rendimiento productivo de los cultivos.

En Bolivia, a través de estudios enfocados en fitoenfermedades que afectan al cultivo de mango, se logró aislar e identificar a *Colletotrichum sp.* como el agente causal de la antracnosis y de ser responsable en ocasionar el 70% de pérdidas anuales del fruto (Barrientos Vera et al., 2014; Gonzales, 2014). Del mismo modo, también se lo ha identificado en cultivos de tarwi (*Lupinus mutabilis*), cacao (*Theobroma cacao*) (Tenorio Pari et al., 2017) y otros cultivos. La propagación de este patógeno es favorecido por factores abióticos (condiciones ambientales) y factores bióticos (organismos como la mosca de la fruta) (Arauz, 2000; Dodd et al., 1991). El control de la antracnosis se basa en el empleo de agentes químicos como los fungicidas (Rivas & Carrizales, 2007). Sin embargo, estos pueden llegar a ser nocivos para la salud humana, animal y ambiental por su excesivo uso (Larrea Poma et al., 2010; OMS, 2016). Asimismo, existen reportes que indican la disminución de la efectividad de diferentes fungicidas en el control de *Colletotrichum sp.* y otros fitopatógenos.

Existen prácticas alternativas al control químico, estas se basan en el control cultural, mecánico, etológico y biológico. De este último, se ha impulsado el estudio de microorganismos, siendo que muchos de ellos son productores de una amplia variedad de metabolitos con actividad biológica (Atlas & Bartha, 2002; Hoyos, 2011; Narayanasamy, 2013). Por lo cual, el desarrollo de esta área permitirá en el futuro próximo, reducir las pérdidas y mejorar el rendimiento

productivo de cultivos de interés económico. En ese sentido, esta investigación evaluó la producción de metabolitos bioactivos empleando cepas fúngicas con actividad inhibitoria frente al desarrollo del fitopatógeno *Colletotrichum sp.*, agente causal de la antracnosis en el mango.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

Evaluar condiciones de cultivo de cepas fúngicas con la finalidad de incrementar la producción de metabolitos bioactivos con actividad antagonica frente a *Colletotrichum sp.*, agente causal de la antracnosis en cultivos de mango.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Seleccionar cepas fúngicas como agentes de control biológico de *Colletotrichum sp.*
- Optimizar condiciones fisicoquímicas durante el cultivo para la producción de filtrados fúngicos con actividad antagonica contra *Colletotrichum sp.*, empleando agentes de control biológico seleccionados.
- Identificar componentes activos de filtrados fúngicos con actividad antagonica frente a *Colletotrichum sp.*

## **2 Diseño teórico**

### **2.1 Marco referencial**

#### **2.1.1 Antecedentes generales sobre el problema en estudio**

Bolivia, cuenta con una amplia diversidad de ecosistemas que permite el cultivo de cereales, frutales, hortalizas, oleaginosas, tubérculos y forrajes (Zeballos, H., 2006). No obstante, el rendimiento productivo de cultivos puede ser afectado por la presencia de plagas y enfermedades, durante diferentes etapas de desarrollo, que como consecuencia provoca pérdidas económicas significativas (Gonzales, 2014). Entre los patógenos que provocan enfermedades en los cultivos, los hongos son conocidos como los principales agentes causales, al ser favorecidos por su oportuna adaptabilidad climática y variabilidad genética (Dodd et al., 1991). Asimismo, cabe notar que los cultivos frutícolas son más susceptibles a sus ataques, entre los cuales están: *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, *Oidium sp.*, *Monilia sp.*, *Botrytis cinérea* (Coca, 2011), *Mycosphaerella sp.*, *Cercospora sp.*, *Phytophthora sp.* (Chávez et al., 2014), *Fusarium sp.*, *Pestalotia sp.* y *Colletotrichum sp.* (Mamani, et al., 2018). El control de estos patógenos se basa en el empleo de fungicidas químicos, que debido a la ausencia de información y

capacitación, su vasto uso ha generado una problemática que repercute en la salud humana y ambiental (Larrea Poma et al., 2010; OMS, 2016). Aparte de afectar a la economía de productores y consumidores, generando un impacto social, lo que conlleva a la búsqueda de soluciones alternativas, sostenibles y saludables.

En los últimos años, el control biológico mediado por microorganismos beneficiosos ha sido considerado como un elemento importante en las estrategias integradas de manejo de enfermedades (Latz et al., 2018). Diferentes estudios han demostrado que las plantas pueden desarrollar asociaciones con microorganismos para su propio beneficio, donde estos llegan a colonizar la superficie de la planta o interactúan con sus raíces a través del suelo, entre los microorganismos mayormente empleados y estudiados se encuentran las bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas*. Por otro lado, diferentes estudios han demostrado la capacidad y el gran potencial de los hongos para efectuar un control biológico sobre las enfermedades al emplear distintos mecanismos de acción frente a patógenos, de este grupo el hongo más estudiado es *Trichoderma spp.*, conocido también como un agente promotor de crecimiento vegetal. Del mismo modo, estudios también han destacado a hongos filamentosos que a diferencia del género *Trichoderma* no han sido estudiados a gran profundidad y que serían de interés para el estudio y producción de metabolitos antifúngicos (Nicoletti et al., 2007).

### **2.1.2 Descripción del ámbito de estudio**

El cambio climático es uno de los mayores problemas globales que enfrenta nuestro medio (Garitano-Zavala, 2016). Problemática que repercute en los ciclos naturales de los ecosistemas, provocando alteraciones en la precipitación, la temperatura y la distribución de fitopatógenos en cultivos agrícolas (FAO, 2008a; Hódar et al., 2012). A ello se compromete el generar respuestas adecuadas a nuestras propias condiciones políticas, económicas y culturales. El estudio de alternativas tecnológicas sostenibles, basadas en la producción de insumos agrícolas como los bioplaguicidas y biofungicidas contribuirá al desarrollo productivo y tecnológico de nuestro país. Los bioplaguicidas y biofungicidas formulados a partir de metabolitos bioactivos de microorganismos y plantas, poseen ventajas que son valoradas en el sector agrícola, al ser biodegradables y no dejar residuos nocivos en el suelo o en los frutos. Así también, estos se

destacan al ser específicos y al no intervenir sobre la población de organismos benéficos (Atlas & Bartha, 2002; Chávez et al., 2014; Hoyos, 2011).

Por tanto, el presente estudio evalúa la actividad antagónica de metabolitos producidos por cepas fúngicas, con la finalidad de proponer formulaciones que puedan ser empleadas como bioinsumos agrícolas, para reducir el desarrollo de fitopatógenos, como *Colletotrichum sp.* agente causal de antracnosis en cultivos de mango y a su vez reducir el uso de pesticidas.

## **2.2 Marco teórico**

### **2.2.1 Cultivo de mango**

#### **2.2.1.1 Aspectos generales del cultivo de mango**

El mango (*Mangifera indica* L.), es un frutal originario del sudoeste asiático, según Galán Sauco, (2009) la clasificación taxonómica del mango corresponde a:

**Reino:** *Plantae*,  
**División:** *Magnoliophyta*,  
**Clase:** *Magnoliopsída*,  
**Subclase:** *Rosidae*.  
**Orden:** *Sapindales*.  
**Familia:** *Anacardiaceae*.  
**Género:** *Mangifera*.  
**Especie:** *Mangifera indica* L.

El cultivo de mango se origina en el trópico de la India, pero ha llegado a ser adaptado y naturalizado a climas subtropicales a consecuencia de los movimientos migratorios de la población humana, siendo considerado como un fruto importante en la dieta de diferentes culturas (Yadav & Singh, 2017). Los árboles de mango pueden llegar a medir entre los 30 y 40 metros de altura, con una copa densa conformada por hojas perennes de color verde claro a rojo o púrpura al brotar y que gradualmente se tornan de color verde oscuro, su sistema radicular se caracteriza por ser profundo y fuerte, llegando a alcanzar 10 metros de radio desde el tronco permitiéndole resistir a temporadas secas (Galán Sauco, 2009; Yadav & Singh, 2017).

#### **2.2.1.2 Fenología del cultivo de mango**

La fenología del cultivo de mango, está sujeto a condiciones ambientales, siendo que su desarrollo puede ser influenciado por factores abióticos (radiación, precipitación y temperatura), llegando a tolerar temperaturas de 15 a 50°C (Ramírez et al., 2014). Su desarrollo presenta tres

etapas de crecimiento vegetativo y una etapa de crecimiento reproductivo (fig. 1), que incluye el desarrollo foliar (brotación de hojas jóvenes); la aparición de inflorescencias o panículas terminales; la floración (unión de gametofitos masculinos y femeninos) asistida por polinizadores (insectos y aves) y el desarrollo del fruto, proceso que suele durar 180 días hasta su cosecha (Galán Sauco, 2009; Hernández Delgado et al., 2011; Ramírez et al., 2014).



**Figura 1. Fenología del cultivo de mango.** A. Brotación; B. Floración; C. Cuajado, formación de canicas; D. Desarrollo del fruto; E. Maduración del fruto; F. Fruto maduro. Adaptado de “Phenological growth stages of mango (*Mangifera indica* L.) according to the BBCH scale”, Hernández, P., 2011, *Scientia Horticulturae*, , 1(30), 536–540.

### 2.2.1.3 Propiedades nutricionales del mango

El mango es un fruto tropical de mayor producción en el mundo, con una producción anual de 27 millones de toneladas, seguido del banano, piña, papaya y palta (FAO, 2008b). Desde el punto de vista nutricional, el mango es una fuente significativa de fibra (pectinas), ácidos orgánicos (ácido cítrico y ácido málico), vitaminas y compuestos polifenólicos (taninos) de carácter antioxidante (Corrales-Bernal et al., 2014; Robles-Sánchez et al., 2009). En base a lo anteriormente mencionado, diferentes estudios proponen la industrialización del mango, considerando a esta ecoeficiente y sostenible, generando productos de valor agregado a partir de la materia prima (cáscara, pulpa y hueso) que habitualmente suele pasar como desecho (Sumaya-Martínez et al., 2012).

El mango, puede ser aprovechado como fuente de ingredientes de alimentos funcionales para controlar niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos (Ajila et al., 2008; Schieber et al., 2003) o como ingredientes de cosméticos, puesto que los aceites obtenidos del hueso son ricos en ácidos grasos poliinsaturados con propiedades emolientes, regeneradoras, antimicrobianas y nutritivas (Engels et al., 2009; F.-X. Liu et al., 2013).

### 2.2.1.4 Producción de mango en Bolivia

En el 2010, Bolivia ocupó el puesto 93 de los 115 países exportadores de mango (IBCE, 2011). Según la Encuesta Nacional Agropecuaria del 2008, la superficie destinada para el cultivo de mango fue de 1164 hectáreas, con un rendimiento de 9033 toneladas métricas del fruto (INE, 2009), siendo cultivado en siete departamentos (tabla 1). Las variedades cultivadas de mango se basan en el mango criollo, manga piña, manga papaya y manga cruceña (Aparicio & Díaz, 2015), cuya cosecha es realizada entre los meses de septiembre a enero (Montes, 2005).

**Tabla 1. Producción de mango en Bolivia**

Departamento productor	Área de cultivo destinada en hectáreas (ha)
La Paz	417
Cochabamba	290
Santa Cruz	208
Beni	104
Pando	78
Chuquisaca	39
Tarija	28

Adaptado de “Sistema de producción del cultivo de mango en el municipio de Irupana”, Aparicio, J., 2015, *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 2(1), p.98.

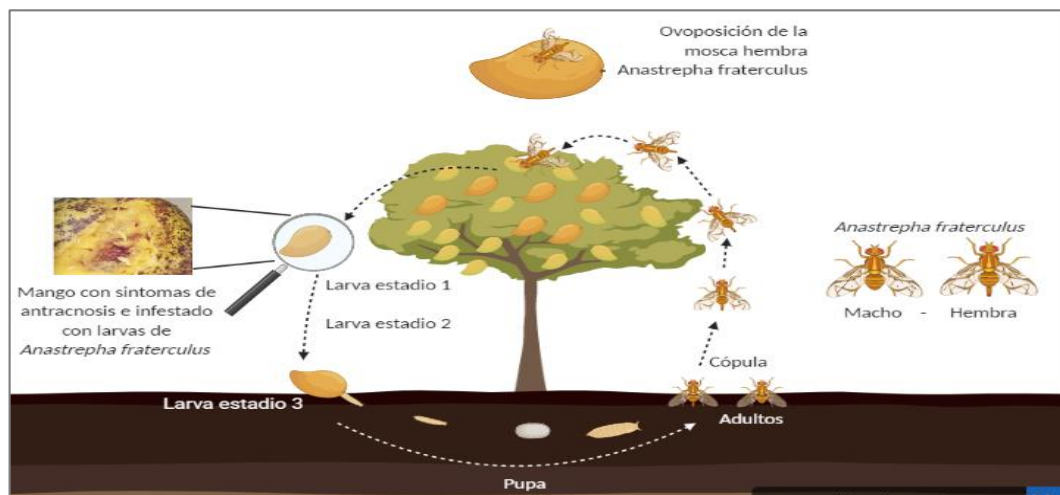
En el Departamento de La Paz, la población productora mayoritaria de mango, se sitúa en el municipio de Irupana, provincia Sud Yungas (Aparicio & Díaz, 2015; Gonzales, 2014). Asimismo, en la última década, el gobierno a través de instituciones como SENASAG y FONADIN ha planteado promover y apoyar la producción de mango a través de talleres de capacitación en el control integrado de plagas y en el manejo del producto con la finalidad de mejorar la calidad y el rendimiento productivo (Aparicio & Díaz, 2015; Senasag, 2016).

### 2.2.2 Plagas y enfermedades que afectan al cultivo de mango

El mango es un cultivo que es afectado por diferentes enfermedades y plagas a lo largo de su desarrollo, durante la pre y post cosecha (Mulkay, 2010). La enfermedad que llegue a desarrollarse puede ser potencializada por la ausencia de nutrientes, estrés fisiológico (Agrios, 1995), alta incidencia de agentes patógenos y cambios drásticos en el medio (factores abióticos), fortaleciendo la sintomatología de la enfermedad. Entre los agentes patógenos que afectan a plantas destacan los insectos, bacterias y hongos; en el caso del cultivo de mango, este es atacado por patógenos microbianos como *Colletotrichum gloeosporioides* Penz agente causal de la antracnosis (Arauz, 2000), *Fusarium mangiferae* causante de la escoba de bruja (Steenkamp

et al., 2000), *Oidium mangifera* Bretel causante del oídio o ceniza (J. A. Tores, 1997), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causante de la necrosis apical (J. Tores et al., 2016), *Dothiorella dominicana* causante de la podredumbre y gomosis del ápice (González-Fernández & Hormaza, 2005), *Xanthocones campestris* causante de la mancha bacteriana (Manicom, 1986), *Alternaria* sp., *Ceratocystis fimbriata*, *Phytophthora infestans* y *Cladosporium tenuissimum* causantes de la mancha negra (Galan Sauco, 2009).

Asimismo, el cultivo de mango también es atacado por plagas como *Aulacaspis tubercularis* (cochinilla del mango) que afecta al fruto (Noriega et al., 2016), *Cryptorhynchus mangiferae* que afecta a la raíz del árbol (Morimoto, 1978), *Anastrepha fraterculus* y *Ceratitis* sp. ambas moscas de la fruta. Adicionalmente, estudios recientes señalan la importancia de la relación entre *Colletotrichum* sp. y *Anastrepha fraterculus*, ya que esta última participaría en la diseminación de conidios de *Colletotrichum* sp. en los frutos durante su maduración al cumplir su ciclo biológico (fig. 2).



**Figura 2** Relación entre el ciclo de vida *Anastrepha fraterculus* y la diseminación de *Colletotrichum* sp. agente causal de la antracnosis. Elaborado con BioRender con adaptaciones de “Manejo y Control de Moscas de la Fruta” de Vilatuña, J., 2010, p. 3, Quito, Ecuador: Agrocalidad

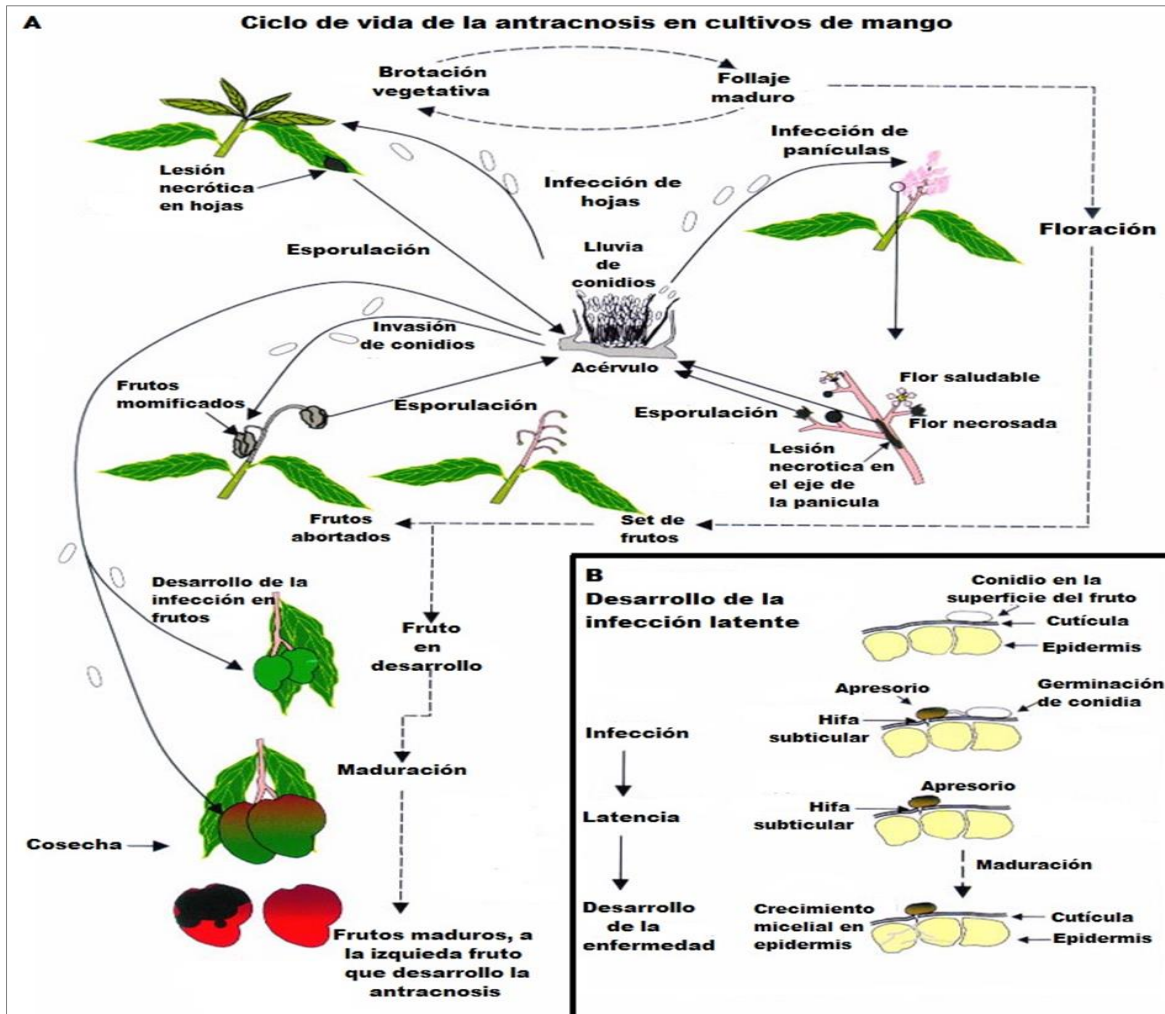
La diseminación de conidios de *Colletotrichum* sp., por *Anastrepha fraterculus* involucra a la mosca hembra que se diferencia de la mosca macho al poseer un oviscapto empleado para la ovoposición de sus huevos en frutos. La infección de los frutos con *Colletotrichum* sp. se da cuando la mosca posa sobre frutos enfermos y sanos, en esta acción esta transporta conidios en sus patas. La penetración de la epidermis con su oviscapto facilita la germinación y desarrollo

hifal del conidio (Galan Sauco, 2009). Por último, cabe destacar que la presencia de agentes patógenos en los cultivos de mango, no solo implica perjuicios en el sector agrícola; sino también en la salud pública, debido a que muchos de estos agentes y en especial patógenos fúngicos, poseen la capacidad de producir una variedad de metabolitos nocivos para la salud humana como las micotoxinas que son responsables de provocar alergias e inducir afecciones graves como el cáncer.

### **2.2.2.1 Antracnosis y agente causal**

La antracnosis es una fitoenfermedad que provoca pérdidas económicas significativas por la disminución de la producción, al afectar y ocasionar lesiones necróticas en hojas, ramas, inflorescencias y frutos (Dodd et al., 1991). Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Almeida en 1899 en Portugal. Y es ocasionada por diferentes especies de *Colletotrichum* que abarcan alrededor de 600 especies y que afectan a más de 3000 especies de plantas silvestres y cultivos en zonas tropicales, subtropicales y templadas (Hoz et al., 2016). El ciclo de vida de *Colletotrichum sp.* comprende de dos fases, una fase sexual y otra asexual, que combinadas favorecen su dispersión y patogenicidad, en función a su variabilidad genética (Kim et al., 1998). El ciclo inicia por la esporulación y contaminación de conidios por acérvulos de *Colletotrichum sp.* (fig. 3A) en frutos momificados hacia hojas jóvenes, inflorescencias y frutos sanos. Las lesiones en hojas, inician con una pequeña mancha angular de color grisáceo a negruzco, que se amplía a extensas áreas, produciendo necrosis vegetal e induciendo su caída temprana durante la época seca (Arauz, 2000).

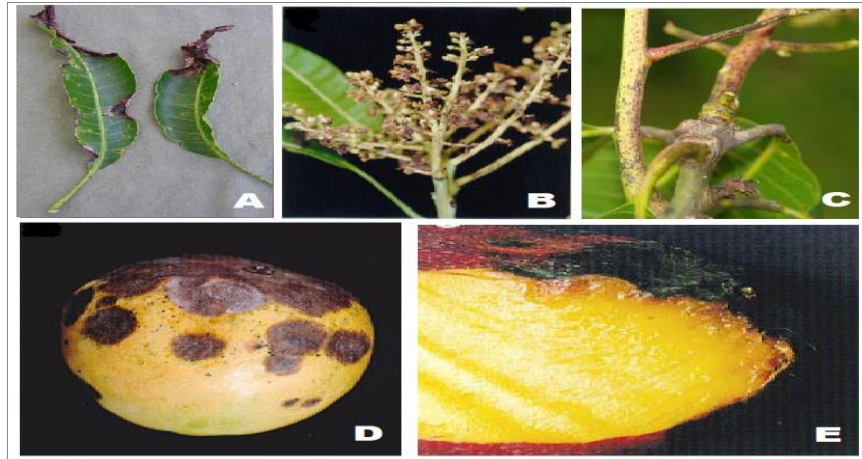




**Figura 3.** Ciclo de antracnosis en mango. **A.** Ciclo de vida de la antracnosis; **B.** Desarrollo de infección latente. Las líneas continuas representan el ciclo de la enfermedad, las líneas punteadas representan la fenología del mango. Recuperado de "Mango Antracnose: Economic Impact and Current Options for Integrated Management", Arauz, L., 2000, *Plant Disease*, 84(6), p. 603

Cuando la infección llega a inflorescencias (panículas), impide la floración provocando la necrosis del tejido e induce la marchitez de flores y aborto de frutos (Gutiérrez-Alonso et al., 2001). El fruto es infectado mientras permanece inmaduro (infección latente); inicialmente, los conidios de *Colletotrichum sp.* se fijan a la superficie inmadura del fruto, formando una capa mucilaginosa compuesta por polisacáridos y glucoproteínas (fig. 3B). La germinación de los conidios es favorecida por ceras epicuticulares y el etileno del hospedante, coincidiendo con la maduración del fruto e induciendo la formación de un apresorio que se caracteriza por su estructura asimétrica con un domo superior melanizado y una región basal plana que contiene un conducto para la penetración de hifas a través de la cutícula y células epidérmicas del fruto.

La formación del conducto, involucra la fuerza mecánica a través de la alta presión de turgencia, así como la acción enzimática mediante la secreción de enzimas degradadoras (Ploetz, 2008; E. S. Rodríguez-López et al., 2009). La infección es detenida por la secreción de sustancias antifúngicas del árbol (infección latente), pero continua cuando el fruto entra en proceso de maduración cuando se reducen las sustancias antifúngicas.



**Figura 4.** Sintomatología de la antracnosis en mango. **A.** Necrosis y marchitez de hojas; **B.** Marchitez de panículas; **C.** Necrosis en ramas y brotes; **D.** Necrosis en fruto maduro y **E.** lesiones en la pulpa del mango. Adaptado de “Mango Anthracnose: Economic Impact and Current Options for Integrated Management”, Arauz, L., 2000, *Plant Disease*, 84(6), p. 602-603

La sintomatología de la antracnosis se caracteriza por la aparición de manchas necróticas y la marchitez de hojas, ramas, panículas y frutos (fig. 4). En los frutos, se suele observar lesiones necróticas en la superficie, siendo más comunes en el final del tallo y el ápice del fruto; asimismo, estas pueden llegar a afectar la pulpa (mesocarpio), contribuyendo a la descomposición completa del fruto (Arauz, 2000; Ploetz, 2008; E. S. Rodríguez-López et al., 2009).

#### **2.2.2.2 Pérdidas de producción agrícola por *Colletotrichum sp.***

La antracnosis ocasiona la disminución del rendimiento productivo de los frutos hasta un 90 % en diferentes países, afectando significativamente a la economía de éstos (É. S. Rodríguez-López et al., 2013). Adicionalmente, esta puede transmitirse a otros cultivos e inducir mayores pérdidas (Arias Rivas & Carrizales, 2007; Dodd et al., 1991). Por otro lado, diferentes estudios han observado que la infección con *Colletotrichum sp.* y el desarrollo de la antracnosis en pre- y post cosecha no solo afecta el rendimiento agrícola del fruto, sino también la comercialización del producto, siendo que el desarrollo de la enfermedad continúa durante el transporte y

almacenamiento; además de transmitirse a frutos sanos, repercutiendo en su calidad y en el cumplimiento de las normas de calidad para su exportación (Arauz, 2000; Ploetz, 2008).

En Bolivia, la población que reside en el municipio de Irupana, Departamento de La Paz, llega a perder cerca del 70 % de sus cosechas de mango a causa de enfermedades como la antracnosis, escoba de bruja, mancha foliar y mancha negra, siendo causadas por *Colletotrichum sp.*, *Fusarium verticillioides*, *Pestalotia sp.* y *Alternaria sp.*, entre otras (Mamani, et al., 2018). Asimismo, se ha detectado la presencia de plagas como la mosca de la fruta (Gonzales, 2014). Este escenario, es común en otras zonas productoras del país, pese a que se utilizan diferentes técnicas para su control. En el 2010, las exportaciones bolivianas de mango y mangostanes frescos o secos a Estados Unidos y Países Bajos, alcanzó un total de 14,504.00 USD, las perspectivas de mercados potenciales para la exportación de mango se basan en el rendimiento agrícola anual (IBCE, 2011), para ello, se deben diseñar y aplicar estrategias que combinen técnicas de control integrado de plagas para disminuir pérdidas durante la pre-y post cosecha del fruto.

### **2.2.3 Control de plagas y enfermedades**

El control de plagas y enfermedades en los cultivos, implica el uso de estrategias que las minimicen, y estas habitualmente se basan en el enriquecimiento del suelo (empleo de fertilizantes), riego, poda de hojas y ramas enfermas, trampas contra la población de plagas y la aplicación de plaguicidas, entre otros (FUNDESNAP, 2012). La Organización Mundial de la Salud define a los plaguicidas como: sustancias destinadas a la prevención y control de plagas, incluyendo vectores de enfermedades de origen humano o animal (World Health Organization & Programme, 1990). Los plaguicidas y fungicidas, empleados en el control químico suelen estar constituidos por uno o más ingredientes activos de origen inorgánico u orgánico, que pueden variar de acuerdo a su composición (tabla 2).

**Tabla 2. Clasificación de fungicidas según su composición**

<b>Clasificación</b>	<b>Ingredientes activos</b>
<b>Metoxiacrilatos</b>	Azoxistrobina
<b>Triazoles</b>	Epoxiconazole, ciproconazole, difenoconazole, propiconazole, fenbuconazole, flutriafol, tebuconazole, Flusilazole.
<b>Derivados del benceno</b>	Clorotalonil
<b>Ditiocarbamatos</b>	Mancozeb
<b>Bencimidazoles</b>	Carbendazim, tiabendazol, metil tiofanato.

Adaptado de “Apuntes sobre fungicidas”, Vivienne, G. Recuperado de [http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/Apuntes\\_Fungicidas](http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/Apuntes_Fungicidas).

Del mismo modo, los plaguicidas pueden clasificarse según su comportamiento con las plantas: contacto directo, cuando son aplicados sobre el cultivo y previenen infecciones; plaguicidas sistémicos, cuando son absorbidos y acoplados al sistema vascular de la planta. Existe también otra clasificación de acuerdo a su grado de toxicidad (tabla 3) sobre la salud humana, empleando diferentes bandas de colores para diferenciarlos (Bascopé Zanabria et al., 2019).

**Tabla 3. Clasificación toxicológica de plaguicidas, según la OMS**

<b>Banda de toxicidad (color de etiqueta)</b>	<b>Grado de toxicidad</b>
Red	Ia Extremadamente tóxico
	Ib Altamente tóxico
Ambar	II Moderadamente tóxico
Azul	III Ligeramente tóxico
Verde	IV Precaución

Adaptado de “The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification” de World Health Organization & International Programme on Chemical Safety, 2010.

