



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS
PROCEDENTES DE MACROORGANISMOS MARINOS COLOMBIANOS,
COMO AGENTES BIOCONTROLADORES DE *Colletotrichum* spp., CAUSANTE DE
ANTRACNOSIS EN FRESA (*Fragaria* sp)**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C. 2019**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS
PROCEDENTES DE MACROORGANISMOS MARINOS COLOMBIANOS,
COMO AGENTES BIOCONTROLADORES DE *Colletotrichum* spp CAUSANTE DE
ANTRACNOSIS EN FRESA (*Fragaria* sp)**

**NATALIA RIVEROS FRAILE
RUBI ALEJANDRA ROSERO CALDERON**

**Asesora externa
ADRIANA ROCÍO ROMERO OTERO Mg.
Universidad Nacional De Colombia.**

**Asesora interna
LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ LEAL M.Sc.
Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C. 2019**

DEDICATORIA

A nuestras familias

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en primer lugar a nuestras familias por el amor, la comprensión, el apoyo incondicional durante nuestras carreras, por creer en nosotras y nuestras capacidades e impulsarnos a ser mejores cada día.

A nuestros amigos y demás personas que nos acompañaron, apoyaron y motivaron a seguir adelante con este trabajo, en aquellos momentos cuando el camino se hacía un poco difícil.

Al grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos de Colombia” de la Universidad Nacional de Colombia, por abrirnos sus puertas para desarrollar este proyecto. Especialmente a Diana Marcela Vinchira Villarraga, por brindarnos su confianza, paciencia, el tiempo dedicado a solucionar cualquier duda y su compañía incondicional, a pesar de todas las dificultades en cada paso.

A nuestra asesora externa Adriana Rocío Romero Otero, por su constancia y exigencia durante todo este tiempo para el buen desarrollo de nuestro trabajo.

Al profesor Freddy Alejandro Ramos Rodríguez, quien estuvo pendiente de los resultados que se iban obteniendo, así como lo que requeríamos para este proyecto. Por su confianza y apoyo incondicional.

Al profesor Leonardo Castellanos Hernández, líder del grupo de investigación quien nos recibió muy amablemente en el grupo y a todos los integrantes del mismo, por hacernos sentir cómodas y prestarnos su ayuda cuando la necesitamos. Aunque muchos ya no están, siempre los tenemos presentes en nuestras mentes.

A la profesora Ibonne Aydee García Romero, por permitirnos realizar parte de nuestro trabajo en el laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de

Colombia. A Elizabeth y Victoria por la colaboración y compañía prestada en su momento.

A la profesora Ligia Consuelo Sánchez Leal, por motivarnos e inspirarnos en el desarrollo de este trabajo, por su asesoría y compañía constante en la elaboración del mismo.

A la microbióloga María Eugenia Downs Burgos, por prestarnos las instalaciones y equipo del laboratorio del Hospital Cardiovascular del niño de Cundinamarca, para poder realizar parte de nuestro trabajo.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca docentes, estudiantes y administrativos por cada una de sus enseñanzas.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Resumen	11
1. Introducción	15
2. Objetivos	17
3. Antecedentes	18
4. Marco referencial	22
4.1. Características generales de la fresa	22
4.1.1. Características morfo-fisiológicas	22
4.1.2. Condiciones del cultivo	23
4.1.3. Cultivo de fresa en Colombia	24
4.1.4. Problemas fitosanitarios asociados al cultivo	25
4.2. Características generales del género <i>Colletotrichum</i> spp.	26
4.2.1. Clasificación taxonómica	27
4.2.2. Características macroscópicas y microscópicas del género <i>Colletotrichum</i> spp.	27
4.2.3. Ciclo de vida de <i>Colletotrichum</i> spp.	29
4.3. Antracnosis por <i>Colletotrichum</i> spp. en fresa (<i>Fragaria</i> sp.)	30
4.4. Manejo integrado de antracnosis en el cultivo de fresa	31
4.5. Ambientes marinos como fuente de microorganismos marinos	33
4.5.1. Características generales de ambientes marinos	33
4.5.2. Ambientes marinos en Colombia	34
4.6. Bacterias aisladas de ambientes marinos con actividad Antimicrobiana	35
4.7. Hongos aislados de ambientes marinos con actividad Antimicrobiana	36
5. Diseño metodológico	38
5.1. Universo, población y muestra	38
5.2. Hipótesis, variables e indicadores	39
5.3. Técnicas y procedimientos	40
5.3.1. Generación de la colección de microorganismos marinos	41
5.3.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica de	

los microorganismos seleccionados frente a <i>Colletotrichum</i> sp.	46
5.3.3. Ensayo en hojas de la actividad antifúngica de los microorganismos obtenidos.	49
5.3.4. Identificación de los microorganismos seleccionados por observación macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas	52
5.3.5. Caracterización de microorganismos con actividad antifúngica frente a <i>Colletotrichum</i> sp	53
6. Resultados	54
6.1. Generación de la colección de microorganismos marinos	54
6.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica de los microorganismos seleccionados	55
6.3. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antifúngica de los microorganismos seleccionados	57
6.4. Identificación de los microorganismos seleccionados por observación macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas	61
6.5. Caracterización de microorganismos con actividad antifúngica frente a <i>Colletotrichum</i> sp	64
7. Discusión	67
8. Referencias	74
9. Anexos	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de *Fragaria* sp.

Figura 2. Estructura de la planta de fresa.

Figura 3. Producción y rendimiento nacional del cultivo de fresa durante el periodo del año 2010 - 2018

Figura 4. Clasificación taxonómica del género *Colletotrichum* spp.

Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas de *Colletotrichum* spp.

Figura 6. Ciclo de vida general para las especies de *Colletotrichum* spp.

Figura 7. Infección en frutos de fresa en diferentes estados de maduración

Figura 8. Macroorganismos muestreados para el aislamiento de microorganismos marinos

Figura 9. Aislamiento directo de hongos epífitos

Figura 10. Aislamiento directo de bacterias epífitas

Figura 11. Aislamiento directo de microorganismos endófitos

Figura 12. Método de preservación para bacterias

Figura 13. Métodos de preservación 1 y 2 para hongos.

Figura 14. Métodos de preservación 3 y 4 para hongos.

Figura 15. Protocolo enfrentamiento *in vitro* (Hongo-hongo)

Figura 16. Protocolo de ensayo de bioautografía por overlay sobre medio sólido

Figura 17. Protocolo de ensayo de difusión en placa

Figura 18. Ensayo en hojas bajo condiciones de laboratorio

Figura 19. Resultados de medición de las áreas de inhibición de los hongos antagonicos frente a *Colletotrichum* spp

Figura 20. Resultados del ensayo de difusión en placa

Figura 21. Análisis estadístico del ensayo *in vivo* en hojas de fresa.

Figura 22. Resultados del ensayo *in vivo* en hojas de fresa

Figura 23. Resultados tinción de Gram. Bacilos Gram negativos

Figura 24. Crecimiento en agar Mac Conkey. Colonias rojas fermentadoras lentas de lactosa.

Figura 25. Resultados del panel de identificación bioquímico (aplica para la cepa 484 y 478).

Figura 26. Observación macroscópica y microscópica del hongo aislado.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos ensayo in vitro sin dato atípico

Tabla 2. Clasificación taxonómica de los aislamientos bacterianos de la secuenciación del gen 16s rARN

Tabla 3. Clasificación taxonómica del aislamiento 34 mediante secuenciación de región ITS.



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS
PROCEDENTES DE MACROORGANISMOS MARINOS COLOMBIANOS,
COMO AGENTES BIOCONTROLADORES DE *Colletotrichum* spp CAUSANTE DE
ANTRACNOSIS EN FRESA (*Fragaria* sp)**

RESUMEN

Una amplia diversidad de organismos marinos han demostrado ser una fuente alternativa de microorganismos biocontroladores; debido a la producción de metabolitos con actividad biológica que pueden ser aplicados para el manejo de fitopatógenos. En Colombia, la antracnosis en los cultivos de fresa, origina hasta el 70% de pérdidas en campo y continúa su ciclo en postcosecha. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial biocontrolador de aislamientos microbianos obtenidos de macroorganismos marinos para el manejo del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp. en plantas de fresa. Se procesaron 84 muestras de zonas costeras del caribe colombiano, para aislar y purificar diferentes microorganismos con los que se conformó un cepario. Posteriormente, se evaluaron mediante técnicas *In vitro* (difusión en placa, enfrentamiento directo y ensayos de inoculación en hoja) para determinar su potencial antifúngico contra *Colletotrichum* spp. Los resultados permitieron seleccionar dos aislamientos bacterianos (478 y 484) y un aislamiento fúngico (34) según su efectividad

durante las pruebas. La clasificación taxonómica de estos microorganismos, se realizó a través de caracterización fenotípica y molecular. Las dos bacterias pertenecen al género *Serratia* mientras que el hongo pertenece al género *Neoscytalidium* siendo cercano a la especie *N. dimidiatum*. Los resultados de este trabajo contribuyen al estudio de tratamientos alternativos para el control biológico de fitopatógenos. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios que complementen estos hallazgos, con el fin de obtener un producto viable que permita proteger los cultivos de fresa contra la antracnosis, favoreciendo la actividad agrícola, la economía y la importación de Colombia.

PALABRAS CLAVES: Biocontrolador, Microorganismos marinos, *Fragaria* sp, Antracnosis, *Colletotrichum* spp.

Estudiantes Natalia Riveros Fraile, Rubi Alejandra Rosero Calderon.

Docentes: Ligia Consuelo Sánchez, M.Sc., Adriana Rocío Romero Otero M.Sc.

Institución: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Fecha: 4 de octubre 2019



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS FROM
COLOMBIAN MARINE MACROORGANISMS, AS BIOCONTROL AGENTS OF
Colletotrichum spp CAUSANT OF STRAWBERRY (*Fragaria* sp) ANTHRACNOSE**

ABSTRACT

A wide diversity of marine organisms have been an alternative source of biocontroller microorganisms; due to the production of metabolites with biological activity that can be applied for the management of phytopathogens. In Colombia, anthracnose in strawberry crops, causes up to 70% of losses in the field and continues its cycle in postharvest. The objective of this work was to evaluate the biocontroller potential of microbial isolates detected from marine macro-organisms for the management of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum* spp. in strawberry plants. 84 samples from coastal areas of the Colombian Caribbean were processed to isolate and purify different microorganisms with which a cepary is formed. Subsequently, it is evaluated using in vitro techniques (plate diffusion, direct confrontation and leaf inoculation assays) to determine its antifungal potential against *Colletotrichum* spp. The results allowed to select two bacterial isolates (478 and 484) and a fungal isolation (34) according to their modification during the tests. The taxonomic classification of these microorganisms was carried out through phenotypic and molecular characterization. The two bacteria

belonging to the genus *Serratia* while the fungus belongs to the genus *Neoscytalidium* being close to the species *N. dimidiatum*. The results of this work refer to the study of alternative treatments for the biological control of phytopathogens. However, it is necessary to carry out other studies that complement these findings, in order to obtain a viable product that allows to protect strawberry crops against anthracnose, favoring the agricultural activity, the economy and the importation of Colombia.

Keywords: Biocontrol, Marine microorganisms, *Fragaria* spp, Anthracnose, *Colletotrichum* spp.

INTRODUCCIÓN

La antracnosis, es una enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum* spp. y uno de los más importantes problemas fitosanitarios, debido a las considerables pérdidas económicas que genera en diversos cultivos tanto en el campo como post cosecha¹. En la fresa (*Fragaria* sp), cultivo de interés de este proyecto, las pérdidas debidas a la antracnosis pueden superar el 50% cuando las condiciones son favorables para el desarrollo del patógeno¹.

Este problema se ha manejado en el país a partir del uso de productos químicos altamente tóxicos, que además de eliminar las plagas y/o enfermedades comprometen la salud de las plantas, así como de los trabajadores y consumidores finales de estos productos². El principal inconveniente, además de su toxicidad y poca selectividad con los macro o microorganismos que atacan, es que pueden permanecer en el sitio de aplicación por largos periodos afectando de igual manera la microbiota natural de la planta³, que cumple un papel fundamental en su metabolismo y el transporte de nutrientes.

En los últimos años, estudios han demostrado un aumento en la incidencia de infecciones de los cultivos, por especies de *Colletotrichum* spp. resistentes a los tratamientos químicos⁴. Estas son generadas a partir de las variaciones polimórficas en sus genes, una vez han entrado en contacto de forma repetitiva con sustancias comúnmente comercializadas para el control de la infección⁴.

Con el fin de reducir pérdidas por este problema fitosanitario, las alternativas biológicas para el manejo de plagas y enfermedades han cobrado importancia. Estas pueden consistir en el uso de extractos naturales de plantas, la aplicación directa de microorganismos o de sus metabolitos secundarios para el manejo de fitopatógenos, a partir de la actividad antagónica o de antibiosis frente a éstos⁵.

En la búsqueda de otras fuentes alternativas de microorganismos biocontroladores, una amplia diversidad de organismos marinos (donde se incluyen algas, esponjas y octocorales, así como peces, moluscos y artrópodos, entre otros) han demostrado ser una buena fuente de estos. Siendo, además, potenciales productores de metabolitos con estructuras químicas novedosas y actividad biológica que pueden ser aplicadas en el campo científico, para el manejo de enfermedades y el control de plagas fitosanitarias⁶.

Este proyecto se desarrolló con el fin de determinar si microorganismos aislados de macroorganismos marinos colombianos, tienen el potencial de producir compuestos antimicrobianos para el manejo del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp. en plantas de fresa, como una contribución a una alternativa ambientalmente sostenible para el manejo de la antracnosis en el país.

Se utilizaron aislamientos obtenidos de muestras recolectadas de ecosistemas marinos, puesto que, pese al esfuerzo científico, aún son poco conocidos dada su extensa dimensión geográfica y continua variación⁷. En el caso del territorio colombiano, lo anterior es especialmente cierto, ya que cuenta con innumerables fuentes hídricas de donde se puede extraer una enorme riqueza microbiana que podría ser explotada para la obtención de nuevas moléculas y sustancias químicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el potencial biocontrolador de aislamientos microbianos obtenidos de macroorganismos marinos en el caribe colombiano para el manejo del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp. en cultivos de *Fragaria* sp.

2.2. Objetivos específicos

- Conformar una colección de microorganismos cultivables a partir de muestras de macroorganismos marinos recolectados en el caribe colombiano.
- Evaluar la actividad biocontroladora de la colección obtenida de microorganismos marinos frente a un aislamiento colombiano de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en cultivos de *Fragaria* sp.
- Caracterizar los microorganismos aislados que presentan actividad biocontroladora frente a *Colletotrichum* spp. mediante técnicas bioquímicas y moleculares.

3. ANTECEDENTES

3.1. Manejo alternativo de la antracnosis

La antracnosis, enfermedad causada por *Colletotrichum* sp. impacta negativamente la cadena de valor de los cultivos en todo el mundo. Este patógeno reduce la productividad hasta en un 90%, generando graves pérdidas económicas a los agricultores, quienes tienen que invertir grandes sumas de dinero en una nueva preparación de sus suelos para eliminar el patógeno y poder repetir la cosecha⁸.

Actualmente, el manejo de esta enfermedad en los cultivos consiste en la aplicación de fungicidas químicos durante la fase productiva. Sin embargo, se han venido investigando alternativas biotecnológicas para combatir enfermedades fúngicas en diversos cultivos, debido al incremento en las restricciones sanitarias sobre el uso de compuestos químicos por los efectos tóxicos que generan en la salud humana, la contaminación del medio ambiente⁹ y la inducción de resistencia en los patógenos⁴.

Además, dado el auge de los alimentos orgánicos en el mundo, el interés por buscar alternativas que cumplan con las expectativas de sus consumidores, ha fomentado la búsqueda de métodos de origen natural para el control de fitopatógenos postcosecha. A continuación, se describen algunos ejemplos del uso de extractos de origen natural y microorganismos¹⁰.

El uso de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas en los cultivos agrícolas ha tomado importancia en los últimos años, puesto que estos aceites poseen un amplio espectro antimicrobiano y antifúngico que podría ser una solución ecológica y económica para el manejo de enfermedades¹¹. En una investigación del año 2018 realizada por Vilaplana et al., se propone el uso del aceite de tomillo en bananos orgánicos para proteger la fruta al controlar la antracnosis causada por *C. musae* en las bodegas de almacenamiento, permitiendo conservar la fruta hasta por 21 días¹².

Pérez et al. en el 2018, evaluó *in vitro* la actividad inhibitoria de aceites esenciales extraídos de hojas frescas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.), contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. agente causante de la antracnosis en cultivos de ñame, en el departamento de Sucre, Colombia. Los resultados demostraron que la actividad inhibitoria de los aceites esenciales aumentó conforme se incrementaba la concentración de las preparaciones utilizadas para el ensayo¹³.

En cuanto a los extractos de origen natural, en el año 2017, España et al⁴ realizaron un estudio para evaluar el efecto antifúngico contra *Colletotrichum gloeosporioides* de aceites esenciales y extractos etanólicos de especies de *Eucalyptus* cultivadas en Colombia. Los resultados demostraron que los extractos etanólicos de la hoja de eucalipto presentan una inhibición más fuerte de *C. gloeosporioides* que los aceites esenciales, respaldando evidencia preliminar del uso de especies de *Eucalyptus* para la protección de cultivos agrícolas.

Un estudio realizado en Irak por Rashida et al.¹⁴, que buscaba evaluar la eficacia de la planta de zumaque (*Rhus coriaria*) en el control de la antracnosis del tomate causada por *C. acutatum*, determinó que los extractos crudos de los frutos y semillas de esta planta poseen una fuerte actividad inhibitoria del hongo. Efecto logrado por la ruptura de la pared celular del microorganismo, ofreciendo una alternativa para el control de las enfermedades previas y posteriores a la cosecha; y la conservación de la calidad de los alimentos, ya que no ejerce ningún cambio sobre su aspecto y sabor. En otro estudio, se hizo uso de un extracto crudo de brócoli que demostró que a mayor concentración (1.54 µg/µl) menor es la germinación de esporas (0-10%) de *C. gloeosporioides*¹⁵.

Por otro lado, en cuanto al uso de microorganismos, *Trichoderma* spp. ha sido el antagonista más estudiado para el control de fitopatógenos. En el año 2017 Karimi et al.¹⁶ realizaron un estudio comparativo en el que evaluaron especies de *Trichoderma* spp. aisladas de cultivos y otras de cepas comerciales contra *Colletotrichum nymphaeae*, patógeno de los cultivos de fresa. En este estudio, se demuestra la capacidad de estos microorganismos para la inhibición de *Colletotrichum* tanto *in vitro*

como *in planta*. Adicionalmente, se sugiere la producción enzimática como posible mecanismo de acción. Sus resultados indican que hay una gran variabilidad entre los aislamientos de *Trichoderma* spp. y el hecho de que vengan del mismo ambiente del cultivo no determina su efectividad contra el patógeno.