La importancia del conocimiento de la toxicidad de plaguicidas, se basa en la precaución para limitar su uso y prevenir intoxicaciones humanas; además de la contaminación de suelos y cuerpos de agua. Existen estudios que evidencian los efectos que estos ocasionan en la salud humana al ser acumulados en el organismo, ocasionando intoxicaciones que comprometen daño cardiovascular, renal, hepático, efectos cancerígenos y problemas a nivel del SNC, entre otros. Además, reportes de su efecto sobre poblaciones microbianas y organismos del suelo (Vargas M. & Ubillo F., 2001) interrumpiendo los ciclos biogeoquímicos que aportan los elementos vitales en el suelo e induciendo su infertilidad y erosión (FAO, 2017).

### **2.2.3.1 Uso de agentes químicos en Bolivia**

Durante las dos últimas décadas, Bolivia ha cuádruplicado la importación de plaguicidas de 10 mil toneladas en el 2004 a 40 mil toneladas en el 2016, obteniendo aun así un rendimiento agrícola por debajo del 20 % (Arestegui, 2019). El uso excesivo de estos productos ha repercutido sobre la salud pública y la contaminación ambiental. Reportes indican que, de 229 plaguicidas registrados, 164 (72%) son altamente tóxicos, 105 son prohibidos en otros países y 75 no permitidos en la Unión Europea (Chuquimia, 2018; FUNDESNAP, 2012).

### **2.2.3.2 Agentes químicos para el control de la antracnosis**

El uso de fungicidas químicos para el control de la antracnosis en cultivos de mango, se basa en la prevención de la aparición de la sintomatología (Mc Grath, 2014). Entre los fungicidas más comunes para el control de la antracnosis se encuentran: como principio activo el Benomil en Benomil 50WP® y Bezil 50WP®, fungicida sistémico de categoría II; carboxamida en Captan®, que inhibe la germinación y desarrollo micelial de esporas, como fungicida de contacto de categoría III; Carbendazim en Bavistin 500® y Derosal 500® que inhibe el desarrollo de los tubos germinativos, la formación de apresorios y el crecimiento del micelio, fungicida de contacto de categoría III; Mancozeb en Manzate 200®, Maneb® y Dithane M-45® de categoría III, que inactiva grupos sulfhidrilo de aminoácidos y enzimas provocando alteraciones en el metabolismo (Liñan, 2018); Azoxystrobin en Amistar 50® fungicida sistémico de categoría IV, que inhibe la germinación de esporas y crecimiento del micelio; metalaxyl en Ridomil®, fungicida sistémico de categoría III que inhibe la síntesis de proteínas e interfiere en la síntesis de ARN ribosomal; y los compuestos de cobre como la Pasta Bordelesa y Ramcaf® con oxiclورو de cobre como principio activo, que inhibe la germinación y desarrollo de esporas (Agrios, 1995).

En Bolivia, según estudios realizados por Barrientos Vera et al., (2014), los fungicidas más utilizados en el control de la antracnosis incluyen el uso de Ridomil®, Antracol® (principio activo ditiocarbamato) y Ramcaf®. Sin embargo, estudios recientes demuestran la generación de resistencia de *Colletotrichum sp.* hacia estos fungicidas a consecuencia de sus excesivas aplicaciones en cultivos, lo cual beneficia la diseminación de la antracnosis. Ante esta problemática, se crea la necesidad de desarrollar otras alternativas amigables en el control de plagas y enfermedades.

#### **2.2.4 Control biológico de plagas y enfermedades que afectan a cultivos agrícolas**

El control o regulación biológica, fue definido por primera vez en 1919 por Smith como: la introducción de enemigos naturales a una nueva zona con el objetivo de controlar determinadas plagas. Esta definición fue modificada por la Organización Internacional de Lucha Biológica a: la utilización de organismos vivos, o sus productos, con el fin de controlar los daños causados por organismos nocivos (Perez, 2004). De tal manera, que hoy en día el control biológico emplea a organismos como bacterias, hongos, nematodos e insectos como agentes de control biológico (BCAs) en el control de plagas y enfermedades en cultivos. Asimismo, los BCAs también incluye a compuestos de origen natural, como extractos vegetales y metabolitos de microorganismos, ya que poseen efectos nocivos sobre el desarrollo de patógenos y disminuyen los daños en tejidos vegetales (Ehlers, 2011; Narayanasamy, 2013).

Habitualmente, los BCAs suelen ser aislados del suelo y de tejidos vegetales (raíz, tallos, hojas y frutos) (Azcón-Bieto & Talón, 2013). Y su introducción en cultivos agrícolas puede ser realizado a través de: *i*) la inoculación inundativa, que implica su aplicación en altas concentraciones y *ii*) la inoculación aumentativa, que implica aplicaciones seguidas en menores concentraciones para fortalecer la población de BCAs en el suelo (Cook et al., 1996). A diferencia de los plaguicidas, los BCAs son considerados como una práctica amigable en el control de plagas y enfermedades, debido a que posee mayores ventajas como la especificidad al no ser perjudicial con organismos benéficos, ser complejos y tener menor riesgo en el desarrollo de resistencias. Por ello, los BCAs tienen el potencial de desempeñar un papel importante en el control de plagas y enfermedades al ser una práctica sostenible y ambientalmente segura. Además de permitir un mayor aprovechamiento y conocimiento de la biodiversidad microbiana (Narayanasamy, 2013).

##### **2.2.4.1 Mecanismos de acción antagónicos desarrollados por BCAs microbianos**

Los BCAs son organismos que al interactuar con agentes patógenos activan diferentes modos y mecanismos de acción para suprimir e inhibir el desarrollo del agente patógeno (Costa et al., 2019). Por lo cual, para una comprensión mejorada, estos han sido clasificados en dos tipos de antagonismo: directo e indirecto; involucrando a una variedad de metabolitos antagónicos. El antagonismo directo resulta del contacto físico y del grado de selectividad de los BCAs por los patógenos. Al desarrollar mecanismos de acción como el hiperparasitismo y la hipovirulencia.

Mecanismos que se caracterizan por la secreción de enzimas líticas para la digestión de estructuras celulares (hiperparasitismo) (Bowman & Free, 2006), la competición (espacial y nutritiva) (Di Francesco et al., 2016) y la producción de sideróforos (quelación de Fe<sup>2+</sup>) (hipovirulencia) (Cano, 2011; Hoyos, 2011; Junaid et al., 2013).

Por otro lado, el antagonismo indirecto resulta de una interacción no física que principalmente se basa en la secreción de sustancias tóxicas para el patógeno y amigables para las plantas. Por ejemplo, bacterias del género *Bacillus* sintetizan lipopéptidos (iturinas, fengicinas y surfactinas) que interrumpen la fluidez de la membrana plasmática y que provocan su ruptura (Villarreal-Delgado et al., 2018). El favorecimiento con las plantas, se basa en la promoción del crecimiento al producir estructuras análogas a fitohormonas, vitaminas e inductores de resistencia sistémica que fortalecen el desarrollo y reducen la susceptibilidad a patógenos (Cano, 2011; Leal-Almanza et al., 2018; Villarreal-Delgado et al., 2018).

**Tabla 4. Mecanismos de acción en el control biológico de fitopatógenos**

<b>Tipo de antagonismo</b>	<b>Modo</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>BCA</b>
<b>D I R E C T O</b>	<b>Depredación</b>	Consumo de la presa	Nematodos depredadores
	<b>Parasitismo *</b>	Dstrucción del patógeno por simbiosis	Microorganismo productor de enzimas líticas
	<b>Hipovirulencia *</b>	Silenciamiento de virulencia	Microorganismos o fagos
		Quelación y secuestro de hierro	Sideróforos, quelantes producidos por microorganismos
		Ocupación física del nicho	BCA competidores
<b>I N D I R E C T O</b>	<b>Inhibición</b>	Antibiosis	Producción de sustancias antifúngicas y antibacterianas
	<b>Favorecimiento de la planta</b>	Resistencia sistémica inducida	Moléculas análogas a fitocomponentes
		Mejoramiento del estado nutricional por incremento en la disponibilidad de nutrientes	Sideróforos, quelantes, ácidos orgánicos producidos por microorganismos
		Estimulación del crecimiento vegetal	Fitohormonas de origen biológico

\*Mecanismos de acción que actúan de manera directa e indirecta en el control de fitopatógenos. Adaptado de Hoyos, 2011.

Comprender como funcionan los BCAs facilita la optimización del control y a detectar cepas eficientes. Estudios de co-cultivo como el enfrentamiento dual permiten observar la reacción de interacción entre BCAs y patógenos, permitiendo observar la actividad antagónica (con indicios de diferentes mecanismos antagónicos) y de seleccionarlos como potenciales BCAs (Baron et al., 2019; Köhl et al., 2019). De tal modo, que se ha desarrollado escalas para clasificar su efecto en patógenos (Bell et al., 1982).

#### **2.2.4.2 Hongos como agentes de control biológico**

En la actualidad numerosos estudios han reportado a hongos como BCAs por su capacidad de desarrollar diversos modos y mecanismos de acción ya mencionados (Butt et al., 2018). Entre los microorganismos de origen fúngico más destacados como BCAs se encuentra el género *Trichoderma* que posee actividad antagónica contra numerosos patógenos de importancia agrícola y económica como *Phytophthora sp.*, *Botrytis sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Moniliophthora roreri* y *Fusarium sp.* que entre otros afectan a la producción de cultivos hortícolas, frutícolas y cereales. Entre los mecanismos empleados por el género *Trichoderma* incluyen la antibiosis (secreción de tricodermina), micoparasitismo (adhesión y enrollamiento), competición por nutrientes y nicho (secreción de sideróforos), promoción del crecimiento vegetal (secreción de etileno), inducción de la resistencia sistémica (secreción de fitohormonas que incluyen a citoquinas, indol-3-acidoacético y giberelinas) y la modificación de las condiciones ambientales.

Los microorganismos fúngicos que habitan en el suelo interactúan con la flora y pueden actuar como promotores de crecimiento de vegetal y como agentes de control biológico debido a la interacción que poseen con raíces de plantas. En la rizosfera del suelo, las micorrizas (del griego myces, hongo y rhiza, raíz) y hongos del *Phyla Ascomycota* interactúan con las raíces de plantas y se asocian simbióticamente con células vegetales del córtex contactarse a través de hifas fúngicas (micelio) y al formar redes que favorecen una mayor captación de agua y nutrientes por la solubilización de minerales para que puedan ser aportados y así favorecer el desarrollo y crecimiento de plantas (Solomon et al., 2013); además tanto micorrizas y hongos del *Phyla Ascomycota* pueden proteger a plantas del ataque de distintos patógenos a través de distintos



mecanismos de acción antagónicos (Alarcón & Ferrera, 1999; Camargo, Montaña, & De la Rosa, 2012; Agrogenia, 2015). Sin embargo, cabe recalcar que hongos del *Phyla Ascomycota*, se destacan como hongos más predominantes del suelo, entre estos se destacan los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* ya que sus formas reproductoras esporulantes les permite distribuirse en diversos pisos ecológicos (Tedersoo, et al. 2014; Eguidi et al. 2019). Estudios realizados por Eguidi et al. (2019) demostraron que cepas de *Penicillium oxalicum* poseen la capacidad de coadyuvar a el crecimiento de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) en condiciones adversas, siendo beneficiados en una mayor captación de nutrientes y tolerancia al estrés abiótico. Asimismo, recientes estudios señalan a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* como productores de enzimas catalíticas y metabolitos secundarios como ácidos orgánicos y de otros compuestos farmacéuticos importantes (Varga & Samson, 2008). Los metabolitos secundarios son considerados productos naturales bioactivos que derivan del metabolismo microbiano (Madigan et al. 2009) y que pueden ser obtenidos a través del cultivo de microorganismos activos biológicamente en estado líquido o en cultivo en estado sólido (Patil, Patil, & Maheshwari, 2016).

En la actualidad estudios recientes se basan en la obtención de metabolitos secundarios bioactivos para su comercialización y empleo en el control de plagas y enfermedades, además de conocer su efecto potenciador en el crecimiento vegetal (Narayanasamy, 2013). Sin embargo, en términos de bioseguridad éstos deben ser estudiados ampliamente antes de su utilización como agentes de control biológico en el campo y seguir una secuencia de pasos a seguir para que estos cumplan normas exigidas por organizaciones que las controlan, estos implican : *i*) el aislamiento del BCA; *ii*) estudios sobre la ecología, fisiología y taxonomía del BCA, *iii*) estudios *in vitro* e *in vivo* en la producción y aplicación de metabolitos bioactivos, analizando la dosis efectiva contra fitopatógenos; *iv*) elucidación de componentes bioactivos y mecanismos de acción, *v*) producción en masa de componentes bioactivos, *vi*) formulación de componentes para evitar disminución de eficacia (protección contra la desecación y luz UV) y *vii*) por último, capacitación del usuario, facilitando la comprensión de las características del producto.

Por lo anteriormente descrito, el uso de BCAs es considerado una práctica amigable debido a que poseen gran diversidad metabólica y funcional, propiciando su amplio uso en la agricultura

respecto al uso de pesticidas químicos. Sin embargo, existen reportes que señalan desventajas de los BCAs como: *i*) la susceptibilidad ante las condiciones ambientales (temperatura, nutrientes, humedad, etc.) cuando son introducidos al ecosistema, afectando su desarrollo y sus efectos benéficos, *ii*) desequilibrio de la diversidad microbiana nativa e interrupción del flujo de energía al alterar la estructura biológica del suelo (Ambrosini, Souza, & Passaglia, 2015; Trabelsi & Rhamdi, 2013), Gao et al. (2012) observaron que el BCA *Pseudomonas fluorescens* introducido impactó negativamente en la comunidad microbiana del suelo, al influir en la disminución de comunidades fúngicas benéficas. Litchman (2010) define a los microorganismos invasores como “aquellos microorganismos que proliferan en ambientes ajenos e impactan sobre comunidades y ecosistemas locales”; *iii*) conversión de BCAs a fitopatógenos, estudios de Hendrichs (2009) señalan la conversión del BCA *Dischamimorpha longicaudata* en fitopatógeno de cultivos frutales, debido al desplazamiento de la población hospedadora. Por ello, antes de realizar la liberación de BCAs, se recomienda acondicionarlos en el área de aplicación (Van-Driesche & Hoddle, 2007) lo cual implica una inversión.

### 2.3 Marco conceptual

**Agente de control biológico (BCA).** – Organismos, extractos vegetales y metabolitos empleados en el control biológico de plagas al ejercer sobre fitopatógenos distintos mecanismos de acción antagónicos.

**Antagonista.** – Estructura biológica o química que interfiere en el desarrollo de organismos.

**Antibiosis.** – Refiere a la producción de componentes de bajo peso molecular que poseen un efecto directo en el crecimiento de patógenos.

**Antifúngicos.** – Sustancias que poseen la capacidad de producir una alteración en la estructura celular del hongo, logrando inhibir su desarrollo y viabilidad.

**Biofungicida.** – Insumo agrícola compuesto por una mezcla de compuestos biológicos activos tóxicos que impiden y eliminan a fitopatógenos fúngicos.

**Bioactivo.** – Componente que posee actividad biológica en organismos.

**Fitosanitario.** – Refiere a la prevención y control de enfermedad en cultivos agrícolas.

**Fitopatógeno.** – Organismo que genera enfermedades en las plantas al causar impacto en el metabolismo celular, al secretar enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias, además de absorber nutrientes de la célula para su propio crecimiento.

**Metabolito.** – Componentes resultantes o intermediarios del metabolismo de organismos.

**Micorriza.** – Asociación simbiótica comprendida por células fúngicas con células vegetales de la raíz de ciertas especies vegetales.

**Simbiosis.** – Relación benéfica entre dos o más organismos.

**Pesticida.** – Sustancia elaborada para eliminar una plaga que provoque daño o pérdidas económicas o que transmita o produzca alguna enfermedad.

### **3 Formulación de la hipótesis de investigación**

- Hipótesis nula

Los filtrados fúngicos obtenidos de los agentes de control biológico (BCAs) seleccionados, no inhiben el desarrollo micelial de *Colletotrichum sp.*, agente fitopatógeno de la antracnosis del mango.

- Hipótesis alterna

Los filtrados fúngicos obtenidos de BCAs seleccionados, inhiben el desarrollo micelial de *Colletotrichum sp.*, agente fitopatógeno de la antracnosis del mango.

- Hipótesis de investigación

Los filtrados fúngicos obtenidos de BCAs seleccionados cultivados en condiciones optimizadas, inhiben el desarrollo de *Colletotrichum sp.*, agente fitopatógeno causante de la antracnosis del mango.

### **4 Operacionalización de variables en estudio**

Operacionalización de variables en estudio				
Variable	Definición	Tipo de variable	Dimensión	Indicador
Independiente: Cepas fúngicas	Cepas fúngicas viables y cultivables	Cuantitativa discreta	Selección de cepas fúngicas viables y cultivables	Número de cepas fúngicas viables
Dependiente: Actividad antagónica directa de cepas fúngicas contra <i>Colletotrichum sp.</i>	Agentes de Control Biológico	Cuantitativa discreta	Selección de agentes de control biológico (BCA) con actividad antagónica moderada o superior	Porcentaje de inhibición mayor a 60% (equivalente a la categoría II en la escala de Bell)
Dependiente: Obtención y evaluación de filtrados provenientes de BCAs con actividad antagónica	Evaluación de filtrados con actividad antagónica producidos por BCAs	Cuantitativa discreta	Producción natural de metabolitos con actividad biológica	Porcentaje de inhibición (%)
Independiente: Variables: físicas (agitación y luz), químicas (fuentes de carbono y nitrógeno) y biológica (inducción por co-cultivo)	Optimización de condiciones de cultivo y producción de filtrados con actividad antagónica	Cualitativa Cuantitativa	Producción optimizada de metabolitos con actividad biológica	Porcentaje de inhibición (%)
Dependientes: Concentración de proteínas Actividad enzimática de filtrados Concentración de compuestos fenólicos	Caracterización de filtrados fúngicos con actividad antagónica	Cuantitativa continua	Estudio de metabolitos primarios o secundarios con actividad antagónica	Concentración de proteínas (g/L) Actividad enzimática de filtrados (U/mL) Concentración de compuestos fenólicos (mg/L)

## **5 Diseño metodológico**

### **5.1 Población en estudio, ámbito y periodo de investigación**

#### **5.1.1 Población en estudio**

La población en estudio incluyó 50 cepas de origen fúngico con posible actividad biológica, aisladas de suelos de cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) del altiplano boliviano de las regiones del Altiplano Norte, Central y Sur, incluyendo a las comunidades de Sullcataca Baja, Choquenaira, Cañaviri, Patacamaya, Saitoco e Irpani (Cardenas, 2016). Se empleó a *Colletotrichum sp.* como modelo de agente fitopatógono fúngico (cepa caracterizada como agente causal de la antracnosis en cultivos de mango). Todas las cepas empleadas en el estudio pertenecen al cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB).

#### **5.1.2 Ámbito**

El presente trabajo de investigación evaluó la capacidad de cepas fúngicas y sus metabolitos bioactivos como posibles agentes de control biológico frente a *Colletotrichum sp.* Este trabajo de investigación plantea una alternativa de control biológico contra el fitopatógono *Colletotrichum sp.* y fue desarrollado en el área de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.

#### **5.1.3 Periodo de investigación**

El presente trabajo de investigación se desarrolló durante las gestiones 2017 – 2020.

### **5.2 Tipo de investigación**

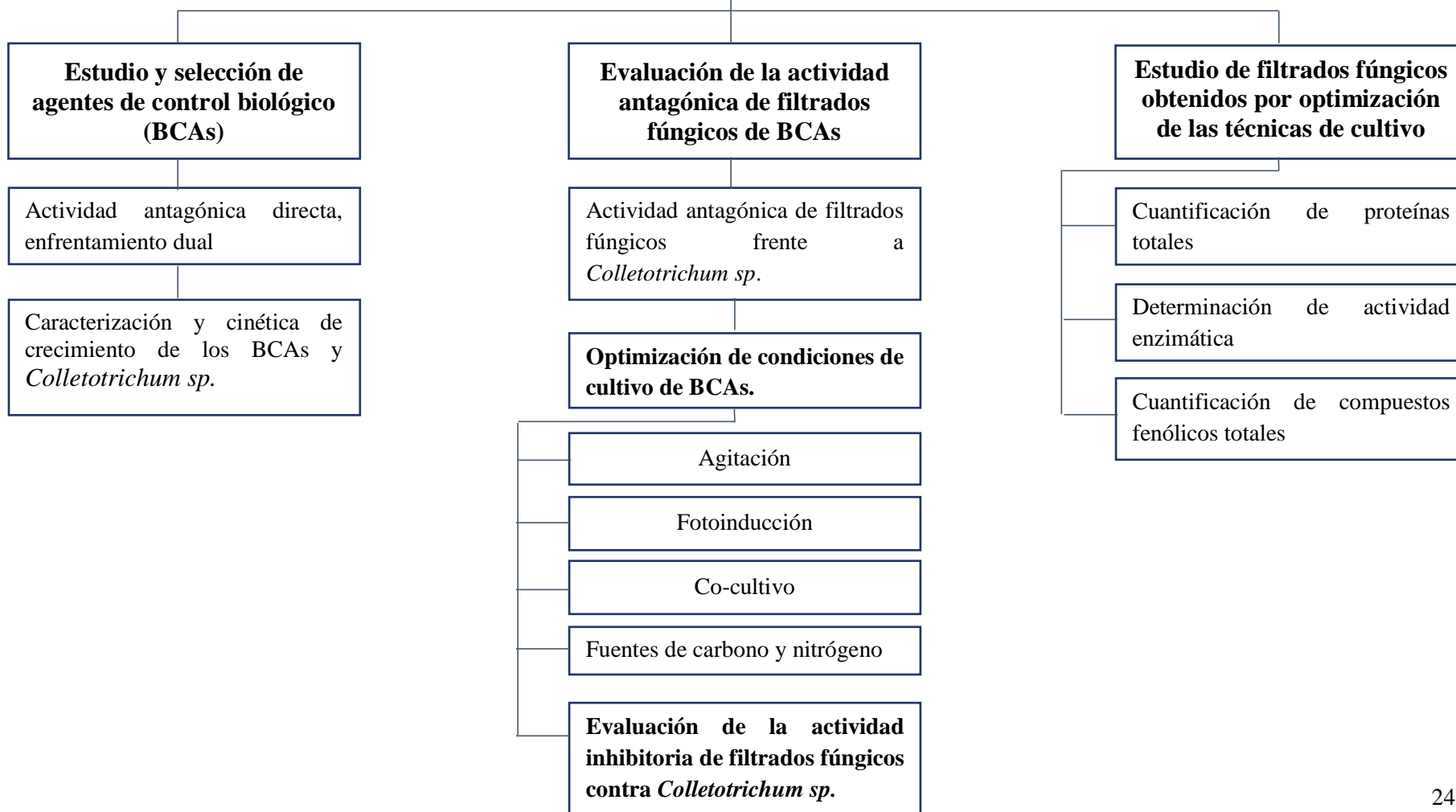
Esta investigación fue de tipo experimental, se estudió el efecto de modificaciones en las condiciones de cultivo de cepas fúngicas seleccionadas (variables independientes) para la obtención de metabolitos bioactivos en filtrados fúngicos con capacidad inhibitoria frente a *Colletotrichum sp.* (variable dependiente).

### **5.3 Materiales, métodos, técnicas y procedimientos**

#### **5.3.1 Protocolo de Investigación**

**ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE FILTRADOS FÚNGICOS FRENTE A *Colletotrichum sp.*,  
AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS**

Activación de cepas fúngicas con posible actividad de control biológico y *Colletotrichum*



### 5.3.2 Material biológico

Cincuenta cepas fúngicas, provenientes del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) fueron evaluadas en este estudio. Estas cepas fúngicas fueron aisladas a partir de muestras de suelo de cultivos de quinua del altiplano boliviano de las regiones del Altiplano Norte, Central y Sur, incluyendo a las comunidades de Sullcataca Baja, Choquenaira, Cañaviri, Patacamaya, Saitoco e Irpani (Cardenas & Mamani, 2016) y agrupadas por su morfología en los siguientes géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporidium*, *Scopoluriopsis*, *Diplodia* y micelio estéril.

Por otro lado, se empleó el fitopatógeno fúngico *Colletotrichum sp.*, aislado de frutos de mango con síntomas de enfermedad y caracterizado como el agente causal de antracnosis en cultivos de mango ubicados en el municipio de Irupana del Departamento de La Paz, Bolivia (Mamani, et al., 2018).

### 5.3.3 Activación de cepas fúngicas

Para la activación de cepas fúngicas se prepararon suspensiones de esporas en una concentración de  $1.5 \times 10^6$  esporas/mL de aislados fúngicos y de *Colletotrichum sp.* y se inocularon 100  $\mu$ L de cada suspensión de esporas en 10 mL de caldo papa dextrosa (CPD: 200g papa, 20g glucosa y 1000 mL de agua destilada) y se los llevo a incubación a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  en agitación y oscuridad a 120 rpm por siete días. Subsiguientemente, se realizaron resiembras, depositando 100  $\mu$ L de cada cepa fúngica activa en una horadación central de una placa con agar papa dextrosa (PDA: 200g papa, 20g glucosa, 15g de agar y 1000 mL de agua destilada) y se incubó a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por siete días y posteriormente se evaluó el desarrollo, axenidad y viabilidad de cada aislado fúngico para ser seleccionados para evaluaciones posteriores.

### 5.3.4 Estudio de agentes de control biológico (BCAs)

#### 5.3.4.1 Evaluación de BCAs con actividad antagónica directa

Se evaluó la actividad inhibitoria de 35 cepas fúngicas viables contra *Colletotrichum sp.*, empleando la prueba de enfrentamiento dual *in vitro* descrita por Weller, et al. (1985). Para ello, se prepararon placas petri con medio PDA con dos horadaciones laterales (con 5 mm diámetro y una separación de 4 cm entre horadaciones) y se inoculó por separado en cada horadación: 75  $\mu$ L de una suspensión de  $1.5 \times 10^6$  esporas/mL de cada cepa fúngica (posibles BCAs) y de



*Colletotrichum sp.* Adicionalmente, para el control de crecimiento del patógeno sin tratamiento, se inoculó 75  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas ( $1.5 \times 10^6$  esporas/mL) de *Colletotrichum sp.* en medio PDA con una horadación central. Posteriormente, todos los cultivos fueron incubados a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por siete días con fotoperiodos de 12h.

La inhibición del crecimiento hifal del patógeno fue determinada mediante el porcentaje de inhibición (sección 5.3.6.1). La actividad antagonica de las cepas fúngicas fue clasificada de acuerdo a la escala de (Bell, DK et al., 1982) y se seleccionó como agentes de control biológico (BCAs) a las cepas que presentaron un porcentaje de inhibición mayor o igual al 60%, equivalente al nivel II en la escala de Bell.

#### **5.3.4.2 Caracterización de BCAs**

##### **5.3.4.2.1 Preparación de cultivos monospóricos**

Para la caracterización de BCAs, inicialmente se obtuvieron cultivos monospóricos, siguiendo la técnica de (Canedo & Ames, 2004). Preparando una suspensión de esporas ( $1 \times 10^3$  esporas/mL) de cada cepa fúngica en solución salina (0,9 %, p/v), 100  $\mu\text{L}$  de esta suspensión fue inoculada por agotamiento en placas petri con agar agua (15 g/L agar bacteriológico en 1 L de agua destilada). Los cultivos se incubaron a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 h, cuando se observó la germinación de una espóra, inmediatamente fue recolectada y transferida con un sacabocado esteril a una placa petri con PDA.

##### **5.3.4.2.2 Caracterización morfológica de cepas fúngicas seleccionadas**

A partir de cultivos monospóricos de BCAs seleccionados, se realizó su caracterización morfológica macro y microscópica (Watanabe, 2010). En la caracterización macroscópica de BCAs se empleó un estéreo microscopio (Optika, Italia) para observar la morfología (tamaño, color, superficie y la presencia de exudados o pigmentos) de cada cepa fúngica. Para la caracterización microscópica se empleó cinta adhesiva para tomar parte del micelio de cada cepa, este fue adherido un portaobjetos que contenía de 2 dos gotas de colorante vegetal azul brillante y fue observado en un microscopio óptico (Zeiss, Alemania) con una magnificación de 400 y 1000 aumentos, comparando la imagen con claves fenotípicas para su identificación y control axénico.

#### **5.3.4.2.3 Determinación de la velocidad de crecimiento de BCAs**

La determinación de la velocidad de crecimiento de BCAs se realizó de acuerdo a (Puño et al., 2011). Preparando placas petri (20 cm de diámetro) con PDA y añadiendo una horadación central (5 mm de diámetro) para inocular 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas ( $1.5 \times 10^6$  esporas/mL) de cada BCA. Los cultivos fueron llevados a incubación a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por 17 días. Cabe recalcar que cada 24 h se midió el frente hifal al emplear un vernier, los resultados fueron obtenidos en función al desarrollo del frente hifal por día (mm/d).

#### **5.3.5 Producción de filtrados fúngicos y evaluación de su actividad antagónica contra *Colletotrichum sp.***

La producción basal de filtrados fúngicos empleando BCAs seleccionados se realizó en cultivo batch. Para ello, un inóculo de 80  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  esporas/mL) fue suspendido en 80 mL de caldo CPD e incubado a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 días bajo las siguientes condiciones de cultivo: estanco (sin agitación) y en fotoperiodo (luz natural / oscuridad) 12 h/d. Concluido el tiempo de incubación, se recuperó el sobrenadante de cada cultivo, el cual fue procesado para su posterior evaluación de actividad antagónica contra *Colletotrichum sp.* (sección 5.3.6.7).

#### **5.3.6 Optimización de condiciones de cultivo y producción de filtrados con actividad antagónica**

La producción optimizada de filtrados fúngicos se basó en la evaluación del efecto de variables físicas, biológicas y químicas para inducir la producción de metabolitos bioactivos contra el desarrollo de *Colletotrichum sp.* Concluido el tiempo de incubación se recuperaron los sobrenadantes de los cultivos y se los proceso para su posterior evaluación de actividad antagónica contra *Colletotrichum sp.* (sección 5.3.6.7).

##### **5.3.6.1 Efecto de la fotoinducción en la producción de filtrados fúngicos con actividad antagónica**

El efecto de la fotoinducción fue evaluado como variable física en el cultivo de BCAs seleccionados. Para ello, se realizó una serie de cultivos batch, donde se inóculó 80  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  esp/mL) de cada cepa fúngica en 80 mL de caldo CPD e incubó en agitación (120 rpm) a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 días bajo las siguientes condiciones de fotoinducción

(24 h/d) con: luz blanca ( $\lambda$  400-750 nm), luz roja ( $\lambda$  680 nm), luz amarilla ( $\lambda$  580 nm), luz verde ( $\lambda$  520 nm), luz violeta ( $\lambda$  410 nm) y en fotoperiodo (luz natural / oscuridad) 12 h/d por 15 días. Finalizado el tiempo de incubación, se recuperaron los sobrenadantes como se describe en la sección 5.3.6.7.

#### **5.3.6.2 Efecto del co-cultivo en la producción de filtrados fúngicos con actividad antagónica**

La evaluación de la variable biológica se basó en el co-cultivo entre cada BCA y *Colletotrichum sp.* Para ello, se inoculó 80  $\mu$ L de una suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  esp/mL) tanto de BCA como de *Colletotrichum sp.* en 80 mL de CPD. Los co-cultivos fueron incubados en agitación (120 rpm) a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 días en fotoperiodo (luz natural / oscuridad) 12 h/d por 15 días, como condición optimizada (sección 5.3.5.1).

#### **5.3.6.3 Efecto de la concentración de fuente de carbono sobre la producción de filtrados fúngicos con actividad antagónica**

La evaluación de la variable química del medio de cultivo de BCAs, se basó en la modificación de la concentración de glucosa como fuente de carbono, se preparó 80 mL de caldo papa suplementado con glucosa a: 5, 10, 15 y 20 g/L. Posteriormente, se inoculó 80  $\mu$ L de cada suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  esp/mL) y se incubó en agitación (120 rpm) a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  en fotoperiodo (luz natural / oscuridad) 12 h/d por 15 días. Seguidamente se realizó el cultivo de BCAs y la evaluación de sus filtrados bajo las condiciones de cultivo antes descritas. Concluido el experimento y bajo la influencia de los resultados, se empleó el caldo papa suplementado con 20g/L de glucosa para la evaluación de diferentes fuentes de nitrógeno.

#### **5.3.6.4 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de filtrados fúngicos con actividad antagónica**

La evaluación de la variable química del medio de cultivo de BCAs, se basó en la modificación del tipo de fuente de nitrógeno. Para ello, se preparó 80 mL de caldo papa suplementado con glucosa (20 g/L) al cual se adicionaron tres fuentes de nitrógeno manteniendo la relación DQO (demanda química de oxígeno): Nitrógeno [100: 5,6] con cloruro de amonio (19,11 g/L), sulfato de amonio (23,65 g/L) y urea (10,75 g/L). Posteriormente, se inoculó 80  $\mu$ L de cada suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  esp/mL) y se incubó en agitación (120 rpm) a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  en fotoperiodo (luz

natural / oscuridad) 12 h/d por 15 días. Seguidamente, se realizó el cultivo de BCAs y la evaluación de sus filtrados bajo las condiciones de cultivo antes descritas. Concluido el experimento y bajo la influencia de los resultados, se seleccionó al medio suplementado con cloruro de amonio (denominado de aquí en adelante como caldo papa dextrosa modificado) como medio optimizado en posteriores evaluaciones.

#### **5.3.6.5 Efecto del tiempo de cultivo en la producción de filtrados fúngicos con actividad antagónica**

Después de evaluar y determinar las condiciones óptimas de cultivo de las cepas *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 (cultivo en fotoperiodo 12 h/d en agitación en caldo papa modificado 20 g/L glucosa con cloruro de amonio; secciones 5.3.6.1 y 5.3.6.3). Se evaluó la actividad antagónica de filtrados fúngicos obtenidos a diferentes tiempos de cultivo, colectando los filtrados cada 48 horas durante 20 días y evaluando el efecto contra *Colletotrichum sp.* por la técnica descrita (sección 5.3.6.7.), para determinar el tiempo de colecta de filtrados con mayor actividad antagónica y determinar si corresponden a metabolitos primarios producidos en trofofase o metabolitos secundarios producidos durante idiofase.

#### **5.3.6.6 Efecto de la concentración de filtrados fúngicos y su actividad antagónica**

Adicionalmente, a la evaluación de las condiciones de cultivo optimas, se evaluó la actividad inhibitoria de los filtrados fúngicos al emplear una dilución de los mismos al realizar la técnica de vertido en placa diluciones:  $\frac{1}{2}$ ;  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{1}{8}$ . Asimismo, se comparó su actividad inhibitoria con un fungicida agrícola Ramcaf® (4 g/L) en PDA. La actividad antagónica de filtrados fúngicos se estimó a través del porcentaje de inhibición (descrita en la siguiente sección).

#### **5.3.6.7 Obtención de filtrados fúngicos y evaluación de su actividad antagónica contra *Colletotrichum sp.***

La obtención de filtrados fúngicos se realizó para cada experimento (secciones 5.3.5.1, 5.3.5.2 y 5.3.5.3), para ello se recuperó la parte líquida de cada cultivo y se centrifugó a 6500 rpm, 10°C durante 20 min. Posteriormente, cada sobrenadante fue filtrado a través de papel whatman N°1, membrana millipore (0.22 µm) y fue preservado en viales estériles a 4°C. La evaluación de su actividad antagónica contra *Colletotrichum sp.* fue realizada de acuerdo a la técnica de vertido en placa de Sivan et al., (1984). En placas petri se preparó una mezcla entre cada filtrado fúngico

y PDA en una relación de 1:1 (v/v). Se realizó una horadación central de 5 mm de diámetro e inoculó 75 µL de una suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  esp/mL) de *Colletotrichum sp.* e incubadas a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 días.

#### **5.3.6.7.1 Determinación de la actividad antagonica de BCAs y filtrados fungicos contra *Colletotrichum sp.***

La actividad antagonica de BCAs y la de sus filtrados fúngicos contra *Colletotrichum sp.* fue determinada mediante el porcentaje de inhibición basado en la restricción del crecimiento hifal. Para ello, se midió el diámetro de crecimiento del frente hifal de *Colletotrichum sp.*, en placas petri con tratamiento por: enfrentamiento dual (sección 5.3.4.1) o vertido en placa (sección 5.3.6) y sin tratamiento (control de crecimiento de *Colletotrichum sp.*). Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición empleando la ecuación propuesta por (Weller et al., 1985):

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

Donde:

D1: Diámetro de crecimiento hifal de *Colletotrichum sp.* (sin tratamiento) en centímetros.

D2: Diámetro de crecimiento hifal de *Colletotrichum sp.* (con tratamiento) en centímetros.

Los porcentajes de inhibición, fueron clasificados según la escala de Bell para la selección de BCAs y la de sus filtrados producidos en diferentes condiciones.

#### **5.3.7 Estudio de filtrados fúngicos seleccionados por su actividad antagonica contra *Colletotrichum sp.***

Seguida a la optimización de la actividad antagonica de filtrados fúngicos, se realizó el estudio de filtrados fúngicos que exhibieron porcentajes de inhibición superiores (óptimos según la escala de Bell) para una caracterización preliminar.

##### **5.3.7.1 Cuantificación de proteínas solubles totales en filtrados fúngicos**

La concentración de proteínas solubles totales en filtrados fúngicos fue cuantificada mediante la técnica de Lowry et al. (1951) empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Inicialmente la mezcla de reacción estuvo compuesta por: 100 µL de cada filtrado fúngico y 1000 µL de reactivo C: Carbonato de sodio (2%, p/v), hidróxido de sodio (0,1 M), sulfato cúprico pentahidratado (1%, p/v) y tartrato sódico-potásico (2%, p/v). Y fue llevada a incubación en oscuridad a

temperatura ambiente por 15 min, seguido a ello se adicionó 100  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteau (ácido fosfotúngstico, ácido fosfomolibdico, azul de tungsteno y molibdeno) (1N) y se continuó con el tiempo de incubación por 30 min adicionales para completar la reacción. La absorbancia de cada mezcla fue determinada por espectrofotometría a una longitud de onda de 580 nm. Empleando agua destilada en lugar de filtrado fúngico, como blanco de reacción. La concentración de proteínas solubles totales fue determinada al interpolar los datos de absorbancia en una curva de calibración con albumina sérica bovina (BSA) disuelta en NaCl (0,15 M) a distintas concentraciones (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1 g/L) (Anexo 1).

### **5.3.7.2 Determinación de actividad enzimática de filtrados fúngicos**

#### **5.3.7.2.1 Actividad proteolítica de filtrados fúngicos**

La actividad proteolítica de filtrados fúngicos, se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Charney & Tomarelli (1947). La mezcla de reacción estaba compuesta por: 200  $\mu$ L de azocaseína como sustrato (0.5%, p/v) en buffer bicarbonato de sodio (0.1 M; pH: 8.3) y 20  $\mu$ L de filtrado fúngico, e incubada a 30°C por 60 min. La reacción fue detenida por la adición de 200  $\mu$ L de ácido tricloroacético (5%, p/v) y shock térmico durante 30 min. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 8000 rpm por 20 min y se adicionaron 100  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteau (1N) incubando a temperatura ambiente y oscuridad por 30 minutos. La absorbancia de cada mezcla fue determinada a una longitud de onda de 380 nm contra un blanco con filtrado fúngico inactivado. La concentración de producto se determinó empleando una curva de calibración con una solución madre de L – tirosina (16.2 mg/500mL) en distintas concentraciones (Anexo 2). La unidad de actividad proteolítica fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 $\mu$ mol de L - tirosina positiva para Folin-Ciocalteau por minuto.

#### **5.3.7.2.2 Actividad celulolítica de filtrados fúngicos**

La actividad celulolítica de filtrados fúngicos se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Halliwell (1962). La mezcla de reacción estuvo compuesta por: 500  $\mu$ L de carboximetil celulosa (CMC, 2%, p/v) como sustrato en buffer acetato (0.1 M; pH: 3.2) y 500  $\mu$ L de cada filtrado fúngico. La mezcla de reacción fue incubada a 30°C por 60 min y fue detenida por shock térmico durante 5 min. Posteriormente, las mezclas se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min. La concentración de azúcares reductores liberados por la actividad celulolítica fue determinada por la técnica del ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS: 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 150 g de

tartrato de sodio-potasio, 8 g de NaOH y 500 mL de agua destilada) (Miller et al., 1960), adaptado por (Bello et al., 2006). Para ello, se mezclaron 500  $\mu$ L del sobrenadante de reacción con 500  $\mu$ L del reactivo de DNS incubando a 90°C por 5 min. La absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 540 nm. Para cada determinación se empleó un blanco y un control, compuestos por 500  $\mu$ L de buffer en lugar de filtrado y 500  $\mu$ L de filtrado fúngico en lugar de sustrato, respectivamente, con el fin de descartar el contenido de glucosa presente en el filtrado fúngico. La actividad enzimática fue calculada en función a la liberación de azúcares reductores cuantificados empleando una curva de calibración con glucosa a distintas concentraciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L) (Anexo 3). Una unidad de endoglucanasa se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de azúcares reductores equivalentes a glucosa por minuto.

#### **5.3.7.2.3 Actividad quitinolítica de filtrados fúngicos**

La actividad quitinolítica de filtrados fúngicos se determinó mediante la técnica de cuantificación de N-acetil glucosamina (NAG) de (Reissig et al., 1955). La mezcla de reacción estuvo compuesta por: 1 mL de filtrado fúngico y quitina coloidal (10%, p/v) como sustrato en buffer acetato (0.1 M; pH: 3.2). La mezcla de reacción fue incubada a 30°C por 60 min y fue detenida por la adición de 1 mL de hidróxido de sodio (1%, p/v). Consecutivamente, las mezclas fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. A 250  $\mu$ L del sobrenadante se añadieron 40  $\mu$ L de tetra borato de potasio (0,8 M; pH: 9), se homogenizo e incubo por 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 1 mL de p-dimetilamino benzaldehído (10%, p/v) en ácido acético glacial y se incubó a 37 °C por 60 min. La absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de producto se determinó empleando una curva de calibración con NAG en distintas concentraciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L) (Anexo 4). Una unidad de actividad quitinolítica se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de NAG (N-acetil glucosamina) por minuto.

#### **5.3.7.3 Determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales en filtrados fúngicos**

La presencia de compuestos fenólicos totales en filtrados fúngicos, se determinó de acuerdo a la técnica de (Singleton & Rossi, 1965). La mezcla de reacción estaba compuesta por: 100  $\mu$ L de filtrado fúngico, 250  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteau (1N), 750  $\mu$ L de carbonato de sodio (20 %; p/v) y 900  $\mu$ L de agua destilada. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente

en oscuridad por 2 horas. La absorbancia de las mezclas se determinó a una longitud de onda de 765 nm contra un blanco que en lugar de filtrado fúngico contenía agua destilada. La concentración de compuestos fenólicos fue estimada empleando una curva de calibración con ácido gálico a distintas concentraciones (0.1, 1.5, 2, 3 y 4 mg GAE/mL) (Anexo 5).

### **5.3.8 Evaluación de la actividad antagónica de metabolitos fúngicos volátiles contra *Colletotrichum sp.***

Las cepas CP17 y CP34, seleccionadas en la sección 6.4.1.3 por su actividad antagónica fueron evaluadas por su capacidad de producir metabolitos volátiles empleando la técnica de doble placa descrita por Montealegre et al., (2003), con las siguientes modificaciones: se prepararon suspensiones de las esporas de los BCAs ( $1,5 \times 10^6$  esp/mL). En dos bases de placas Petri se inocularon 80  $\mu$ L de cada suspensión de esporas (BCA y *Colletotrichum sp.*) en PDA con un pozo central de 5 mm de diámetro. Adicionalmente, se empleó 80  $\mu$ L de agua destilada en lugar de la suspensión de esporas como control negativo. Una vez que el inóculo fue absorbido totalmente en la superficie del medio, las bases fueron selladas entre sí, acondicionando como base de apoyo la que contenía la suspensión de esporas de cada BCA, facilitando así la difusión de metabolitos volátiles en la atmosfera interna. Cada doble placa se incubó a  $27 \pm 1$  °C durante 15 días. Los resultados fueron evaluados a través de la determinación de la actividad antagónica en función al porcentaje de inhibición descrito en la sección 5.3.6.7.1.

### **5.3.9 Determinaciones analíticas**

#### **5.3.9.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)**

La demanda química de oxígeno (DQO) del medio CPD empleado, se determinó siguiendo la norma internacional ISO 6060:1989. La mezcla de reacción estuvo compuesta por: 1.5 mL de dicromato de potasio (solución de digestión), 3.5 mL de ácido sulfúrico y 2.5 mL del caldo papa dextrosa en una relación 1:1000. Asimismo, se emplearon dos blancos (blanco digerido: BD y blanco no digerido: BND), reemplazando el medio CPD por agua destilada en ambos casos. Cada mezcla de reacción fue homogenizada previa a la digestión que fue a 150 °C por 2 horas en un termoblock a excepción del BND. Concluida la digestión, se dejó enfriar las mezclas a temperatura ambiente para que posteriormente fuesen tituladas con sulfato ferroso amónico (FAS; 0.25 M) añadiendo 2 gotas del indicador ferroína, cuyo viraje determinó el fin de la reacción. La DQO del medio CPD se estimó de acuerdo a las dos siguientes ecuaciones:



$$M = \frac{0.1 * mL Cr2O7}{mL FAS (BND)} \quad (Ec. 1)$$

Dónde:

0.1 : Concentración de la solución estándar del Cr2O7 (M)

mL: Volumen de Cr2O7 utilizado (1.5 mL)

mL FAS (BND): Volumen de solución FAS utilizada en el BND (en mL)

M: Molaridad de la solución FAS

$$DQO \left( \frac{mg O_2}{L} \right) = \frac{(A-B) * M * 8000}{mL de muestra} \quad (Ec.2)$$

Dónde:

A: Volumen de solución FAS utilizada en el BD (en mL)

B: Volumen de solución FAS utilizada en la muestra de análisis (en mL)

M: Molaridad de la solución FAS

8000: Peso en mili-equivalentes de oxígeno

### 5.3.9.2 Nitrógeno total

El nitrógeno total del medio CPD se determinó de acuerdo al método de Kjeldahl descrito por AOAC (2000), que consiste en la digestión de la muestra, destilación y titulación. Para la digestión de la muestra, en un tubo de digestión Kjeldahl se preparó una mezcla con: 1.5 mL del medio CPD (sin adición de glucosa), 0.1 g de sulfato cúprico pentahidratado, 0.9 g de sulfato potásico y 3 mL de ácido sulfúrico (98%, p/p) e inmediatamente la mezcla fue transferida al termoblock a 400 °C por 2 horas. Concluida la digestión se dejó enfriar la mezcla para añadir 10 mL de agua destilada y 10 mL de hidróxido de sodio (40%, p/v), para neutralizar el amonio y destilarlo con 25 mL de ácido bórico (4%, p/v) y con 15 gotas del indicador rojo de metilo. Para terminar, la mezcla fue titulada con ácido clorhídrico (0.1 N) hasta reducir el pH a 3.5. La cuantificación de nitrógeno en el medio CPD, se estimó por cada equivalente de ácido clorhídrico correspondiente a un equivalente de nitrógeno presente empleando la siguiente ecuación:

$$N (unidades) = \frac{(VAV - VB) \times C \times 1,4007}{VM}$$

Dónde:

N: concentración de nitrógeno de la muestra

VAV: Volumen de la solución valorante (titulación)

VB: Volumen blanco

C: Concentración de la solución valorante

## **5.4 Procesamiento de los datos**

### **5.4.1 Recolección**

Los datos recolectados en el transcurso de realización del trabajo de investigación, fueron registrados en una bitácora de laboratorio y transcritos a una base de datos Excel, para su procesamiento y análisis estadístico.

### **5.4.2 Elaboración**

Se elaboraron tablas y figuras a partir de los datos recolectados en cada experimento realizado durante la investigación, se empleó el programa estadístico GraphPad prisma versión 7® y Microsoft office Excel 2016.

### **5.4.3 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de la actividad antagónica de agentes de control biológico y la de sus filtrados fúngicos contra el desarrollo de *Colletotrichum sp.* fueron analizados utilizando ANOVA unidireccional con un valor de significancia de  $p < 0,01$  y comparación múltiple: Test de Tukey con un valor de significancia de  $p < 0,05$ . Empleando el software de GraphPad InStat (Versión 6.01, GraphPad Software Inc.) y de Minitab (Versión 18, Minitab Inc.). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados que se presentan corresponden a la media y  $\pm$  desviación estándar.

## 6 Resultados y discusiones

### 6.1 Cepas fúngicas viables

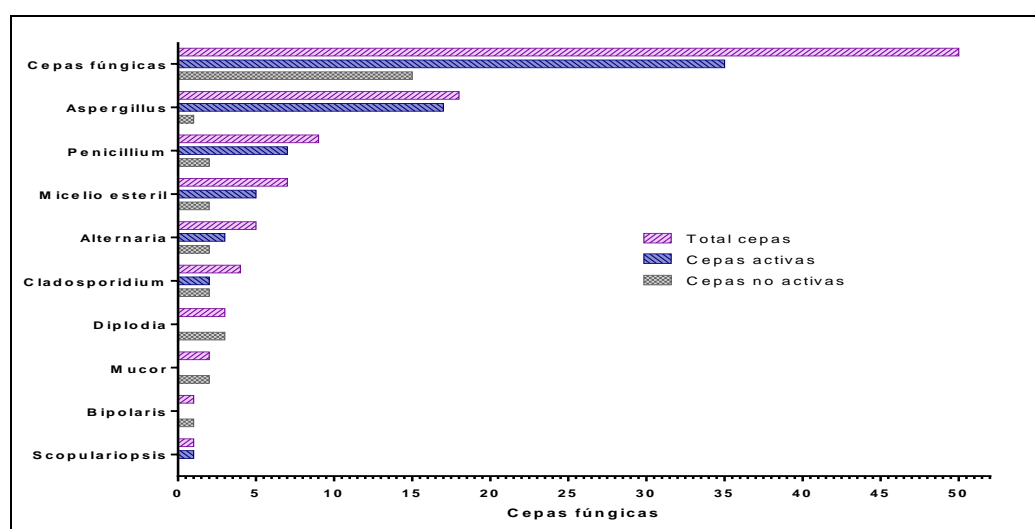
El suelo actúa como un ecosistema que alberga a una gran diversidad de microorganismos, que interactúan con la geosfera (rocas y minerales), hidrosfera (cuerpos de agua), atmósfera y seres vivos (Schinner et al., 2012). Estos cumplen un rol importante al actuar como modeladores de la dinámica biogeoquímica que permite el ciclo de diferentes elementos que benefician el desarrollo de otros organismos (Eldor, 2007). Sin embargo, su distribución y desarrollo está sujeta a factores bióticos y abióticos del ecosistema (Liang et al., 2017), es así, que estos son seleccionados por su entorno, siendo además que pueden establecer asociaciones con plantas (Dumbrell et al., 2010). Las asociaciones pueden ser simbióticas, mutualistas o parasitarias (Azcón & Talón, 2013; González-Teuber et al., 2017; Patil et al., 2016).

En las últimas décadas, se ha realizado diferentes estudios enfocados en la simbiosis desarrollada por microorganismos y plantas. Siendo que diferentes microorganismos pueden relacionarse con plantas y colonizar tejidos vegetales, sin provocar lesiones fisiológicas y logrando desarrollar una relación dinámica que favorece el desarrollo de ambos (Patil et al., 2016), donde las plantas proveen de nutrientes y fuentes de carbono a los microorganismos y estos en compensación sintetizan metabolitos que pueden promover el crecimiento de la planta e inducir una respuesta de resistencia sistémica e inhibir el desarrollo de organismos patógenos que afecten a la planta. Entre los microorganismos que pueden establecer esta relación, se encuentran: bacterias y hongos promotores de crecimiento (PGPR y PGPF) (Hossain & Sultana, 2020; Nadeem et al., 2015), actinomicetos, micorrizas, endomicorrizas y ectomicorrizas, entre otros (Lugo & Pagano, 2019). Por ende, estos microorganismos son de alta importancia biotecnológica por su potencial en el desarrollo de nuevas técnicas para incrementar el rendimiento agrícola (Hubbard et al., 2014).

En un estudio previo se aislaron e identificaron 50 cepas fúngicas de la rizosfera de cultivos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) de las regiones del Altiplano Norte, Central y Sur de Bolivia que comprende a las comunidades de Sullcataca Baja, Choquenaira, Cañaviri, Patacamaya, Saitoco e Irpani (Cardenas, 2016). En continuidad a ello, en el presente estudio se evaluó el potencial de estas cepas para inhibir el desarrollo del patógeno fúngico *Colletotrichum*

*sp.* agente causal de la antracnosis en cultivos de mango, siendo este aislado y caracterizado en un estudio reciente (Mamani et al., 2018).

A pesar que inicialmente se contaba con un stock de 50 cepas fúngicas identificadas, solo se lograron recuperar 35 cepas viables, las cuales se codificaron como CP: 1 – 35 (Anexo 6). Las cepas viables fueron reclasificadas en función a sus claves morfológicas de las cuales 17 corresponden al género *Aspergillus*, 7 al género *Penicillium*, 3 al género *Alternaria*, 2 al género *Cladosporidium*, 1 al género *Scopulariopsis* y 5 a micelio estéril (las cepas clasificadas como micelio estéril no presentaron formas reproductivas que faciliten su identificación por microscopía óptica) (Fig. 5).



**Figura 5.** Cepas fúngicas, relación entre cepas fúngicas viables (barras azules) y cepas fúngicas no viables (barras color gris) respecto al total (barras violetas). A la izquierda, el listado de los géneros de cepas en estudio.

De las 35 cepas fúngicas viables, destacó la predominancia de los hongos pertenecientes a los géneros: *Aspergillus* (17) y *Penicillium* (7). Como ya se lo había mencionado, la distribución y desarrollo de microorganismos está sujeto a factores bióticos y abióticos del ecosistema o nicho (Liang et al., 2017), dicha predominancia de ambos géneros podría deberse a su capacidad de tolerar el estrés abiótico, al captar una mayor cantidad de nutrientes y minerales a comparación de otros microorganismos (Egidi et al., 2019; Tedersoo et al., 2014).

La predominancia observada por ambos géneros coincide con los resultados de Pasaca-Quisbert et al. (2017) y Paco-Pérez et al. (2017) quienes en sus estudios reportaron la presencia de los

géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en la rizosfera de cultivos de quinua en el altiplano norte y sur (Municipio de Viacha, La Paz y Municipio Salinas de Garci Mendoza, Oruro).

Los suelos productores de quinua se caracterizan por presentar un menor contenido de materia orgánica, pH alcalino y bajos niveles de nitrógeno y fósforo (Paco-Pérez et al., 2017). De tal manera que los microorganismos con la capacidad de sobrevivencia al estrés abiótico pueden colonizar el suelo. Asimismo, estos pueden cumplir un rol importante en los cultivos al interactuar con tejidos vegetales y colonizarlos sin ocasionar daños en su fisiología. El beneficio de esta interacción se caracteriza principalmente por la promoción de crecimiento y la protección contra agentes patógenos que ha sido observada en diferentes investigaciones.

El estudio de González-Teuber et al. (2017) reveló que los hongos *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium* colonizan las raíces de plantines de quinua sin provocar signos o síntomas de enfermedad, los cuales fueron clasificados como hongos endófitos. Del mismo modo, Pandey et al., (2008) y Yin et al., (2015) en sus estudios corroboraron en que *Penicillium sp.* es un hongo endófito capaz de promover el crecimiento de plantas y de contribuir a la resistencia sobre la salinidad de suelos. Sin embargo, de las 35 cepas viables recuperadas de suelos de cultivo de quinua no se estudió la capacidad endófito, no obstante, sería interesante evaluar su potencialidad como mejoradores de crecimiento vegetal.

La asociación de microorganismos con plantas constituye un área de investigación con alta importancia, estableciendo una interesante alternativa para el control de enfermedades generadas por agentes patógenos, siendo que muchos microorganismos poseen la capacidad natural de inhibir el desarrollo de enfermedades provocadas por agentes patógenos, además de presentar mejoradores de crecimiento vegetal. Por lo cual, estos microorganismos llegan a ser una alternativa amigable para el desarrollo de una agricultura sostenible y ambientalmente segura.

## **6.2 Cepas fúngicas con actividad antagónica directa frente a *Colletotrichum sp.***

El incremento de la población a nivel mundial y por ende el incremento en la demanda de alimentos origina preocupación por la presencia de plagas y enfermedades en cultivos, llegando a convertirse en un problema que compromete a la seguridad alimentaria global (Babu et al., 2015). Asimismo, la presencia y distribución de plagas y enfermedades en los diferentes cultivos

puede ser favorecido por condiciones extremas como la sequía, salinidad, temperatura extrema y humedad, entre otros como factores abióticos (Dodd et al., 1991; Khanzada et al., 2018; Liang et al., 2017). Los patógenos fúngicos, agentes causales de enfermedades en plantas son considerados perjudiciales debido a su distribución en diferentes pisos ecológicos, además de presentar resistencia a tratamientos convencionales y la capacidad de producir micotoxinas que poseen diferentes propiedades toxicológicas que pueden ser nocivas para la salud humana y animal.

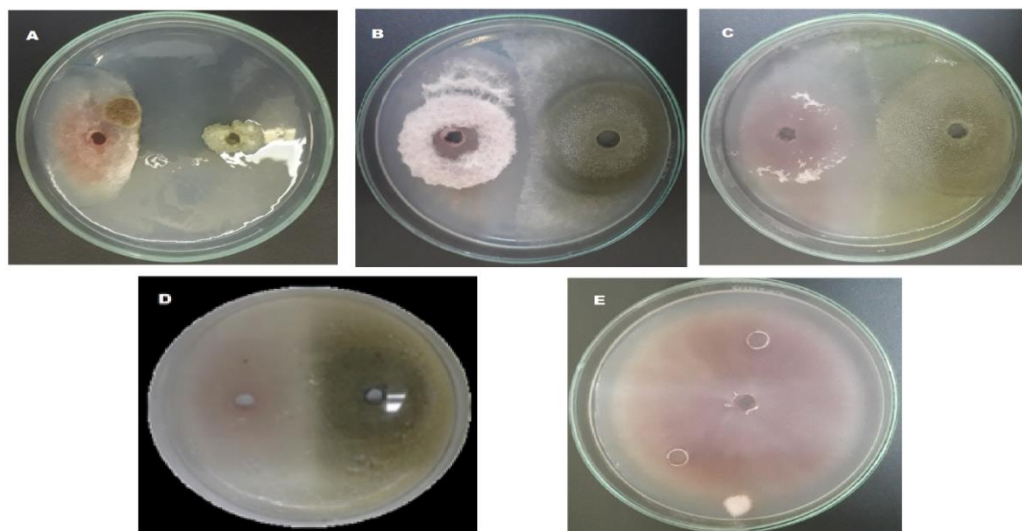
El hongo *Colletotrichum sp.*, agente causal de la antracnosis afecta a una amplia variedad de cultivos hortícolas y frutícolas, ocasionando pérdidas variables entre el 40 y 60%, y hasta más del 90% si no se efectúan controles fitosanitarios adecuados. Su control se caracteriza por el empleo de fungicidas de origen químico (Dodd et al., 1991; Rivas & Carrizales, 2007). Sin embargo, algunos de ellos han sido reportados inefectivos por la resistencia desarrollada por el patógeno a consecuencia de su vasto e irracional uso (Chechi et al., 2019; Forcelini et al., 2016). Asimismo, se debe de tomar en consideración que la exposición a los fungicidas puede desarrollar problemas crónicos en la salud humana (Larrea Poma et al., 2010) y ambiental al depositarse en suelos y cuerpos de agua (Del Puerto et al., 2014). Constituyendo una importante necesidad de buscar alternativas inocuas y amigables al empleo de fungicidas.