En el 2018 Guardado et al.¹⁷ evaluaron el papel antagónico de una nueva especie nativa de *Bacillus* cepa B5 sobre el *C. gloeosporioides*. Para esto, utilizaron el sobrenadante libre de células a partir de un cultivo de la cepa B5 que mostró ser eficaz para inhibir el crecimiento micelial y la germinación de los conidios de *C. gloeosporioides* durante los ensayos *in vitro*. Además, en un ensayo en fruta cosechada (aguacate y guanábana), el sobrenadante disminuyó la incidencia y severidad de la antracnosis mostrando su posible uso como tratamiento preventivo. En el estudio fue posible la amplificación de genes responsables de la producción de metabolitos como surfactinas, iturinas y bacilomycinas que pueden contribuir a la eficiencia del tratamiento. Estos lipopéptidos son moléculas que además de tener actividad antimicrobiana, han demostrado en estudios anteriores estimular la resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas.

Adicionalmente a los mecanismos anteriormente propuestos de biocontrol (enzimático y por producción de metabolitos secundarios), también existen ejemplos de micoparasitismo. Dadas las pérdidas causadas por antracnosis en poscosecha de papaya en Brasil. Lima et al.¹⁸ realizaron un estudio en el 2013, donde se emplearon dos especies de levaduras con potencial fungicida, *Wickerhamomyces anomalus* (cepa 422) y *Meyerozyma guilliermondii* (cepa 443). Ensayos de microscopía electrónica mostraron la existencia de una relación de micoparasitismo entre las levaduras y *C. gloeosporioides*¹⁸. Actualmente, las levaduras son agentes de control sobresalientes, ya que presentan una alta tasa de replicación y colonización al no requerir de muchos sustratos, no producen toxinas, lo que garantiza la seguridad del consumidor; además, expresan diferentes mecanismos antagónicos ya sea por competencia o por síntesis de metabolitos¹⁹.

3.2. Estudio de microorganismos marinos

En el año 1950 se reportó el aislamiento de la spongotimina el primer producto natural marino (PNM), obtenido a partir de una esponja²⁰, que dio origen al desarrollo del primer medicamento derivado de un metabolito de origen marino, el derivado sintético Vidarabina (Ara-A). Actualmente hay más de 29.000 PNM, de los cuales el 57% son aislados de microorganismos marinos²¹. Estos compuestos han sido aislados en un 49.5% de climas tropicales, 28,1% de climas subtropicales, 21.6% de climas templados y el 0.7% de regiones polares²².

La producción de estos compuestos se debe a la compleja naturaleza del medio marino, ya que sus microorganismos cuentan con sistemas fisiológicos y bioquímicos eficientes que les permite adaptarse a diversas condiciones. Muchas de estas condiciones pueden ser extremas y provocar estrés en los microorganismos, generando así la producción de compuestos biológicamente activos. Es importante conocer detalladamente cuáles son las características del ambiente marino en cuanto a sus condiciones únicas de sal, luz, oxígeno, temperatura, pH, nutrientes y demás características para poder determinar qué condiciones se les da al momento de realizar los aislamientos microbianos y así poder aprovechar sus compuestos metabólicamente activos²³.

Al respecto, un estudio realizado en enero del 2019 por Zhang et al.²⁴ sobre los biofilms marinos como una fuente de diversidad microbiana con potencial funcional, desarrolló diferentes perfiles a partir de técnicas de metagenómica. Estos permitieron la identificación del microbiota total de las superficies analizadas, al comparar los resultados con bases de datos ya establecidas. Los resultados demostraron que el genoma de estos microorganismos (principalmente bacterias) está muy influenciado por las condiciones medioambientales, lo cual les ha permitido desarrollar mecanismos de respuesta frente al estrés. De igual forma, se destaca el potencial para producir una amplia variedad de metabolitos secundarios no descritos aún, pero que por sus capacidades pueden ser utilizados en diferentes campos de la ciencia.

4. Marco referencial

4.1. Características generales de la fresa

Figura 1. Clasificación taxonómica de *Fragaria ananassa*.

REINO	Plantae
ORDEN	Rosales
FAMILIA	Rosaceae
GENERO	<i>Fragaria</i>

La fresa (*Fragaria* sp.) es una planta herbácea del reino Plantae, perteneciente al orden de los Rosales y de la familia Rosaceae (Figura 1). Es un producto muy utilizado a nivel mundial en los procesos agroindustriales y en repostería, por ser una fuente importante de compuestos bioactivos como vitamina C, K, filoquinona, folato y constituyentes fenólicos con capacidad antioxidante²⁴. Dentro de las más de 160 especies de este género, la más mencionada es *Fragaria ananassa*, un híbrido resultante del cruce *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana* y por el que se conocen a todas las variedades de fresa.

4.1.1. Características morfo-fisiológicas

Es una especie hortícola que posee un sistema radicular compuesto por raíces estructurales y raicillas de aspecto fibroso que le dan soporte a la base de la planta y se originan en la corona al nivel del suelo. La corona, está conformada por tejidos vasculares y es el sitio donde nacen las hojas y los tallos²⁵.

Las plantas de fresa se caracterizan por sus hojas largamente pecioladas y trifoliadas, además en su aspecto se pueden apreciar bordes aserrados y una elevada cantidad de estomas. En cuanto a la flor, su desarrollo se puede dar a partir de una yema terminal de la corona, o de yemas axilares de las hojas (Figura 2). Su estructura consiste en 5 a 6 pétalos, de 20 a 35 estambres y muchos pistilos sobre un receptáculo. La formación del fruto se da tras la caída de los pétalos y el desarrollo de los aquenios²⁵.

Figura 2. Estructura de la planta de fresa. *



*Figura tomada de: Cámara de comercio de Bogotá. Manual Fresa [Internet]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11520/14312>

En cuanto a su reproducción, el ciclo fenológico de la fresa dura aproximadamente 150 días (5 meses). Una vez se ha realizado la siembra, se dan las etapas vegetativas de brotación, desarrollo de hojas - estolones y la etapa reproductiva de floración, los cuales se culminan a los 120 días. Posteriormente, se da la formación y maduración del fruto que dura 20 días más. Finalmente, el proceso de cosecha se da pasados los 150 días de la siembra²⁶.

4.1.2. Condiciones del cultivo

El cultivo de fresa tiene la ventaja de soportar variedad de climas; inclinándose por lo climas en donde predomina el frío. Su parte vegetativa puede soportar heladas de hasta -20°C. Sin embargo, su temperatura ideal oscila entre 15°C y 20°C; debido a que temperaturas inferiores pueden generar frutos deformados, y las temperaturas superiores pueden acelerar la maduración y coloración pese a no haber alcanzado el tamaño ideal para poder ser comercializado²⁷.

Para la propagación de la fresa durante la siembra, se pueden hacer vegetativa o asexualmente por tres diferentes técnicas³⁰. Por estolones importados que sirven de plantas madre y van a dar origen a las plantas que se comercializan. La segunda es por división de la corona, donde se utilizan sólo plantas jóvenes menores de un año, que tengan la corona bien desarrollada, estimulando la formación de raíces en las coronas secundarias mediante el aumento de nitrógeno y el fósforo. Y la tercera es por

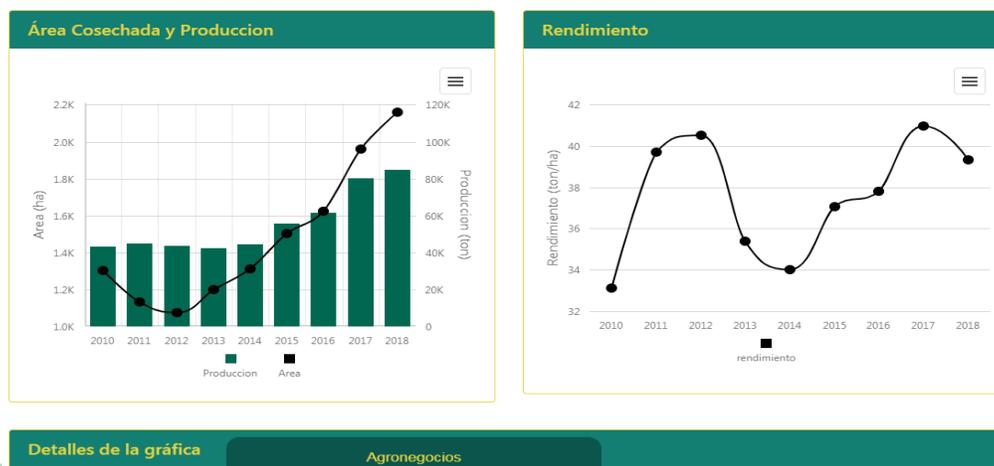
micropopagación; que es un proceso *in vitro* en el que se usan fragmentos de una planta madre con el fin de obtener clones; para ello se provee de factores de crecimiento.

4.1.3. Cultivo de fresa en Colombia

En Colombia, las variedades de fresa que se cultivan por su adaptación al clima de la Sabana son: Oso Grande, Camarosa, Camino Real, Monterrey, Albión y San Andrea; estas fueron establecidas en diferentes departamentos como Cundinamarca, Antioquia y Norte de Santander²⁴.

En Antioquia la siembra de esta fruta fue fomentada por parte de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. En el año 2016, según datos del Ministerio de Agricultura, hubo una producción en fresa de 60.000 toneladas en aproximadamente 385 hectáreas destinadas a este frutal. Sin embargo, para el año 2018, Cundinamarca fue el departamento con mayor producción (54.917 toneladas), seguido de Antioquia, (16.240 toneladas) y Norte de Santander (4.422 toneladas) (Figura 3)²⁸.

Figura 3: Producción y rendimiento nacional del cultivo de fresa durante el periodo del año 2010 - 2018. *



*Figura tomada de: Ministerio de Agricultura y desarrollo rural. Reporte: Área, Producción y Rendimiento Nacional por Cultivo. Agronet. [Internet]. Disponible en: <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>

El cultivo de la fresa en Colombia es posible empezarlo en cualquier época del año. Sin embargo, es recomendable hacerlo al inicio de la época de lluvias con el fin de asegurar la adaptación del cultivo y garantizar el desarrollo inicial. Además, la recolección se lleva a cabo en la época seca, que coincide con la época de menor producción para destinos importadores como Países Bajos, y países exportadores como Estados Unidos, México y España²⁹.

La producción de este cultivo se realiza de dos formas. En la primera, a campo abierto, se presentan algunas limitaciones de carácter biótico, como el ataque de plagas; y condiciones climáticas adversas, como altas precipitaciones; factores que inducen grandes pérdidas de la cosecha. La segunda alternativa, es bajo condiciones protegidas con macrotúneles, esta opción presenta un elevado costo de estructuras; pero permite contrarrestar las limitaciones bióticas, favoreciendo el desarrollo de los cultivos al proporcionar condiciones ambientales controladas que disminuyan el desarrollo de patógenos oportunistas³⁰.

4.1.4. Problemas fitosanitarios asociados al cultivo

Los cultivos de fresa se ven afectados en todo el mundo por diferentes patógenos oportunistas como hongos, bacterias, virus y nematodos, que se pueden clasificar de acuerdo al órgano en el que se desarrollan. En cuanto a las plagas que afectan follaje y/o frutos están: el ácaro blanco (*Steneotarsonemus pallidus*), trips (*Frankliniella spp*), la mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), babosas (*Milax gagates*), trozadores (*Spodoptera sp*), áfidos (*Aphis sp*), arañita roja (*Tetranychus sp*) y mosca de la fruta (*Anastrepha sp*)²⁶.

Por otra parte, los insectos son los principales vectores de transmisión de virus, bacterias y hongos que ingresan directamente al interior de la planta, por las lesiones generadas²⁶.

Entre las plagas que pueden afectar la raíz, se describe un complejo de hongos conformado por: *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora fragariae* y *Verticillium alboatrum* y un complejo de chizas, donde se destacan *Phyllophaga spp.*, *Cyclocephala spp.* y *Anolama spp.* Los hongos anteriormente mencionados, producen un colapso a vascular a nivel de la corona, por estrés hídrico y muerte de las raíces, causando su desprendimiento. Las chizas por su parte, se comen las raíces hasta llegar a la corona, causando marchitamiento y desprendimiento del follaje²⁵. En este grupo también se encuentran los nematodos, que producen daños mecánicos directos en la raíz al alimentarse y facilitan la pudrición por acción de bacterias y hongos²⁷.

Por último, están los patógenos que afectan directamente el fruto; hongos como *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella fragariae* y un complejo de especies de *Colletotrichum sp.*, que producen la antracnosis; una enfermedad muy destructiva, que causa la reducción de la productividad al producir lesiones en la fruta e inclusive mortalidad de plantas²⁷.

4.2. Características generales del género *Colletotrichum spp.*

El género *Colletotrichum spp.* comprende una serie de patógenos de plantas que causan enormes pérdidas de cultivos de cereales, legumbres, vegetales y frutas, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo³¹. Produce infecciones latentes afectando las hojas, inflorescencias y frutos siendo el daño más importante en poscosecha y que se presentan como manchas oscuras o lesiones deprimidas con bordes ligeramente elevados³².

4.2.1. Clasificación taxonómica

El género *Colletotrichum* corresponde al estado asexual del género *Glomerella*. Estos pertenecen a la división *Ascomycota*, orden *Sordariomycetes*, orden *Glomerellales*, familia *Glomerellaceae* (Figura 4)³³.

Actualmente, existen alrededor de 190 especies tanto saprófitas como parásitas incluidas en el género *Colletotrichum*, distribuidas en once complejos de acuerdo a estudios filogenéticos.

El complejo más grande y en el cual se agrupan un mayor número de patógenos, es el complejo de *gloeosporioides*, que está conformado por *C. gloeosporioides* y 37 especies más con las que está estrechamente relacionado. El complejo *acutatum* es el segundo más grande, cuenta con 34 especies y suele verse relacionado con podredumbre en frutas. El complejo *boninense* cuenta con 19 especies, este complejo se ha visto relacionado en la antracnosis de *Passiflora* y mango en Colombia y se ha encontrado como endófito en plantas de café³⁴. También se encuentra el complejo *destructivum* que está relacionado con patogenicidad en plantas y cuenta con 15 especies incluyendo *C. destructivum*. Otro complejo con 15 especies es el *graminicola* cuyo nombre se debe a que se ha encontrado en las gramíneas (poáceas). El complejo *dematium* cuenta con *C. dematium*, ocho especies saprófitas y dos parasitarias y se encuentra frecuentemente en climas templados. El complejo *orbiculare* suele ser patógeno en plantas y cuenta con 8 especies. El complejo *truncatum* cuenta con 4 especies todas reconocidas como patógenas. Otros complejos son los *caudatum*, *spaethianum* y *gigasporum* con 8, 10 y 6 especies respectivamente³⁵.

Figura 4. Clasificación taxonómica del género *Colletotrichum* spp.

REINO	Fungi
DIVISION	Ascomycota
CLASE	Sordariomycetes
FAMILIA	Glomerellaceae
GÉNERO	<i>Colletotrichum</i> (asexual) <i>Glomerella</i> (sexual)

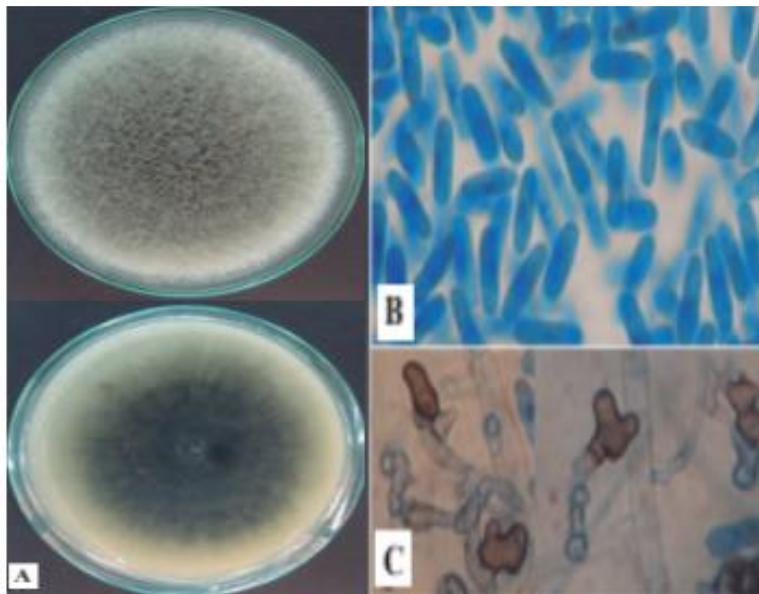
4.2.2. Características macroscópicas y microscópicas del género *Colletotrichum* spp.

Las colonias de *Colletotrichum* en el lado anverso se observa redondas, con un micelio de color blanco a gris, con textura semialgodonosa. Y en el reverso se observa de color crema con ennegrecimiento y puntos negros debido a la formación de apresorios (Figura 5. A).

En microscopía se observa conidios hialinos con tamaño variable entre 2 a 4,8 μm con forma cilíndrica y extremos redondeados (Figura 5. B). El hongo presenta hifas septadas y produce apresorios ovalados, que por su contenido de melanina se visualizan de color café y sus dimensiones pueden variar entre 4 a 12 μm (Figura 5. C).

Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas de *Colletotrichum* spp.

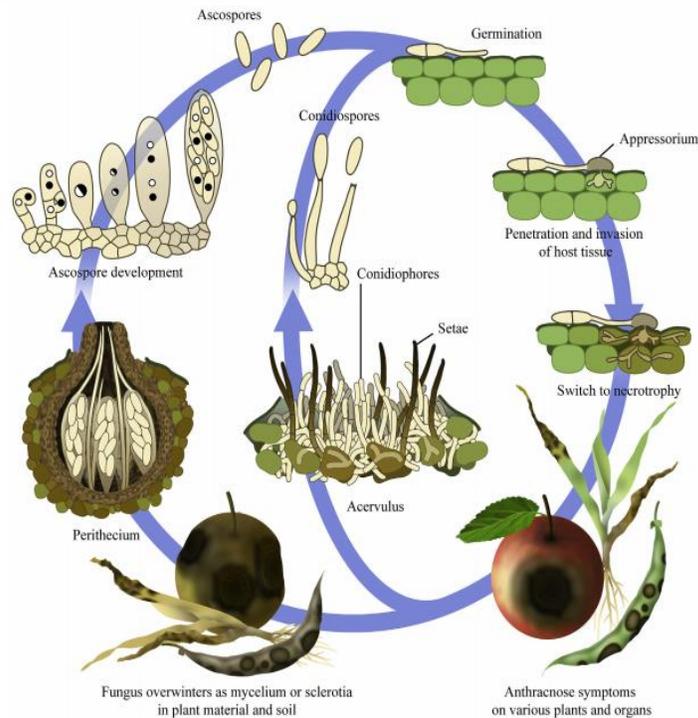
A) Crecimiento de *Colletotrichum* en PDA; B) Conidios; C) Apresorios. *



*Figura tomada de: Gañan L, Álvarez E, Castaño J. Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. Rev., Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat [Internet]. 2015; 39: 152. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18257/raccefyn.192>

4.2.3. Ciclo de vida de *Colletotrichum* spp.

Figura 6. Ciclo de vida general para las especies de *Colletotrichum* spp. *



*Figura tomada de: De Silva D, Crouse P, Ades D, Hyde D, Taylor P. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. BMS. [Internet]. 2017. Jun; 31 (3): 155-168 [Cited 2019 Apr 29]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>.

El ciclo de vida de las especies de *Colletotrichum* sp. comprende una fase sexual y una fase asexual. La primera fase está asociada a la variabilidad genética, mientras que en el estadio asexual se da la dispersión del hongo y el ciclo infeccioso³⁶.