El control biológico involucra el empleo de organismos o microorganismos como bacterias y hongos, conocidos como agentes de control biológico (BCAs) (Hoyos, 2011). Los BCAs limitan el desarrollo de enfermedades y plagas a través de diferentes mecanismos antagónicos; además de ser considerados parte del manejo integrado de plagas (MIP) y como una alternativa al empleo de fungicidas de origen químico (Glare & Moran-Diez, 2016). Muchos de los BCAs son aislados a partir de la rizosfera del suelo o de tejidos vegetales (raíz, tallo, hojas y frutos) debido a que, como se mencionó, muchos de estos se relacionan simbióticamente con plantas, promoviendo su desarrollo y resistencia hacia fitopatógenos (Narayanasamy, 2013).

En el presente estudio se evaluó el potencial de 35 cepas fúngicas viables (descritas en la sección 6.1), como potenciales agentes de control biológico del patógeno fúngico *Colletotrichum sp.* para ello se empleó la técnica de enfrentamiento dual como prueba directa para seleccionar a cepas fúngicas como BCAs, obteniendo resultados variables con porcentajes de inhibición entre

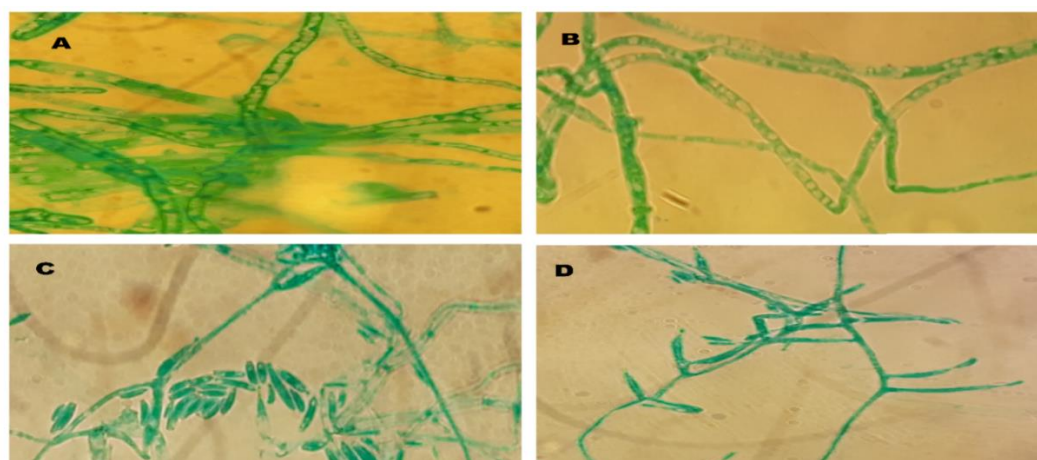
el 22 y el 70% contra *Colletotrichum sp.* (Anexo 7). Consiguientemente, los datos obtenidos fueron clasificados según la escala de Bell, la cual emplea cinco niveles de inhibición para la selección de BCAs potenciales (Bell et al., 1982). Donde los porcentajes de inhibición mayores o iguales al 80% se clasifican como actividad inhibitoria óptima (nivel I); porcentajes de inhibición mayores o iguales al 60%, actividad inhibitoria moderada (nivel II); porcentajes de inhibición mayores o iguales al 40%, actividad inhibitoria leve (nivel III); porcentajes de inhibición mayores o iguales al 20%, actividad inhibitoria deficiente (nivel IV) y por ultimo porcentajes de inhibición menores al 20% que representan una actividad inhibitoria nula (nivel V).

De acuerdo a la escala de Bell se seleccionaron 4 cepas fúngicas con actividad inhibitoria óptima, nivel II. Las cepas: CP12, CP17, CP18 (descritas previamente como miembros del *Aspergillus* Cardenas, O., (2016)), y CP34 (descritas previamente como miembro del *Penicillium* Cardenas, O., (2016)) cuya caracterización es descrita en la sección 6.3, las cuales presentaron porcentajes de inhibición entre el 60 y 70% contra el desarrollo del fitopatógeno *Colletotrichum sp.* Por otro lado, las cepas fúngicas restantes presentaron una actividad inhibitoria leve (59 – 40 %) y deficiente (39 – 22%) (Anexo 7). Asimismo, en las placas de enfrentamiento dual de las cepas seleccionadas CP12, CP17, CP18 y CP34 se observó dos posibles mecanismos antagónicos: la antibiosis desarrollada por la cepa CP34, que se caracteriza por la inhibición a distancia del crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum sp.* (Fig. 6A) y la competencia desarrollada por las cepas CP18, CP17 y CP12, que actuarían frente a *Colletotrichum sp.* mediante la competencia de nutrientes y producción de enzimas hidrolíticas (Fig. 6B, C y D).



**Figura 6.** Actividad antagónica directa de cepas fúngicas contra *Colletotrichum sp.*: **A.** CP34 inhibe a *Colletotrichum sp.* sin contacto directo (antibiosis), **B, C, D.** Cepas CP12, CP17 y CP18 inhiben a *Colletotrichum sp.* a través de mecanismos de competencia. **E.** *Colletotrichum sp.* (control de crecimiento).

Posterior a los enfrentamientos duales se realizó la tinción por impregnación con cinta adhesiva en la zona donde se observó la sobre posición de los BCAs y *Colletotrichum sp.*, para luego compararlas con las hifas del control de crecimiento de *Colletotrichum sp.* (fig. 7). En el caso de la cepa del genero *Penicillium sp.*, no se llegó a observar este tipo de antagonismo (competencia), siendo que el mecanismo de antibiosis es su mecanismo de antagonismo para este género.



**Figura 7.** Efecto antagónico de BCAs en hifas de *Colletotrichum sp.*: Hifas de *Colletotrichum sp.* desarrolladas en presencia de la CP34 (**A**) y CP 17 (**B**) Hifas de *Colletotrichum sp.* en ausencia de BCAs (**C** y **D**), todas las observaciones se realizaron con una magnificación 1000x



Las comparaciones entre la morfología de las hifas tomadas de la zona de confrontación (fig. 7A y B) e hifas de sanas del control de crecimiento (fig. 7C y D) permitió distinguir irregularidades en la morfología microscópica como el engrosamiento y formación de vacuolas, además de una esporulación tardía. Estas irregularidades podrían atribuirse a la inhibición que ejercen los BCAs CP34 y CP17 (fig. 7A y B, respectivamente) sobre *Colletotrichum sp.* a través de la secreción de metabolitos que actúan sobre el desarrollo del patógeno afectando su estructura hifal, por lo cual, pueden comprenderse como signos de estrés ante una alteración en su metabolismo (Dewi et al., 2017; Jadhav et al., 2017). Se ha reportado que los BCAs fúngicos pueden actuar a través de modos de acción directos e indirectos, que son desarrollados por diferentes mecanismos antagónicos como: la producción de enzimas líticas y de metabolitos que ejercen la antibiosis, la competencia por nutrientes y nicho, y el mejoramiento del desarrollo vegetal al producir moléculas promotoras de crecimiento e inductores de resistencia sistémica (Hoyos, 2011; Narayanasamy, 2013).

En el presente estudio, se observó una mayor actividad antagónica empleando la cepa CP34, presentando un porcentaje de inhibición del 70% frente al desarrollo micelial de *Colletotrichum sp.* De acuerdo a la figura 6A, se observa la ausencia de contacto directo entre la cepa CP34 y *Colletotrichum sp.* Suponiendo, que el mecanismo desarrollado por la cepa CP34 frente a *Colletotrichum sp.* es la antibiosis.

Yang et al., (2008) reportó que la actividad antagónica de *Penicillium sp.* frente a *Colletotrichum gloesporioides* obtuvo un porcentaje de inhibición del 68%, también se evaluaron su actividad frente a otros patógenos como: *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* y *Verticillium sp.*, con porcentajes de inhibición mayores al 50%. Del mismo modo, también se ha reportado su actividad frente a *Fusarium sp.* y *Fusarium oxysporium* con porcentajes de inhibición del 68 y 70 % respectivamente (Ilyas et al., 2016; Radhakrishnan, 2013).

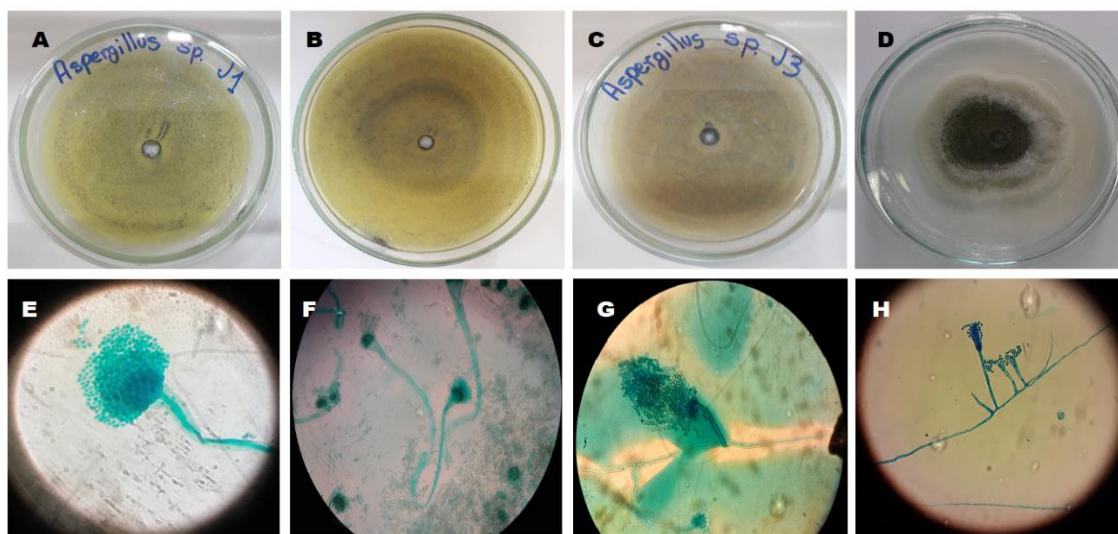
Por otro lado, las cepas CP12, CP17 y CP18 presentaron actividad antagónica con porcentajes de inhibición entre 60 y 65%, su actividad inhibitoria puede atribuirse a la competencia por nutrientes y espacio físico de modo indirecto sobre el desarrollo del patógeno. En estudios similares, Pérez et al. (2010) observó que *Aspergillus sp.* podía controlar el desarrollo de *Botrytis cinerea*, obteniendo un 60 % de inhibición del crecimiento hifal. Del mismo modo,

similares resultados desarrollados por Suarez-Estrella et al. (2007) y Ozer, (2011) quienes reportaron la actividad antagónica de *Aspergillus sp* contra *Fusarium oxysporium* y *Aspergillus niger* al obtener porcentajes de inhibición del 53% y 91%, respectivamente.

Cabe recalcar que las cepas seleccionadas en este estudio CP12, CP17, CP18 y CP34; potenciales BCAs son hongos filamentosos, clasificados anteriormente como *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* (Cardenas, 2016); géneros que han sido ampliamente reportados por su capacidad de producir una variedad de metabolitos secundarios (Binder et al., 2010; Keller & Turner, 2005; Van den Berg, 2013).

### 6.3 Características de BCAs seleccionados

La identificación de los BCAs seleccionados y la evaluación de su carácter axénico se llevó a cabo a través de técnicas convencionales como la observación de sus características morfológicas macro-microscópicas en cultivos monospóricos que corroboran la asignación de las cepas CP12, CP17, CP18 y CP34, en los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, respectivamente (fig. 8).



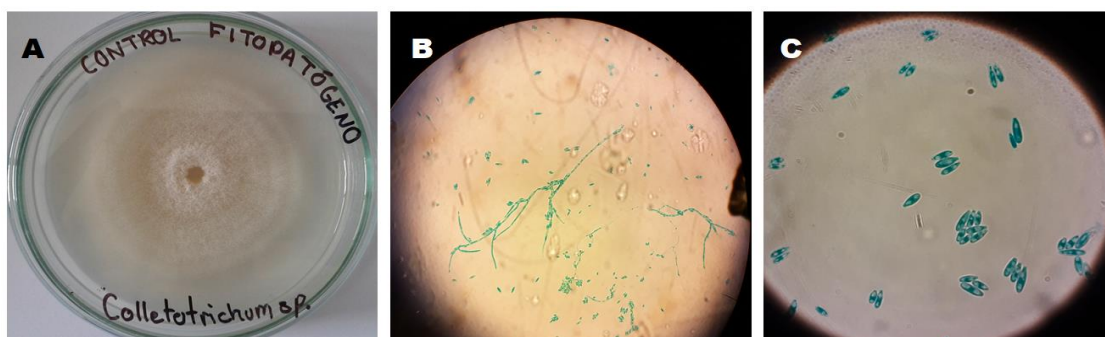
**Figura 8.** Características macro-microscópicas de BCAs seleccionados. **A y E. (1000x).** Identificación de la cepa CP17 *Aspergillus sp.*; **B y F. (400x)** Identificación de la cepa CP12 *Aspergillus sp.*; **C y G. (1000x)** Identificación de la cepa CP18 *Aspergillus sp.*; **D y H. (1000X)** Identificación de la cepa CP34 *Penicillium sp.*

Durante las observaciones, las cepas fúngicas CP12, CP17 y CP18 fueron identificadas por claves morfológicas como *Aspergillus sp.*, las características macroscópicas observadas fue un crecimiento micelial radial blanquecino a un inicio el cual en el transcurso del tercer día presento

una superficie polvorienta de coloración verdosa (fig. 8A, B y C). Asimismo, al quinto día de cultivo se observó un cambio en la tonalidad de las placas de cultivo a una amarillo-verdosa por la secreción de exudados de las cepas. Por otro lado, en observaciones microscópicas se corroboró la axenidad de los cultivos, al observar un solo tipo de formas reproductivas representativas para la identificación de ascomicetos del género *Aspergillus* al lograr distinguir hifas septadas hialinas, un conidióforo y fialides que dan lugar a una larga cadena de filoconidios (fig. 7E, F y G).

En el caso de la cepa CP34, las características macroscópicas que presentó fue un crecimiento micelial radial con una superficie polvorienta de coloración verde en la parte central y blanquecina algodonosa en los bordes (fig. 8D). Mientras que, en observaciones microscópicas, la cepa CP 34 presentó formas reproductivas características de ascomicetos del género *Penicillium* al distinguir hifas septadas hialinas, un conidióforo a 90° de las hifas y fialides que daban lugar a una larga cadena de filoconidios (fig. 7 H). Por lo anteriormente descrito, se corrobora que las cepas fúngicas CP12, CP17 y CP18 por sus claves morfológicas macro y microscópicas corresponden al género *Aspergillus* y la cepa CP34 corresponde al género *Penicillium*.

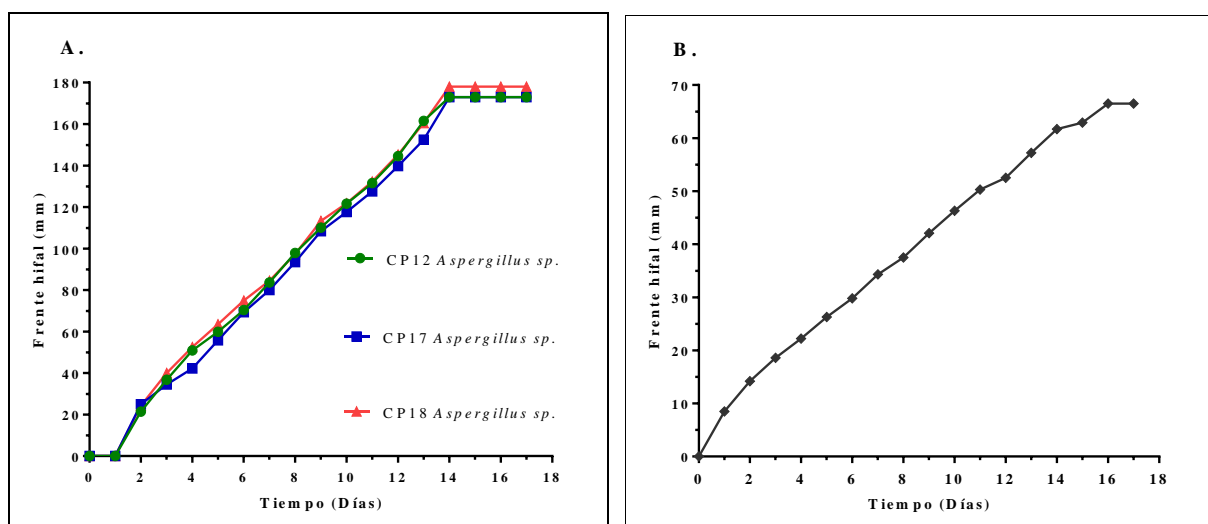
En el caso del patógeno perteneciente al género *Colletotrichum*, agente hemi-biotrófico causante de la antracnosis. Se conoce que sus características de desarrollo en placa varían de acuerdo al medio de cultivo que se empleen. Por lo cual, en la presente investigación éste se cultivó en medio PDA durante 15 días para observar las características macro-microscópicas del mismo. (fig. 9).



**Figura 9.** Identificación macro-microscópica de *Colletotrichum sp.* **A.** Identificación macroscópica de *Colletotrichum sp.* en PDA. **B y C.** (400x – 1000x) Identificación microscópica de *Colletotrichum sp.*

Las características macroscópicas del *Colletotrichum sp.*, se caracterizó por un crecimiento micelial radial con una superficie algodonosa de coloración rosa. Asimismo, tras el décimo quinto día de cultivo, se observó la aparición de exudados de coloración violácea, signo característico de estrés ante la ausencia de nutrientes (Fig. 9A). En el caso de las observaciones microscópicas, en la figura 9B y 9C se observa hifas septadas hialinas con brotes de conidios en cadena y conidios de forma ovalada, distinguiendo la presencia de dos vacuolas. Estas características morfológicas corresponden al género *Colletotrichum* descritas por Watanabe, (2010), y por los resultados obtenidos se corrobora que el fitopatógeno en estudio corresponde a *Colletotrichum sp.*

Consiguiente a la caracterización macro-microscópica de los BCAs y del patógeno, se determinó su cinética de crecimiento (Fig. 10 y Fig. 11) para lo cual, se los cultivó en un medio mínimo agar agua. Concluido el décimo séptimo día de cultivo, las cepas alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento. Durante el cultivo de los BCAs, se evaluó su crecimiento diario a través de la medición del diametro del frente hifal (mm/d) (fig. 10).

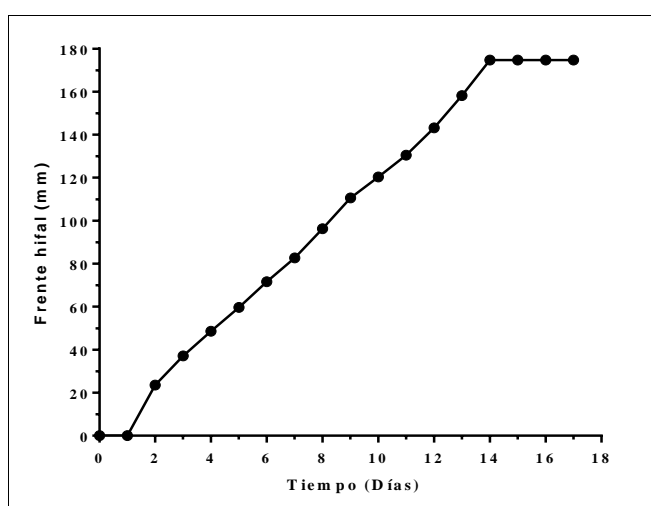


**Figura 10.** Cinética de crecimiento de BCAs: A. *Aspergillus* CP12, CP17 y CP18 B. *Penicillium* CP34. Todas las cepas fúngicas fueron cultivadas en medio mínimo basal (agar agua) por 17 días a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

El crecimiento y desarrollo de las cepas de *Aspergillus* CP12, CP17 y CP18 presento una tasa de crecimiento de 11.38 mm/d, 11.33 mm/d y 11.5 mm/d, respectivamente (fig. 10A). en el caso de la cepa *Penicillium* CP34 presentó una tasa de crecimiento menor de 3.87 mm/d (fig. 10B). Estos datos fueron de utilidad para evaluaciones de optimización de las condiciones de cultivo

de los BCAs (descrito en la sección 6.4) siendo que la cinética de crecimiento permitió distinguir dos fases del metabolismo de las cepas en estudio: la trofofase y la idiofase, fases consideradas importantes en la producción de metabolitos bioactivos (Patil et al., 2016). La trofofase se caracteriza por el desarrollo y la producción de metabolitos precursores y cofactores para la síntesis de metabolitos secundarios en la idiofase. Esta última es también conocida como fase estacionaria en la que se producen metabolitos secundarios, entre ellos agentes antimicrobianos que no son indispensables para el desarrollo, sino se producen como una respuesta de adaptación, depredación y competencia (El-Mansi et al., 2011; Patil et al., 2016; Sanchez-Perez et al., 2020). Por lo cual, en la cinética de crecimiento de los BCAs se determinó que las cepas *Aspergillus* CP12, CP17 y CP18 ingresan a idiofase al decimo cuarto día, asimismo la cepa *Penicillium* CP34 ingresa a idiofase al decimo sexto día, datos importantes para evaluar la producción de metabolitos bioactivos con capacidad antagónica.

En la figura 11, se observa la representación de la cinética de crecimiento del patógeno *Colletotrichum sp.* con una tasa de crecimiento de 11.41 mm/d e ingresando a la fase estacionaria al decimo cuarto día. Los datos obtenidos durante esta evaluación fueron de utilidad para determinar la sensibilidad del patógeno hacia los metabolitos producidos por los BCAs seleccionados, siendo que los datos obtenidos permitieron conocer el desarrollo hifal habitual de *Colletotrichum sp.* en ausencia de inhibidores; además útil para determinar el tiempo de evaluación de la actividad antagónica de los metabolitos bioactivos.



**Figura 11.** Cinética de crecimiento de *Colletotrichum sp.* agente causal de la antracnosis. El fitopatógeno fue cultivado en medio mínimo basal (agar agua) por 17 días a  $27\pm 1^\circ\text{C}$ .

#### **6.4 Actividad antagónica de filtrados fúngicos frente a *Colletotrichum sp.***

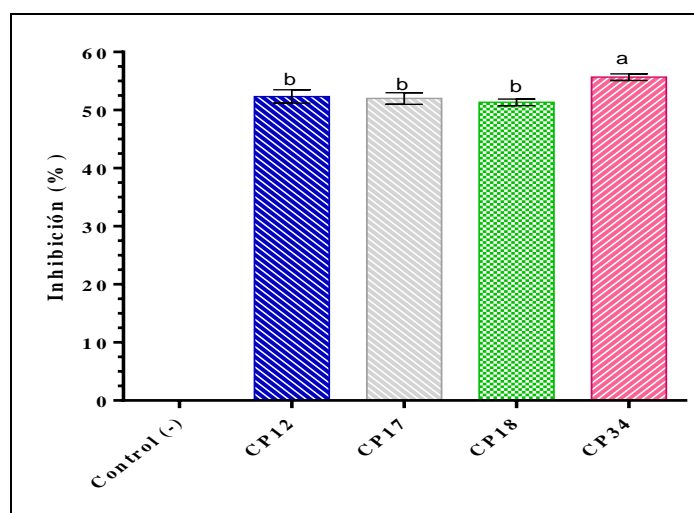
Los microorganismos son conocidos como productores de metabolitos de interés biotecnológico que pueden ser obtenidos a través de diferentes técnicas de cultivo (El-Mansi et al., 2011). Es así que se estudian metabolitos primarios o secundarios (enzimas, vitaminas, proteínas, péptidos, antibióticos y ácidos orgánicos, entre otros) (Berenjian, 2019; Madigan et al., 2019) con aplicación en diferentes industrias. La obtención de estos productos suele ser realizada a través del cultivo de microorganismos en medio líquido, el cual implica el uso de sustratos suspendidos y a disposición (Berenjian, 2019). Además de permitir la recuperación de los metabolitos bioactivos de una manera sencilla. Estos métodos de cultivo pueden ser conducidos a través de diferentes modos operacionales como el cultivo batch, el batch alimentado, el batch semi-alimentado o continuo (Tresguerres et al., 2013).

Los BCAs seleccionados por técnicas de enfrentamiento dual contra *Colletotrichum sp.* (Sección 5.3.4.1) fueron estudiados en función a la actividad antagónica de sus metabolitos bioactivos extracelulares producidos en idiofase en un cultivo líquido. Además, se evaluaron condiciones de cultivo para obtener una mayor actividad antagónica frente al fitopatógeno. Considerando que la aplicación directa de los BCAs en cultivos agrícolas podría interrumpir el equilibrio microbiano de los nichos ecológicos, en este estudio se optó por el empleo de metabolitos bioactivos de filtrados fúngicos considerándose también esta estrategia parte del control biológico (Hoyos, 2011). Alternativa que permite aprovechar la capacidad metabólica de los microorganismos del suelo y otros asociados a plantas (endófitos) por su capacidad de producir y secretar metabolitos bioactivos que de igual forma promueven el desarrollo y salud de las plantas.

Con lo anteriormente mencionado, en la presente investigación, se estudió la producción de filtrados fúngicos a través de su cultivo en caldo papa bajo las condiciones de cultivo descritas en la sección 5.3.4.3 [estanco y ciclo de luz y oscuridad (12 h/d)]. Concluido el tiempo de cultivo, se recuperó el sobrenadante (filtrado crudo con metabolitos bioactivos) y se determinó su actividad antagónica contra *Colletotrichum sp.* (procedimiento descrito en la sección 5.3.6).

Los resultados obtenidos demostraron que los filtrados fungicos de los BCAs seleccionados poseen actividad antagónica frente a *Colletotrichum sp.* (fig. 12) observando una reducción en

el desarrollo del patógeno con porcentajes de inhibición entre el 51 y 56 %, presentando una diferencia significativa respecto al control según el análisis de varianza ANOVA ( $p < 0.001$ ).



**Figura 12.** Actividad antagonica de filtrados fúngicos producidos en cultivo batch a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 días de BCAs (*Aspergillus sp.* CP12, CP17, CP18 y *Penicillium sp.* CP34) frente a *Colletotrichum sp.* durante 15 días de incubación, empleando la técnica de vertido en placa (dilución 1:2, v/v). Las líneas verticales representan la desviación estándar de tres replicas. Las letras no comunes indican agrupaciones con diferencia significativa en el Test de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Además, para determinar si existió diferencia significativa entre la actividad antagonica de los filtrados fungicos se realizó el análisis de comparación multiple, empleando el test de Tukey. Éste reveló que los porcentajes de la actividad antagonica de los filtrados fúngicos de las cepas de *Aspergillus* CP12, CP17 y CP18 no presentan una diferencia significativa entre sí, por lo cual muy probablemente, y sustentado con las características morfológicas descritas previamente (sección 6.3), las cepas de *Aspergillus* CP12, CP17 y CP18 podrían corresponder a la misma especie. No obstante, el resultado obtenido con el filtrado de la cepa *Penicillium sp.* CP34 posee una diferencia significativa en relación a las otras cepas en estudio ( $p < 0.05$ ) lo que indica posiblemente una diferencia en mecanismo de acción.

Los resultados obtenidos al emplear los filtrados fúngicos frente a *Colletotrichum sp.*, son acordes a los resultados esperados, ya que anteriormente presentaron actividad antagonica directa en enfrentamientos duales. Sin embargo, cabe destacar que hubo una disminución en la actividad antagonica, obteniendo porcentajes de inhibición entre el 51 y 56 % en comparación con los resultados obtenidos en los enfrentamientos duales donde los porcentajes de inhibición

fueron entre el 60 y 70 %. Esta diferencia puede ser explicada por el empleo de BCAs de manera directa en enfrentamientos duales (i) o sus filtrados de cultivo líquido (ii) contra *Colletotrichum sp.* En el primer caso, el enfrentamiento dual implica el co-cultivo entre el agente patógeno y el agente de control biológico simulando un ambiente natural que permite exhibir al máximo la competencia entre ambos agentes, siendo que estos interactúan y terminan compitiendo por un nicho y una cantidad limitada de nutrientes, lo cual promueve la producción y secreción de metabolitos bioactivos (Bertrand et al., 2014; Costa et al., 2019) que implica la activación de genes y mecanismos de defensa contra el patógeno (Netzker et al., 2015; Vinale et al., 2017). Ello explica la disminución en la actividad biológica de los filtrados que se producen en ausencia del patógeno, los cuales son recuperados y evaluados contra el patógeno posteriormente. Sin embargo, cabe señalar que la estrategia empleando los filtrados con metabolitos bioactivos ya ha sido evaluada en diversas investigaciones con distintos microorganismos; entre los cuales los filtrados de los hongos del género *Trichoderma* se caracterizan por contener enzimas hidrolíticas como quitinasas,  $\beta$ -glucanasas, proteasas y compuestos antifúngicos (Es-Soufi et al., 2020; Naglot et al., 2015; Qualhato et al., 2013; S. Zhang et al., 2018) y que hoy en día han sido empleados en la formulación de bioinsumos agrícolas para el control de plagas en cultivos.

Corroborando los resultados obtenidos en esta investigación, existen reportes que han demostrado la actividad antagónica de los filtrados de cultivo de *Penicillium* y *Aspergillus*. Por ejemplo, Mejdoub-Trabelsi et al., (2017) obtuvo porcentajes de inhibición entre 47 - 62 % y 33 - 44 % al emplear los filtrados de *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.*, contra fitopatógenos asociados a la papa como: *Fusarium oxysporium*, *F. graminearum* y *F. sambonicum*. Abdallah et al., (2014) reportó resultados similares al emplear el filtrado de cultivo de diferentes cepas de *Aspergillus sp.* obteniendo porcentajes de inhibición entre el 39 - 77 % en contra de *Pythium ultimum* patógeno de la papa. De la misma manera, Khokhar et al., (2011) y Kang et al., (2005) reportaron la actividad antagónica de *Penicillium simplicissimum*, *P. italicum* y de *Aspergillus sclerotiorum* con porcentajes de inhibición de entre el 42 - 68 % en contra de *Fusarium oxysporium*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Clarosporidium cladosporoides*, patógenos en cultivos frutícolas y árboles de especies forestales. Por lo cual, los resultados de actividad antagónica moderada (porcentaje de inhibición mayor o igual al 60 %; nivel II según la escala de Bell) obtenidos al emplear los filtrados de *Aspergillus sp.* CP12, CP17, CP18 y *Penicillium*



*sp.* CP34 son comparables a los ya reportados en otros estudios y albergan la posibilidad de ser empleados potencialmente en contra de *Colletotrichum sp.* Sin embargo, cabe notar que las condiciones de cultivo para la obtención de los mismos pueden afectar su producción y por tanto su actividad antagónica contra el patógeno.

Por lo cual, considerando lo anteriormente mencionado y debido a que el cultivo batch permite realizar modificaciones en las condiciones de cultivo para optimizar el crecimiento y desarrollo de los microorganismos para incrementar el rendimiento de los metabolitos de interés (Steyaert et al., 2010). Consiguientemente se analizó el efecto de parámetros físicos, biológicos y químicos durante el cultivo de BCAs y su repercusión en la actividad antagónica para de este modo seleccionar los parámetros óptimos que permitan alcanzar mayores porcentajes de inhibición en contra del patógeno *Colletotrichum sp.*

#### **6.4.1 Efectividad antagónica de filtrados fúngicos producidos en condiciones de cultivo optimizadas**

##### **6.4.1.1 Efecto de la agitación y la fotosensibilidad en la producción de filtrados fúngicos**

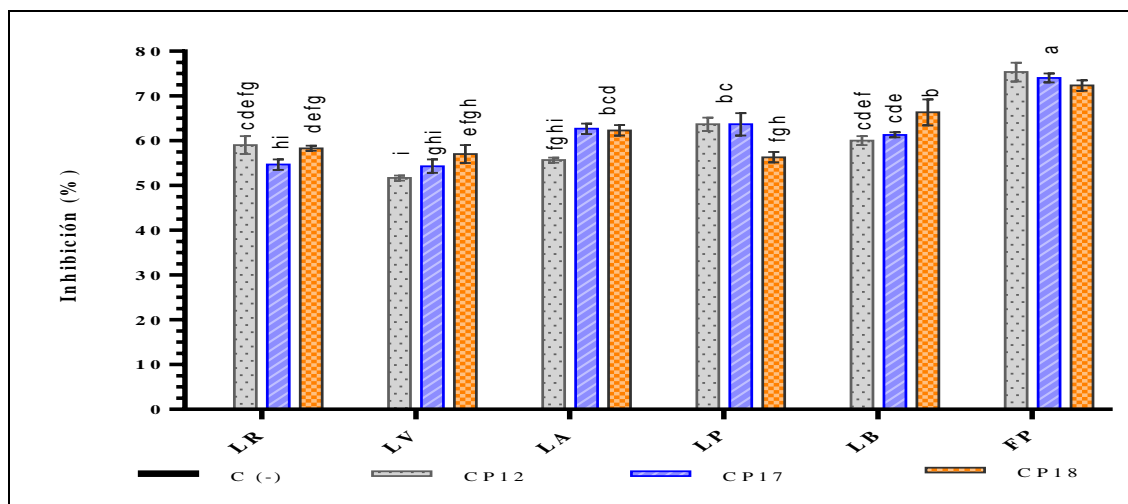
Diferentes estudios han revelado que los hongos pueden percibir y reaccionar a distintas longitudes de onda al poseer fotoreceptores. Esta capacidad tiene base genética, mediada por proteínas fotosensibles altamente conservadas en el reino fungí (Fuller et al., 2015). Además, de poseer receptores específicos de luz, los hongos también pueden percibir la intensidad de la luz, cualidad conocida como fotosensibilidad (Kück et al., 2009). La luz puede estimular la activación de cascadas de señalización para generar cambios en la expresión génica que modifican varios mecanismos como la inducción de estrés oxidativo, térmico y la reducción o incremento de la tasa de crecimiento (Fuller et al., 2015). Estos mecanismos son una respuesta al estrés, que pueden repercutir en la entrada temprana a idiofase y a la producción de metabolitos bioactivos. Por ello, la exposición a la luz es considerada como un componente importante en la optimización de condiciones de cultivo para la producción de biomasa y la producción de metabolitos de interés (Steyaert et al., 2010).

Con lo anteriormente mencionado, con el fin de optimizar la actividad inhibitoria de los filtrados fúngicos frente a *Colletotrichum sp.*, se evaluaron las condiciones de cultivo de los BCAs. Considerando como parámetros físicos: la agitación y foto sensibilidad; parámetros biológicos:

el co-cultivo con el patógeno y parámetros químicos: la concentración de fuente de carbono y el tipo de fuente de nitrógeno. Por lo tanto, en la presente sección se estudió la actividad antagonista de metabolitos bioactivos producidos en agitación constante y fotoperiodo (procedimiento descrito en la sección 5.3.6.1). Concluido el tiempo de cultivo se determinó su actividad antagonista frente a *Colletotrichum sp.* (procedimiento descrito en la sección 5.3.6).

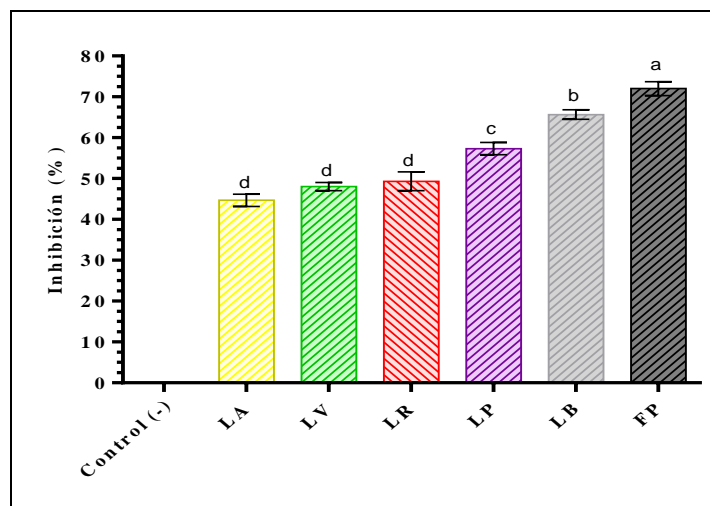
Los resultados obtenidos demostraron que los filtrados fungicos de BCAs cultivados en agitación y exposición a distintas longitudes de onda, LB: luz blanca ( $\lambda$ : 400 – 750 nm); LR: luz roja ( $\lambda$ : 625 – 740 nm); LA: luz amarilla ( $\lambda$ : 565 – 590 nm); LV: luz verde ( $\lambda$ : 520 – 565 nm); LP: luz violeta ( $\lambda$ : 380 – 446 nm); y FP: fotoperiodo con luz natural de 12 h/día. Presentaron actividad antagonista frente a *Colletotrichum sp.* con porcentajes de inhibición variables que van desde 45 al 75 % , de acuerdo a analisis estadístico se observa una diferencia significativa respecto al control negativo (*Colletotrichum sp.* desarrollado en ausencia de BCAs) según el análisis de varianza ANOVA ( $p < 0.001$ ) (fig. 13 y fig. 14).

En la figura 13, se observa la actividad antagonista de los filtrados fúngicos de los BCAs pertenecientes al género de *Aspergillus sp.* cepas CP12, CP17 y CP18. Donde se puede observar que las tres cepas presentan mejor actividad antagonista en condiciones de fotoperiodo (FP) y agitación, como condición de cultivo óptima al alcanzar porcentajes de inhibición mayores al 70 % , a diferencia de las anteriores condiciones de cultivo descritas que presentaron porcentajes de inhibición entre el 51 al 68 % . Asimismo, el análisis de comparación múltiple corroboró que el FP y agitación es la condición de cultivo óptima con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre esta y las otras condiciones de cultivo, respectivamente (fig. 13). De este modo, se determina que los porcentajes de inhibición obtenidos empleando un cultivo en fotoperiodo y agitación son mayores a los obtenidos en fotoinducción  $FP > LB = LP > LA > LV = LR$ .



**Figura 13** Porcentaje de inhibición de filtrados fúngicos producidos por: *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18 frente a *Colletotrichum sp.* durante 15 días de cultivo, empleando la técnica de vertido en placa dilución 1:2 (v/v). Las líneas verticales representan la desviación estándar de tres replicas. Las letras no comunes indican agrupaciones con diferencia significativa para el test de Tukey  $FP > LB > LP > LR = LV = LA$ . ( $p < 0.05$ ). Condiciones de cultivo para la obtención de los filtrados bajo parámetros físicos: agitación (120 rpm) y fotoinducción (LB: luz blanca, LP: luz purpura, LV: luz verde, LA: luz amarilla, LR: luz roja y FP: Fotoperiodo con 12h/día; Control (-) *Colletotrichum sp.* cultivado en PDA).

En la figura 14 se observa los porcentajes de inhibición de los filtrados de la cepa *Penicillium sp.* CP34 que presentaron una diferencia significativa respecto al control negativo (*Colletotrichum sp.* desarrollado en ausencia de BCAs) según el análisis de varianza ANOVA ( $p < 0.001$ ), los filtrados de la cepa de *Penicillium sp.* CP34 en condiciones de fotoinducción con diferentes filtros presentaron porcentajes de inhibición variados que van desde el 45 al 72 %. Sin embargo, los filtrados de *Penicillium sp.* CP34 producidos en fotoperiodo y agitación alcanzaron porcentajes de inhibición del 72 % frente a *Colletotrichum sp.* Del mismo modo, la condición fotoperiodo y agitación posee una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a las otras condiciones evaluadas. Por lo cual, se determina que el cultivo en fotoperiodo y agitación es la condición óptima para obtener filtrados con metabolitos con mayor actividad antagonista contra el patógeno, seguida de la fotoinducción  $FP > LB > LP > LR = LV = LA$ .



**Figura 14** Porcentaje de inhibición de filtrados producidos por BCA: *Penicillium sp.* CP34 frente a *Colletotrichum sp.* durante 15 días de cultivo, empleando la técnica de vertido en placa dilución 1:2 (v/v). Las líneas verticales representan la desviación estándar de tres replicas. Las letras no comunes indican agrupaciones con diferencia significativa para el Test de Tukey ( $p < 0.05$ )  $FP > LB > LP > LR = LV = LA$ . Condiciones de cultivo para la obtención de los filtrados bajo parámetros físicos: agitación (120 rpm) y fotoinducción (LB: luz blanca, LP: luz púrpura, LV: luz verde, LA: luz amarilla, LR: luz roja y FP: Fotoperiodo con 12h/día; Control (-) *Colletotrichum sp.* cultivado en PDA.

Los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, son conocidos como agentes productores de una gran variedad de metabolitos, entre los cuales se destacan los metabolitos antibacterianos y antifúngicos de interés para el desarrollo de bioinsumos agrícolas (Pusztahelyi et al., 2015). Dicha producción puede estar involucrada con las condiciones de cultivo y ha sido considerada en diferentes estudios, existen investigaciones que corroboran nuestros resultados y que revelan la influencia de la agitación y la del ciclo circadiano (exposición luz - oscuridad), es decir la condición natural (Fuller et al., 2015; Köhl et al., 2019).

Entre los parámetros físicos que se evaluaron son fotoinducción y agitación, como condición de estrés para la obtención de filtrados fúngicos de BCAs con actividad inhibitoria frente a *Colletotrichum sp.*, se destaca la agitación como condición de cultivo principal y coadyuvante en la producción de filtrados fúngicos con mayor actividad inhibitoria frente al patógeno. Dado que al comparar los resultados obtenidos en la anterior sección (6.4), cultivo en fotoperiodo (12 h/d) y estanco se obtuvo un porcentaje de inhibición del 51 al 56 %, son menores a los obtenidos en cultivo en fotoperiodo (12 h/d) y agitación que presentó un porcentaje de inhibición mayor al 70 %. Las condiciones de agitación y fotoperiodo son relevantes para la obtención de filtrados con capacidad de inhibir al patógeno en estudio, porque suple de oxígeno a los microorganismos

durante su cultivo, influyendo en el consumo de sustratos y la síntesis de productos (Ibrahim et al., 2015). Además, de controlar la transferencia de nutrientes y de actuar como un aceptor de electrones terminal (oxígeno) en reacciones oxidativas que proporcionan energía para las actividades celulares (Alves et al., 2010).

Sin embargo, en el caso de emplear fotoinducción los porcentajes de inhibición son menores a los esperados. Estudios como el de Köhl et al., (2019) en *Penicillium chrysogenum* que demostró que una exposición continua a la oscuridad, inhibe la formación de cuerpos fructíferos pero induce el desarrollo vegetativo y que a diferencia de este, la exposición a la luz induce la producción de cuerpos fructíferos pero inhibe el desarrollo vegetativo. Llegando a deducir que la alternación entre la luz y oscuridad permitiría un desarrollo mejorado del hongo. Lo que coincide con los resultados en la producción y actividad antagónica de filtrados fúngicos de *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18, y *Penicillium sp.* CP34 al estar expuestos al fotoperiodo (12h/d). Del mismo modo, Rouissi et al., (2013) reportó la actividad inhibitoria de los filtrados del cultivo de *Penicillium expansum* cuando fueron producidos en fotoperiodo, obteniendo porcentajes de inhibición cercanos al 60% en contra del desarrollo del fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*.

Por tanto, considerando los resultados obtenidos en esta sección, se concluye que la condición de cultivo óptima para obtener filtrados fúngicos de BCAs con una mayor actividad antagónica frente al patógeno *Colletotrichum sp.* es el fotoperiodo (12 h/d) con agitación (120 rpm). Esta es la condición base sobre la cual se evaluó el efecto de los parámetros biológicos y químicos descritos en la siguiente sección.

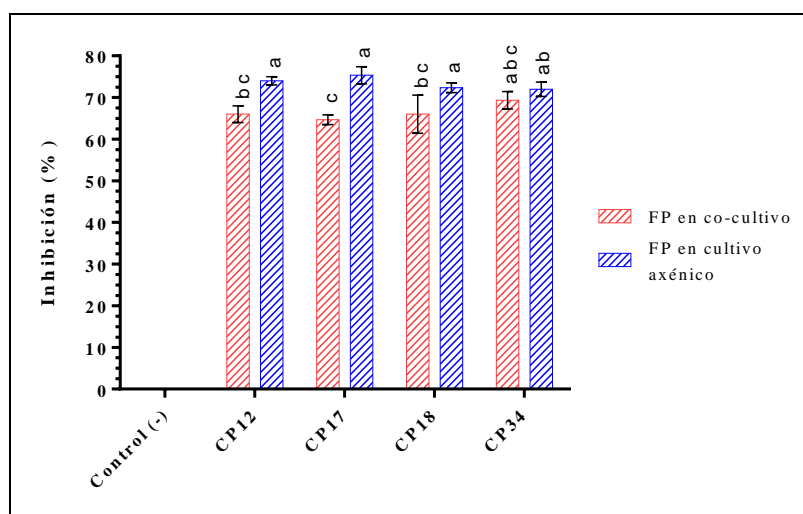
#### **6.4.1.2 Co-cultivo con *Colletotrichum sp.* en la producción de filtrados fúngicos**

El co-cultivo microbiano ha sido empleado eficazmente para inducir vías metabólicas (Karupiah et al., 2019), incluyendo la producción de metabolitos secundarios a través de la activación de moléculas de señalización o de expresión de enzimas para incrementar la producción de metabolitos (Wakefield et al., 2017). El empleo de consorcios microbianos en el sistema agrícola puede mejorar la eficacia, estabilidad y uniformidad de las poblaciones microbianas en el control de fitoenfermedades y en la promoción del crecimiento vegetal en diversas condiciones ambientales (Stockwell et al., 2011). Por ello, considerando estudios

similares, en esta sección se evaluó la producción de metabolitos bajo el efecto del co-cultivo de los BCAs con el fitopatógeno (procedimiento descrito en la sección 5.3.6.2). Concluido el tiempo de cultivo se determinó su actividad antagonica frente a *Colletotrichum sp.* (Procedimiento descrito en la sección 5.3.6).

La actividad antagonica de los filtrados fúngicos de los BCAs *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18 y, *Penicillium sp.* CP34 en co-cultivo con el patógeno *Colletotrichum sp.* puede ser observada en la figura 15. En donde se puede apreciar una diferencia significativa respecto al control negativo (*Colletotrichum sp.* desarrollado en ausencia de BCAs) según el análisis de varianza ANOVA ( $p < 0.001$ ).

Los porcentajes de inhibición de los BCAs en co-cultivo con el patógeno van desde el 60 al 65 % para las cepas de *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18 y hasta un 69 % para la cepa de *Penicillium sp.* CP34. No obstante, la actividad antagonica de los filtrados fúngicos obtenidos en cultivo axénico fue mayor a la obtenida en co-cultivo, presentando porcentajes de inhibición mayores al 70 %, demostrando una diferencia significativa a favor del cultivo axénico en fotoperiodo para las cepas de *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18. A excepción de la cepa *Penicillium sp.* CP34 que no presentó diferencia significativa entre los filtrados obtenidos en co-cultivo y cultivo axénico según el Test de Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Figura 15.** Porcentajes de inhibición de filtrados fúngicos producidos por BCAs: *Aspergillus sp.* CP12, CP17, CP18 y *Penicillium sp.* CP34 bajo el efecto de co-cultivo durante 15 días con el patógeno contra *Colletotrichum sp.* Se empleó la técnica de vertido en placa, dilución 1:2 (v/v). Las líneas verticales representan la desviación estándar de tres replicas. Control (-) *Colletotrichum sp.* cultivado en PDA.

A través del co-cultivo se ha logrado comprender la interacción entre distintas poblaciones microbianas (Karuppiyah et al., 2019); además, de los cambios en los sistemas metabólicos, al tener un enfoque motivado por la competencia y comunicación inter-microbiana (Netzker et al., 2015). La alternativa de inducir la producción de metabolitos mediante la activación y expresión de genes a través del co-cultivo es de interés en la industria agrícola para el desarrollo de bioinsumos, por lo cual, hay investigaciones que evalúan la interacción de distintos microorganismos (Es-Soufi et al., 2020; Karuppiyah et al., 2019; Li et al., 2020). En esta sección, se evaluó el efecto del co-cultivo de cada BCA con el fitopatógeno y su repercusión en la actividad antagónica de sus filtrados contra *Colletotrichum sp.* Sin embargo, los resultados obtenidos revelaron menor actividad antagónica comparada con cultivos axénicos ( $p < 0.05$ ). En contraste, el estudio de Karuppiyah et al., (2019) reveló que el co-cultivo entre *Trichoderma asperellum* GDFS1009 y *Bacillus amyloliquefaciens* 1841, posee un efecto sinérgico frente a *Fusarium graminearum* con porcentajes de inhibición entre el 75 y 85 %. Por otro lado, Li et al., (2020) realizó el co-cultivo entre *Trichoderma atroviride* SG3403 y *Bacillus subtilis* 22; sin embargo, la actividad antagónica del filtrado resultante, presentó un porcentaje de inhibición menor al 54 %, en relación a los estudios de Karuppiyah et al., (2019) en contra de *Fusarium graminearum*. Estas investigaciones se basan en combinar los mecanismos de acción antagónicos y de ese modo incrementar su actividad inhibitoria frente a patógenos.

Una estrategia alternativa descrita por Emanuel et al., (2020) empleó el micelio inactivado de *Colletotrichum sp.* en el co-cultivo de *Trichoderma sp.* y *Bacillus subtilis* revelando que el co-cultivo con la adición del micelio inactivo del fitopatógeno, promueve la producción de compuestos orgánicos difusibles, como el acetato de butilo e incrementa el efecto antagónico contra *Colletotrichum sp.* donde se observó alteraciones en la morfología e inhibición del crecimiento micelial radial con porcentajes de entre el 70 y 90 %, además de reducir la formación de esporas, produciendo colonias blancas del fitopatógeno.

En relación a lo mencionado, el co-cultivo ha demostrado tener potencial biotecnológico; sin embargo, se requieren más estudios para determinar la eficiencia de los BCAs seleccionados. En el caso de esta investigación, dos estrategias ameritan mayores estudios: el co-cultivo entre BCAs seleccionados, fúngicos o bacterianos, para observar la sinergia de sus efectos

antagónicos frente a *Colletotrichum sp.* y otros fitopatógenos, considerando antes estudiar la interacción entre estos a través del enfrentamiento dual y observando que no exista un efecto antagónico entre sí (Schisler et al., 2011). Del mismo modo, se recomienda el cultivo axénico de BCAs con la adición del micelio inactivo del fitopatógeno para inducir la producción de metabolitos bioactivos con actividad antagónica como en el estudio de Emanuel et al., (2020).

#### **6.4.1.3 Actividad de filtrados fúngicos producidos a diferentes concentraciones de glucosa**

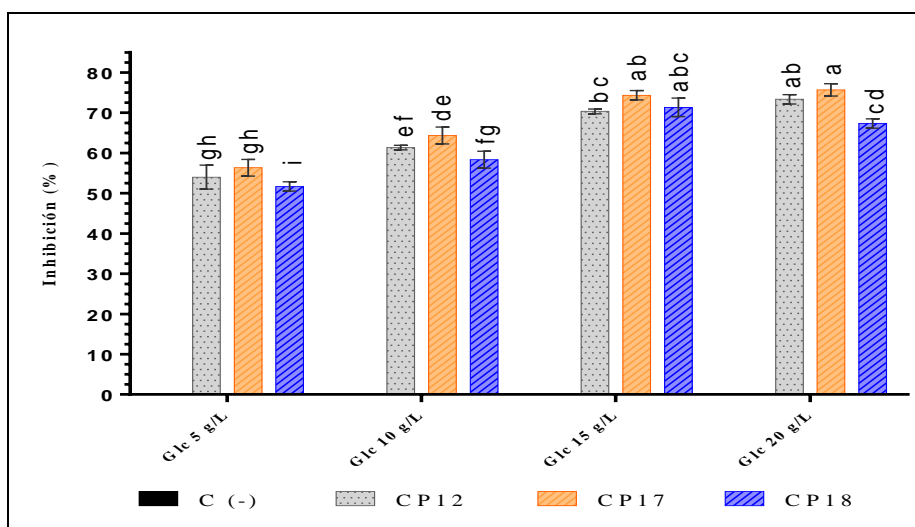
Se conoce que la composición química de los medios de cultivo es de utilidad para la obtención de varios productos de interés a través de las fermentaciones (S. Zhang et al., 2018). En ese sentido, para lograr mayor producción de biomasa microbiana o de metabolitos específicos a un costo razonable, es necesario diseñar medios de cultivo definidos (constituidos por compuestos químicamente definidos y en una cantidad precisa) o complejos (constituidos por elementos orgánicos cuya composición nutricional no es precisamente descrita) (Angulo-Cortés et al., 2012; J. Liu et al., 2017). La composición nutricional se basa principalmente en las fuentes de carbono y de nitrógeno, siendo que ambas actúan como precursores que regulan el metabolismo e influyen en la síntesis del producto final (Elibol, 2004; Singh et al., 2017).

En la presente sección se evaluó el efecto de la suplementación de glucosa en diferentes concentraciones al medio de cultivo CPD (5, 10, 15 y 20 g de glucosa/L) para la producción de metabolitos con actividad antagónica contra *Colletotrichum sp.* Posteriormente, sobre la concentración optimizada de glucosa se evaluó el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno, empleando cloruro de amonio, sulfato de amonio y urea (procedimiento descrito en la sección 5.3.6.3). En ambas evaluaciones los BCAs fueron expuestos al fotoperiodo y agitación durante su cultivo, concluido el tiempo de cultivo se determinó su actividad antagónica frente a *Colletotrichum sp.* (procedimiento descrito en la sección 5.3.6).

La actividad antagónica de los filtrados fúngicos obtenidos al cultivar los BCAs en el caldo papa suplementado con diferentes concentraciones de glucosa puede ser observada en las figuras 16 y 17. Los porcentajes de inhibición variaron entre el 51 y 77 % en el caso de las cepas de *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18, dando como resultado una diferencia significativa entre todos los ensayos respecto al control negativo (*Colletotrichum sp.* desarrollado en ausencia de

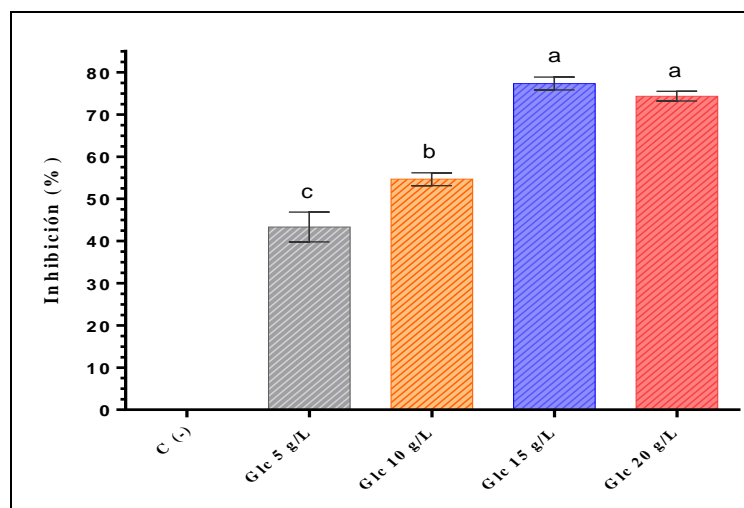


filtrados de BCAs) según el análisis de varianza ANOVA ( $p < 0.001$ ). Sin embargo en la suplementación de caldo papa con glucosa a concentraciones de 15 y 20 g/L, se obtuvo mayor actividad antagónica frente al patógeno con porcentajes de inhibición entre 70 y 77%, respectivamente. Del mismo modo, el análisis de comparación multiple (test de Tukey,  $p > 0.05$ ) reveló que no existe diferencia significativa entre los porcentajes de inhibición obtenidos con los filtrados de las cepas de *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18. Por lo cual, para ensayos posteriores se seleccionó a la cepa *Aspergillus sp.* CP17 cultivado en 20 g/L de glucosa.



**Figura 16** Porcentajes de inhibición de filtrados fúngicos producidos por: *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18 frente a *Colletotrichum sp.* durante 15 días de cultivo bajo la influencia de diferentes concentraciones de glucosa, empleando la técnica de vertido en placa dilución 1:2 (v/v). Las líneas verticales representan la desviación estándar de tres replicas. Las letras no comunes indican agrupaciones con diferencia significativa para el Test de Tukey ( $p < 0.05$ ). Condiciones de cultivo para la obtención de filtrados: suplementación del caldo papa con glucosa a 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L y 20 g/L. Control negativo (-) *Colletotrichum sp.* cultivado en PDA en ausencia de BCAs.

En la figura 17 se observa los porcentajes de inhibición de los filtrados obtenidos con la cepa *Penicillium sp.* CP34 cultivada a diferentes concentraciones de glucosa (5, 10, 15 y 20 g/L), éstos presentan diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo (*Colletotrichum sp.* desarrollado en ausencia de BCAs) según el análisis de varianza ANOVA ( $p < 0.001$ ). Los porcentajes de inhibición van desde el 40 al 77 %, destacando que las cepas de *Aspergillus sp.* suplementados con glucosa a concentraciones de 15 y 20 g/L en caldo papa presenta mayor actividad antagónica frente al patógeno. El analisis de comparación multiple, reveló una diferencia significativa en la actividad antagónica al emplear las diferentes concentraciones de glucosa, excepto entre 15 y 20 g/L ( $p < 0.05$ ).



**Figura 17** Porcentajes de inhibición de filtrados producidos por BCA: *Penicillium sp.* CP34 frente a *Colletotrichum sp.* durante 15 días de cultivo, bajo la influencia de diferentes concentraciones de glucosa empleando la técnica de vertido en placa, dilución 1:2 (v/v). Las líneas verticales representan la desviación estándar de tres replicas. Las letras no comunes indican agrupaciones con diferencia significativa para el Test de Tukey ( $p < 0.05$ ). Condiciones de cultivo para la obtención del filtrado: suplementación del caldo papa con glucosa a 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L y 20 g/L. Control negativo (-) *Colletotrichum sp.* cultivado en PDA en ausencia de BCAs.

Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de la concentración de la fuente de carbono en la producción de filtrados fúngicos revelan una actividad antagónica moderada (nivel II; porcentajes de inhibición mayores al 60 %) según la escala de Bell et al., (1982), con porcentajes de inhibición del 76 % en el caso de la CP17 *Aspergillus sp.* y del 75 % con la CP34 *Penicillium sp.* al emplear glucosa en una concentración de 20 g/L en caldo papa; concentración en la cual se evaluó el efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno en la siguiente sección.

Como se mencionó anteriormente, la optimización de la composición de un medio de cultivo es importante ya que influye en la productividad metabólica de los microorganismos, ya que la concentración de ciertos componentes como la glucosa pueden modificar la expresión y producción de diferentes metabolitos de interés (El-Mansi et al., 2011; Madigan et al., 2019). Al igual que esta investigación, existen reportes que obtuvieron resultados similares a los presentados a pesar que se basan en la producción de productos con otros fines. El estudio de Luti, (2018), se basó en producción optimizada de undecil prodigiosina (agente inmunosupresor cancerígeno) a través del cultivo de *Streptomyces coelicolor*, en la que se seleccionó a la glucosa al 2% (p/v) como fuente óptima de carbohidratos. Del mismo modo, la investigación de Bello Forero, (2021) obtuvo resultados similares al emplear glucosa a concentraciones de 22 y 16 g/L

al cultivar al hongo macromiceto *Lentinula edodes* y así obtener una mayor producción de polisacáridos, esteroides, terpenoides y compuestos fenólicos.