En primer lugar, los inóculos de *Colletotrichum* spp. se dispersan a través del agua y el aire, llegando a hojas, frutos y tallos de las plantas³⁷ (Figura 6). En el momento en que las conidias se adhieren a la cutícula del huésped, empiezan a germinar en un periodo de 12 a 24 horas, luego se agrupan formando la estructura de infección en la punta del tubo germinal conocida como apresorio³⁸.

El apresorio contiene capas de melanina que permiten la penetración por parte de la hifa y por lo tanto la entrada de la infección al interior del tejido vegetal. Posteriormente

comenzará el proceso de diferenciación de las hifas primarias y subsecuentemente las hifas secundarias se propagarán rápidamente invadiendo y matando las células vegetales³⁹.

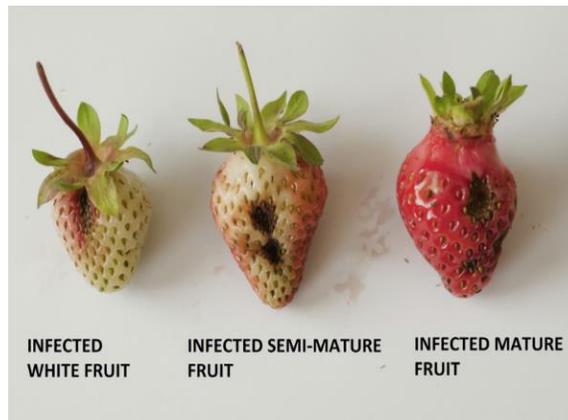
Algunas de las especies de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis en diversos cultivos, exhiben dos fases principales de nutrición durante la colonización de la planta; la fase inicial biotrófica en la cual se obtienen los alimentos de las células vivas huésped, y la segunda fase tardía necrotrófica donde los alimentos se obtienen de las células hospederas muertas a causa del ataque del patógeno⁴⁰.

La fase biótrofa es de corta duración y en esta se asegura el establecimiento del patógeno, sin daños severos en el tejido vegetal. La expresión enzimática para degradar la pared vegetal está estrictamente limitada durante esta fase y la planta hospedera parece no reconocer al patógeno. En consecuencia, no se desencadena respuesta de defensa. Durante la fase necrotrófica se asocia la aparición de los síntomas de la antracnosis, con una estrecha relación entre dicha aparición, el incremento en la expresión enzimática para degradar la pared celular vegetal y la virulencia del patógeno. La capacidad de expresar estas dos fases se denomina hemibiotrofia⁴⁰.

4.3. Antracnosis por *Colletotrichum* sp. en fresa

La fresa es un fruto con alta actividad metabólica y altas tasas de respiración; condiciones que son favorecedoras para el crecimiento de hongos fitopatógenos, como los pertenecientes al género *Colletotrichum*. La antracnosis en fresa se caracteriza por presentar lesiones hundidas en forma circular o irregular, que pueden ser al inicio acuosas y luego secas. Estas lesiones son de color marrón oscuro a negro en los frutos maduros⁴¹ (Figura 7).

Figura 7. Infección en frutos de fresa en diferentes estados de maduración.*



*Figura tomada de: Weber N, Veberic R, Mikulic M, Stampar F, Jakopic J. Metabolite accumulation in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) fruits and runners in response to *Colletotrichum nymphaeae* infection. *Physiol Mol Plant Path.* [Internet]. 2015. Oct; 92 (29): 119-129 [Cited 2019 Sept 14]. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.10.003>.

Los síntomas producidos por las diferentes especies de *Colletotrichum* spp., incluyen necrosis de pecíolo y del estolón, así como podredumbre de la fruta y la corona, que conlleva al colapso y la muerte de toda la planta. El mecanismo de infección se describe como hemibiotrófico, que abarca tanto las fases biotróficas como las necrotróficas⁴².

Sin embargo, el desarrollo de la infección varía dependiendo de la madurez de la fruta. En frutos maduros, la colonización sigue un patrón típico intramural subcuticular necrotrofo, donde el patógeno invasivo forman hifas que se extienden rápidamente y colonizan tejidos intra e intercelular. Por otra parte, en frutos inmaduros, el patógeno entra en un período de inactividad, donde sólo forma apresorios melanizados, con el fin de evitar la respuesta de defensa por parte del fruto inmaduro, entra en una fase de dormancia y retomando su crecimiento cuando el fruto madura⁴³.

4.4. Manejo integrado de antracnosis en cultivos de fresa.

El manejo de la antracnosis en los cultivos de fresa, está enfocado a la prevención de la misma, desde antes del trasplante, ya que no se cuenta con especies resistentes.

Para esto, el control cultural juega un papel fundamental en el control de la enfermedad, en la medida que se aplican estrategias para proteger las plantas madres y poder tener así plantas sanas y viables.

Dentro de las estrategias que los agricultores aplican se encuentra, la adaptación de sistemas de microgoteo y microaspersión; ya que, impiden el desarrollo de condiciones favorables para la propagación del patógeno, como el exceso de humedad. También se hace rotación de los cultivos, para evitar que las plantas se vean afectadas desde inóculos presentes en el suelo. Sin embargo, cuando esto no es posible, se aplican tratamientos de remoción del suelo y lavados con fungicidas; lo cual no siempre resulta ser efectivo, ya que puede haber otros agentes infecciosos que perduren⁴⁴.

La detección de la enfermedad es el punto clave para evitar la diseminación. El retiro de las partes con sospecha de la enfermedad, o de la planta de ser necesario, es fundamental. Se han documentado técnicas que utilizan calor para conferir “resistencia” a la enfermedad, estas incluyen, la inmersión de las plántulas en agua caliente previo a la siembra, siendo esta la técnica más económica. En principio, este tratamiento favorece las condiciones de poscosecha, inhibiendo la maduración y el ablandamiento de la fruta, así como el desarrollo de la enfermedad, atacando las esporas del hongo, afectando su viabilidad, retrasando la germinación de conidios y su crecimiento^{44,45}.

Si bien, los productos químicos tienen un efecto inmediato para tratar enfermedades y eliminar plagas con seguridad y sin requerir de mucho trabajo, estos presentan algunas desventajas. Entre ellas, la más importante es la toxicidad que genera, no solo para los que se encargan de la fumigación sino también, para los consumidores finales. Cabe decir, además, que los productos químicos contienen materiales que son ajenos al medio ambiente y en consecuencia generan contaminación. Por otra parte, estas sustancias se depositan en las superficies, entrando en el ecosistema y aumentan su concentración conforme se distribuyen en la cadena alimenticia².

4.5. Ambientes marinos como fuente de microorganismos marinos.

4.5.1. Características generales de los ambientes marinos.

Dentro de las características de las aguas profundas que convierten este ecosistema en un ambiente extremo, se describen el aumento de presión atmosférica y la disminución de la temperatura conforme aumenta la profundidad del agua, alcanzando aproximadamente los 2°C. También, la concentración de oxígeno en el fondo es menor que en la región circundante, o incluso cero, dependiendo del balance entre el suministro y velocidad de consumo de oxígeno. Por último, la intensidad luminosa disminuye exponencialmente y tiende a ser un entorno oscuro que prevalece por debajo de los 250 m de profundidad⁴⁶.

En estos cuerpos de agua se encuentran un gran número de recursos naturales, de los cuales aún no se han investigado en su totalidad. Según Couttolenc⁴⁷, “Uno de los ecosistemas con una mayor biodiversidad en los océanos costeros son los arrecifes de coral, debido a esto se les pueden considerar como una buena fuente para el aislamiento de microorganismos.

El medio ambiente donde se desarrollan los microorganismos está estrechamente relacionado con los metabolitos que estos producen, por lo que las condiciones extremas que presenta el entorno son responsables de las características únicas que poseen dichos metabolitos, ya que derivan de la adaptación del organismo al medio ambiente, como mecanismos de defensa para su supervivencia⁴⁷.

Dentro de los microorganismos marinos encontramos formas de vida como algas, levaduras, hongos, bacterias, actinobacterias y cianobacterias. Estos microorganismos son buenos candidatos para la síntesis de metabolitos biológicamente importantes en diferentes campos de la industria agrícola, farmacéutica, textil, alimentaria, entre otras. El desarrollo de estos nuevos productos, se da en los laboratorios de biotecnología y busca que se pueda aprovechar la capacidad metabólica de los microorganismos

elaborando productos que sean menos riesgosos para el bienestar de las personas y del medio ambiente⁴⁸.

La idea de poder obtener de las fuentes marinas compuestos únicos se está convirtiendo en un foco importante de interés microbiológico, ya que la microbiota marina representa un recurso biológico bastante prometedor. Estos microorganismos poseen adaptaciones únicas para ambientes con alto contenido de sal y alta presión hidrostática, por otra parte, llama también la atención la cantidad de comunidades marinas que se pueden estratificar en los sedimentos marinos⁴⁹.

4.5.2. Ambientes marinos en Colombia

Colombia está entre los cinco países con más biodiversidad del planeta. Posee gran cantidad de hábitats y ecosistemas marinos, tales como, lagunas costeras y humedales, arrecifes de corales, algas marinas, manglares, playas rocosas y arenosas, zonas de afloramiento costero y varios tipos de fondos marinos⁵⁰.

Las aguas marinas y de estuarios colombianos son el hogar de 306 especies de esponjas, 124 especies de corales, 15 corales de aguas profundas, 1.250 especies de moluscos, 246 especies de gusanos anélidos, 560 especies de crustáceos decápodos, 296 especies de equinodermos, 990 de peces, 18 de mamíferos marinos y 565 especies de algas marinas entre otras especies⁵⁰.

Esta gran diversidad de los ecosistemas marinos colombianos y su gran potencial, ha hecho que, a pesar de los esfuerzos de varios grupos de investigación, estos ambientes aún no hayan sido estudiados a profundidad en el país. De tal manera, es importante seguir realizando estudios que contribuyan a conocer la diversidad de estos ambientes y a desarrollar su potencial biotecnológico.

4.6. Bacterias aisladas de ambientes marinos con actividad antimicrobiana

Los microorganismos marinos constituyen una fuente rica para la investigación y el desarrollo de nuevos productos antimicrobianos, debido a su diversidad y capacidad genética de producir metabolitos nuevos y únicos. Dentro de estos microorganismos, el grupo de las bacterias, más específicamente los actinomicetos, encabezan el listado, dado que sintetizan de forma natural antibióticos que se han estudiado para su aplicación en el área farmacéutica⁵¹. A continuación, se describen algunos ejemplos de diversos estudios donde se han logrado aislar moléculas novedosas con propiedades antimicrobianas.

De igual forma otro estudio del 2019, consiguió aislar dos agentes antifúngicos, pertenecientes a la surfactinas de una cepa de *Bacillus* sp que fueron estudiados contra *Magnaporthe grisea*, patógeno fúngico de cultivos de cereales. Demostrando que aumentaba de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando graves daños en la pared celular y el citoplasma del patógeno⁵³.

Otros microorganismos analizados son las *Stenotrophomonas* aisladas de esponja, erizo de mar y *Ophiura* que han mostraron actividad inhibitoria fúngica y las *Pseudoalteromonas tunicata* produce un pigmento amarillo que tiene actividad antifúngica⁵⁴.

En Colombia gran parte del estudio de los recursos marinos está liderado por la Universidad Nacional en la sede de Bogotá, por cuenta del grupo “Estudio y aprovechamiento de productos naturales y marinos de Colombia”. Este grupo ha producido abundante material sobre diversos organismos marinos y de estos, se destaca el trabajo de Luz Adriana Betancurt que sirve de referencia para el desarrollo de este trabajo.

En el año 2017, Betancur L et al.⁵⁶ realizó un estudio para aislar cepas de actinobacterias de muestras de sedimentos, invertebrados y algas de los arrecifes de

coral de Providencia y Santa Catalina (Mar Caribe colombiano) para evaluar su potencial de producir compuestos antimicrobianos contra diferentes fitopatógenos. En este trabajo se logró la obtención de 203 microorganismos de todas las muestras y se utilizaron varios ensayos para seleccionar aislamientos de actinobacterias, se obtuvieron 24 cepas de tres géneros: *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Gordonia*, las cuales presentaron actividad biológica en los ensayos *in vitro*.

A partir de las cepas seleccionadas, se logró el aislamiento de dos tetrapéptidos cíclicos producidos por *Streptomyces* sp. PNM-161a, obtenida de una muestra de *Bryopsis* sp. (Chlorophyta). Los compuestos aislados fueron evaluados frente a diferentes fitopatógenos, mostrando actividad frente a las bacterias *Burkholderia gladioli* y *B. glumae* patógenas del cultivo de arroz y una cepa de *C. gloeosporioides*, patógeno del cultivo de ñame⁵⁵.

4.7. Hongos aislados de ambientes marinos con actividad antimicrobiana

En múltiples publicaciones se han descrito las actividades antagónicas de los hongos de origen marino contra los fitopatógenos fúngicos de las plantas a través de diferentes mecanismos como la antibiosis, la competencia por los nutrientes y la tolerancia al NaCl. A continuación, se mencionan algunos de los hallazgos más relevantes sobre el potencial de estos microorganismos.

Un estudio realizado en marzo del 2019⁵⁷ analizó el potencial antifúngico de 20 hongos marinos aislados contra 10 hongos fitopatógenos de plantas de interés comercial. Los resultados determinaron que *T. asperellum* y *T. harzianum* mostraron los efectos antagónicos más altos contra todos los patógenos analizados.

Por otra parte, en China, Shen et al⁵⁸, lograron aislar e identificar una levadura marina (*S. pararoseus* ZMY-1) que inhibe el crecimiento de *B. cinerea* en la fresa causada. Este microorganismo posee la capacidad de sobrevivir y se multiplicarse en la

superficie y en las heridas de la fresa, reduciendo la incidencia de la enfermedad sin afectar la calidad de la fruta durante el almacenamiento a 20 ° C.

Es bien conocido que *Pestalotiopsis theae* es un patógeno que produce tizón gris en la planta de té. En una investigación se aislaron 12 compuestos del hongo marino *Fusarium solani*; de los cuales 3 demostraron actividad biológica frente a *P. theae*. Los compuestos que demostraron actividad fueron la hymeclusina, fusari lactona A y fusari lactona B⁵⁹.

En Tailandia también se han desarrollado estudios con hongos marinos, en uno de ellos se evaluaron 20 especies fúngicas y su papel antagónico frente a 10 hongos patógenos de interés comercial. De los 10 hongos analizados, todos tuvieron al menos antagonismo frente a un hongo del género *Ascomycete* >50%. Pero los más efectivos fueron *Trichoderma asperellum* y *T. harzianum* que lograron inhibición de 60 a 65% en todos los hongos y de 100% en *Colletotrichum gloeosporioides* y *Phytophthora palmivora*⁶⁰.

Cabe mencionar por último, que en China se aisló el hongo marino *Botryosphaeria ramosa* L'29 y de este se encontraron 4 derivados de isocumarina denominados "botryospyrones A, B,C y D. El derivado A inhibió a *Fusarium oxysporum*, B y C inhibió a *F. oxysporum* y *F. graminearum* y el D a *F. oxysporum*, *F. graminearum* y *Penicillium italicum*⁶¹.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. Universo, población, muestra

Universo:

- Microorganismos epifitos y endófitos que hacen parte del microbioma de macroorganismos marinos.
- Microorganismos fúngicos patógenos del cultivo de fresa.

Población:

- Microorganismos epifitos y endófitos que hacen parte del microbioma de macroorganismos marinos provenientes del caribe colombiano.
- Microorganismos fúngicos del género *Colletotrichum* spp del cultivo de fresa.

Muestras:

- Microorganismos epifitos y endófitos cultivables aislados a partir de macroorganismos marinos del caribe colombiano de los géneros: *Amphiroa*, *Chaetomorpha*, *Laurencia*, *Ulva*, *Padina*, *Hypnea*, *Sargassum*, *Caulerpa*, *Pterogorgia*, *Monanchon*, *Eunicea*, *Xestospongia*, *Callyspongia*, *Niphates*, *Spirastrella*).
- Cepa del género *Colletotrichum* spp del cultivo de fresa donada por el Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

Tipo de estudio:

- Descriptivo y experimental.

Enfoque de investigación:

- Cualitativa y cuantitativa. Mixta.

5.2. Hipótesis, variables e indicadores

5.2.1. Hipótesis

Los microorganismos epifitos y endófitos que se aíslan de macroorganismos marinos del caribe colombiano presentan capacidad antifúngica frente a especies fitopatógenas de *Colletotrichum* sp., para prevenir o combatir el desarrollo de la antracnosis en los cultivos de fresa.

5.2.2. Variables

La variable dependiente para este estudio fue:

- Metabolitos antifúngicos provenientes de algunos microorganismos epifitos y endofíticos cultivables

Las variables independientes para este estudio fueron:

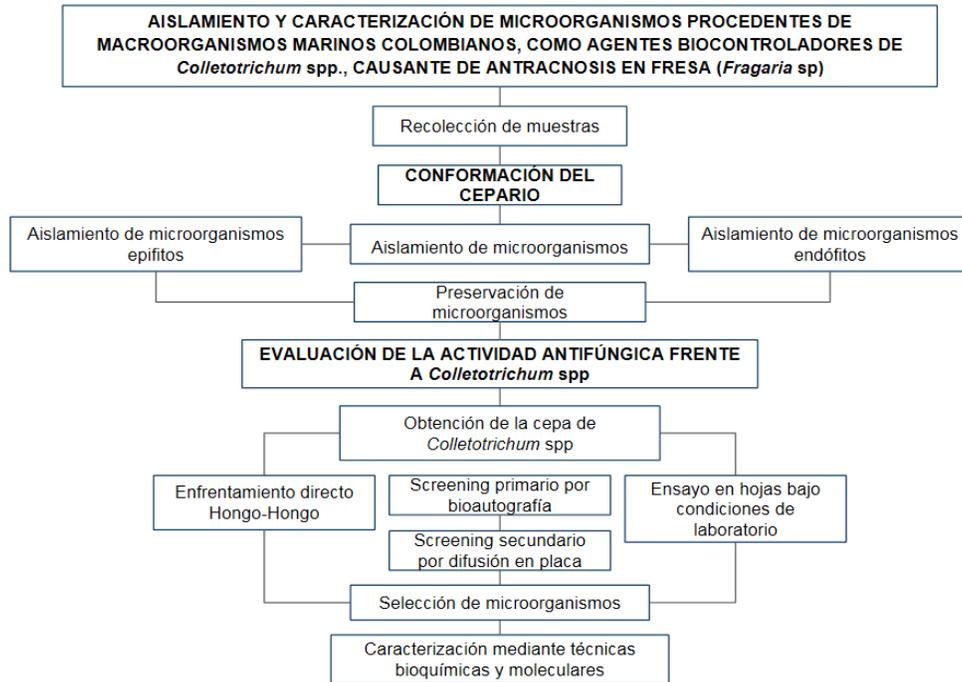
- Microorganismos epifitos y endófitos cultivables aislados a partir de macroorganismos marinos del caribe colombiano.
- Cepa del hongo patógeno *Colletotrichum* sp.

5.2.3. Indicadores

Actividad antifúngica *in vitro* asociada a la producción de metabolitos: Será determinado por el diámetro de los halos de Inhibición o la disminución del área de crecimiento de *Colletotrichum* sp. en enfrentamiento *in vitro*.

Actividad antifúngica *in vivo*: Será determinado por el porcentaje de lesión ocasionado por *Colletotrichum* sp. en el enfrentamiento *in vivo*, con ayuda del programa de procesamiento de imagen digital *ImageJ*.