Los carbohidratos son importantes en los medios de cultivo como fuente energética durante el desarrollo y producción de metabolitos (Marwick y Col. 1999). Asimismo, a través de estudios en la producción de antibióticos por bacterias, se demostró que la asimilación gradual de las fuentes de carbono, como la galactosa, puede mejorar la producción de metabolitos secundarios (antibióticos). Así también, en distintas investigaciones, se ha probado que la glucosa posee un efecto represor en la producción de penicilina (Sanchez & Demain, 2002; Singh et al., 2017). Dicho de ese modo, los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de la suplementación del medio con glucosa, demuestran que esta permite la producción de los metabolitos implicados en la actividad antagónica de los BCAs contra *Colletotrichum sp.* ejerciendo mecanismos de regulación, siendo que los BCAs en estudio toleran la concentración seleccionada de glucosa para producir los metabolitos de interés; sin embargo, para confirmar esta suposición debemos de conocer la naturaleza estructural de los metabolitos bioactivos.

Por lo cual, para concluir se determina que la concentración de glucosa óptima para el cultivo de las cepas *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 es 20 g/L, debido a que esta concentración se obtuvieron porcentajes de inhibición mayores al 70 %. Por otro lado, una alternativa interesante podría ser evaluar el efecto de otros monosacáridos diferentes a la glucosa e inclusive disacáridos u oligosacáridos en diferentes concentraciones en el cultivo de BCAs y su efecto en la producción de metabolitos bioactivos. Asimismo, evaluar la posibilidad de emplear residuos agroindustriales, como el bagazo de caña, la cascarilla de arroz y otros para formular medios de cultivo para los BCAs productores de metabolitos bioactivos y de esta manera reducir el costo de producción de estos, como potencial ingrediente activo en bioinsumos para el control biológico de la antracnosis.

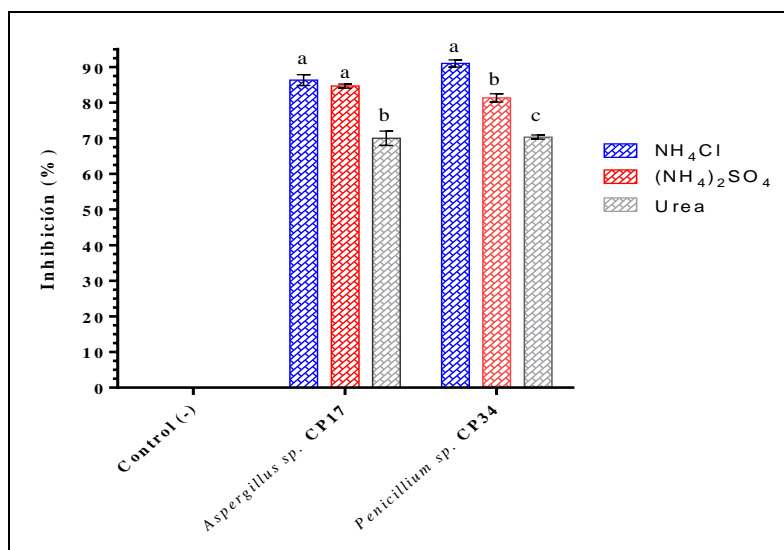
#### **6.4.1.4 Actividad de filtrados fúngicos producidos con diferentes fuentes de nitrógeno**

Así como la modificación de las condiciones físicas de cultivo, la composición química del medio es importante en el cultivo de microorganismos, debido a que esta influye en la fisiología microbianas, en su crecimiento y productividad (Singh et al., 2017). Generalmente, la sobreproducción de un determinado metabolito suele verse afectada por diferentes parámetros,

entre los cuales las fuentes de carbono y nitrógeno son importantes. La productividad metabólica depende de varios factores, entre ellos el tipo de sustrato utilizado (fuente de carbono y nitrógeno) y su concentración, la capacidad del microorganismo, el tipo de producto y su concentración, las condiciones operacionales durante la producción, entre otros. (Luti, 2018). De ese modo, en esta sección se evaluó el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo de BCAs en la producción de filtrados fúngicos con actividad antagonista frente a *Colletotrichum sp.*

La actividad antagonista de los filtrados fúngicos obtenidos durante el cultivo de BCAs en caldo papa dextrosa (20 g/L glucosa) suplementados: 1) cloruro de amonio, 2) sulfato de amonio y 3) urea en una relación DQO: N (100: 5.6).

En la figura 18 se puede observar que la cepa de *Aspergillus sp.* CP17, presenta porcentajes de inhibición que variaron entre 70 al 88 %, en cambio para la cepa *Penicillium sp.* CP34 los porcentajes de inhibición variaron entre el 70 al 91 %. Demostrando una diferencia significativa entre los ensayos realizados respecto al control negativo (*Colletotrichum sp.* desarrollado en ausencia de filtrados de BCAs) según el análisis de varianza ANOVA ( $p < 0.001$ ).



**Figura 18.** Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno [NH<sub>4</sub>Cl - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - urea] en la actividad antagonista de filtrados fúngicos producidos por *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 frente al desarrollo de *Colletotrichum sp.* durante 15 días de cultivo. Ensayo realizado con la técnica de vertido en placa dilución 1:2 (v/v). Las líneas verticales representan la media y la desviación estándar de tres replicas. Las letras no comunes indican agrupaciones con diferencia significativa para el Test de Tukey ( $p < 0.05$ ). Control negativo (-): *Colletotrichum sp.* cultivado en PDA en ausencia de BCAs.

Como se observa en la figura 18, la suplementación del medio de cultivo con las diferentes fuentes de nitrógeno, permitió obtener una mayor actividad antagonica frente a *Colletotrichum sp.* Los porcentajes de inhibición de los filtrados fúngicos de la cepa de *Aspergillus sp.* CP17 variaron entre el 70 y 86 % bajo las siguientes condiciones  $\text{NH}_4\text{Cl} = (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{Urea}$ . Del mismo modo, el comportamiento de los filtrados fúngicos de *Penicillium sp.* fueron similares obteniendo porcentajes de inhibición variables entre el 70 y 91% bajo las siguientes condiciones:  $\text{NH}_4\text{Cl} > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{Urea}$ . Por lo cual, en ambos casos la adición de cloruro de amonio en CPD (19.11 g/L) incrementó la actividad antagonica de los filtrados fúngicos, llegando a obtener porcentajes de inhibición mayores al 85%, ambos porcentajes corresponden a una actividad antagonica óptima (nivel I; porcentajes de inhibición entre el 80 y 100 %) según la escala de Bell et al., (1982). Considerando lo anteriormente mencionado, se seleccionó al cloruro de amonio como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo caldo papa, siendo que la adición del mismo incrementó la actividad antagonica de los filtrados fúngicos de BCAs.

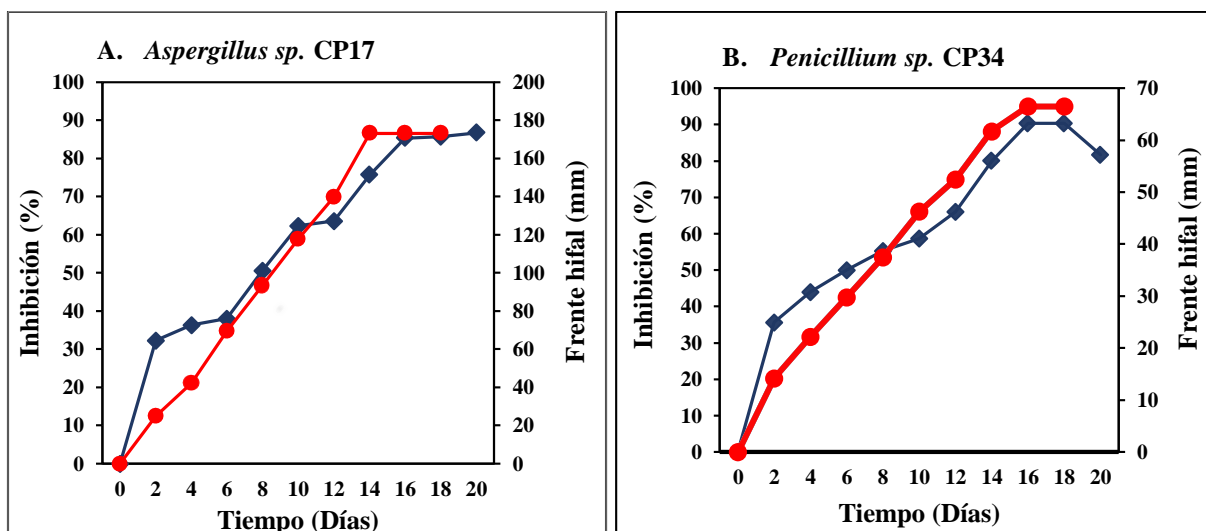
La relación carbono: nitrógeno (C: N) es conocida como un parámetro significativo en el desarrollo de biomasa (Wang et al., 2019), estableciendo que una relación DQO: N (100: 5,6) cercana a la reportada de DQO: N (100: 5) es empleada óptimamente para el desarrollo de microorganismos aerobios (Madigan et al., 2019). La selección y la concentración de una fuente de nitrógeno en el medio juega un papel crucial en la producción de metabolitos, siendo que puede limitar la síntesis de enzimas y disminuir la degradación de los compuestos nutricionales que se encuentran en el medio de cultivo. En este estudio, se observó que la adición de cloruro de amonio mejora la producción de metabolitos antagonicos. Dicho de este modo, y de manera similar a nuestros resultados, el estudio de Durairaj et al., (2017), demostró que la actividad antagonica de *Pseudomonas aeruginosa* frente a patógenos bacterianos era mayor al emplear un medio enriquecido con cloruro de amonio (0,1 g/L) que al emplear nitrato de amonio (0,1 g/L). Del mismo modo, Rodrigues et al., (2010), obtuvieron una mayor producción de biomasa al cultivar a *A. platensis* en un medio enriquecido con cloruro de amonio (21,5 mM). La selección del cloruro de amonio como fuente de nitrógeno en los medios de cultivo se debe a que ofrece ventajas como su fácil asimilación por microorganismos, además de ser una fuente de nitrógeno económica, especialmente cultivos a mayor escala (S. Zhang et al., 2013, 2020).

Por lo cual, finalizada la evaluación de las condiciones físico, químico y biológicas para la optimización de la actividad antagonista de los filtrados bioactivos de los BCAs: *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34, se determina que las condiciones óptimas de cultivo son: el cultivo axénico en fotoperiodo (12 hrs/día) en agitación (120 rpm) y cultivados en el medio caldo papa (relación DQO:N; 100: 5,6) con la adición de glucosa (20 g/L) y cloruro de amonio (19,11 g/L); parámetros constantes de aquí en adelante para el cultivo de los BCAs y la obtención de filtrados fúngicos con actividad antagonista.

#### **6.4.1.5 Actividad antagonista de los filtrados fúngicos obtenidos en diferentes tiempos de cultivo**

La producción de compuestos bioactivos fúngicos puede ser influenciada por las condiciones de cultivo como se ha observado en las anteriores secciones. Por lo cual, en la presente sección se evaluó el tiempo de cultivo y su repercusión en la producción de metabolitos con actividad antagonista contra *Colletotrichum sp.* Para ello, se cultivaron *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 por 20 días en condiciones de cultivo modificadas (FP con agitación; 20g/L glucosa y 19,11 g/L cloruro de amonio; procedimientos descritos en las secciones 6.4.1.1; 6.4.1.3 y 6.4.1.4), realizando una colecta de la fracción líquida del medio de cultivo cada 48 horas. Posteriormente, se obtuvieron los filtrados y se evaluó su efecto frente a *Colletotrichum sp.* por la técnica de vertido en placa (dilución 1:2, filtrado fúngico: PDA).

En la figura 19, se muestra la cinética de crecimiento y la actividad antagonista de los filtrados fúngicos de las cepas (A) *Aspergillus sp.* CP17 y (B) *Penicillium sp.* CP34 obtenidos cada 48 horas, durante 20 días de cultivo. La actividad antagonista de los filtrados varió en un rango ascendente de 30 al 90 % frente a *Colletotrichum sp.* Asimismo, estos presentaron diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo (*Colletotrichum sp.* desarrollado en ausencia de filtrados de BCAs). Se observó que los filtrados poseen actividad antagonista del 30 al 40 % de inhibición a partir del segundo día de recolección y es mayor al 50 % de inhibición a los 10 días de cultivo. Los mayores porcentajes de inhibición fueron obtenidos entre los días de cultivo 16 y 18, alcanzando porcentajes de inhibición entre 84 al 87 % para *Aspergillus sp.* CP17 y entre 88 al 92 % para *Penicillium sp.* CP34.



**Figura 19** Relación entre la cinética de crecimiento y la actividad antagonística de filtrados fúngicos de BCAs **A.** *Aspergillus sp.* CP17, **B.** *Penicillium sp.* CP34 frente a *Colletotrichum sp.* durante 20 días de cultivo, realizando una colecta de la fracción líquida del medio de cultivo cada 48 horas y evaluados a través de la técnica de vertido en placa dilución 1:2 (v/v). Cinética de crecimiento: —●—; Actividad antagonística de filtrados fúngicos: —◆—, colectados en diferentes tiempos durante la cinética de crecimiento.

Los resultados de actividad antagonística alcanzados empleando filtrados fúngicos son similares a los observados en la sección previa donde se colectaron los mismos en un tiempo de 15 días, logrando alcanzar porcentajes de inhibición mayores al 85 % (5.6.3.4. Actividad de filtrados fúngicos producidos con diferentes fuentes de nitrógeno). Por lo cual, se confirma que el tiempo óptimo para obtener filtrados fúngicos con mayor actividad antagonística frente a *Colletotrichum sp.* se encuentra entre los 15 y 18 días de cultivo, período de transición entre trofofase e idiofase de crecimiento. Es así que se observa que los BCAs: *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 bajo condiciones de cultivo optimizadas, ingresan a idiofase a partir del décimo día de cultivo, llegando a producir metabolitos bioactivos que poseerían actividad antagonística frente a *Colletotrichum sp.* con porcentajes de inhibición mayores al 50 %, valor que alcanza su pico máximo de 86 % para *Aspergillus sp.* CP17 y 92 % para *Penicillium sp.* CP34 entre los 15 y 18 días de cultivo. Del mismo modo, cabe destacar que el comportamiento de la actividad antagonística de los filtrados fúngicos se contrasta con la cinética de crecimiento de (A) *Aspergillus sp.* CP17 y (B) *Penicillium sp.*, siendo que los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron a los 14 y 16 días de incubación, respectivamente. Por lo cual, podemos llegar a considerar que los metabolitos bioactivos con actividad antagonística producidos entre los días de cultivo 2 y 10 (período comprendido en trofofase) son posiblemente metabolitos primarios

excretados al medio durante el crecimiento exponencial de los BCAs y que también podrían ser metabolitos precursores y cofactores para la síntesis de metabolitos secundarios en la idiofase.

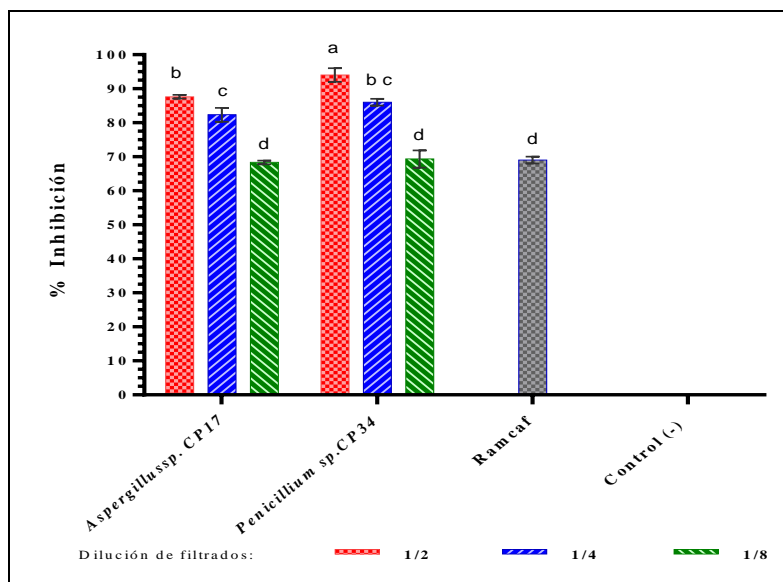
Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son conocidos como productores de una gran cantidad de metabolitos. La producción de los metabolitos secundarios inicia en fase estacionaria o inicio de idiofase (Bertrand et al., 2014; Frisvad, 2015; Rohlf, 2015). Los metabolitos producidos en esta fase se caracterizan por no estar relacionados con el crecimiento celular (Gutiérrez-Correa & Villena, 2010; Singh, 2009).

#### **6.4.1.6 Actividad antagónica a diferentes concentraciones de los filtrados fúngicos frente a *Colletotrichum sp.***

Se ha demostrado que los metabolitos producidos por hongos poseen actividad biológica significativa, lo que evidencia su relevancia como agentes antimicrobianos (Mosquera et al., 2020). Los cambios en las condiciones de cultivo pueden influir en la producción de compuestos bioactivos, como se ha demostrado en las anteriores secciones. En esta sección se evaluó la actividad inhibitoria de filtrados en varias concentraciones (proporciones 1:2, 1:4 y 1:8) para considerar el empleo de dosis menores y alcanzar efectividad inhibitoria para una posible aplicación *in vivo*. Para ello, se cultivaron a las cepas *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 por 15 días en condiciones optimizadas (descritas previamente en las secciones 6.4.1.1; 6.4.1.3 y 6.4.1.4) y se colectó la fracción líquida del cultivo para evaluar su actividad contra *Colletotrichum sp.* en dosis de: 1:2; 1:4 y 1:8 (filtrado: PDA). Asimismo, se empleó como control positivo el fungicida agrícola Ramcaf® (4 g/L) en PDA.

En la figura 20, se observa la actividad antagónica de los filtrados fúngicos de las cepas de *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34. Los porcentajes de inhibición variaron entre 88 al 94 % empleando una dilución 1:2; de 82 al 86 % empleando una dilución 1:4 y por ultimo entre 67 al 69 % al emplear una dilución 1:8, presentando diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo (*Colletotrichum sp.* desarrollado en ausencia de filtrados de BCAs) y con el fungicida agrícola Ramcaf® (Control positivo).





**Figura 20** Actividad antagonista de filtrados fúngicos de las cepas *Aspergillus sp.* CP17, *Penicillium sp.* CP34 y fungicida agrícola Ramcaf® frente al desarrollo de *Colletotrichum sp.* durante 15 días de cultivo. Ensayo realizado con la técnica de vertido en placa: dilución 1:2; 1:4 y 1:8 (v/v). Las líneas verticales representan la desviación estándar de tres replicas. Las letras no comunes indican agrupaciones con diferencia significativa para el Test de Tukey ( $p < 0.05$ ). Control negativo (-): *Colletotrichum sp.* cultivado en PDA en ausencia de BCAs.

El análisis de comparación múltiple, reveló una diferencia significativa en la actividad antagonista al emplear la dilución 1:2 del filtrado de *Penicillium sp.* CP34; no obstante, los filtrados preparados en diluciones 1:2 y 1:4 de *Aspergillus sp.* CP17, y 1:4 de *Penicillium sp.* CP34 no presentaron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Asimismo, cabe destacar que los filtrados preparados en una dilución 1:8 presentaron diferencia significativa con los porcentajes de inhibición de las diluciones 1:2 y 1:4 y no así con el fungicida químico Ramcaf®, siendo que este presentó actividad antagonista del 79 %, similar a la de los filtrados.

Las enfermedades provocadas por patógenos fúngicos provocan pérdidas significativas en el rendimiento de diferentes productos. Por ejemplo, se ha reportado que la producción de mango en el Departamento de La Paz, puede ser reducida hasta en un 80%, por plagas, enfermedades fúngicas, mal manejo del suelo, lluvias excesivas, sequía y otros, sino se realiza un manejo integrado (Gonzales, 2014). Por lo cual, para reducir la pérdida de rendimiento inducida por fitopatógenos, se realiza la aplicación de fungicidas químicos. Sin embargo, estudios recientes han reportado la disminución de su actividad biológica contra diferentes fitopatógenos fúngicos, debido a su empleo indiscriminado e indiferenciado por los agricultores (Kitchen et al., 2016).

Según reportes, patógenos como *Fusarium manguiiferae* han desarrollado resistencia frente a fungicidas como Captan, Score y Daconil, disminuyendo su efectividad (Iqbal et al., 2010). De manera similar, en el estudio de Raghavendra et al., (2019) reportó una inhibición del 80 % del fungicida Ramcaf frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, porcentajes de inhibición similares a los obtenidos por el fungicida Ramcaf ®, en este estudio. Del mismo modo, se ha reportado el impacto que estos pueden ejercer no solo en la salud humana, sino también sobre la diversidad microbiana (Meena et al., 2020), disminuyendo la diversidad de hongos y bacterias benéficos, y de este modo afectar a los procesos biogeoquímicos del suelo como la fijación de nitrógeno atmosférico y disminuyendo la fertilidad del suelo (Aktar et al., 2009; Lo, 2010; Meena et al., 2020).

Por lo cual, el desarrollo y aplicación de bioinsumos como los filtrados fúngicos, es una alternativa amigable al empleo de fungicidas químicos; siendo estos sostenibles e innovadores en el control integrado de plagas en la agricultura. Como se ha demostrado en este estudio, los filtrados fúngicos en diluciones 1:2 y 1:4, obtenidos del cultivo en condiciones optimizadas, pueden llegar a tener mayor actividad antagonista frente a *Colletotrichum sp.* que el fungicida químico Ramcaf ® empleado como control positivo.

#### **6.4.1.7 Filtrados fúngicos de las cepas *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 respecto a su composición química.**

Los agentes de control biológico (BCAs) poseen mecanismos de acción directos e indirectos involucrados en el control biológico de fitoenfermedades. Estos mecanismos incluyen; antibiosis (producción de un metabolito inhibidor o antibiótico), micoparasitismo (degradación y consumo de nutrientes del hongo fitopatógeno), resistencia inducida (inducción de respuesta defensiva de las plantas contra los patógenos) y la mejora del crecimiento (promoción de crecimiento a través de la secreción de hormonas como el ácido indolacético y el ácido giberélico mientras se reducen los efectos de la enfermedad) (Cano, 2011; Latz et al., 2018; Narayanasamy, 2013).

Durante las últimas décadas, ha surgido la tendencia mundial de reducir el empleo de agroquímicos (fungicidas y plaguicidas, entre muchos otros) en el manejo y control de enfermedades en cultivos. Efectuando investigaciones con el fin de encontrar alternativas

amigables (seguras y ecológicas) y eficaces para reducir pérdidas económicas significativas por la descomposición de frutos durante la pre y post cosecha. Los BCAs han cobrado importancia como alternativas amigables para el control de fitopatógenos al desarrollar diferentes mecanismos antagónicos. Además de ofrecer mayor seguridad y un mínimo impacto ambiental. Por lo cual, en la presente sección se estudiaron características de los filtrados fúngicos de *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 obtenidos en condiciones de cultivo optimizadas y que presentaron mayor porcentaje de inhibición frente a *Colletotrichum sp.* a través de la determinación de compuestos fenólicos, proteínas solubles totales y actividad enzimática específica (proteolítica, celulolítica y quitinolítica).

De ambos filtrados fúngicos, el obtenido de *Penicillium sp.* CP34 posee mayor concentración de compuestos fenólicos mismos que son comparados con valores de referencia de extractos etílicos de las flores de *Barkleyanthus salicifolius* (Tabla 5).

**Tabla 5. Fenólicos totales presentes en filtrados fúngicos de *Aspergillus sp.* CP17, *Penicillium sp.* CP34 y *Barkleyanthus salicifolius*.**

Fenólicos totales (mg GAE/ mL)	Filtrados fúngicos		<i>Barkleyanthus salicifolius</i> (Ramos et al., 2020).
	<i>Aspergillus sp.</i> CP17	<i>Penicillium sp.</i> CP34	
	32,54 ± 0,51	90,62 ± 1,1	31,92

Los valores son la media de tres repeticiones, ± la desviación estándar. GAE: equivalentes de ácido gálico.

Los compuestos fenólicos están presentes en la naturaleza en forma orgánica de bajo peso molecular que contienen más de un grupo fenólico y que son producidos naturalmente por plantas y microorganismos (Ansari et al., 2013). En la tabla 5, se describe la concentración presente de fenólicos totales en los filtrados fúngicos de *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34; asimismo, estos son comparados con el valor de referencia de extractos etílicos de flores de *Barkleyanthus salicifolius*. Este valor referencial es empleado dado que se ha descrito su actividad antagónica frente a *Colletotrichum gloeosporioides* con porcentajes de inhibición del 62% en un estudio reciente de Ramos et al., (2020), mismo modelo fitopatógeno estudiado en esta investigación. Al comparar los valores de los compuestos fenólicos totales, se destacan los obtenidos en los filtrados fúngicos de *Penicillium sp.* CP34 (90,62 mg GAE/mL) superior al valor de referencia de *Barkleyanthus salicifolius* (31,92 mg GAE/mL). La actividad antagónica

del filtrado de *Penicillium sp* CP34 frente a *Colletotrichum sp.*, estaría relacionado con la presencia de grupos fenólicos.

En plantas, los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios sintetizados durante su desarrollo normal, así como también en condiciones de estrés (disrupción de tejidos, infecciones o alta exposición a radiación UV). Estos cumplen funciones de defensa contra herbívoros y patógenos, soporte mecánico en la atracción de polinizadores y se ha reportado reducen el crecimiento de las plantas competidoras cercanas (Colina et al., 2016). Por otro lado, también se ha observado que los microorganismos son capaces de producir compuestos fenólicos que poseen propiedades antioxidantes (Bhanja Dey et al., 2016) y antifúngicas de interés (Ansari et al., 2013). Asimismo, se ha reportado su implicación en la simbiosis entre plantas y microorganismos (Mandal et al., 2010), la inducción de resistencia sistémica contra fitopatógenos (Christ-Ribeiro et al., 2019; Dambolena et al., 2012) y la promoción de crecimiento al promover la síntesis del ácido indol acético, auxina involucrada en el crecimiento y desarrollo de plantas (Vega-Celedón et al., 2016).

Los mecanismos de acción antifúngicos desarrollados por los compuestos fenólicos aún no han sido descritos por completo, entre los reportados se encuentran la interrupción de la fluidez de la membrana celular por la inhibición en la síntesis de ergosterol y glucosamina, componentes de la membrana celular fúngica (Ansari et al., 2013), la inhibición de la función transportadora de los canales ABC (ATP binding carriers), que suelen estar implicados en mecanismos de resistencia a fungicidas (Wink et al., 2012), la inhibición del cambio morfogenético y la formación de biopelículas (L. Zhang et al., 2011). Entre los compuestos fenólicos, comúnmente se identifican al ácido cafeico, ácido protocatequico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina, ácido siríngico, ácido clorogénico y ácido p-hidroxibenzoico (Omedi et al., 2019). Asimismo, se reportó el efecto antifúngico del ácido benzoico (0,15 %, v/v) y el ácido salicílico (0,1 %, v/v) contra *Fusarium oxysporum* (Shukla & Dwivedi, 2013). Del mismo modo, los estudios de Bouddine et al., (2012) reportaron la actividad antifúngica del eugenol, el carvacrol y el timol frente a *Aspergillus niger* y *Rhizopus sp.*

Descrito ya el mecanismo de actividad antifúngica de los compuestos fenólicos, se recomienda realizar estudios más específicos para la identificación de estos compuestos y así dilucidar un posible mecanismo de acción que se desarrolla frente al patógeno de los filtrados fúngicos.

Siguiendo con el estudio de la actividad antagonica de los filtrados fúngicos se observó que estos presentaban actividad enzimática proteolítica, celulolítica y quitinolítica. Asimismo, se determinó la actividad específica de cada enzima. En la tabla 6 se describe la actividad enzimática específica de los filtrados fúngicos, además de la concentración de proteínas solubles totales.

**Tabla 6. Actividad enzimática específica de filtrados fúngicos de *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34**

Actividad enzimática específica	Filtrados fúngicos		<i>Aspergillus sp.</i> (Novozyme, 2021; Brzezinska & Jankiewicz, 2012; El-Shora et al., 2021)
	<i>Aspergillus sp.</i> CP17	<i>Penicillium sp.</i> CP34	
<b>Proteasa (UI/mg)</b>	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,02	500
<b>Celulasa (UI/mg)</b>	0,11	0,09	379,1
<b>Quitinasa (UI/mg)</b>	0,08	0,11	9,46
<b>Proteínas solubles totales (mg/mL)</b>	9,54 ± 0,06	5,04 ± 0,02	

Los valores son la media de tres repeticiones, ± la desviación estándar. UI/mg: Unidades internacionales/miligramos de proteína; mg/mL: miligramos por mililitro.

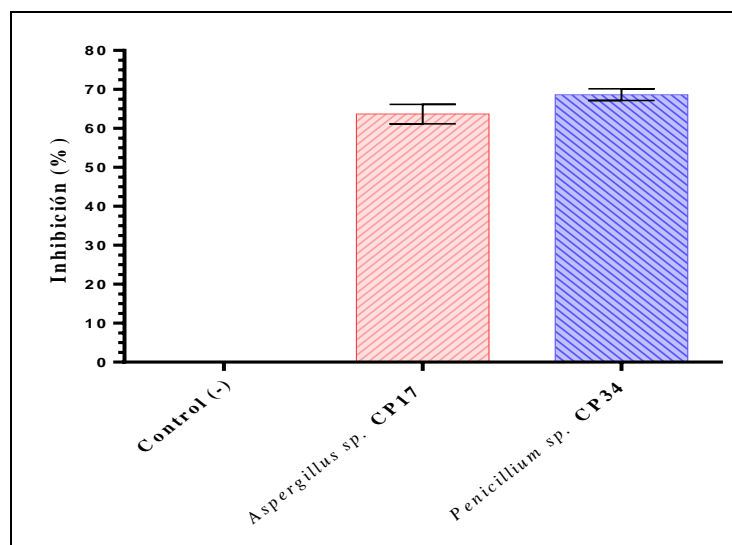
Los filtrados fúngicos de las cepas *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34, presentaron actividad enzimática proteasa ( $0,35 \pm 0,22$  y  $0,21 \pm 0,12$ ), celulasa ( $1,06 \pm 0,05$  y  $0,47 \pm 0,01$ ) y quitinasa ( $0,75 \pm 0,01$  y  $0,54 \pm 0,01$ ), respectivamente. La presencia de la actividad proteolítica, celulolítica y quitinolítica en los filtrados fúngicos señala una posible actividad frente al desarrollo de *Colletotrichum sp.*, por la degradación de su pared celular, resaltando la actividad proteasa que degrada directamente a las proteínas presentes, un componente clave en la estructura de la pared y membrana celular. Sin embargo, comparando los valores obtenidos con los referenciales de *Aspergillus oryzae* (proteasa) (Novozyme, 2021) y *Aspergillus niger* (celulasa y quitinasa) (Brzezinska & Jankiewicz, 2012; El-Shora et al., 2021), las actividades enzimáticas son menores y casi nulas en comparación. Por lo cual, se sugiere que la actividad

antagónica de los filtrados fúngicos se debe posiblemente a metabolitos no enzimáticos, dada la concentración importante de proteínas solubles.