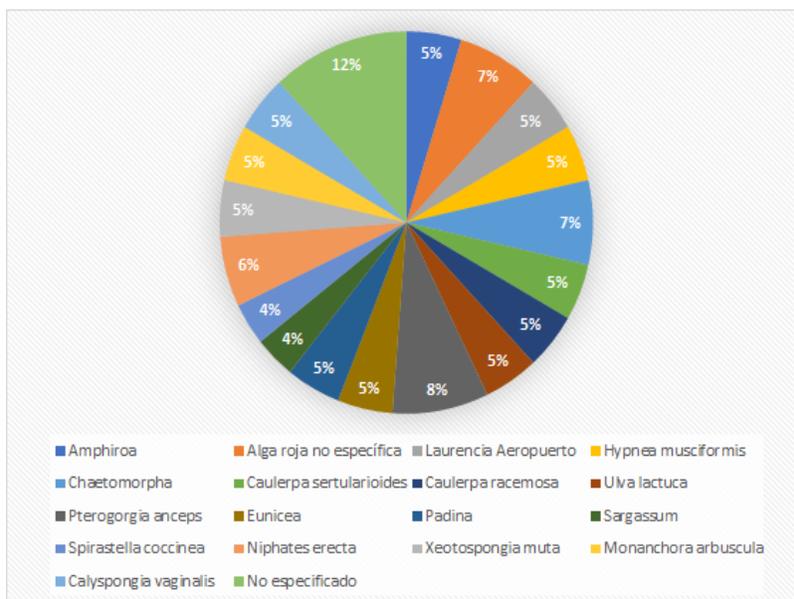
5.3. Técnicas y procedimientos.



Recolección de macroorganismos marinos

Las 84 muestras de fragmentos de algas, esponjas y octocorales provenientes de Isla Arena, Islas del Rosario y Cartagena fueron obtenidas por el grupo de investigación “Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia” de la Universidad Nacional (Figura 8). Estas muestras fueron transportadas en falcon de 15 ml con agar malta, agar avena y agar caseína almidón (ACA) suplementado con cloranfenicol en pico de flauta, sellados y refrigerados, estos medios favorecen el crecimiento de cepas derivadas de macroorganismos marinos⁶². Posteriormente se llevaron al laboratorio del grupo de investigación en el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. La ANLA (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales) y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, otorgaron el permiso para recolectar y estudiar las muestras de las bacterias recuperadas según el Contrato de acceso a recurso genético No 108 y Contrato de acceso a recurso genético No 121 otrosí número 6.

Figura 8. Macroorganismos muestreados para el aislamiento de microorganismos marinos.



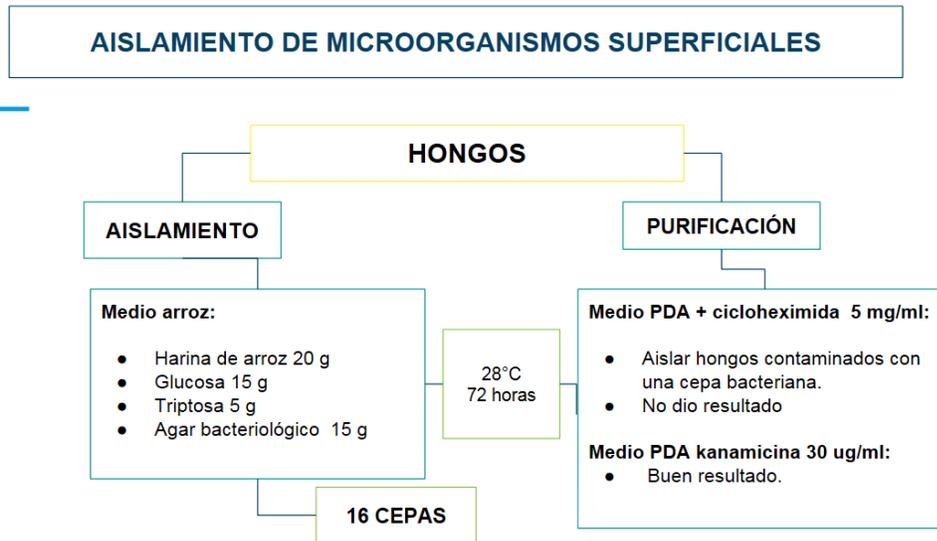
5.3.1. Generación de la colección de microorganismos marinos.

Tras una previa observación de las muestras y para asegurar la mayor recuperación de microorganismos, se clasificaron en dos grupos, muestras que presentaban crecimiento visible (micelio o puntos similares a colonias bacterianas) y muestras que no presentaban dicho crecimiento. Posteriormente, la recuperación se realizó en dos etapas: Por aislamiento directo para obtener microorganismos epífitos y por maceración de las muestras para obtener microorganismos endófitos.

Aislamiento directo de microorganismos epífitos

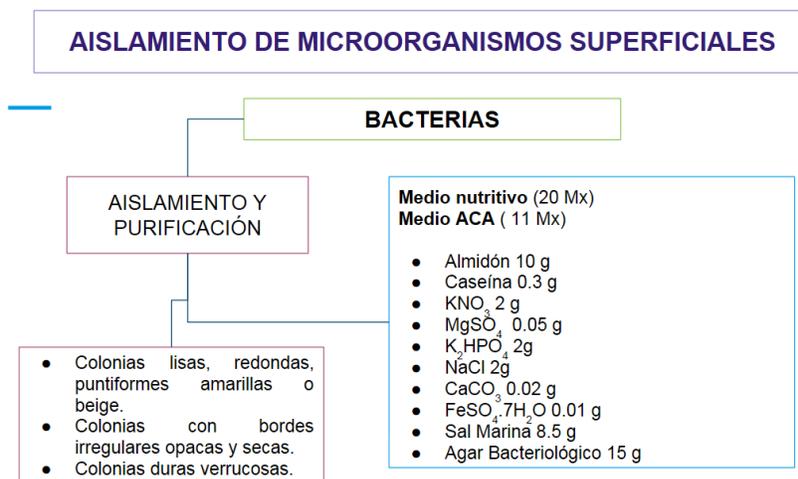
- **Obtención de hongos:** Se tomaron las muestras que presentaban crecimiento visible (micelio) y se rasparon en la superficie con palillos estériles, el material recolectado se sembró a profundidad en Agar PDA y Agar arroz⁶³ (Harina de arroz 20 g/L, Agar bacteriológico 15 g/L) suplementado con glucosa (15 g/L) y triptona (5 g/L). Las cajas se llevaron a incubación por 5 días a 25°C (Figura 9).

Figura 9. Aislamiento directo de hongos epífitos



- **Obtención de bacterias:** Se tomaron las muestras que presentaban crecimiento visible (puntos similares a colonias) y se rasparon de la superficie con palillos estériles, el material recolectado se sembró en Agar nutritivo y Agar Caseína-Almidón (ACA) (Almidón 10 g/L, Caseína 0.3g/L, KNO₃ 2 g/L, MgSO₄ 0.05g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, NaCl 2 g/L, CaCO₃ 0.02g/L, FeSO₄ 0.01g/L, Sal marina 8,5 g/L, Agar bacteriológico 15 g/L.)⁶³. Las cajas se llevaron a incubación por 48 horas a 25°C (Figura 10).

Figura 10. Aislamiento directo de bacterias epífitas



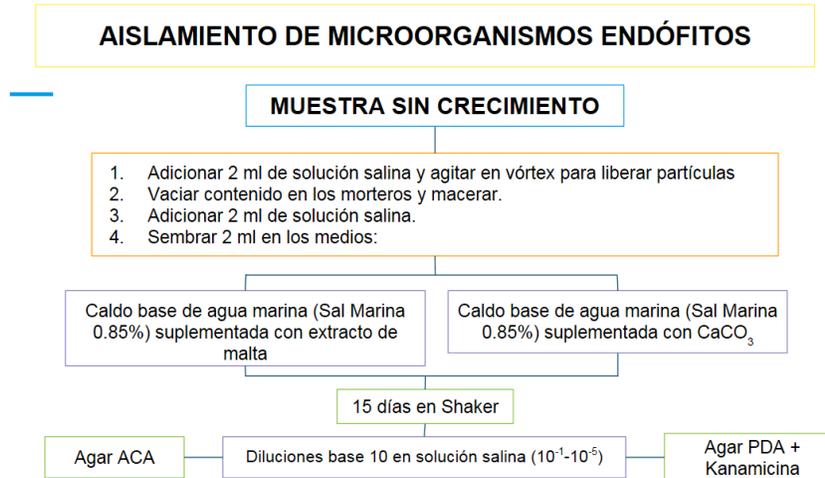
Aislamiento por maceración de microorganismos endófitos.

Preparación de la muestra: Se tomaron todas las muestras y se procesaron por maceración, siguiendo el proceso descrito a continuación (Figura 11):

1. Bajo condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar se añadieron 2 ml de solución salina al 0,85% a los fálcon donde venían transportadas las muestras.
2. Las muestras se agitaron con ayuda de un vórtex por 10 segundos, con el fin de desprender la biomasa y dispersar todos los posibles microorganismos presentes en el medio.
3. Se vació el contenido con la muestra en un mortero estéril y se añadieron 2 ml más de solución salina, luego se procedió a macerar completamente la muestra.
4. Lo obtenido de la maceración se pasó a dos falcones de 50 ml. Uno de ellos contenía 10 ml sal marina al 0,85% y extracto de malta (para recuperar hongos endófitos) y otro con CaCO_3 y glucosa, (para obtener bacterias endófitas).
5. Estas muestras se dejaron en agitación por 15 días en el equipo Orbital HD-3000 Dimaq (*shaker*) a 130 rpm y a temperatura ambiente.

Aislamiento de los microorganismos: Se tomaron las muestras de los dos falcón y se sembraron en medio sólido ACA y PDA. Para aislar las bacterias se usó agar ACA y se dejaron por 48 horas en incubación a 25°C. En el caso de los hongos, se hizo un tratamiento para eliminar los microorganismos acompañantes y recuperar solo las cepas fúngicas, sembrándolos en agar PDA suplementado con kanamicina 30 $\mu\text{g/mL}$ ⁶⁴. Se dejaron por 72 horas en incubación a 25°C (Figura 11).

Figura 11. Aislamiento directo de microorganismos endófitos

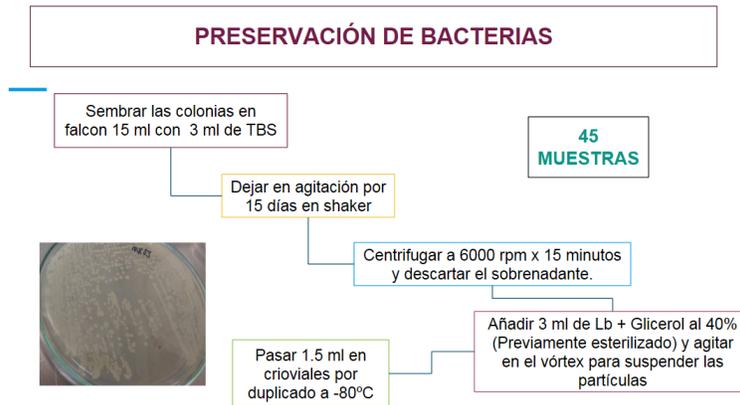


Preservación de los microorganismos aislados.

Basados en el protocolo utilizado por Betancur L.A⁶⁵, se realizó la preservación de las bacterias a partir de un cultivo líquido en caldo tripticasa soya (TSB). Para ello, una colonia aislada de cada microorganismo se inoculó en 3 ml de TSB, permitiendo su crecimiento a temperatura ambiente con agitación continua (120 r.p.m.) por 5 días.

Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 7500 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante en hipoclorito. Al precipitado (biomasa) se le adicionaron 3 mL de una solución estéril, compuesta de caldo Luria Bertani (LB) + Glicerol al 40% y se mezcló en el vórtex por 10 segundos para resuspender las colonias. Se pasó 1.5 mL de la suspensión a crioviales de 2 ml estériles por duplicado, se guardaron en el ultracongelador a -80°C. La viabilidad y pureza de los viales preservados se verificó por cultivo en medios sólidos a las 24 horas tras la criopreservación. Este proceso se realizó nuevamente 4 meses después de la primera evaluación para confirmar la viabilidad de los aislamientos y la eficiencia de la técnica de preservación (Figura 12).

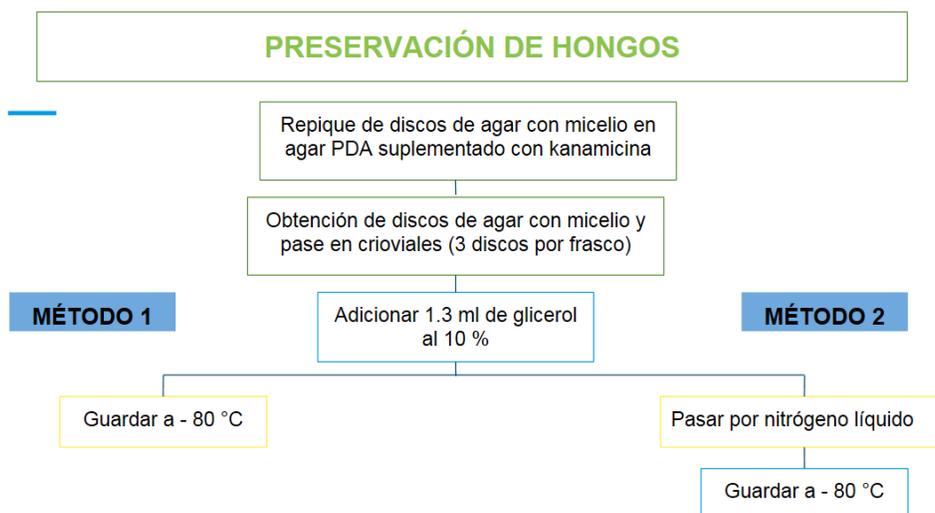
Figura 12. Método de preservación para bacterias



En el caso de los aislamientos fúngicos, se utilizaron 4 protocolos diferentes, con el objetivo de definir cuál era el más efectivo para conservación de estos microorganismos. Para todos los casos se partió de la siembra de los hongos en agar PDA suplementado con kanamicina a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que se dejaron por 72 horas en incubación a 25°C.

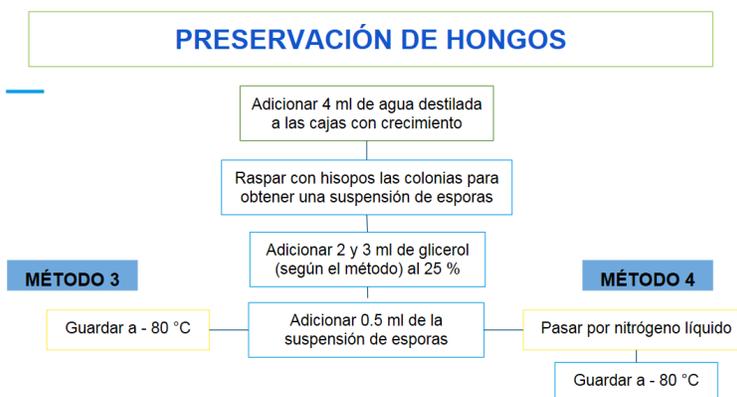
Para los protocolos 1 y 2, se esterilizaron previamente crioviales con 1.3 ml de glicerol al 10% y se pusieron 3 discos de agar de cada hongo sembrado, preparando dos crioviales por microorganismo. Para el protocolo 1, los crioviales se guardaron en refrigeración directamente a -80°C⁶⁶; para el protocolo 2, los crioviales se suspendieron en nitrógeno líquido por 5 minutos antes de llevarlos a refrigeración⁶ (Figura 13).

Figura 13. Métodos de preservación 1 y 2 para hongos.



En el caso de los protocolos 3 y 4, a cada caja de PDA se le añadió 4 ml de agua destilada estéril para hacer una suspensión de esporas. Se esterilizaron previamente crioviales con 2 ml de glicerol al 25% para el protocolo 3 y con 1 ml para el protocolo 4. En ambos casos se les colocó 0.5 ml de la suspensión de esporas, los crioviales del protocolo 3 se guardaron en refrigeración directamente a $- 80^{\circ} \text{C}$ ⁶⁸. Mientras que, para el protocolo 4, los crioviales se suspendieron en nitrógeno líquido por 5 minutos antes de llevarlos a refrigeración⁶⁷. Se les se hizo evaluación al mes y a los 4 meses y adicionalmente, se realizaron pases semanales de las cepas, para garantizar su existencia. (Figura 14)

Figura 14. Métodos de preservación 3 y 4 para hongos.



5.3.2 Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los microorganismos obtenidos.

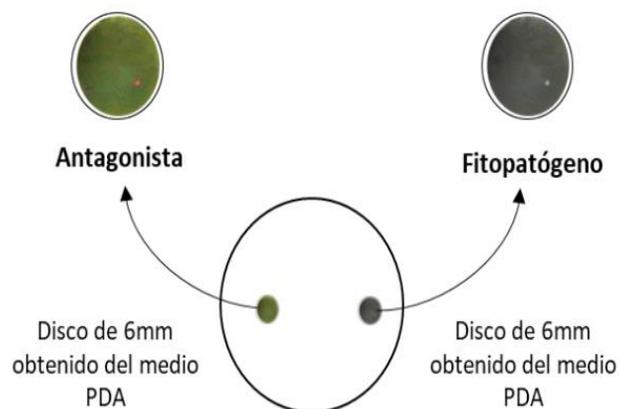
Recuperación de la cepa *Colletotrichum* spp.

Se obtuvo una cepa del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp, aislada de un cultivo de fresa (*Fragaria ananassa*) donada por el Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Se sembró en Agar arroz y Agar PDA y se incubó a 25°C por 7 días.

Enfrentamiento directo Hongo-Hongo.

Se realizaron cultivos frescos de los hongos aislados y del patógeno *Colletotrichum* spp. en agar arroz, para el montaje del ensayo. Posteriormente se cortaron discos de 6 mm de diámetro de agar con micelio y se sembraron en Agar PDA enfrentando a los hongos a evaluar y al patógeno, a una distancia de 1.5 cm del borde de la caja⁶⁹ (Figura 15). Adicionalmente, se realizó un control positivo, donde solo se colocó un disco de agar de *Colletotrichum* spp. Se llevaron las cajas a incubar a 25° C por 5 días, con lecturas diarias.

Figura 15. Protocolo enfrentamiento *in vitro* (Hongo-hongo)^{70*}.

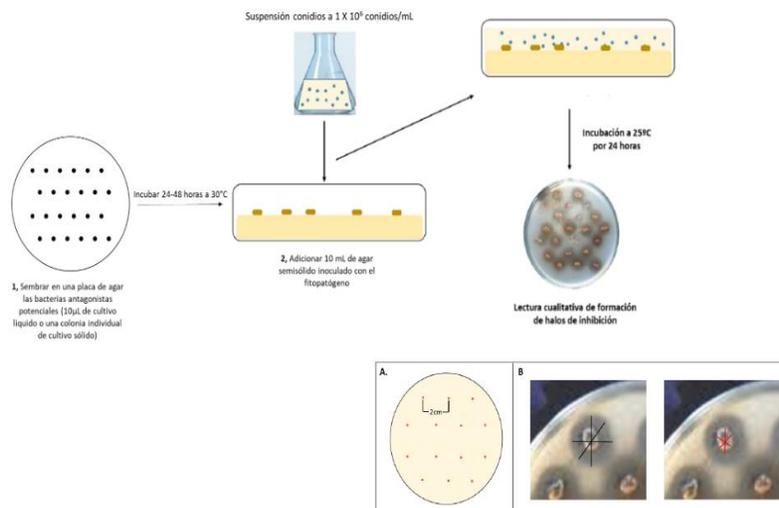


*Figura tomada: Protocolos curso de Microbiología.2017

Screening primario para la determinación de la actividad antifúngica de las bacterias.