Esto puede ser explicado por la presencia de péptidos no ribosómicos o también conocidos como péptidos antifúngicos (AFP) que se ha reportado actúan como metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de amplio espectro frente a diferentes fitopatógenos (Zhang et al., 2020). Entre los AFP que han sido reportados con actividad inhibitoria frente a *Colletotrichum sp.* se encuentran la nicomicina, la lipopeptina A, las neopeptinas A y B, la glomecidina y la valinomicina. Los mecanismos de inhibición de estos metabolitos se basan en la alteración de la pared celular de los hongos impidiendo la formación de hifas y posteriormente la del micelio. Por ejemplo, la nicomicina es un inhibidor competitivo en la síntesis de quitina al ser estructuralmente similar a la UDP-N-acetil glucosamina, un sustrato precursor. Del mismo modo, existen reportes que demuestran la síntesis de AFPs por *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* (Huber et al., (2018). Galgóczy et al., (2013), reportó la presencia de AFPs similares a la beta-defensina en *Penicillium chrysogenum* contra *Fusarium sp.* Asimismo, Bruker et al., (2011), reportó la síntesis de AFPs por *Penicillium chrysogenum* contra *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* y *Botrytis cinerea*; además de reportar la ausencia de citotoxicidad contra células eucariotas, siendo que sus mecanismos son específicos para células fúngicas al hiperpolarizar su membrana plasmática, inducir la síntesis de especies reactivas de oxígeno, inducir la activación de canales iónicos y finalmente inducir la muerte por apoptosis. De este modo, podríamos sustentar que la actividad antagónica de los filtrados pudo deberse a la presencia que péptidos antifúngicos (AFP), presentes como proteínas solubles totales. Por ello se recomienda su estudio iniciando con electroforesis vertical que permitiría determinar su presencia en función a su peso molecular, lo cual tiene especial importancia para desarrollo de bioinsumos agrícolas.

Por último, en esta investigación se realizó la evaluación de la actividad antagónica de metabolitos volátiles producidos por BCAs contra *Colletotrichum sp.* a través de la técnica de doble placa descrita por Montealegre et al., (2003). Considerando que los metabolitos volátiles o también conocidos como compuestos orgánicos volátiles (COV), pueden difundirse a través de la atmósfera y los suelos para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos (Morath et al., 2012). Además, que existen estudios que corroboran esta actividad inhibitoria en distintos

microorganismos. En la figura 21, se observan los resultados de la actividad antagonica de metabolitos volátiles producidos por BCAs contra *Colletotrichum sp.*



**Figura 21** Actividad antagonica de metabolitos volátiles producidos por BCAs frente a *Colletotrichum sp.* durante 15 días de cultivo por la técnica de doble placa. Las líneas verticales representan la desviación estándar de tres replicas. Control negativo (-): *Colletotrichum sp.* cultivado en PDA en ausencia de BCAs.

En la evaluación de la actividad antagonica de metabolitos volátiles producidos por BCAs frente a *Colletotrichum sp.*, se exhibió la capacidad de las cepas *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 observando una disminución en el desarrollo hifal de *Colletotrichum sp.*, con porcentajes de entre el 64 y 69 % respectivamente. La investigación de la actividad antagonica de metabolitos volátiles por cepas del género *Aspergillus* y *Penicillium* es limitada. Sin embargo, se ha reportado la presencia de triptoquialaninas y sesquiterpenos entre algunos de estos metabolitos (Costa et al., 2019; Baazeem et al., 2021).

Por lo cual, con la información recolectada en este último experimento podemos sugerir dos tipos de antagonismo presentes en los filtrados fúngicos frente a *Colletotrichum sp.*, estos incluirían: *i*) el antagonismo indirecto al secretar y difundir compuestos no volátiles, como los fenólicos, y compuestos volátiles que generan antibiosis; *ii*) la menos probable el antagonismo directo por la secreción de enzimas de carácter lítico como proteasas, celulasas y quitinasas. Los mecanismos antagonicos mencionados fueron considerados anteriormente al observar la actividad antagonica directa de los BCAs al realizar el enfrentamiento dual contra *Colletotrichum sp.*, al observar la competencia por nutrientes y nichos por las cepas

pertenecientes al género *Aspergillus sp.* y la antibiosis desarrollada por *Penicillium sp.* al generar un claro halo de inhibición en el desarrollo hifal de *Colletotrichum sp.* La selección de las cepas *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP4 como BCAs concuerda con los reportes de diferentes estudios donde se observó su actividad antifúngica frente a diferentes fitopatógenos (Abdallah et al., 2014; Frisvad, 2015; Mejdoub-Trabelsi et al., 2017; Nicoletti et al., 2007; Sanchez-Perez et al., 2020; Thambugala et al., 2020; Yang et al., 2008).

Es importante seguir estudiando estos metabolitos siendo que muchos de estos se pueden integrar a formulaciones de biofungicidas para un eficaz control de enfermedades fúngicas en cultivos agrícolas. Por lo tanto, en la presente investigación se seleccionó a las cepas *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 y sus filtrados fúngicos como potenciales alternativas de control biológico (BCA). Por sus porcentajes de inhibición mayores al 60%, actividad antagónica moderada como agentes de control biológico (nivel 2) según la escala de Bell y la actividad antagónica óptima de 85 al 90 % de sus filtrados fúngicos (nivel 1) según la escala de Bell. La información reportada durante esta investigación es de suma importancia siendo que actualmente *Colletotrichum sp.* es considerado dentro de los diez agentes patógenos más frecuentes en una diversidad de cultivos agrícolas, causando una gran afectación a la economía de productores y consumidores.

Esta información abre paso a mas incógnitas sobre los mecanismos de acción antagónicos que *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 pueden desarrollar frente a *Colletotrichum sp.* y otros agentes fitopatógenos, por lo que se recomienda mayor énfasis en investigaciones futuras.



## 7 Conclusiones

En el presente estudio, cuatro cepas fúngicas: *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18, y *Penicillium sp.* CP34 fueron seleccionadas como potenciales agentes de control biológico por su actividad antagónica directa frente a *Colletotrichum sp.*, presentando porcentajes de inhibición superiores al 60%, actividad antagónica moderada (nivel 2) según la escala de Bell.

Los filtrados fúngicos de *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18, y *Penicillium sp.* CP34 presentan actividad inhibitoria que van desde el 51 al 56 % frente a *Colletotrichum sp.*, actividad antagónica leve (nivel 3) cuando son cultivados en estanco y fotoperiodo.

Entre las condiciones de cultivo evaluadas para mejorar la actividad de sus metabolitos antagónicos, se concluye que:

- El cultivo en agitación y fotoperiodo, permite obtener metabolitos con mayor actividad inhibitoria que van desde el 70 al 72 % frente a *Colletotrichum sp.*, respecto a los obtenidos en ausencia de la agitación que van desde el 51 al 56 %.
- El co-cultivo de *Aspergillus sp.* CP12, CP17 y CP18, y *Penicillium sp.* CP34 con *Colletotrichum sp.*, reveló porcentajes de inhibición menores en comparación a los obtenidos en cultivos axénicos.
- En cultivos suplementados con 20 g/L glucosa y 19, 11 g/L cloruro de amonio en el medio caldo papa para *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34, presentan un porcentaje de inhibición entre el 88 al 91 % frente a *Colletotrichum sp.*, siendo este la formulación óptima para obtener mayor actividad antagónica frente al patógeno.

El estudio de los componentes bioactivos presentes en los filtrados fúngicos de *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34, demuestra la presencia de compuestos fenólicos en los filtrados fúngicos y baja actividad proteasa, celulasa y quitinasa.

Las cepas *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34 presentan actividad inhibitoria mediada por metabolitos volátiles orgánicos con porcentajes de inhibición entre el 64 al 69 % frente a *Colletotrichum sp.*

## 8 Referencias bibliográficas

- Abdallah, R. A.-B., Abdallah, M., Hassine, H., Jabnoun-Khiareddine, H., Abdallah, & Daami-Remadi, M. (2014). *Antifungal Activity of Culture Filtrates and Organic Extracts of Aspergillus spp. Against Pythium ultimum*. 17.
- Agrios, G. N. (1995). *Fitopatología*. Editorial Limusa S.A. De C.V.
- Ajila, C. M., Leelavathi, K., & Prasada Rao, U. J. S. (2008). Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 319-326. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.10.001>
- Aktar, Md. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Alves, F. G., Filho, F. M., de Medeiros Burkert, J. F., & Kalil, S. J. (2010). Maximization of  $\beta$ -Galactosidase Production: A Simultaneous Investigation of Agitation and Aeration Effects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(5), 1528-1539. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8683-z>
- Angulo-Cortés, J. P., García-Díaz, A., Pedroza, A. M., Martínez-Salgado, M. M., & Gutiérrez-Romero, V. (2012). Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. *Universitas Scientiarum*, 17, 10.
- Ansari, M., Anurag, A., Fatima, Z., & Hameed, S. (2013). Natural phenolic compounds: A potential antifungal agent. *Microb Pathog Strateg Combat them Sci Technol Educ*, 1, 1189-1195.
- Aparicio, J. J., & Díaz, J. P. (2015). Sistema de producción del cultivo de mango en el Municipio de Irupana. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 2(1), 98-104.

- Arauz, L. F. (2000). Mango Anthracnose: Economic Impact and Current Options For Integrated Managaement. *Plant Disease*, 84(6), 600-611. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.600>
- Arestegui, E. (2019, abril 30). El uso de agroquímicos se incrementó en 500%. *Publiagro*. <https://publiagro.com.bo/2019/04/el-uso-de-agroquimicos-se-incremento-en-500/>
- Arias Rivas, B., & Carrizales, L. (2007). Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el municipio cedeño, estado monagas, venezuela. *Bioagro*, 19(1), 19-25.
- Atlas, R., M., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Pearson Educación, S. A.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2013). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Mc Graw Hill - Interamericana.
- 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 (Basel, Switzerland)*, 7(5), 331. <https://doi.org/10.3390/jof7050331>
- Baron, N. C., Rigobelo, E. C., Zied, D. C., Baron, N. C., Rigobelo, E. C., & Zied, D. C. (2019). Filamentous fungi in biological control: Current status and future perspectives. *Chilean journal of agricultural research*, 79(2), 307-315. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000200307>
- Barrientos Vera, V., Ávila Calero, S., Bedregal Flores, K., & Moreira Ascarrunz, S. (2014). Principales cultivos y principales problemas fitosanitarios según los agricultores de la comunidad La Plazuela, Municipio de Irupana, Provincia Sud Yungas, Departamento de La Paz. *Revista Científica de Investigación INFO-INIAF*, 47.

- Bascope Zanabria, R., Bickel, U., & Jacobi, J. (2019). Plaguicidas químicos usados en el cultivo de soya en el Departamento de Santa Cruz, Bolivia: Riesgos para la salud humana y toxicidad ambiental. *Acta Nova*, 9(3), 386-416.
- Bell, DK, Wells, HD, & Markham, CR. (1982). Antagonismo in vitro de especies de *Trichoderma* contra seis patógenos fúngicos de plantas. *Phytopathology*, 72(4), 379-382.
- Bello Forero, R. A. (2021). *Optimización de las condiciones de fermentación líquida en biorreactor para la producción de Lentinula edodes* [Trabajo de grado - Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/80126>
- Berenjian, A. (Ed.). (2019). *Esenciales en tecnología de fermentación, Texto original*. Springer International Publishing. <https://www.springer.com/gp/book/9783030162290>
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., & Wolfender, J.-L. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1180-1204. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.001>
- Bhanja Dey, T., Chakraborty, S., Jain, K. Kr., Sharma, A., & Kuhad, R. C. (2016). Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 53, 60-74. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.007>
- Bouddine, L., Louaste, B., Achahbar, S., Chami, N., Chami, F., & Remmal, A. (2012). Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. *African Journal of Biotechnology*, 11(76), 14083-14087. <https://doi.org/10.4314/ajb.v11i76>
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799-808. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>

- Brzezinska, M. S., & Jankiewicz, U. (2012). Production of Antifungal Chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its Potential Role in the Biological Control. *Current Microbiology*, 65(6), 666-672. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0208-2>
- Butt, K. Y., Altaf, A., Malana, M. A., Ghori, M. I., & Jamil, A. (s. f.). *Optimal Production of Proteases from Bacillus subtilis Using Submerged Fermentation*. 5.
- Canedo, V., & Ames, T. (cip). (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatogenos*. Centro Internacional de la Papa (CIP). <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=QP2007000094>
- Cano, A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14, 15-31.
- Cardenas, O., M., M. ., M. (2016). *Estudio de las comunidades fúngicas en suelos de cultivos de Quinoa (Chenopodium quinoa) del altiplano norte, central y sur de una gestión agraria* (Final). Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.
- Charney, J., & Tomarelli, R. M. (1947). A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *The Journal of Biological Chemistry*, 171(2), 501-505.
- Chávez, G., Tenorio, R., Mamani, M., Crespo, C., Espinal, C., & Alvarez, M. (2014). Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica. Segunda parte: Biocontroladores fúngicos. *Revista CON-CIENCIA*, 2(1), 49-55.
- Christ-Ribeiro, A., Graça, C. S., Kupski, L., Badiale-Furlong, E., & de Souza-Soares, L. A. (2019). Cytotoxicity, antifungal and anti mycotoxins effects of phenolic compounds from fermented rice bran and *Spirulina* sp. *Process Biochemistry*, 80, 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.007>
- Chuquimia. (2018). *Al menos cuatro agroquímicos prohibidos aun se venden en Bolivia*. Pagina Siete.

- Coca, M. (2011). Boletín técnico: Enfermedades del fruto en duraznero (*Prunus persica* L.). *Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias "Dr. Martín Cárdenas"*. *Universidad Mayor de San Simón*, 5(3), 4.
- Cook, R. J., Bruckart, W. L., Coulson, J. R., Goettel, M. S., Humber, R. A., Lumsden, R. D., Maddox, J. V., McManus, M. L., Moore, L., Meyer, S. F., Quimby, Jr., Paul C., Stack, J. P., & Vaughn, J. L. (1996). Safety of Microorganisms Intended for Pest and Plant Disease Control: A Framework for Scientific Evaluation. *Biological Control*, 7(3), 333-351. <https://doi.org/10.1006/bcon.1996.0102>
- Corrales-Bernal, A., Maldonado, M. E., Urango, L. A., Franco, M. C., & Rojano, B. A. (2014). Mango de azúcar (*Mangifera indica*), variedad de Colombia: Características antioxidantes, nutricionales y sensoriales. *Revista chilena de nutrición*, 41(3), 312-318. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182014000300013>
- Costa, J. H., Wassano, C. I., Angolini, C. F. F., Scherlach, K., Hertweck, C., & Pacheco Fill, T. (2019). Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. *Scientific Reports*, 9(1), 18647. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55204-9>
- Dambolena, J. S., López, A. G., Meriles, J. M., Rubinstein, H. R., & Zygadlo, J. A. (2012). Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure–property–activity relationship study. *Food Control*, 28(1), 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.008>
- Dewi, T. K., Agustiani, D., & Antonius, S. (2017). Secondary Metabolites Production by Actinomycetes and their Antifungal Activity. *KnE Life Sciences*, 256-264. <https://doi.org/10.18502/cls.v3i4.713>
- Di Francesco, A., Martini, C., & Mari, M. (2016). Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: How many mechanisms of action? *European Journal of Plant Pathology*, 145(4), 711-717. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0867-0>

- Dodd, J. C., Estrada, A. B., Matcham, J., Jeffries, P., & Jeger, M. J. (1991). The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. *Plant Pathology*, 40(4), 568-575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02421.x>
- Driesche, R., G. Van, Hoddle, M., S., Ruiz-Cancino, E., & Coronado-Blanco, J. M. (2007). CONTROL DE PLAGAS Y MALEZAS POR ENEMIGOS NATURALES. En *US Department of Agriculture, US Forest Service & Forest Health Technology Enterprise Team. FHTET-2007-02. 751 pp. Tiraje: 1,000 ejemplares.* (US Department of Agriculture). US Forest Service Forest Health Technology Enterprise Team. [https://www.academia.edu/2967668/Control\\_de\\_plagas\\_y\\_malezas\\_por\\_enemigos\\_naturales](https://www.academia.edu/2967668/Control_de_plagas_y_malezas_por_enemigos_naturales)
- Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J.-H., Chang, W.-S., Park, Y.-J., Senthilkumar, P., Choi, K.-M., Lee, J.-H., & Oh, B.-T. (2017). Potential for plant biocontrol activity of isolated *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus stratosphericus* strains against bacterial pathogens acting through both induced plant resistance and direct antagonism. *FEMS Microbiology Letters*, 364(23). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx225>
- Ehlers, R.-U. (2011). Regulation of Biological Control Agents and the EU Policy Support Action REBECA. En R.-U. Ehlers (Ed.), *Regulation of Biological Control Agents* (pp. 3-23). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3664-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3664-3_1)
- Elibol, M. (2004). Optimization of Medium Composition for Actinorhodin Production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) With Response Surface Methodology. *Process Biochemistry*, 39, 1057-1062. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00232-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00232-2)
- El-Mansi, E. M. T., Bryce, C. F. A., Demain, A. L., Allman, A. R., Bryce, C. F. A., Demain, A. L., & Allman, A. R. (2011). *Fermentation Microbiology and Biotechnology*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b11490>
- El-Shora, H. M., El-Sharkawy, R. M., Khateb, A. M., & Darwish, D. B. (2021). Production and immobilization of  $\beta$ -glucanase from *Aspergillus niger* with its applications in bioethanol

- production and biocontrol of phytopathogenic fungi. *Scientific Reports*, 11(1), 21000. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00237-2>
- Emanuel, R.-V., César Arturo, P.-U., Lourdes Iveth, M.-R., Homero, R. de la C., & Mauricio Nahuam, C.-A. (2020). In vitro growth of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate, a compound produced during the co-culture of *Trichoderma* sp. And *Bacillus subtilis*. *3 Biotech*, 10(8), 329. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02324-z>
- Engels, C., Knödler, M., Zhao, Y.-Y., Carle, R., Gänzle, M. G., & Schieber, A. (2009). Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7712-7718. <https://doi.org/10.1021/jf901621m>
- Es-Soufi, R., Tahiri, H., Azaroual, L., Oualkadi, A. E., Martin, P., Badoc, A., & Lamarti, A. (2020). In Vitro Antagonistic Activity of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens* against *Colletotrichum acutatum*. *Advances in Microbiology*, 10(03), 82. <https://doi.org/10.4236/aim.2020.103008>
- FAO. (2008a). *Conferencia de Alto Nivel sobre la Seguridad Alimentaria Mundial: Los Desafíos del Cambio Climático y la Bioenergía*. Fao.org. <http://www.fao.org/foodclimate/expert/em3/narrative-em3/es/>
- FAO. (2008b). *Tropical fruits*. Fao.Org. <http://www.fao.org/3/y5143e/y5143e1a.htm#TopOfPage>
- FAO. (2017). *Memorias de los Talleres de Agroecología y Roca del Café en Mesoamérica y República Dominicana* | FAO. <http://www.fao.org/family-farming/detail/es/c/1052795/>
- Fermin, G., Meng, B., Ko, K., & Mazumdar-Leighton, S. (2000). Biotechnology: A new era for plant pathology and plant protection. *APSnet Feature Articles*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2000-0500>



- Frisvad, J. C. (2015). Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Frontiers in Microbiology*, 5, 773. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00773>
- Fuller, K. K., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2015). Fungal photobiology: Visible light as a signal for stress, space and time. *Current genetics*, 61(3), 275-288. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0451-0>
- FUNDESNA. (2012). *Manual de Manejo de Plagas—Proyecto Desarrollo Territorial Comunitario Integrado para Comunidades Alejadas en la Amazonía (DETCAA)*. <https://docplayer.es/4898732-Manual-de-manejo-de-plagas-proyecto-desarrollo-territorial-comunitario-integrado-para-comunidades-alejadas-en-la-amazonia-detcaa.html>
- Galan Sauco, V. (2009). *El cultivo del mango* (Segunda edición). Mundi-Prensa Libros.
- Garitano-Zavala, A. (2016). *Desarrollo Urbano Sostenible Una visión desde la Biología*.
- Gil, D. B., Bocourt, E. C., & Maqueira, Y. D. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico. *ICIDCA*, 40(2), 45-50.
- Gonzales, D., E. (2014). *Investigaciones sobre la Problemática del Mango en el Municipio de Irupana—La Paz*.
- González-Fernández, J., & Hormaza, J. I. (2005). *PLAGAS Y ENFERMEDADES DEL MANGO (MANGIFERA INDICA L.)*. 83.
- Gutiérrez-Alonso, J. G. G., Ángel, D. N., Ortiz, D. T., Mejía, E. Z., Huerta, H. V., Damián, T. M., & Sánchez, F. D. (2001). Características de Crecimiento, Germinación, Esporulación y Patogenicidad de Aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Obtenidos de Frutos de Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(1), 90-93.

- Gutiérrez-Correa, M., & Villena, G. K. (s. f.). *Characteristics and Techniques of Fermentation Systems*. 45.
- Halliwell, G. (1962). The breakdown of cellulose and its derivatives by enzymes from *Myrothecium verrucaria*. *Biochemical Journal*, 85(1), 67-72.
- Hernández Delgado, P. M., Aranguren, M., Reig, C., Fernández Galván, D., Mesejo, C., Martínez Fuentes, A., Galán Saúco, V., & Agustí, M. (2011). Phenological growth stages of mango (*Mangifera indica* L.) according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 130(3), 536-540. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.027>
- Hódar, J. A., Zamora, R., & Cayuela, L. (2012). Cambio climático y plagas: Algo más que el clima. *Ecosistemas*, 21(3), 73-78. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2012.21-3.09>
- Hoyos, Carvajal Liliana. (2011). *Enfermedades de planta: Control Biológico* -. <http://www.etp.com.py/fichaLibro?bookId=83931>
- Hoz, C. J. P.-D. la, Calderón, C., Rincón, A. M., Cárdenas, M., Danies, G., López-Kleine, L., Restrepo, S., & Jiménez, P. (2016). Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops in Colombia. *Plant Pathology*, 65(2), 227-237. <https://doi.org/10.1111/ppa.12410>
- Huber, A., Hajdu, D., Bratschun-Khan, D., Gáspári, Z., Varbanov, M., Philippot, S., Fizil, Á., Czajlik, A., Kele, Z., Sonderegger, C., Galgóczy, L., Bodor, A., Marx, F., & Batta, G. (2018). New Antimicrobial Potential and Structural Properties of PAFB: A Cationic, Cysteine-Rich Protein from *Penicillium chrysogenum* Q176. *Scientific Reports*, 8(1), 1751. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20002-2>
- IBCE. (2011). Mangos, mangostanes y guayabas. *Perfil de mercado*, 5(1), 1.
- Ibrahim, D., Welosamy, H., & Lim, S.-H. (2015). Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged

- fermentation. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(3), 265-271.  
<https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.265>
- INE. (2009). *Encuesta Nacional Agropecuaria—ENA 2008*. Instituto Nacional Agropecuaria, Ministerio de Desarrollo Rural y de Tierras.
- INE. (2019). Agricultura. INE. <https://www.ine.gob.bo/index.php/estadisticas-economicas/agropecuaria/agricultura-introduccion/>
- Iqbal, Z., Pervez, M. A., Ahmad, S., Iftikhar, Y., Yasin, M., Nawaz, A., Ghazanfar, M. U., Dasti, A. A., & Saleem, A. (2010). *DETERMINATION OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATIONS OF FUNGICIDES AGAINST FUNGUS FUSARIUM MANGIFERAE*. 10.
- Jadhav, H. P., Shaikh, S. S., & Sayyed, R. Z. (2017). Role of Hydrolytic Enzymes of Rhizoflora in Biocontrol of Fungal Phytopathogens: An Overview. *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation*, 183-203. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4862-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4862-3_9)
- Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T., Bhat, A., & Bhat, M. A. (2013). Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. *Int J Modern Plant&Anim Sci.*, 1, 39-57.
- Karuppiah, V., Sun, J., Li, T., Vallikkannu, M., & Chen, J. (2019). Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 Causes Differential Gene Expression and Improvement in the Wheat Growth and Biocontrol Activity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1068. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01068>
- Khanzada, M. A., Ansari, A., Rajput, M. A., Maitlo, S., Rajput, A. Q., & Ujjan, A. A. (2018). Effect of different abiotic factors on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose of mango. *Plant Protection*, 2(1), 23-30.

- Khokhar, I., Mukhtar, I., & Mushtaq, S. (2011). Antifungal effect of Penicillium metabolites against some fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(14), 1347-1351. <https://doi.org/10.1080/03235408.2010.496584>
- Kim, Y.-K., Li, D., & Kolattukudy, P. E. (1998). Induction of Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin Signaling by Hard-Surface Contact Primes Colletotrichum gloeosporioides Conidia To Germinate and Form Appressoria. *Journal of Bacteriology*, 180(19), 5144-5150.
- Kitchen, J. L., Bosch, F. van den, Paveley, N. D., Helps, J., & Berg, F. van den. (2016). The Evolution of Fungicide Resistance Resulting from Combinations of Foliar-Acting Systemic Seed Treatments and Foliar-Applied Fungicides: A Modeling Analysis. *PLOS ONE*, 11(8), e0161887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161887>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Kück, U., Nowrousian, M., Hoff, B., & Engh, I. (Eds.). (2009). Physiologie. En *Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung* (pp. 31-63). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-88717-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-88717-1_3)
- Larrea Poma, M., Tirado Bustillos, N., & Ascarrunz G., M. E. (2010). Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. *BIOFARBO*, 31.
- Latz, M. A. C., Jensen, B., Collinge, D. B., & Jørgensen, H. J. L. (2018). Endophytic fungi as biocontrol agents: Elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecology & Diversity*, 11(5-6), 555-567. <https://doi.org/10.1080/17550874.2018.1534146>
- Leal-Almanza, J., Gutiérrez-Coronado, M. A., Castro-Espinoza, L., Lares-Villa, F., Cortes-Jiménez, J. M., Santos-Villalobos, S. de los, Leal-Almanza, J., Gutiérrez-Coronado, M. A., Castro-Espinoza, L., Lares-Villa, F., Cortes-Jiménez, J. M., & Santos-Villalobos, S. de los. (2018). Microorganismos promotores de crecimiento vegetal con yeso agrícola en papa (Solanum tuberosum L.) bajo casa sombra. *Agrociencia*, 52(8), 1149-1159.

- Li, T., Tang, J., Karupiah, V., Li, Y., Xu, N., & Chen, J. (2020). Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites. *Biological Control*, *140*, 104122. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104122>
- Liang, C., Schimel, J. P., & Jastrow, J. D. (2017). The importance of anabolism in microbial control over soil carbon storage. *Nature Microbiology*, *2*(8), 1-6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.105>
- Liñan. (2018). *Listado de materias en Fitosanitarios y Nutricionales*. [https://www.terraia.com/vademecum\\_de\\_productos\\_fitosanitarios\\_y\\_nutricionales/composition\\_index](https://www.terraia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/composition_index)
- Liu, F., Tang, G., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Qi, X., Zhou, Y., Xu, J., Chen, H., Chang, X., Zhang, S., & Gong, G. (2016). Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. *Scientific Reports*, *6*(1), 32761. <https://doi.org/10.1038/srep32761>
- Liu, F.-X., Fu, S.-F., Bi, X.-F., Chen, F., Liao, X.-J., Hu, X.-S., & Wu, J.-H. (2013). Physico-chemical and antioxidant properties of four mango (*Mangifera indica* L.) cultivars in China. *Food Chemistry*, *138*(1), 396-405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.111>
- Liu, J., Li, G., & Sui, Y. (2017). Optimization of Culture Medium Enhances Viable Biomass Production and Biocontrol Efficacy of the Antagonistic Yeast, *Candida diversa*. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02021>
- Lo, C.-C. (2010). Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, *45*(5), 348-359. <https://doi.org/10.1080/03601231003799804>
- Lowry, O. H., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biological Chemistry*, *193*(1), 265-275.