- **Preparación del fitopatógeno fúngico:** Se preparó una solución de conidias de *Colletotrichum* spp. a partir de una caja con crecimiento fresco. Se hizo un raspado con hisopos estériles de toda la biomasa y esta, se pasó a un falcon con 10 mL de solución salina estéril, se agitó la mezcla y se filtró en jeringas con algodón estéril. Una vez obtenida la solución, se realizó conteo en cámara de Neubauer para determinar la concentración de la solución y ajustarla a 1×10^6 Conidias/mL. Esta solución fue disuelta en 500 mL de medio PDA semisólido⁶⁹.
- **Evaluación de la actividad antifúngica por bioautografía:** Se utilizó el ensayo de bioautografía por overlay para hacer un tamizaje primario de las bacterias aisladas para determinar cuáles eran las más activas. En este ensayo se sembraron las bacterias antagonistas aisladas en agar ACA, colocando 10 μ l de cultivo líquido de las bacterias, por triplicado, en diferentes posiciones a lo largo de toda el área de la placa y con distancias iguales entre sí. Se llevan a incubación por 24 horas a 25° C. Transcurrido ese tiempo, se colocó el PDA semisólido con la solución de conidias sobre las cajas donde se sembraron las bacterias y se llevó a incubación por 72 horas a 25°C (Figura 16).

Figura 16. Ensayo de bioautografía por overlay sobre medio sólido*.



*Figura tomada de: Protocolos del curso de Microbiología. 2017⁷⁰.

Screening secundario para la determinación de la actividad antifúngica de las bacterias.

- **Preparación de las bacterias potencialmente activas:** Basados en los resultados obtenidos del primer screening, se hizo la elección de un grupo de bacterias que presentaron actividad frente al patógeno en este ensayo. Tras la selección, se realizaron siembras de estos microorganismos en caldo Trypticase soya (TSB) y caldo ACA, dejándolas en incubación a temperatura ambiente y en shaker por tres días. Una vez crecidas, se realizaron dos ciclos de centrifugación, tomando 1000 μ l del sobrenadante y pasándolos a tubos eppendorf de 2mL. Se centrifugaron a 14000 rpm por 15 minutos, se pasaron 500 μ L del sobrenadante nuevamente a tubos eppendorf y se repitió el ciclo de centrifugación.

Evaluación de la actividad antifúngica por difusión en placa.

Se prepararon placas con 30 mL de Agar Arroz, y se realizó una siembra masiva con escobillones estériles de la suspensión de conidias realizada anteriormente. Se abrieron siete pozos de 6 mm de diámetro en cada placa (tres para las bacterias en ACA, tres para las bacterias en TBS y uno para el control negativo) y se adicionaron 100 μ l de cada suspensión de los antagonistas a los pozos (Figura 17). Se llevaron las cajas a incubar a 30° C por tres días. Posteriormente se hizo la medición de los halos de inhibición.

Figura 17. Ensayo de difusión en placa*.

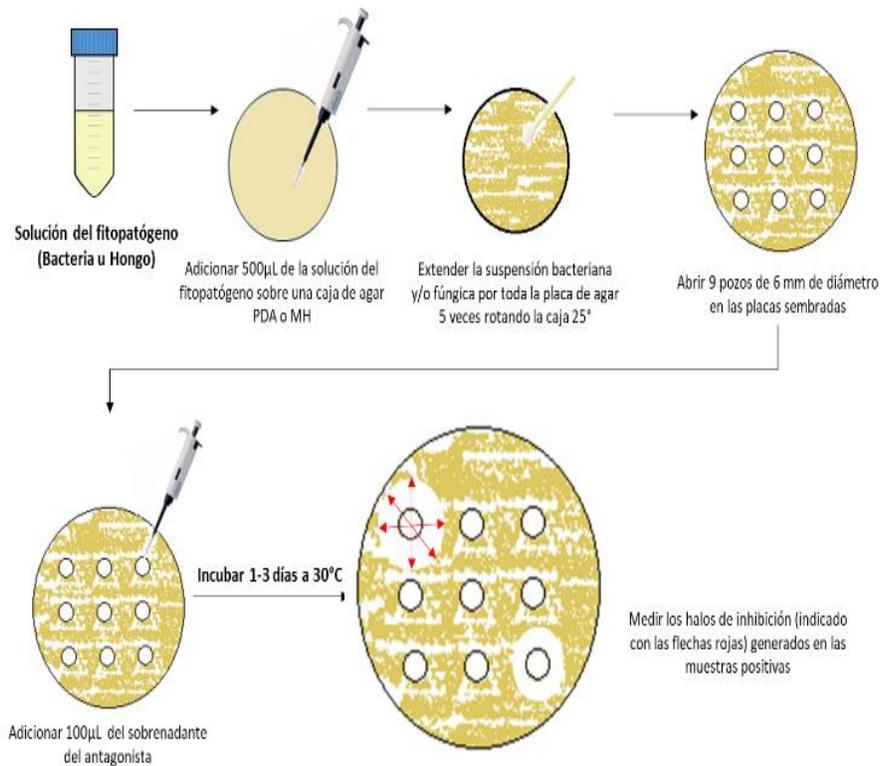
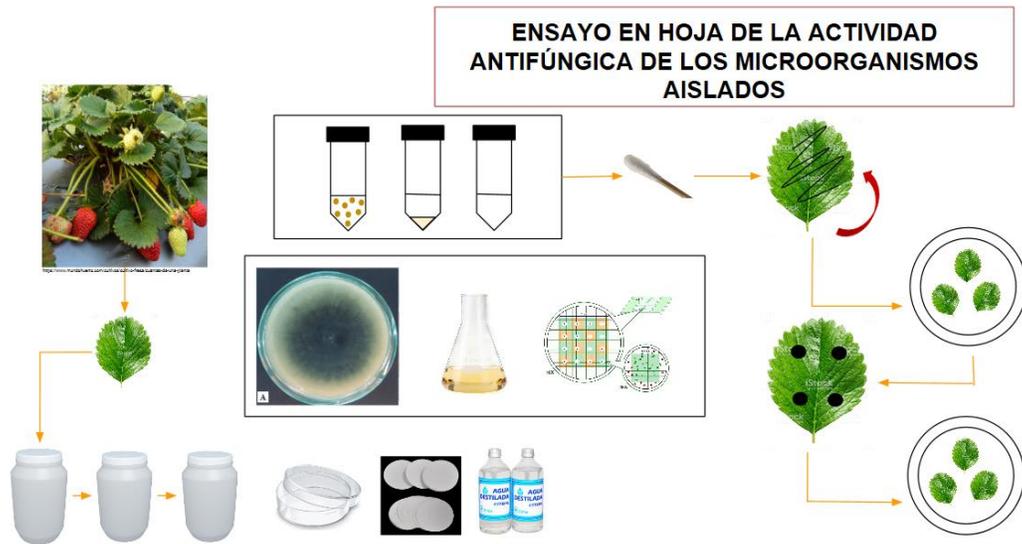


Figura tomada de: Protocolos del curso de Microbiología. 2017⁷⁰.

5.3.3. Ensayo en hojas de la actividad antifúngica de los microorganismos obtenidos.

Partiendo de los resultados obtenidos durante los ensayos *in vitro*, se sometieron los microorganismos que presentaron actividad biológica frente al *Colletotrichum* spp. a ensayos en hojas de plantas de fresa, para hacer una aproximación de cómo sería su comportamiento en campo (Figura 18).

Figura 18. Ensayo en hojas bajo condiciones de laboratorio.



- **Obtención de las hojas plantas de fresa:** Se compraron cinco plantas de fresa de cuatro meses y medio de edad, en el vivero San Miguel, ubicado en el kilómetro 4, vía Sibaté - Fusa. Las plantas estaban en floración y algunas ya tenían frutos, eran provenientes de un cultivo en la vereda San Rafael. Donde eran sometidas a irrigación por goteo y la aplicación de fertilizantes químicos, entre otros plaguicidas combinados. Se transportaron directamente al Laboratorio de Productos Naturales Marinos del departamento de Química de la Universidad Nacional y posteriormente se realizó el corte de las hojas sanas para el montaje del ensayo.
- **Pretratamiento de las hojas:** Las hojas se lavaron siguiendo el siguiente protocolo de desinfección
 1. Se lavaron las hojas con agua de chorro por dos minutos hasta eliminar el suelo y demás contaminantes que sean evidentes a simple vista.
 2. En dos recipientes profundos se añadió solución de hipoclorito de sodio al 0,5% y en el otro, etanol al 75% (150 ml en cada vaso de precipitado de cada una de las soluciones).

3. Después de lavar el material con agua de llave; se sumergió el material vegetal en la solución de hipoclorito por 30 segundos con agitación permanente, luego se lavó con abundante agua destilada estéril en un vaso de precipitado.
 4. Se sumergió en la solución de etanol por 30 segundos también en agitación permanente y se enjuagó nuevamente con abundante agua estéril, dos veces para eliminar los desinfectantes.
 5. Se dejó secar el material sobre toallas estériles en la cabina de flujo laminar.
- **Montaje del ensayo:** Se prepararon cámaras húmedas en cajas de Petri, con papel absorbente estéril y agua destilada estéril. Adicionalmente se preparó una solución de conidias [10^6] y soluciones de los microorganismos antagónicos por triplicado, siguiendo el mismo procedimiento que se usó en el ensayo de difusión en placa.

Se realizaron tres réplicas por cada una de las tres suspensiones realizadas de cada microorganismo, para un total de nueve réplicas por microorganismo en total. El montaje, se realizó en dos fases. La primera fase, consistió en la inoculación de cada uno de los potenciales biocontroladores, para lo cual, se frotaron escobillones estériles humedecidos en las soluciones del sobrenadante libre de células por ambas caras de las hojas y se pusieron a incubar a 25° C por 24 horas. Se montaron adicionalmente, nueve controles sanos, a los cuales se les frotaron escobillones con agua destilada estéril y 15 hojas adicionales, nueve para el montaje del control patógeno, a los que también se les aplicó agua destilada estéril y seis para el control positivo de tratamiento químico con Benomyl⁷¹, cuya concentración se ajustó a 500µl/mL y se aplicó de la misma forma.

Transcurridas las 24 horas, se dio inicio a la segunda fase del ensayo, la cual consistió en la aplicación del patógeno. La inoculación, consistió en realizar dos lesiones con palillos estériles de 2 mm a ambos lados de las hojas y adicionar 10 µl de la suspensión de conidias preparada previamente, en cada herida (10^6

conidias/mL⁻¹)⁷¹. Se volvieron a colocar a incubar en las mismas condiciones anteriores, haciendo seguimiento continuo para evaluar el desarrollo del ensayo y garantizar que no se perdiera la humedad de las cámaras.

5.3.4. Identificación de los microorganismos seleccionados por observación macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas

La identificación de los microorganismos seleccionados por su actividad antifúngica se realizó mediante caracterización fenotípica y molecular. En el caso de la caracterización fenotípica de los microorganismos, se evaluaron las características macroscópicas de cada aislamiento en medios enriquecidos y diferenciales determinando el color, consistencia y forma de la colonia, la producción de pigmentos difusibles en agar, velocidad de crecimiento entre otras. Adicionalmente, se verificaron las características microscópicas de las bacterias y los hongos obtenidos por tinción de Gram y Azul de lactofenol (técnica de impronta) respectivamente.

La caracterización fenotípica de los aislamientos bacterianos fue complementada con pruebas bioquímicas usando el sistema WalkAway y se procesaron en el equipo Microscan WalkAway *plus* de Beckman Coulter. Para ello, se realizó la reactivación y siembra de las cepas bacterianas en agar selectivo Mac Conkey y se incubaron a 30°C por 48 horas. Posteriormente, se seleccionaron las colonias aisladas y se prepararon las suspensiones de bacterias con ayuda del sistema PROMPT con las que se inocularon los paneles, estos se ingresaron en el equipo Microscan WalkAway *plus*, que incuba a 37°C, conserva la humedad y adiciona automáticamente los reactivos necesarios para revelar las reacciones. Se dejaron por 24 horas, hasta la lectura de resultados.

Este sistema, permite la identificación bioquímica mediante sustratos convencionales y la determinación de resistencia o susceptibilidad frente a 32 antibióticos, ofreciendo una confiabilidad del 99.0% en el resultado, al ser comparado con la base de datos interna con la cual se obtuvo una identidad putativa del microorganismo que fue posteriormente corroborada con los resultados obtenidos del análisis molecular

5.3.5. Caracterización molecular de los microorganismos seleccionados.

Para confirmar la identidad de los aislamientos obtenidos, se realizó la caracterización molecular mediante secuenciación del Internal Transcriber Spacer 1 (ITS1) en el caso de los hongos y en el caso de las bacterias, mediante amplificación y secuenciación del gen 16S rARN (gen ribosomal 16S) los cuales fueron realizados como servicio externo en Agrosavia (Tibaitatá, Colombia). En ambos casos, la extracción se realizó con kit comercial y la cuantificación en el equipo NanoDrop 2000. La amplificación del DNA del hongo, se hizo en un solo sentido (forward), utilizando los primers ITS-4 e ITS-1, mientras que la de las bacterias se hizo en ambos (forward y reverse), utilizando los primers 27F y 1492R. finalmente, la secuenciación se hizo con la técnica sanger, en el equipo ABI 3500.

El análisis de las secuencias obtenidas para los aislamientos bacterianos y el aislamiento fúngico se realizó usando la base de datos del GenBank, a través de la plataforma Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Adicionalmente, las secuencias parciales del gen 16S también se analizaron en las bases de datos de las plataformas EZtaxon⁷² (<https://www.ezbiocloud.net/?bannerId=4>) y Ribosomal Database Project RDP⁷³ (<https://rdp.cme.msu.edu/treebuilder/treeing.spr>) que cuentan con secuencias curadas de cepas tipo de diversos géneros y especies bacterianos. Los datos obtenidos de las tres plataformas para los aislamientos bacterianos y del GenBank en el caso del aislamiento fúngico, fueron comparados con las características fenotípicas evaluadas previamente con el fin de corroborar la concordancia entre ellos, validando los resultados de clasificación taxonómica de los aislamientos.

6. RESULTADOS

6.1. Generación de la colección de microorganismos marinos

6.1.1. Aislamiento de microorganismos epífitos y endófitos.

A partir de los protocolos utilizados, se obtuvieron un total de 184 microorganismos, de los cuales, 16 fueron hongos (8.7 %) y 168 bacterias (91.3 %). Encontrando que el método propuesto para el aislamiento de microorganismos epífitos, permitió obtener todos hongos con respecto al método para la recuperación de endófitos. En cuanto a las bacterias, el mayor número de cepas fue obtenido a partir de la maceración y siembra de las muestras.

Se hizo la descripción macroscópica y microscópica de las cepas (Anexo 1) utilizando improntas con azul de lactofenol para los hongos y tinción de Gram para las bacterias (Anexo 2). Se observó que la mayoría de hongos presentaban gotas de exudado en los bordes de las colonias, lo que podría indicar una alta producción de metabolitos secundarios. En la observación microscópica, presentaron estructuras hialinas y dematiáceas, siendo predominantes las conidias. La identificación con claves dicotómicas no fue posible en todos los casos, por incompatibilidad.

En cuanto a las bacterias, se encontraron colonias de todos los tipos. Estas presentaron mejor desarrollo de biomasa en agar nutritivo, a diferencia del crecimiento en agar ACA. Donde algunas colonias crecieron sumergidas en el agar y produjeron halos. La observación de las coloraciones, mostraron levaduras y consorcios de bacterias, entre cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos, en algunos de los casos esporulados.

6.1.2. Evaluación de métodos de conservación

Para la evaluación del método de conservación utilizado para los hongos, se hicieron siembras directas de los viales preservados un mes después y se encontró que el protocolo 1 permitió recuperar todas las cepas, presentando una tasa baja de

contaminación cruzada y además conservó intacta la estructura de los discos con micelio, haciendo más fácil la siembra; en comparación a otros métodos probados (Anexo 3). De manera que se decidió conformar el cepario de hongos bajo este método, realizando viales de los hongos por duplicado. La cepa de *Colletotrichum* spp., obtenida del instituto de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, se preservó por el mismo método en seis viales.

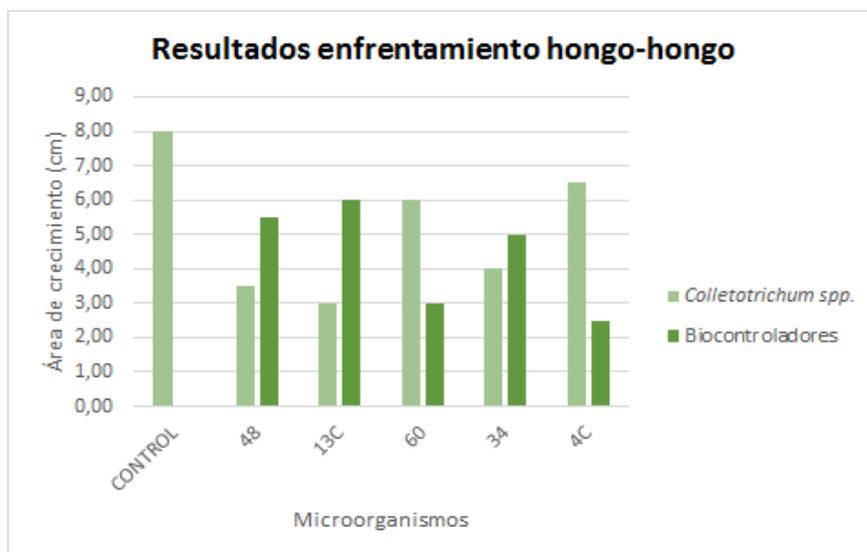
El método de conservación utilizado para preservar las bacterias no presentó fallas, por lo que el cepario de bacterias se preservó con esta metodología.

6.2. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de los microorganismos obtenidos.

6.2.1. Enfrentamiento directo hongo-hongo.

De los enfrentamientos directos realizados para determinar el potencial antifúngico de los 16 hongos aislados, se encontró que tres lograron inhibir al fitopatógeno. De estos, se seleccionaron tres hongos, identificados con los números 34, 48 y 13C para realizar enfrentamientos *in vivo*, debido a que fueron capaces de reducir el crecimiento de *Colletotrichum* spp., en más de su 50% (figura 19).

Figura 19. Resultados de medición de las áreas de inhibición de los hongos antagónicos frente a *Colletotrichum* spp



Como estrategias de inhibición se observó la producción de pigmentos y la secreción de gotitas líquidas en donde están contenidos metabolitos secundarios con posible actividad biológica⁷⁴, así como micoparasitismo sobre la cepa de *Colletotrichum* spp. También se observó que, aunque el tiempo de crecimiento y desarrollo de los hongos ensayados es menor en comparación al de *Colletotrichum* spp., esto no favoreció la inhibición en todos los casos.

6.2.2. Screening primario para la determinación de la actividad antifúngica de las bacterias.

Evaluación de la actividad antifúngica por bioautografía.

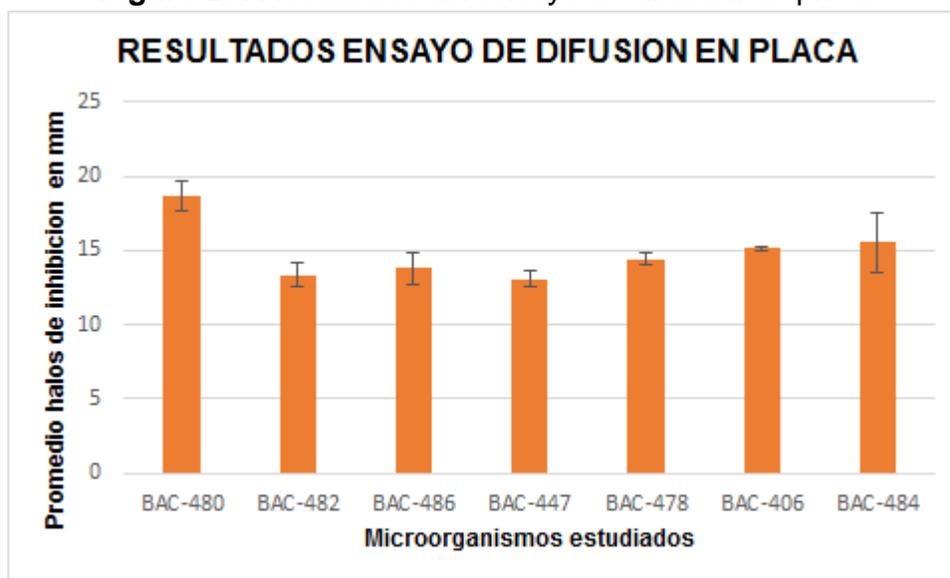
La lectura de este ensayo fue cualitativa, a partir de la observación de formación de halos de inhibición. De esta manera, de los 168 aislamientos ensayados, se seleccionaron 16 cepas bacterianas (9.5 %) que presentaron inhibición, identificadas con los números 295 - 296 - 298 - 312 - 315 - 364 - 365 - 385 - 387 - 480 - 482 - 484 - 486 - 478 - 406 y 447 para realizar un segundo screening.

6.2.3. Screening secundario para la determinación de la actividad antifúngica de las bacterias.

Evaluación de la actividad antifúngica por difusión en placa.

Al realizar la lectura de las cajas de este ensayo, se observó que la mayor actividad inhibitoria la presentaron los sobrenadantes libres de células provenientes de cultivos en caldo tripticasa soya (TBS). De los 16 sobrenadantes de las bacterias probadas en este método, siete mostraron inhibición del patógeno y, por lo tanto, fueron seleccionadas para probar en el ensayo en hojas. Las cepas seleccionadas fueron la 406, 447, 478, 480, 482, 484 y la 486 (figura 20).

Figura 20. Resultados del ensayo de difusión en placa



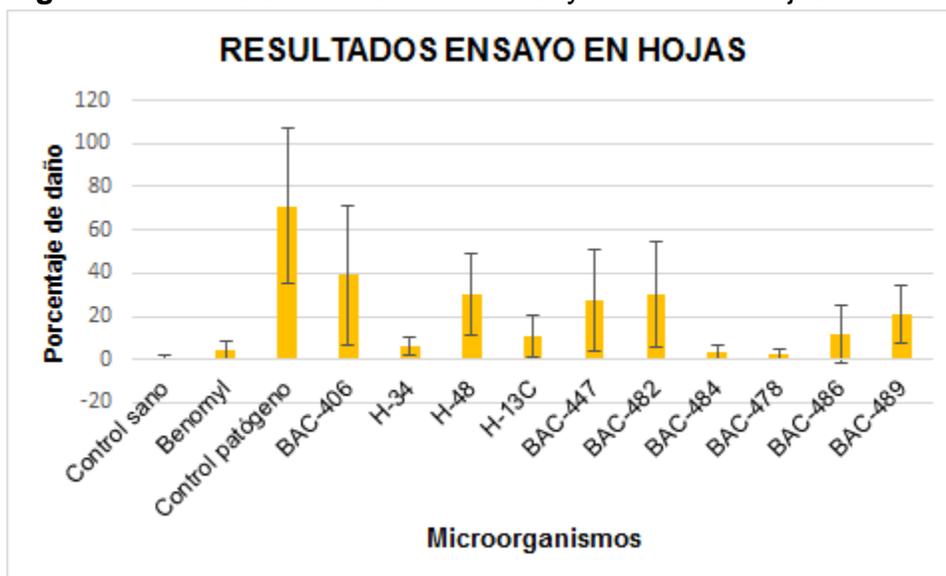
6.3 Evaluación del ensayo en hojas de la actividad antifúngica de los microorganismos seleccionados

Para determinar el porcentaje de daño producido o inhibido en cada réplica se utilizó el programa ImageJ (National Institutes of Health. 2016), que a partir de una imagen de la superficie infectada permite conocer el área total y el área sana de las hojas, y a partir de esos datos discriminar el área enferma (área total - área sana). Una vez obtenidos estos valores, se realizó un promedio de las nueve lecturas y se sometieron los datos a la aplicación del test de Grubbs, que permite calcular valores atípicos dentro de los datos más extremos y así saber si se pueden eliminar y continuar con el análisis. Finalmente, se calculó la desviación estándar y se eligieron dos de los microorganismos que presentaron el porcentaje de daño más bajo (Figura 21).

Tabla 1. Datos ensayo in vitro sin dato atípico

LECTURA	Porcentajes de daño								Promedio	Desviación estándar
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Control sano	0	0	1,64	0	0	3,7	1,3	1,9	1,07	1,19
Benomyl	10,33	4,4	0	0	8,1				4,57	3,82
Control patógeno	93,25	96,79	91,4	8,72	11,7	96,1	99,3	70,8	71,00	34,01
406	82,88	6,92	94,1	18,42	6,5	53,4	65,3	23,7	43,89	30,57
34	8,71	2,09	0	12,1	3,0	5,0	11,1	5,6	5,94	3,83
48	9,59	64,9	25,32	9,5	18,6	37,1	40,7	33,7	29,93	16,28
13C	4,87	0	2,69	8,1	4,7	19,2	27,4	22,0	11,13	9,03
447	57,07	4,4	61,53	4,5	2,6	39,4	27,2	52,0	31,10	21,99
482	4,33	7,89	42,5	49,59	4,1	11,1	23,6	18,5	20,21	15,35
484	8,79	4,0	0,27	2,1	2,7	8,1	0	0	3,23	3,10
478	1,16	3,62	6,8	2,82	1,0	5,1	0	0	2,57	2,18
486	5,04	3,36	39,9	2,64	4,8	8,5	0	29,2	11,69	12,88
489	39,31	17,73	13,6	10,71	3,0	26,4	12,8	42,8	20,80	12,49

Figura 21. Análisis estadístico del ensayo *in vivo* en hojas de fresa.



Como se aprecia en la tabla 1 y figura 21, las bacterias 478, 484 y el hongo 34 mostraron la mayor reducción en el área foliar afectada con porcentajes de daño del

2,57%, 3,23% y 5,94%% respectivamente. Estos microorganismos se caracterizaron por generar una reducción en el porcentaje de daño estadísticamente significativa en comparación al control del patógeno. Los resultados demostraron además que estos microorganismos presentaban menor variabilidad entre las réplicas (Figura 22), lo cual podría incidir en su desempeño en campo a diferencia de lo obtenido con aislamientos como 447, 482 o 486 en donde el coeficiente de variación fue superior al 50% indicando falta de reproducibilidad de los resultados entre las diferentes réplicas biológicas evaluadas.

Figura 22. Resultados del ensayo *in vivo* en hojas de fresa.

CONTROL SANO		
		
Daño: 23,59%	0%	0%
		
1,64%	0%	0%
		
1,3%	1,9%	3,7%

CONTROL PATÓGENO		
		
100%	93.25%	96.79%
		
91.4%	8.72%	8.3%
		
11.7%	97%	70.8%

34		
		
8.71%	2.09%	0%
		
100	12.1%	3.0%
		
5.0%	11.1%	5.6%

478		
		
1.16%	3.62%	6.8%
		
2.82%	1.0%	5.1%
		
0%	9.2%	0%

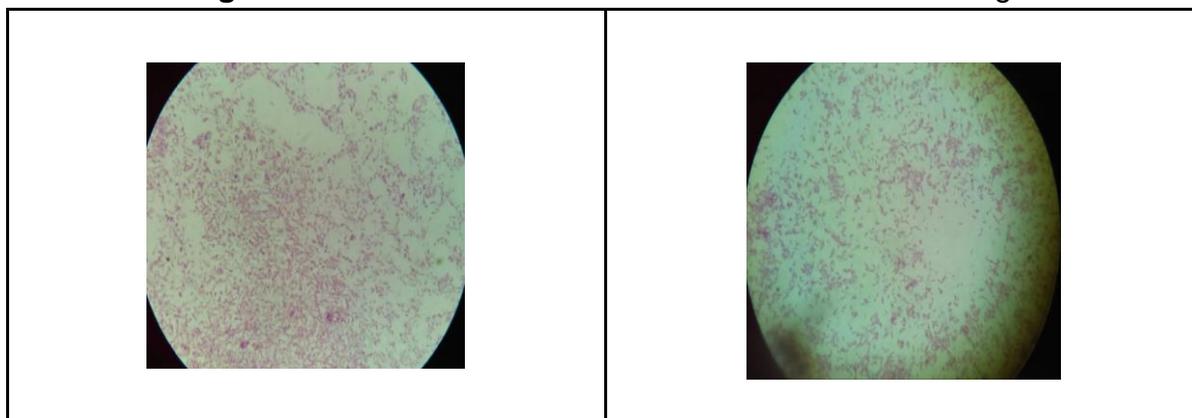
484		
		
8.79%	9.35%	4.0%
		
0.27%	2.1%	2.7%
		
8.1%	0%	0%

6.4. Identificación de los microorganismos seleccionados por observación macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas

La formulación de un inoculante biológico para el control fitosanitario de hongos fitopatógenos, requiere que el aislamiento biocontrolador sea inocuo para animales, humanos y otras plantas. Por ello, es necesario realizar un proceso de identificación taxonómica de los microorganismos con potencial antifúngico en aras de asegurar que su uso en campo no representa un riesgo biológico para otros organismos o el medio ambiente. En este sentido, se decidió realizar la caracterización taxonómica de los aislamientos 478, 484 y 37 mediante pruebas fenotípicas y moleculares.

En el primer caso (evaluación fenotípica), se determinaron las características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas de los aislamientos seleccionados. Como resultado se obtuvo que las bacterias 478 y 484 son bacilos Gram negativos (Figura 23), fermentadores de lactosa y productores de un pigmento rojizo (Figura 24), característico del género *Serratia*. Teniendo en cuenta estos resultados previos, se les montó un panel de identificación tipo WalkAway para microorganismos Gram negativos y el equipo identificó ambas cepas como *Serratia marcescens* con un 99.99% de probabilidad según su base de datos. Las pruebas bioquímicas indicaron que tiene un metabolismo fermentador de glucosa y de lactosa lento, no hidroliza la urea ni desamina la ornitina, lo que indica que no presenta una gran actividad enzimática (Figura 25).

Figura 23. Resultados tinción de Gram. Bacilos Gram negativos



CEPA 484	CEPA 478
-----------------	-----------------

Figura 24. Crecimiento en agar Mac Conkey. Colonias rojas fermentadoras lentas de lactosa.

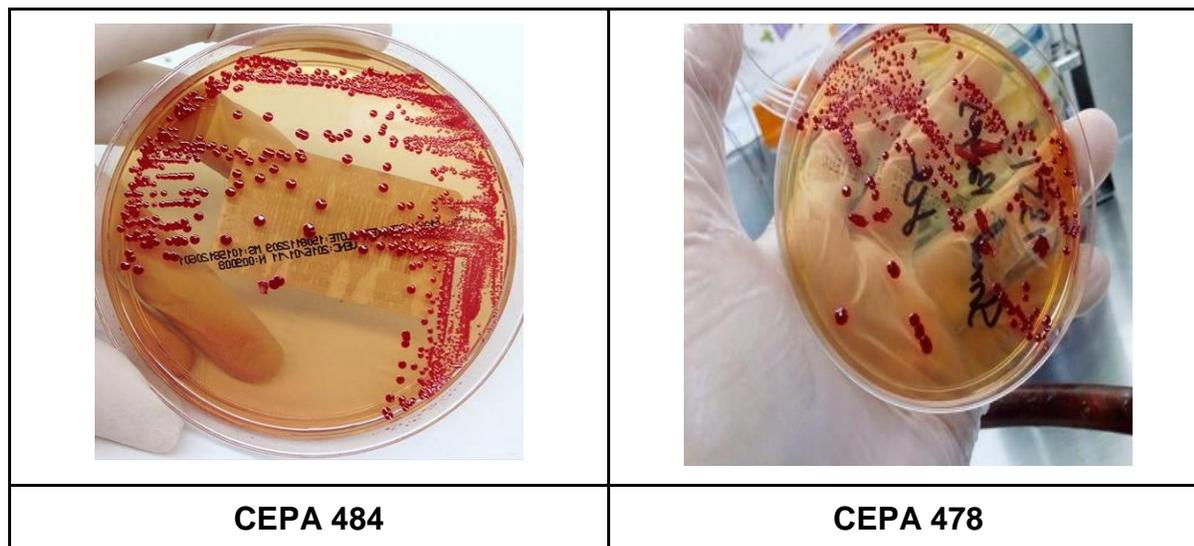


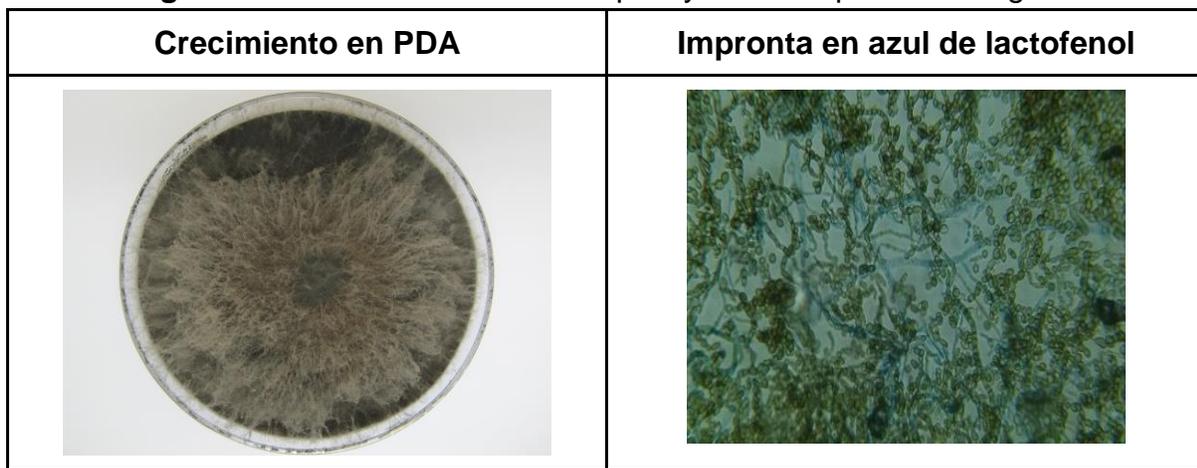
Figura 25. Resultados del panel de identificación bioquímico (aplica para la cepa 484 y 478).

INFORME GLOBAL DE ESTADO DE PANEL														
Identificación del paciente: 484							Fecha de muestra: 19/09/2019							
Muestra: 484							Fecha de muestra: 19/09/2019							
Origen: Académico							Fecha de muestra: 18/09/2019 10:18:37 am							
Tipo de panel: Neg Combo 72							Proxima lectura. NO							
WalkAway: WalkAway 4030103							Torre: 5							
Estado de panel: En WalkAway, Completo							Nivel: 2							
DATOS OBTENIDOS DIRECTAMENTE DE Walk Away														
Biotipo: 70445257066														
Identificación de microorganismos														
Microorganismo				% de probabilidad					Características especiales					
1. S. marcescens				99.99					Pigm rojo var					
Resultados bioquímicos														
GLU +	RAF -	INO +	URE +	LYS +	TDA -	CIT +	CL4 +	TAR -	OF/G +	NIT +				
SUC -	RHA -	ADO -	H2S -	ARG -	ESC +	MAL -	CF8 +	ACE -	P4 +	FD64 +				
SOR-	ARA -	MEL -	IND -	ORN +	VP-	ONPG +	TO4 +	CET-	K4 -	OXI -				
Resultados de CIM														
A/S	AK	AM	AZT	CAZ	CAZ/C A	CFT	CFT/C A	CFX	CFZ	CL	CP	CP E	CR M	ETP

	<=16	>16	<=4	<=1	<=0.25	NR	4	>16	>4	>4	<=1	<=2	>16	<=0.5
GM	IMP	LVX	MER	NA	P/T	T/S	TE	TIM	TO					
<=4	<=1	<=2	<=1	<=16	<=16	<=2/38	>8	<=16	>8					

Por otra parte, la observación microscópica del hongo 34, permitió evidenciar la producción de abundantes conidias dematiáceas en cadena e hifas hialinas septadas. Macroscópicamente, este aislamiento fúngico se caracteriza por producir colonias dematiáceas filamentosas elevadas en medio PDA tras 04 días de incubación (Figura 26). Infortunadamente, los resultados obtenidos no fueron suficientes para realizar una identificación presuntiva con las claves dicotómicas usuales, haciendo necesaria la comparación con los resultados moleculares.

Figura 26. Observación macroscópica y microscópica del hongo aislado



6.5. Resultados de la caracterización molecular de los microorganismos seleccionados

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos de las características fenotípicas de los aislamientos bacterianos 478 y 484 y determinar la identidad del aislamiento fúngico 34; se llevó a cabo un proceso de secuenciación del gen 16s ADNr para el caso de las bacterias, utilizando los primers 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Para el aislamiento fúngico se usaron los primers ITS- 4 (TCCTCCGCTTATTGATAT) e ITS -1 (TCCGTAGGTGAACCTGCG).

En el caso de las bacterias, las secuencias obtenidas no permitieron la generación de una secuencia consenso, por ello, el análisis tuvo que llevarse a cabo usando las secuencias parciales obtenidas con ambos primers (Forward y Reverse) las cuales tuvieron en promedio una longitud de 550-600 pb.