- Luti, K. (2018, septiembre 10). Mixture Design of Experiments for the Optimization of Carbon Source for Promoting Undecylprodigiosin and Actinorhodin Production. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. <https://microbiologyjournal.org/mixture-design-of-experiments-for-the-optimization-of-carbon-source-for-promoting-undecylprodigiosin-and-actinorhodin-production/>
- Madigan, Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2019). *Brock. Biología de los microorganismos* (12 ed.). Pearson Educación, S. A. <https://pearson.es/espa%20C3%B1a/TiendaOnline/brock-biolog%C3%ADa-de-los-microorganismos>
- Mamani, M. M., Alvarez, Aliaga, M. T., & Calle, D. X. T. R. (2018). *Estrategias bioquímicas para la producción de compuestos con actividad biológica inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos que afectan a cultivos del mango en la Región de la Plazuela, Irupana La Paz*. [Thesis, Universidad Mayor de San Andres. Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquimicas. Maestria en Ciencias Biologicas y Biomédicas.]. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/17589>
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 359-368. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>
- Manicom, B. Q. (1986). Factors affecting bacterial black spot of mangoes caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Mangiferaeindicae*. *Annals of Applied Biology*, 109(1), 129-135. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1986.tb03191.x>
- Mc Grath. (2014). *What Are Fungicides (Spanish Version)*. What Are Fungicides (Spanish Version). <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Pages/fungicidesSpanish.aspx>
- Meena, R. S., Kumar, S., Datta, R., Lal, R., Vijayakumar, V., Brtnicky, M., Sharma, M. P., Yadav, G. S., Jhariya, M. K., Jangir, C. K., Pathan, S. I., Dokulilova, T., Pecina, V., &

- Marfo, T. D. (2020). Impact of Agrochemicals on Soil Microbiota and Management: A Review. *Land*, 9(2), 34. <https://doi.org/10.3390/land9020034>
- Mejdoub-Trabelsi, B., Aydi Ben Abdallah, R., Nawaim, A., & Daami-Remadi, M. (2017). Antifungal Potential of Extracellular Metabolites from *Penicillium* spp. And *Aspergillus* spp. Naturally Associated to Potato against *Fusarium* species Causing Tuber Dry Rot. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 9, 181-190. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000364>
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., & Burton, A. L. (1960). Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*, 1(2), 127-132. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(60\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(60)90004-X)
- Montes. (2005). *Capítulo 15, recursos agrícolas*. Bolivia.com. <https://www.bolivia.com/geografiadebolivia/cap15.htm>
- Morath, S. U., Hung, R., & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2), 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>
- Morimoto, K. (1978). ON THE GENERA OF ORIENTAL CRYPTORHYNCHINAE (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). *Undefined*. <https://www.semanticscholar.org/paper/ON-THE-GENERA-OF-ORIENTAL-CRYPTORHYNCHINAE-%3A-Morimoto/f3796703af32ab2a9623603612fa77658af8edfa>
- Mosquera, W. G., Criado, L. Y., Guerra, B. E., Mosquera, W. G., Criado, L. Y., & Guerra, B. E. (2020). Actividad antimicrobiana de hongos endófitos de las plantas medicinales *Mammea americana* (Calophyllaceae) y *Moringa oleifera* (Moringaceae). *Biomédica*, 40(1), 55-71. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4644>
- Mulkay, T. (2010). Diagnóstico de las enfermedades fungosas de mayor incidencia durante la poscosecha de la papaya (*Carica papaya* L.), el mango (*Mangifera indica* L.) y el

- aguacate (*Persea americana* Miller) en tres localidades frutícolas de Cuba. *CITRIFRUT*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Diagn%C3%B3stico+de+las+enfermedades+fungosas+de+mayor+incidencia+durante+la+poscosecha+de+la+papaya+%28Carica+papaya+L.%29+el+mango+%28Mangifera+indica+L.%29+y+el+aguacate+%28Persea+americana+Miller%29+en+tres+localidades+frut%C3%ADcolas+de+Cuba.&author=Mulkay%2CTania%2C+Instituto+de+Investigaciones+en+Fruticultura+Tropical&publication\\_year=2010](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Diagn%C3%B3stico+de+las+enfermedades+fungosas+de+mayor+incidencia+durante+la+poscosecha+de+la+papaya+%28Carica+papaya+L.%29+el+mango+%28Mangifera+indica+L.%29+y+el+aguacate+%28Persea+americana+Miller%29+en+tres+localidades+frut%C3%ADcolas+de+Cuba.&author=Mulkay%2CTania%2C+Instituto+de+Investigaciones+en+Fruticultura+Tropical&publication_year=2010)
- Naglot, A., Goswami, S., Rahman, I., Shrimali, D. D., Yadav, K. K., Gupta, V. K., Rabha, A. J., Gogoi, H. K., & Veer, V. (2015). Antagonistic Potential of Native *Trichoderma viride* Strain against Potent Tea Fungal Pathogens in North East India. *The Plant Pathology Journal*, 31(3), 278-289. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.01.2015.0004>
- Narayanasamy, P. (2013). *Biological Management of Diseases of Crops, Texto original: Volume 1: Characteristics of Biological Control Agents*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6380-7>
- Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D. J., König, C. C., Valiante, V., Schroeckh, V., & Brakhage, A. A. (2015). Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers in Microbiology*, 6, 299. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00299>
- Nicoletti, R., Lopez-Gresa, M. P., Manzo, E., Carella, A., & Ciavatta, M. L. (2007). Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. *Mycopathologia*, 163(5), 295-301. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9015-x>
- Noriega, D., Urías-López, M., Gonzalez-Carrillo, J., & López-Guillén, G. (2016). Seasonal Abundance of White Mango Scale, *Aulacaspis tubercularis* Newstead, in Guerrero, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 41, 845-853.
- Omedi, J. O., Huang, W., & Zheng, J. (2019). Effect of sourdough lactic acid bacteria fermentation on phenolic acid release and antifungal activity in pitaya fruit substrate. *LWT*, 111, 309-317. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.038>



- OMS. (2016). *OMS / ¿Residuos de plaguicidas en los alimentos?* WHO; World Health Organization. <http://www.who.int/features/qa/87/es/>
- Patil, R. H., Patil, M. P., & Maheshwari, V. L. (2016). Chapter 5 - Bioactive Secondary Metabolites From Endophytic Fungi: A Review of Biotechnological Production and Their Potential Applications. En Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 49, pp. 189-205). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63601-0.00005-3>
- Perez, N. (2004). *Manejo ecológico de plagas*. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural-CEDAR.
- Ploetz, R. (2008). *Antracnosis en mango: Manejo de la enfermedad más importante pre y postcosecha* (Department of Plant Pathology, pp. 1-11). University of Florida, TREC-Homestead Department of Plant Pathology. [https://www.mango.org/wp-content/uploads/2017/10/Anthracnose\\_Mangos\\_Final\\_Report\\_Eng.pdf](https://www.mango.org/wp-content/uploads/2017/10/Anthracnose_Mangos_Final_Report_Eng.pdf)
- Puño, R., Terrazas, E., Alvares, T., Giménez, A., Mendoza, L., Smeltekop, H., & Loza-Murguía, M. (2011). Evaluación de la capacidad biocontroladora de metabólicos de *Trichoderma inhamatum* Bol12 QD sobre cepas nativas de *Phytophthora infestans* in vitro. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 2(1), 26-33.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., & Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00573>
- Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandão, R. S., Jesuino, R. S. A., & Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 35(9), 1461-1468. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1225-3>
- Raghavendra, S., HS, R., K, D., & AN, R. (2019). ANTIFUNGAL EFFICIENCY OF COPPER OXYCHLORIDE-CONJUGATED SILVER NANOPARTICLES AGAINST COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES WHICH CAUSES ANTHRACNOSE

- DISEASE. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 230-233. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i18.34297>
- Ramírez, F., Davenport, T. L., Fischer, G., Pinzón, J. C. A., & Ulrichs, C. (2014). Mango trees have no distinct phenology: The case of mangoes in the tropics. *Scientia Horticulturae*, 168, 258-266. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.040>
- Ramos, A. de J., López-Palestina, C. U., Pinedo-Espinoza, J. M., Altamirano-Romo, S. E., Santiago-Saenz, Y. O., Aguirre-Mancilla, C. L., Gutiérrez-Tlahque, J., Joaquín-Ramos, A. de J., López-Palestina, C. U., Pinedo-Espinoza, J. M., Altamirano-Romo, S. E., Santiago-Saenz, Y. O., Aguirre-Mancilla, C. L., & Gutiérrez-Tlahque, J. (2020). Phenolic compounds, antioxidant properties and antifungal activity of jarilla (*Barkleyanthus salicifolius* ENT#91;KunthENT#93; H. Rob & Brettell). *Chilean journal of agricultural research*, 80(3), 352-360. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392020000300352>
- Reissig, J. L., Storminger, J. L., & Leloir, L. F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *The Journal of Biological Chemistry*, 217(2), 959-966.
- Rivas, B., & Carrizales, L. (2007). Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el Municipio Cedeño, Estado Monagas, Venezuela. *Bioagro*, ISSN 1316-3361, Vol. 19, N°. 1, 2007, pags. 19-25, 19.
- Robles-Sánchez, R. M., Rojas-Graü, M. A., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G. A., & Martín-Belloso, O. (2009). Effect of minimal processing on bioactive compounds and antioxidant activity of fresh-cut 'Kent' mango (*Mangifera indica* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 51(3), 384-390. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.09.003>
- Rodrigues, M. S., Ferreira, L. S., Converti, A., Sato, S., & Carvalho, J. C. M. (2010). Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: Potassium nitrate and ammonium

chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 101(12), 4491-4498. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.054>

Rodríguez-López, É. S., Cárdenas-Soriano, E., Hernández-Delgado, S., Gutiérrez-Diez, A., & Mayek-Pérez, N. (2013). Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. De frutos de aguacatero. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(3), 898-905. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000300029>

Rodríguez-López, E. S., González-Prieto, J. M., & Mayek-Pérez, N. (2009). La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista mexicana de fitopatología*, 27(1), 53-63.

Rohlf, M. (2015). Fungal secondary metabolite dynamics in fungus–grazer interactions: Novel insights and unanswered questions. *Frontiers in Microbiology*, 5, 788. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00788>

Rouissi, W., Ugolini, L., Martini, C., Lazzeri, L., & Mari, M. (2013). Control of Postharvest Fungal Pathogens by Antifungal Compounds from *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*, 76(11), 1879-1886. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-072>

Sanchez, S., & Demain, A. L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 895-906. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00172-2)

Sanchez-Perez, J. A., Béjar Castillo, V., Villanueva Cotrina, F., Guevara-Granados, J. M., Sanchez-Perez, J. A., Béjar Castillo, V., Villanueva Cotrina, F., & Guevara-Granados, J. M. (2020). Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sensu stricto sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. *Anales de la Facultad de Medicina*, 81(2), 180-185. <https://doi.org/10.15381/anales.v81i2.16170>

- Schieber, A., Hilt, P., Streker, P., Endress, H.-U., Rentschler, C., & Carle, R. (2003). A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4, 99-107. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00087-5)
- Schisler, D., Slininger, P., Boehm, M., & Paul, P. (2011). Co-culture of Yeast Antagonists of Fusarium Head Blight and their Effect on Disease Development in Wheat. *Papers in Plant Pathology*. <https://digitalcommons.unl.edu/plantpathpapers/385>
- Senasag. (2016). *GOBIERNO NACIONAL BUSCA IMPULSAR LA PRODUCCIÓN DE MANGO EN EL DEPARTAMENTO DE LA PAZ*. Senasag.gob.bo. <http://www.senasag.gob.bo/prensa/noticias/2995-gobierno-nacional-busca-impulsar-la-produccion-de-mango-en-el-departamento-de-la-paz.html>
- Shukla, A., & Dwivedi, S. K. (2013). Antifungal approach of phenolic compounds against Fusarium udum and Fusarium oxysporum f.sp.ciceri. *African Journal of Agricultural Research*, 8(7), 596-600. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.2318>
- Singh nee' Nigam, P. (2009). Production of Bioactive Secondary Metabolites. En P. Singh nee' Nigam & A. Pandey (Eds.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* (pp. 129-145). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_7)
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2087. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sivan, A., Elad, Y., & Chet, I. (1984). Biological control effects of a new isolate of Trichoderma harzianum on Pythium aphanidermatum. *Phytopathology*, 74(4), 498-501.

- Solomon, E., Berg, L., & Martin, D. (2013). *Biología* (9.<sup>a</sup> ed.). CENGAGE Learning.
- Steenkamp, E., Britz, H., Coutinho, T., Wingfield, B., Marasas, W., & Wingfield, M. (2000). Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. *Molecular Plant Pathology*, *1*(3), 187-193. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00024.x>
- Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A., & Stewart, A. (2010). Reproduction without sex: Conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology (Reading, England)*, *156*(Pt 10), 2887-2900. <https://doi.org/10.1099/mic.0.041715-0>
- Sumaya-Martínez, M. T., Herrera, L. M. S., García, G. T., & Paredes, D. G. (2012). Red De Valor Del Mango Y Sus Desechos Con Base En Las Propiedades Nutricionales Y Funcionales. *Revista Mexicana de Agronegocios*, *30*, 826-833.
- Tenorio Pari, R., Mollinedo Portugal, P. A. T., & Alvarez Aliaga, M. T. T. (2017). *Aislamiento, identificación y ensayos de control biológico in vitro de fitopatógenos de la Mazorca de cacao (Theobroma cacao)*. [Thesis, Universidad Mayor de San Andres. Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquimicas. Maestria en Ciencias Biologicas y Biomédicas.]. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/17585>
- Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J. L., Kannangara, S. D., & Promputtha, I. (2020). Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 718. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>
- Tores, J. A. (1997). [Oidium of mango tree (*Oidium mangiferae* Berthet). *Phytoma Espana*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=%5BOidium+of+mango+tree+%28Oidium+mangiferae+Berthet%29%5D.+%5BSpanish%5D&author=Tores+J.A.&publication\\_year=1997](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=%5BOidium+of+mango+tree+%28Oidium+mangiferae+Berthet%29%5D.+%5BSpanish%5D&author=Tores+J.A.&publication_year=1997)
- Tores, J., Guirado, E., Herniso, J., Sarmiento, D., Carzola, F., & De Vicente, A. (2016). *NECROSIS APICAL DEL MANGO BACTERIOSIS CAUSADA POR PSEUDOMONAS*

*SYRINGAE* (Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea «IHSM La Mayora»). [https://www.cajaruralgranada.es/sites/default/files/2020-11/necrosis\\_apical\\_del\\_mango.pdf](https://www.cajaruralgranada.es/sites/default/files/2020-11/necrosis_apical_del_mango.pdf)

Tresguerres, J. F., Fernández, V. M., & Serrano, V. N. (2013). *Biotechnología aplicada a la medicina*. Ediciones Díaz de Santos.

Vargas M., R., & Ubillo F., A. (2001). TOXICIDAD DE PESTICIDAS SOBRE ENEMIGOS NATURALES DE PLAGAS AGRICOLAS. *Agricultura Técnica*, 61(1), 35-41. <https://doi.org/10.4067/S0365-28072001000100004>

Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. de los. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130.

Vinale, F., Nicoletti, R., Borrelli, F., Mangoni, A., Parisi, O. A., Marra, R., Lombardi, N., Lacatena, F., Grauso, L., Finizio, S., Lorito, M., & Woo, S. L. (2017). Co-Culture of Plant Beneficial Microbes as Source of Bioactive Metabolites. *Scientific Reports*, 7, 14330. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14569-5>

Wang, X., Chen, Z., Shen, J., Zhao, X., & Kang, J. (2019). Impact of carbon to nitrogen ratio on the performance of aerobic granular reactor and microbial population dynamics during aerobic sludge granulation. *Bioresource Technology*, 271, 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.119>

Watanabe, T. (2010). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, Third Edition*. CRC Press.

- Weller, DM, Zhang, BX, & Cook, RJ. (1985). Application of a rapid screening test for selection of bacteria suppressive to take-all of wheat. *Plant Disease*, 69, 710-713.
- Wink, M., Ashour, M. L., & El-Readi, M. Z. (2012). Secondary Metabolites from Plants Inhibiting ABC Transporters and Reversing Resistance of Cancer Cells and Microbes to Cytotoxic and Antimicrobial Agents. *Frontiers in Microbiology*, 3, 130. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00130>
- World Health Organization, & Programme, U. N. E. (1990). *Public health impact of pesticides used in agriculture*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39772>
- Yadav, D., & Singh, S. (2017). Mango: History origin and distribution. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 1257-1262.
- Yang, L., Xie, J., Jiang, D., Fu, Y., Li, G., & Lin, F. (2008). Antifungal substances produced by *Penicillium oxalicum* strain PY-1—Potential antibiotics against plant pathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 909-915. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9626-x>
- Zeballos, H. (2006). *Agricultura y desarrollo sostenible*. Plural.
- Zhang, L., Chang, W., Sun, B., Groh, M., Speicher, A., & Lou, H. (2011). Bisbibenzyls, a new type of antifungal agent, inhibit morphogenesis switch and biofilm formation through upregulation of DPP3 in *Candida albicans*. *PloS One*, 6(12), e28953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028953>
- Zhang, S., Gan, Y., Liu, J., Zhou, J., & Xu, B. (2020). Optimization of the Fermentation Media and Parameters for the Bio-control Potential of *Trichoderma longibrachiatum* T6 Against Nematodes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574601>

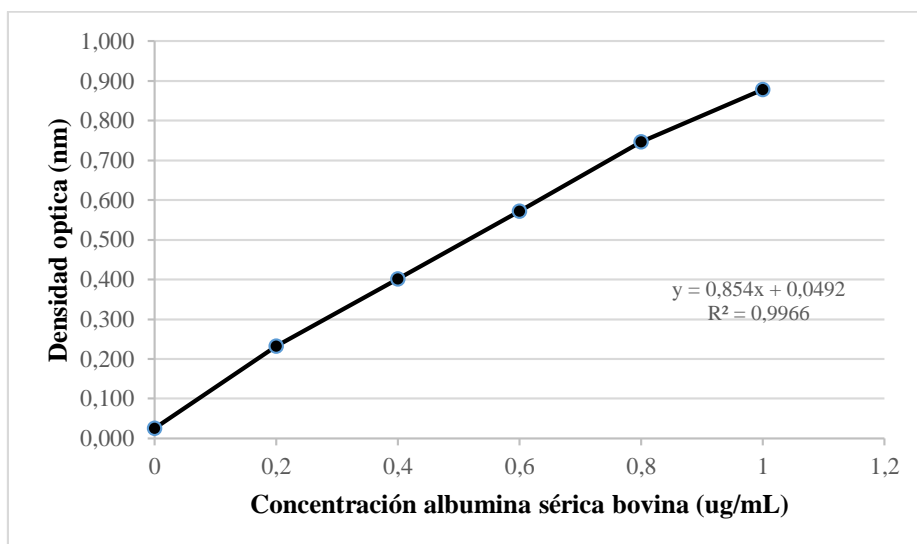
Zhang, S., Huang, J., & Luo, L. (2013). *Optimización del medio de fermentación para la producción de proteasas por Bacillus subtilis*. CNKI. [https://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTotol-ZNGZ201302009.htm](https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotol-ZNGZ201302009.htm)

Zhang, S., xu, B., Zhang, J., & Gan, Y. (2018). Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathgens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.006>

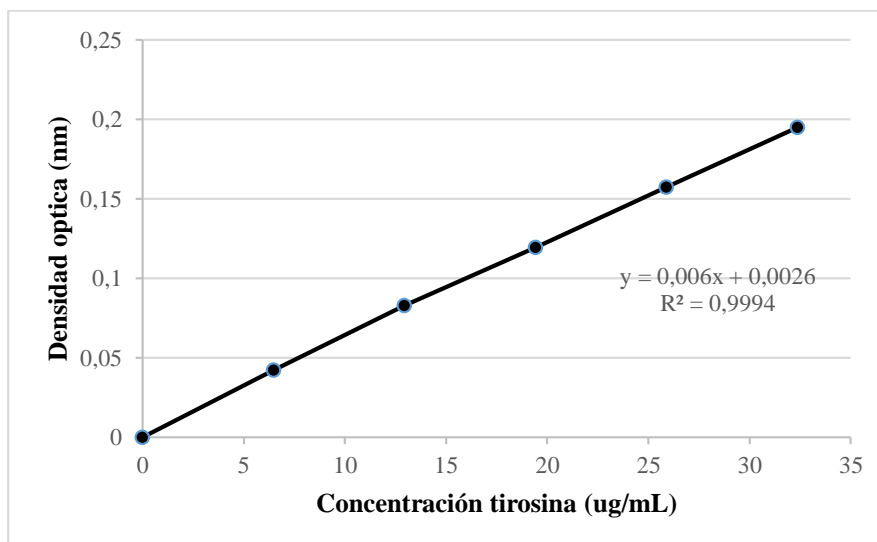


## 9 ANEXOS

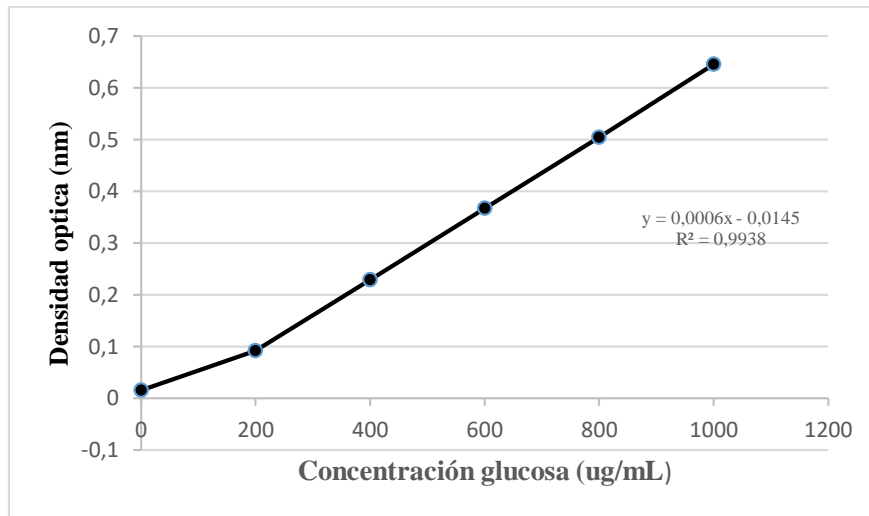
### Anexo 1. Curva de calibración de albúmina sérica bovina, determinación de proteínas solubles totales.



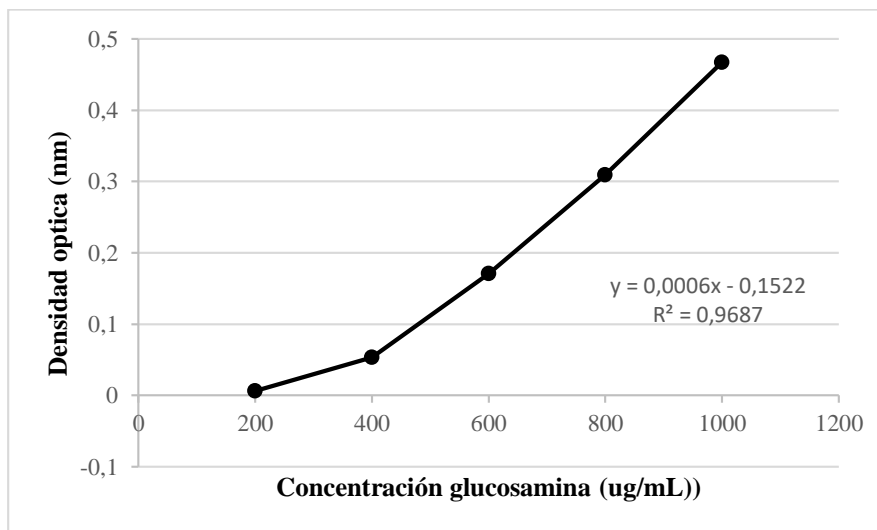
### Anexo 2. Curva de calibración de tirosina, determinación de actividad proteolítica



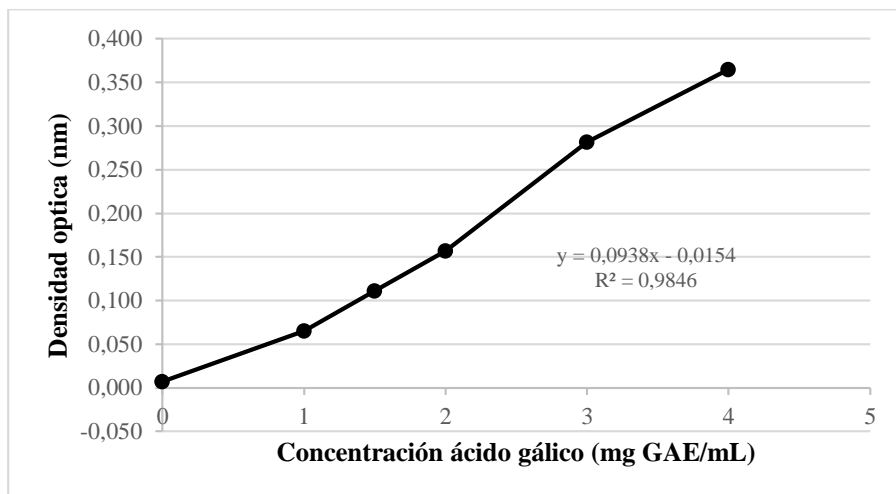
**Anexo 3. Curva de calibración de glucosa, determinación de actividad celulolítica**



**Anexo 4. Curva de calibración de N – acetil glucosamina, determinación de actividad quitinolítica**



**Anexo 5. Curva de calibración de ácido gálico, determinación de la concentración de compuestos fenólicos**



**Anexo 6. Codificación de cepas fúngicas**

<b>Código</b>	<b>Cepas</b>
CP 1	<i>Micelio esteril H1</i>
CP 2	<i>Alternaria J2 8%</i>
CP 3	<i>Alternaria sp. J2 8% 2L</i>
CP 4	<i>Alternaria sp. K3 2%</i>
CP 5	<i>Aspergillus sp. A1</i>
CP 6	<i>Aspergillus sp. A1</i>
CP 7	<i>Aspergillus sp. A3 2%</i>
CP 8	<i>Aspergillus sp. A3 2%</i>
CP 9	<i>Aspergillus sp. G1 2%</i>
CP 10	<i>Aspergillus sp. G3 2%</i>
CP 11	<i>Aspergillus sp. I 1 A</i>
CP 12	<i>Aspergillus sp. J1 1L</i>
CP 13	<i>Aspergillus sp. J1 PDA</i>
CP 14	<i>Aspergillus sp. J1 PDA</i>
CP 15	<i>Aspergillus sp. J1 PDA2</i>
CP 16	<i>Aspergillus sp. J1 PDA3</i>
CP 17	<i>Aspergillus sp. J2 2%</i>
CP 18	<i>Aspergillus sp. J3 8%</i>
CP 19	<i>Aspergillus sp. K1 1L</i>
CP 20	<i>Aspergillus sp. K2 8%</i>
CP 21	<i>Aspergillus sp. M1</i>
CP 22	<i>Cladosporidium sp. A2</i>
CP 23	<i>Cladosporidium sp. A3</i>
CP 24	<i>Micelio esteril B2 2%</i>
CP 25	<i>Micelio esteril CB</i>
CP 26	<i>Micelio esteril I 8%</i>
CP 27	<i>Micelio esteril X3 2%</i>
CP 28	<i>Penicillium sp. J2 2%</i>
CP 29	<i>Penicillium sp. J2 8%</i>
CP 30	<i>Penicillium sp. J2 8%</i>
CP 31	<i>Penicillium sp. J2 8%</i>
CP 32	<i>Penicillium sp. J2 8% 2</i>
CP 33	<i>Penicillium sp. K3 8%</i>
CP 34	<i>Penicillium sp. X2 2%</i>
CP 35	<i>Scopoluriopsis sp. J2</i>

**Anexo 7. Actividad antagonica directa de cepas fungicas**

<b>Código</b>	<b>Cepa</b>	<b>Promedio ± DS</b>	<b>Escala de Bell</b>
CP 34	<i>Penicillium sp. X2 2%</i>	70 ± 5	II
CP 18	<i>Aspergillus sp. J3 8%</i>	65 ± 2	II
CP 12	<i>Aspergillus sp. J1 1L</i>	62 ± 4	II
CP 17	<i>Aspergillus sp. J2 2%</i>	60 ± 2	II
CP 6	<i>Aspergillus sp. A1</i>	59 ± 1	III
CP 16	<i>Aspergillus sp. J1 PDA3</i>	59 ± 1	III
CP 13	<i>Aspergillus sp. J1 PDA</i>	58 ± 1	III
CP 9	<i>Aspergillus sp. G1 2%</i>	58 ± 1	III
CP 28	<i>Penicillium sp. J2 2%</i>	58 ± 2	III
CP 27	<i>Micelio esteril X3 2%</i>	51 ± 7	III
CP 32	<i>Penicillium sp. J2 8% 2</i>	56 ± 1	III
CP 15	<i>Aspergillus sp. J1 PDA2</i>	56 ± 2	III
CP 33	<i>Penicillium sp. K3 8%</i>	56 ± 1	III
CP 19	<i>Aspergillus sp. K1 1L</i>	55 ± 6	III
CP 7	<i>Aspergillus sp. A3 2%</i>	51 ± 3	III
CP 5	<i>Aspergillus sp. A1</i>	50	III
CP 21	<i>Aspergillus sp. M1</i>	49 ± 2	III
CP 11	<i>Aspergillus sp. I 1 A</i>	47 ± 2	III
CP 10	<i>Aspergillus sp. G3 2%</i>	47 ± 3	III
CP 1	<i>Micelio esteril H1</i>	47 ± 7	III
CP 3	<i>Alternaria sp. J2 8% 2L</i>	46 ± 4	III
CP 23	<i>Cladosporidium sp. A3</i>	42 ± 5	III
CP 8	<i>Aspergillus sp. A3 2%</i>	42 ± 1	III
CP 26	<i>Micelio esteril I 8%</i>	40 ± 4	III
CP 35	<i>Scopoluriopsis sp. J2</i>	39 ± 2	IV
CP 24	<i>Micelio esteril B2 2%</i>	38 ± 8	IV
CP 31	<i>Penicillium sp. J2 8%</i>	37 ± 2	IV
CP 14	<i>Aspergillus sp. J1 PDA</i>	36 ± 4	IV
CP 4	<i>Alternaria sp. K3 2%</i>	36 ± 1	IV
CP 2	<i>Alternaria J2 8%</i>	36 ± 6	IV
CP 22	<i>Cladosporidium sp. A2</i>	32 ± 1	IV
CP 30	<i>Penicillium sp. J2 8%</i>	28 ± 2	IV
CP 20	<i>Aspergillus sp. K2 8%</i>	26 ± 4	IV
CP 29	<i>Penicillium sp. J2 8%</i>	24	IV
CP 25	<i>Micelio esteril CB</i>	22 ± 1	IV