Como se presenta en la tabla 2, los resultados de las secuencias parciales corroboraron la información fenotípica obtenida anteriormente, indicando que ambos aislamientos bacterianos pertenecen al género *Serratia*, siendo su vecino cercano las especies *S. marcescens* y *S. nematodiphila* con porcentajes de similaridad superiores al 99%. Estos resultados fueron reproducibles en las tres bases de datos dando soporte a la identificación de estos aislamientos bacterianos.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de los aislamientos bacterianos de la secuenciación del gen 16s rARN

CEPA	SECUENCIA	BLAST	% SIMILARIDAD	EZ TAXON	% SIMILARIDAD	RDP	% SIMILARIDAD
478	FORWARD	<i>Serratia</i> sp. NJAU-N19bac	99,5%	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	99%	<i>Serratia marcescens</i> CF-S28	98,6%
		<i>Serratia marcescens</i> S6BD2	99,5%	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	98%	<i>Serratia marcescens</i> IRGB 500	98%
		<i>Serratia marcescens</i> HD01	99,5%	<i>Serratia marcescens</i> KRED	98%	<i>Serratia marcescens</i> IRGB 501	98%
	REVERSE	<i>Serratia marcescens</i> WW4	99,8%	<i>Serratia marcescens</i> KRED	99,8%	<i>Serratia</i> sp. BZ-L	99%
		<i>Serratia marcescens</i> CF-S28	99,6%	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	99,8%	<i>Serratia</i> sp. XT-32	99%
		<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> B7	99,6%	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	99,4%	<i>Serratia</i> sp. XT-1	99%
484	FORWARD	<i>Serratia marcescens</i> ZK2	99,2%	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	100%	<i>Serratia marcescens</i> 21-2	100%

		<i>Serratia marcescens</i> ZCL-01	99,1%	<i>Serratia marcescens</i> KRED	100%	<i>Serratia marcescens</i>	99,6%
		<i>Serratia</i> sp. Jx- 14	99,1%	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	100%	<i>Serratia marcescens</i> AS-1	99,6%
	REVERSE	<i>Serratia marcescens</i> 21-2	100%	<i>Serratia marcescens</i> KRED	100%	<i>Serratia</i> sp. PRGB11	97,1%
		<i>Serratia</i> sp. EM017	99.8%	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	100%	<i>Serratia</i> sp. PSGB07	97,1%
		<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> B7	99.8%	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	99,6%	<i>Serratia marcescens</i> M9	97,1%

En el caso del aislamiento fúngico 34, para la región ITS se obtuvo una secuencia de 522 pb. Esta secuencia fue evaluada en la plataforma Blastn, obteniendo como resultado que 34 corresponde a un aislamiento del género *Neoscytalidium* estando cercanamente relacionado con la especie *N. dimidiatum* con un porcentaje de similitud superior al 97%. Al igual que en el caso de las bacterias, las características macro y microscópicas reportadas para este género fúngico fueron comparadas con las obtenidas para el aislamiento 34 encontrando concordancia entre ambas confirmando así la pertenencia de 34 a este género fúngico (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación taxonómica del aislamiento 34 mediante secuenciación de región ITS.

AISLAMIENTO	BLAST	% SIMILARIDAD
34	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> JX524168.1	98.11%
	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> BWH-TS1	98.11%
	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> HLN2	97.75%

7. DISCUSIÓN

En Colombia, los estudios enfocados hacia este tema han demostrado la enorme riqueza metabólica del mar caribe. Existen reportes de sustancias aisladas de algas, esponjas y corales, que se han probado contra diferentes microorganismos que actualmente presentan multirresistencia a fármacos, contra fitopatógenos y contra células cancerígenas⁷⁵. El principal enfoque de estos estudios está dirigido a la obtención de especies de actinobacterias y *Bacillus*, ya que han demostrado ser excelentes productoras de metabolitos secundarios que se han ensayado contra patógenos de interés fitosanitario. Sin embargo, se han encontrado otras especies con un enorme potencial, donde destacan las levaduras y algunos hongos metabólicamente activos^{52,53,55,56}.

En el presente estudio, se incluyeron 84 muestras provenientes de diferentes zonas costeras del caribe Colombiano, que se evaluaron para conocer su potencial antifúngico contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum* sp. La metodología utilizada, permitió identificar tres aislamientos que demostraron una alta efectividad durante los ensayos realizados. La identidad de estos, corresponden a dos bacterias del género *Serratia* sp con un 99.1 % de compatibilidad y un hongo *Neoscytalidium dimidiatum* con un 97.9% de compatibilidad, según los resultados del análisis en las tres diferentes bases de datos empleadas^{52, 53, 55, 56}.

El género *Serratia* ha sido reportado previamente como rizobacteria promotora de crecimiento y como agente de biocontrol. Estas habilidades se asocian principalmente a la producción de un pigmento rojo característico denominado prodigiosina, al cual se le describen propiedades antioxidantes, antitumorales, antibióticas, entre otras. La producción de esta sustancia depende de las condiciones a las que esté expuesta la bacteria. La temperatura ideal de crecimiento varía entre los 20 y 27°C, sin embargo, se han encontrado cepas que pueden resistir un choque térmico de hasta 60°C, lo que sugiere a esta sustancia como candidata para ser usada en cultivos con diferentes temperaturas. El medio de cultivo que más se utiliza para la obtención de prodigiosina es el medio LB, pero el empleo de sustancias como el etanol, glucosa, glicerol y ácidos

grasos de semillas oleaginosas, pueden dar un mejor resultado para la producción de esta sustancia⁷⁶.

En cuanto a la actividad antifúngica, se ha encontrado que está relacionada con la capacidad quitinolítica de *Serratia*; la cual depende de la producción de enzimas quitinolíticas y proteínas accesorias. Se han descrito tres enzimas con esta capacidad; ChiA que está relacionada con quitoolisacáridos de cadena larga y quitina insoluble, ChiB con quitotriosa y ChiC con formas solubles de quitina⁷⁷. Su capacidad depende también de la sinergia que exista entre estas enzimas y las proteínas accesorias. Estas quitinasas tienen mejor capacidad a temperaturas entre 27-32,5°C. Se ha reportado actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, entre otros.

En un estudio realizado por Gutiérrez et al⁷⁶ se evaluó en qué condiciones mejoraba la producción de prodigiosina y quitinasas, la respuesta del crecimiento micelial y germinación de conidias de un aislamiento de *Colletotrichum gloeosporioides* frente a tres aislamientos de *Serratia marcescens*. Respecto a las condiciones para la producción de metabolitos; se obtuvo que la producción de prodigiosina se ve favorecida en medios con maní (*Arachis hypogaea*), donde se producen de 2 a 3 veces más en comparación con el medio LB. La mayor producción de quitinasa se dió a las 16 horas especialmente en medio soja (*Glycine max*) y se obtuvo que hubo una reducción del 40% en crecimiento micelial y de 81,89% de germinación de conidias desde las primeras 6 horas de contacto.

La producción de estas sustancias por parte del género *Serratia* la hacen un microorganismo prometedor para el control biológico de diversos microorganismos; en este proyecto se evidenció la reducción del daño en porcentajes desde 9,35% hasta el 0%. Esta efectividad puede ser aumentada, empleando medios y condiciones de cultivo diferentes. El uso directo de este género tiene un uso limitado debido a que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* que es patógena para el ser humano, por ello, se recomienda la implementación de medios de cultivo que favorezcan la producción de los metabolitos activos para poder ser usados en campo.

Por otro lado, el biocontrolador fúngico aislado es *Neoscytalidium dimidiatum*, un moho predominantemente feoide que causa dermatomicosis y onicomosis crónicas en humanos, principalmente en los pies. La nomenclatura de *N. dimidiatum* ha sido controvertida debido a la producción de artroconidios sinanamorfos picnidiales y de las colonias hialinas y/o feoides. Otro nombre por el cual es clasificado es *Scytaalidium dimidiatum*⁷⁸.

Actualmente, no existen reportes del hongo *Neoscytalidium dimidiatum* como biocontrolador, por el contrario, este es un patógeno oportunista tanto para el hombre, como para las plantas. En las plantas causa el chancro, manchas en la superficie del tallo y podredumbre negra interna en la fruta. La mayoría de los aislamientos de este fitopatógeno, se han hecho en países de oriente, como Malasia y China donde se ha asociado a infecciones en cultivos de pitahaya⁷⁹ y en plantas ornamentales como la *Sansevieria trifasciata*, comúnmente conocida como la lengua de suegra, causado tizón foliar⁸⁰.

En latinoamérica, se han reportado casos de infección en árboles como el mango en Venezuela⁸¹ y de pitahaya en Costa Rica⁸¹. Su mecanismo de infección depende de las condiciones de estrés a la que esté sometida la planta, ya sea por regímenes hídricos desfavorables, condiciones secas o altas temperaturas. Una vez el hongo se ha introducido en la planta a través de heridas previas, se hospeda debajo de la corteza, formando masas de esporas que se convertirán en chancros. En la superficie de estos últimos se forman picnidios y por último, los tallos se pudren.

En el ser humano, las infecciones son causadas de forma endémica en zonas tropicales y subtropicales, como África, América del Sur, el Caribe, India y Asia, a través de la exposición directa o indirecta a suelo contaminado. Los casos van desde dermatomicosis y onicomosis principalmente en pies, hasta endocarditis e infiltraciones pulmonares asociadas a un cuadro de inmunosupresión de los pacientes^{81, 83}.

En los ensayos realizados, se observa un buen potencial antagónico contra el *Colletotrichum* spp, inhibiendo en un 55% al hongo fitopatógeno durante el enfrentamiento directo *in vitro* y disminuyendo el porcentaje de daño en un 94,06% durante el ensayo en hojas de fresa. Aunque no se sabe con certeza a que metabolitos se debe su actividad antifúngica para inhibir el desarrollo de la enfermedad, al ser aplicado como tratamiento previo a las hojas antes de la infección, su efectividad superó el porcentaje que alcanzó el agroquímico utilizado como control (Benomyl).

Por otra parte, en cuanto al resultado obtenido tras el enfrentamiento directo, se puede decir que el porcentaje de inhibición se atribuye ya sea al micoparasitismo, por la forma como el hongo *Neoscytalidium dimidiatum* creció, en comparación al *Colletotrichum* spp. Se ha descrito, además, que la producción de melanina asegura su supervivencia y es además un factor de virulencia que lo protege contra las agresiones del medio ambiente y del huésped, radiaciones ultravioleta y temperaturas extremas⁸⁴. También le confiere resistencia contra muchos de los antimicóticos usados de las especies dematiáceas, motivo por el cual pudo sobrevivir a las condiciones del ambiente donde fue aislado.

Como ya se mencionó, ambos microorganismos aislados son patógenos para el ser humano. Sin embargo, los avances científicos de la actualidad permiten explorar alternativas para volver viables estos microorganismos, ya sea a partir del aislamiento de las sustancias encargadas de la actividad antifúngica o por silenciamiento de genes. La aplicación de técnicas para aislar las sustancias de interés, puede permitir extraer y fraccionar todos los compuestos, poder estudiarlos de forma independiente y conocer las propiedades de cada uno y si presentan toxicidad para el ser humano.

Actualmente, la tecnología para la edición de genes ha cogido fuerza para su implementación en el control biológico, ya que están enfocadas a mitigar los genes encargados de la síntesis de los factores de virulencia que poseen aquellos microorganismos que presentan buenos resultados en los enfrentamientos *in vitro*, pero

que no son viables para su aplicación en el campo. Dentro de los métodos que más se han utilizado se encuentran la introducción de ARN antisentido, ARN bicatenario (ARNds; también llamado interferencia de ARN, o ARNi, en animales) o transgenes sensoriales (también llamados co-supresión en plantas o sofocación de hongos). Su principal objetivo es inhibir genes a nivel postranscripcional en diferentes organismos⁸⁵.

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede decir que los resultados obtenidos en este trabajo, contribuyen al estudio de tratamientos alternativos para el control biológico de enfermedades en los cultivos de interés comercial en Colombia. Sin embargo, aún faltan muchos estudios que complementen estos hallazgos, para poder obtener un producto viable que permita proteger los cultivos de fresa contra la antracnosis producida por el hongo *Colletotrichum* spp., favoreciendo la actividad agrícola, la economía y la importación de Colombia.

8. CONCLUSIONES

1. En las pruebas de tamizaje in vitro realizadas, 3 hongos y 7 bacterias demostraron una capacidad antagónica superior al 30%, lo que demuestra su potencial para inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp. bajo condiciones de laboratorio. De estos microorganismos, 2 hongos y 2 bacterias, presentaron los valores más significativos en los ensayos en hojas.
2. Los microorganismos seleccionados para caracterizar molecularmente fueron identificados como *Serratia* sp y *Neoscytalidium dimidiatum*. Ambos, patógenos para el ser humano y para algunos cultivos, por lo que se concluye que su uso directamente no representa un mecanismo de biocontrol adecuado.
3. Los resultados obtenidos permiten inferir que, la actividad antifúngica de los microorganismos evaluados puede ser una alternativa biológica para controlar la infección por *Colletotrichum* spp. en plantas de fresa. Para ello, es necesario complementar el estudio con la evaluación de las sustancias secretadas producidas y responsables de la actividad biológica para garantizar que no produzcan efectos tóxicos para el agricultor o los consumidores o la aplicación de otras tecnologías que vuelvan viables los resultados obtenidos de este proyecto.

Recomendaciones

Uno de los principales inconvenientes durante la realización de este trabajo, fue la alta variabilidad encontrada en los resultados de los ensayos realizados en hoja. Ya que, resultó difícil controlar todas las variables que representan interferencias en el ensayo. Motivo por el cual, se encontraron datos inconsistentes que interfirieron con la selección de los microorganismos y la calidad del ensayo, por lo que se hizo necesaria la aplicación del test de Grubbs para determinar cuáles eran los valores desviados de la tendencia para poder eliminarse del análisis estadístico.

De acuerdo con lo anterior se recomienda, en primer lugar, realizar el ensayo en plantas completas para evitar falsos resultados por la herida que se hace al momento de cortar las hojas. Segundo, seleccionar plantas jóvenes, de una misma edad y libres de agroquímicos para evitar interferencias con otros productos presentes, que puedan inhibir a los biocontroladores que se están estudiando.

Tercero, cabe resaltar que la variabilidad entre los resultados obtenidos *in vitro*, además de ser consecuencia de todo lo anteriormente mencionado, puede deberse también a la procedencia de los microorganismos que se están utilizando. Ya que, estos fueron aislados de su hábitat natural y sometidos a diferentes condiciones medioambientales entre los ensayos. Aunque esto no se puede corregir, si se sugiere que las muestras sean procesadas tan pronto se pueda luego de ser tomadas, para garantizar la recuperación de los microorganismos lo más parecido a cómo se comportan en su entorno natural y no someterlos a estrés o a una competencia con el demás microbiota que pueda matarlos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gañán L, Álvarez E, Zapata J. Genetic identification of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose in fruits of avocado, banana, mango and tamarillo. Rev. acad. colomb. cienc. exact. fis. nat. [Internet]. 2015; 39(152): 211-218 [Cited 2018 Oct 29]. Available at: doi:<http://dx.doi.org/10.18257/raccefyn.192>
2. Landero N, Lara F, Andrade P, Aguilar L, Aguado A. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. Rev. Mex. Cienc Agríc. [Internet]. 2016; 7 (5): 1189-1198. [Citado 2018 oct 24] Disponible en: doi: 10.29312/remexca.v7i5.245
3. Giraldo N, Bustamante S, Pinzón Y, Buitrago G. Molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from yam plants of Colombia Atlantic Coast using DNA Amplification Fingerprinting technique (DAF) Rev.Colomb.Biotecnol. [Internet] 2016; 18 (1): 95–103 [Cited 2018 oct 24]. Available at: doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57720
4. España M, Arboleda J, Ribeiro J, Abdelnurd P, Guzmán J. Eucalyptus leaf byproduct inhibits the anthracnose-causing fungus *Colletotrichum gloeosporioides* Industrial Crops & Products. [Internet]. 2017; (108) 793-797. [Cited 2018 oct 24]. Available at: doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.002>
5. Górski R, Sobieralski K, Siwulski M, Frąszczak B, Sas I. The effect of *Trichoderma* isolates, from family mushroom growing farms, on the yield of four *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach strains. Journal of Plant Protection Research. [Internet] 2014; 54 (1): 102–105 [Cited 2018 oct 30]. Available at: doi:<https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0016>
6. Fouillaud M, Venkatachalam M, Girard-Valenciennes E, Caro Y, Du Fossé L. Anthraquinones and derivatives from marine-derived fungi: Structural diversity and selected biological activities. Mar Drugs. [Internet]. 2016; 14(4): 64. [Cited 2018 oct 30]. Available at: doi: 10.3390/md14040064.
7. De Felício, R, Pavão GB, De Oliveira et al. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities exhibited by endophytic fungi from the Brazilian marine red alga *Bostrychia tenella* (Ceramiiales). Rev. bras. farmacogn. [Internet]. 2015; 25:641–650 [Cited 2018 Oct 24]. Available at: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.003>
8. Santos S, Folter S, Délano J, Gómez M, Guzmán D, Sánchez P, et al. Puntos críticos en el manejo integral de mango: floración, antracnosis y residuos industriales. Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas. [Internet]. 2011 2; (2): 221-234 [Citado 2018 oct 27]. Disponible en: doi: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v2n2/v2n2a4.pdf>

9. Puerto A, Suárez S, Palacio D. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Rev Cubana Hig Epidemiol* [Internet]. 2014; 52 (3): 372-387. [Citado 2018 Oct 27]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v52n3/hig10314.pdf>
10. Munhuweya K, Caleb O, Lennox C, Reenen A, Opara L. In vitro and in vivo antifungal activity of chitosan-essential oils against pomegranate fruit pathogens. *POSTHARVEST BIOL TEC.* [Internet]. 2017, 129: 9-22. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.03.002>
11. Hromis N, Lazic V, Popovic S, Markov S, Vastag Z, Suput D. Investigation of a product-specific active packaging material based on chitosan biofilm with spice oleoresins. *J FOOD NUTR.*[Internet].2016; 55 (1):78-88. Available at: DOI: 10.1016/j.foodhyd.2010.07.022. 15. DIN 53380-2:2006-11
12. Vilaplana R, Pazmiño L, Valencia S. Control of anthracnose, caused by *Colletotrichum musae*, on postharvest organic banana by thyme oil. *Postharvest Biol. Technol.* [Internet]. 2018 (138): 56-63 [Cited 2018 Oct 24]. Available at: doi: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.12.008>
13. Pérez A, Vitola D, Chamorro L. Activity of essential oil of basil (*Ocimum basilicum*) against *Colletotrichum gloeosporioides* of yam (*Discorea alata*). *Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient.* [Internet]. 2018; 21 (1): 99 - 108 [Cited 2018 Oct 24]. Available at: doi:10.31910/rudca.v21.n1.2018.667
14. Rashida T, Awlab H, Sijam K. Antifungal effects of *Rhus coriaria* L. fruit extracts against tomato anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *IND CROP PROD.* [Internet]. 2018; 113: 391–397. [Cited 2018 Oct 24]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.066>
15. Lara F, Nieto D, Nava C, Gutiérrez G, Ayala Ó, Aguilar A et al. Efecto del glucorafano aislado de floretes de brócoli sobre la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Rev. Fitotec. Mex.* [Internet]. 2014; 37 (2): 141 - 147. [Consultado 2018 Oct 27]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v37n2/v37n2a5.pdf>
16. Karimi, K, Babai Ahari, Arzanlou M, Amini J, Pertot I. Comparison of indigenous *Trichoderma* spp. strains to a foreign commercial strain in terms of biocontrol efficacy against *Colletotrichum nymphaeae* and related biological features. *J PLANT DIS PROTECT.* [Internet]. 2017; 124 (5): 453-466. [Cited 2018 Oct 24]. Available at: 0.1007 / s41348-017-0088-6
17. Guardado L, Tovar E, Chacón A, López U, et al. Identification and characterization of a new *Bacillus atrophaeus* strain B5 as biocontrol agent of postharvest anthracnose disease in soursop (*Annona muricata*) and avocado (*Persea americana*). *Microbiol. Res.* [Internet]. 2018; (210) 26–32. [Cited 2018 Oct 24]. Available at: doi: 10.1016/j.micres.2018.01.007.
18. Lima J, Gondime D, Oliveira J, Oliveira, Goncalves L, Viana F. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biol*

- Technol. [Internet]. 2013; 83: 58-64. [Cited 2018 Oct 24]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.03.014>
19. Qing F, Shiping T. Postharvest Biological Control of Rhizopus Rot of Nectarine Fruits by *Pichia membranefaciens*. Plant Dis. [Internet]. 2007; 84 (11): 58-64. [Cited 2018 Oct 24]. Available at: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.11.1212>
 20. Bergmann W, Feeney R. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. J. Am. Chem. Soc. [Internet]. 1950. Jun; 7 (26) 2809-2810. [Cited 2019 Jun 20]. Available at: doi: <https://doi.org/10.1021/ja01162a543>.
 21. Bernardini S, Tiezzi A, Laghezza Masci V, Ovidi E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. Nat Prod Res. [Internet]. 2018, 32 (16): 1926 – 50. Aug 18 [Cited 2019 Jun 5]; Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2017.1356838>
 22. Croll A, Copp B, Davis R, Keyzers R, Prinsep M. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. [Internet]. 2019; 36: 122-173. [Cited 2019 Jun 20]. Available at: <https://doi.org/10.1039/C8NP00092A>
 23. Biswas K, Dipak P, Narayan S. Marine Bacteria: A Potential Tool for Antibacterial Activity. J Appl Environ Microbiol. [Internet]. 2016; 4(1): 25-29. [Cited 2018 Oct 25]. Available at: doi: 10.12691/jaem-4-1-3
 24. Giampieri F, S. Tulipani J, Alvarez J, Quiles B, Mezzetti D. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. Nutrition 2. [Internet]. 2012; 28 (1): 9-19 [Cited 2019 Mar 02]. Available at: doi: 10.1016/j.nut.2011.08.009.
 25. Manual técnico del cultivo de fresa bajo buenas prácticas agrícolas. [Internet]. [Consultado 2019 mar 02]. Disponible en: https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/fresa%20BPA_1.pdf
 26. Cámara de comercio de Bogotá. Manual Fresa [Internet] [Citado 2018 Oct 29]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11520/14312>
 27. Angulo R. Cartilla fresa. (Fragaria ananassa). Bayer. [Internet]. 2009. [Citado 2018 Oct 29]. Disponible en: https://www.cropscience.bayer.co/~media/Bayer%20CropScience/Peruvian/Country-Colombia-Internet/Pdf/Cartilla-FRESA_baja.ashx
 28. Ministerio de Agricultura y desarrollo rural. Reporte: Área, Producción y Rendimiento Nacional por Cultivo. Agronet. [Internet]. [Citado: 02 2019 Mar 02]. Disponible en: <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>
 29. Cortes Paniagua R. Propuesta técnica ambiental para asegurar la inocuidad de fresas cultivadas en Cartago. Tesis Mg. San José Costa Rica. [Internet] 2011. [Citado 2019 Mar 03]. Disponible en: <http://www.uci.ac.cr/Biblioteca/Tesis/PFGMIA72.pdf>.

30. Rubio S, Alfonso A, Grijalba C, Mercedes M. Determinación de los costos de producción de la fresa cultivada a campo abierto y bajo macrotúnel. *Revista Colombiana de ciencias hortícolas* .[Internet]. 2014; 8 (1): 67-79. [Citado 2019 Mar 02]. Disponible en: <https://doi.org/10.17584/rcch.2014v8i1.2801>
31. Rojo I, García R, Sañudo A, León J, Allende R. Proceso de infección de antracnosis por *Colletotrichum truncatum* en papaya maradol. *Rev. Bras. Frutic.* [Internet]. 2017; 39: 379. [Citado 2019 Mar 02]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017379>
32. Wang, CH, Jiang, ZT, Huang, RJ, Shi, GC, Wang, PP, Xue L. The occurrence and control to strawberry anthracnose in China. *Bayer*. [Internet]. 2017; 1156: 797-799. [Cited 2019 Abr 29]. Available at: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1156.117>
33. Damm U, Cannon P, Woudenberg J, Johnston P, Weir B, Tan Y, et al. The *Colletotrichum boniense* species complex. *Stud Mycol. NCBI* .[Internet]. 2012; 73 (1): 1 - 36. [Cited 2019 Mar 09]. Available at: <http://doi: 10.3114/sim0002>
34. Jayawardena R, Hyde K, Damm U, Cai L, Liu M, Li X, et al. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere*. [Internet]. 2016; 7 (8): 1192-1260. [Cited 2019 Mar 09]. Available at: [Doi 10.5943/mycosphere/si/2c/9](https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/2c/9)
35. Zhang L, Huang X, He C, Zhang Q, Zou X, Duan K, Gao Q. Novel Fungal Pathogenicity and Leaf Defense Strategies Are Revealed by Simultaneous Transcriptome Analysis of *Colletotrichum fructicola* and Strawberry Infected by This Fungus. *Front. Plant Sci.* [Internet]. 2018; 25 (9): 434. [Cited 2019 Mar 09]. Available at: [doi: 10.3389/fpls.2018.00434](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00434).
36. Beltrán M, García D. *Colletotrichum gloeosporioides* fitopatógeno asociado a la nutrición humana. *UAEM*. [Internet]. 2006;8(13):73-80. [Consultado 2019 Mar 02] Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=239017515006>
37. Yan Y, Yuan Q, Tang J, Huang J, Hsiang T, Wei Y, Zheng L. *Colletotrichum higginsianum* as a Model for Understanding Host-Pathogen Interactions: A Review. *Int J Mol Sci.* [Internet]. 2018; 23: 19 (7): 2142. [Cited 2019 Mar 02] Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms19072142>
38. Xu X, Wang Y, Tian C, Liang Y. The *Colletotrichum gloeosporioides* RhoB regulates cAMP and stress response pathways and is required for pathogenesis. *Fungal Genet Biol.* [Internet]. 2016; 96: 12-24. [Cited 2019 Mar 09]. Available at: [http:// doi: 10.1016/j.fgb.2016.09.002](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.09.002).
39. Costantini R, Ventura RI, Hernández M, Bautista S, Barrera LL. Potencial antifúngico de nanopartículas de quitosano y extracto de Arándano sobre *Colletotrichum fragariae* en fresa. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* [Internet]. 2018; 19 (1): 46-61.[Citado 2019 Abr 30]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81355612004>

40. Savi D, Rossi B, Rodrigues G, Santos L, Maba F, Glienke C, et al. Microscopic analysis of colonization of *Colletotrichum abscissum* in citrus tissues. *Microbiol. Res.* [Internet]. 2019; 226: 27-33
41. Costantini R, Ventura RI, Hernández M, Bautista S, Barrera LL. Potencial antifúngico de nanopartículas de quitosano y extracto de Arándano sobre *Colletotrichum fragariae* en fresa. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* [Internet]. 2018; 19 (1): 46-61.[Citado 2019 Abr 30]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81355612004>
42. Weber N, Veberic R, Mikulic M, Stampar F, Koron D, Munda A, Jakopic J. Metabolite accumulation in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) fruits and runners in response to *Colletotrichum nymphaeae* infection. *PMPP* [Internet]. 2015; 92: 119-129 [Cited 2018 oct 31]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.10.003>
43. Curry K, Abril M, Avant, J, Smith B. Strawberry anthracnose: Histopathology of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae*. *J Fitopatologi.* [Internet]. 2002; 92 (10): 1055-1063. [Cited 2019 Abr 30]. Available at: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.10.1055>
44. California strawberry comission. Antracnosis en fresa [Internet]. 2017; 14 [Disponible en: <https://ucanr.edu/blogs/fresamora/blogfiles/47936.pdf>]
45. Vilaplana R, Hurtado G, Valencia S. Hot water dips elicit disease resistance against anthracnose caused by *Colletotrichum musae* in organic bananas (*Musa acuminata*). [Internet]. 2018, (95) 247 - 254. [Cited 2018 oct 31]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.085>
46. Thistle D. The deep-sea floor: An overview. In *Ecosystems of the Deep Oceans.* Elsevier Science. [Internet]. 2003; (28) 6 – 8. [Cited 2019 Abr 30]. Available at: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.473.3524&rep=rep1&type=pdf>
47. Couttolenc A. Estudio químico del hongo marino endófito *Curvularia trifolii* nativo del Sistema Arrecifal Veracruzano. [Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas]. [Internet]. Veracruz: Universidad Veracruzana. Centro de investigaciones Biomédicas ; 2015. Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/42482>
48. Zhang, W, Ding, W, Li, Y.-X, Tam C, Bougouffa S, Wang R. Marine biofilms constitute a bank of hidden microbial diversity and functional potential. *Nat. Commun.* [Internet]. 2019; 10 (1): 517. [Cited 2019 Abr 30]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08463-z>
49. Kossuga M, Et al. Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. *SciELO* [Internet] 2011; 22(2) [Cited 2018 may 06] Available at: DOI:10.1590/S0102-695X2011005000222

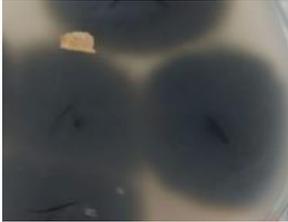
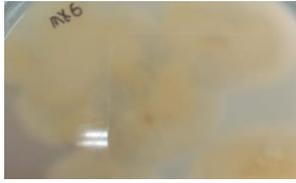
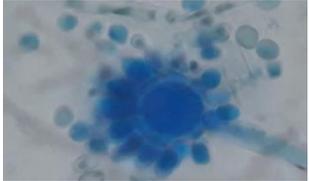
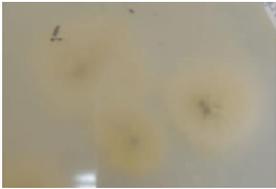
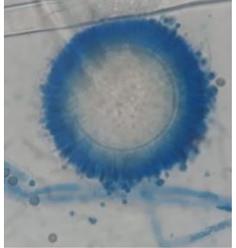
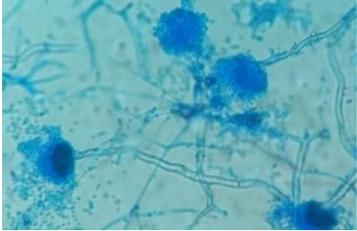
50. Invemar. Informe del estado de los ambientes y recursos marinos costeros de Colombia. [Internet]. 2017; 3. [Citado 2019 Abr 30]. Disponible en: http://www.invemar.org.co/documents/10182/14479/IER_2016_baja.pdf/4648b25a-fb94-4294-9ecb-a027abb3a211
51. Tortorella E, Tedesco P, Esposito F, Pascale D, January G, Fani R. Antibiotics from Deep-Sea Microorganisms: Current Discoveries and Perspectives. MAR DRUGS. [Internet]. 2018; 16 (10): 355. [Cited 2019 May 24]. Available at: doi: 10.3390/md16100355.
52. Tareq F, Lee H, Lee Y, Lee J, Shin H. Ieodoglucomide C and ieodoglycolipid, new glycolipids from a marine-derived bacterium *Bacillus licheniformis* 09IDYM23. J Lipids. [Internet]. 2015; 50 (1): 513-519. [Cited 2019 Abr 30]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4014-z>
53. Wu S, Liu G, Zhou S, Sha Z, Sun C. Characterization of Antifungal Lipopeptide Biosurfactants Produced By Marine Bacterium *Bacillus* sp. CS30. Mar Drugs. [Internet]. 2019; 17 (199): 4 - 20. [Cited 2019 Abr 30]. Available at: <https://doi.org/10.3390/md17040199>
54. Bhatnagar I, Kim S. Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds. Mar Drugs. [Internet]. 2010; 8 (10): 2673-2701. [Cited 2019 Mar 16]. Available at: <https://www.mdpi.com/1660-3397/8/10/2673/htm>
55. Betancur L, Forero A, Romero A, Sepúlveda L, Castellanos L, Ramos F. Cyclic tetrapeptides from the marine strain *Streptomyces* sp. PNM-161a with activity against rice and yam phytopathogens. J ANTIBIOT. [Internet]. 2019. [Cited 2019 Abr 30]. Available at: doi: 10.1038/s41429-019-0201-0
56. Betancur L, Naranjo S, Vinchira D, Moreno N, Castellanos L, Ramos F. Marine Actinobacteria as a source of compounds for phytopathogen control: An integrative metabolic-profiling / bioactivity and taxonomical approach. PLoS One. [Internet]. 2017. [Cited 2019 Abr 30]. Available at: DOI:10.1371/journal.pone.0170148
57. Chalearmsrimuang T, Ismail S, Mazlan N, Suasaard S, Dethoup T. Marine-derived fungi: A promising source of halo tolerant biological control agents against plant pathogenic fungi. J PURE APPL MICROBIO. [Internet]. 2019; 113 (1): 209-223. [Cited 2019 Abr 30]. Available at: DOI : <http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.13.1.22>
58. Sheng H, Wei Y, Wang X, Xu C, Shao X. The marine yeast *Sporidiobolus pararoseus* ZMY-1 has antagonistic properties against *Botrytis cinerea* in vitro and in strawberry fruit. Postharvest Biol Technol. [Internet]. 2019; 150: 1–8. [Cited 2019 Mar 25]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.12.009>
59. Tang X, Yan X, Fu W, Yi L, Tang B, Yu L, Et al. New B-Lactone with The Pathogenic Fungus Inhibitory Effect from Marine-Derived Fungus

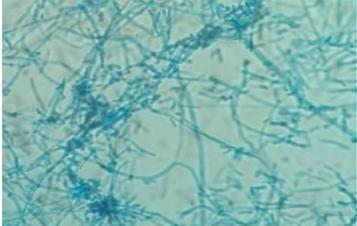
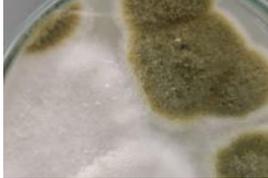
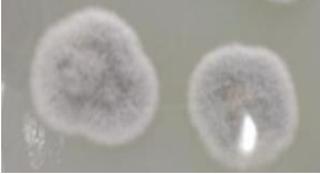
- MCCC3A00951. *J Agric Food Chem.* [Internet]. 2019; 67: 10. [Cited 2019 Mar 16]. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00228>
60. Chalearn Srimuang T, Izera S, Mazlan N, Suasaard, Dethoup T. Marine-Derived Fungi: A Promising Source of Halo Tolerant Biological Control Agents against Plant Pathogenic Fungi. *J Pure Appl Microbiol.* [Internet]. 2019; 13: 01. [Cited 2019 Mar 16]. Available at: <http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.13.1.22>
61. Wu Z, Chen J, Zhang X, Chen Z, Li T, She Z, Et al. Four New Isocoumarins and a New Natural Tryptamine with Antifungal Activities from a Mangrove Endophytic Fungus *Botryosphaeria ramosa* L29. *Mar Drugs.* [Internet]. 2019; 17: 2. [Cited 2019 Mar 16]. Available at: <https://doi.org/10.3390/md17020088>
62. Kjer J, Debbab A, Aly A, Proksch P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat. Protoc.* [Internet]. 2010; 5 (3): 479 - 490. [Cited 2019 Mar 16]. Available at: [doi:10.1038/nprot.2009.233](https://doi.org/10.1038/nprot.2009.233)
63. Maldonado L, Stach J, Pathom W, Ward A, Bull A, Goodfellow M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol.* [Internet]. 2005; 87 (1): 11 - 18. Available at: DOI: [10.1007/s10482-004-6525-0](https://doi.org/10.1007/s10482-004-6525-0)
64. Hameş E, Uzel A. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *J MICROBIOL METH.* [Internet]. 2012; 88: 342 – 347. [Cited 2019 Mar 16]. Available at: [doi:10.1016/j.mimet.2012.01.010](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.010)
65. Betancur L. Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos. Tesis Ph.D. Bogotá Colombia. [Internet] 2017. [Citado 2019 Mar 03]. Disponible en: http://bdigital.unal.edu.co/63733/1/LAB%20TESIS_Ver_Meritoria.pdf.
66. Ayala M, Et al. Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. *Fungal Biol.* [Internet]. 2017; 121 (11): 920 - 928. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.07.007>.
67. Linde G, Luciani A, Lopes A, Silveira J, Barros N. Long-term cryopreservation of basidiomycetes. *Braz. J. Microbiol.* [Internet]. 2018; 49: 220-231. [Cited 2019 Mar 03]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.004>
68. Duque P. Environmental Responses in Plants. *Methods and Protocols.* 2016. [Internet]. [Citado 2019 Abr 24]. Available at: [10.1007/978-1-4939-3356-3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3356-3)
69. Amal A, Mahmoud M, Sabet K, El Banna O. In vitro antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. *Saudi J Biol Sci.* [Internet]. 2010; 17 (2): 153-157. [Cited 2019 Mar 16]. Available at: [doi: 10.1016/j.sjbs.2010.02.009](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.02.009).
70. Diana Marcela Vinchira Villarraga. Protocolos cortos para screening de microorganismos para control biológico de fitopatógenos. *Ecología microbiana*

- del suelo. Instituto de Biotecnología de Universidad Nacional. 2017. [Diapositivas]. 8 diapositivas.
71. De la Rosa S, Martínez P, Gómez S, Corral M, Quintana P, Gómez N. Antifungal Activity of ZnO and MgO Nanomaterials and Their mixtures against *Colletotrichum gloeosporioides* Strains from tropical Fruit. J. Nanomater. [Internet]. 2018; 3: 1-9. [Cited 2019 May 12]. Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/3498527>
 72. Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., & Won, S. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. [Internet]. 2012; 62 (3), 716-721. [Cited 2019 Sep 29]. Available at: doi: 10.1099/ijs.0.038075-0.
 73. Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., & Tiedje, J. M. (2013). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis Nucleic Acids Res. [Internet]. 2014; 42(1), 633-642. [Cited 2019 Sep 29]. Available at: doi: 10.1093/nar/gkt1244
 74. Reyes A, Rincón G, Martínez Z, Quiñones E, López L. Lucha entre microbios: Una herramienta para el control de enfermedades de plantas. Rdu. [Internet]. 2015; 14 (11): 2-15. [Citado 2019 Sep 29]. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num11/art92/>
 75. Bauer K, Puyana M, Castellanos L, Tello E. New Diterpenes Isolated from the Colombian Caribbean Soft Coral *Pseudoplexaura flagellosa* and their Cytotoxic Properties. Rec. Nat. Prod. [Internet]. 2019; 13 (3): 243-253. [Cited 2019 Sep 16]. Available at: <http://doi.org/10.25135/rnp.100.18.07.325.1>
 76. Gutiérrez M, Holguin F, Bello R, Guillén K, Dunn M, Huerta G. Production of prodigiosin and chitinases by tropical *Serratia marcescens* strains with potential to control plant pathogens. World J Microbiol Biotechnol. [Internet]. (2012) 28: 145-153: Available at: DOI 10.1007/s11274-011-0803-6
 77. Gutiérrez M, Dunn M, Tinoco R, Holguin F, Huerta G, Guillén K. Potentiation of the synergistic activities of chitinases ChiA, ChiB and ChiC from *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 by chitobiase (Chb) and chitin binding protein (CBP). World J Microbiol Biotechnol. [Internet]. 30(1) 33-42 2013. Available at: DOI 10.1007/s11274-013-1421-2
 78. Palacio A, Cuetara M. Infecciones por hongos invasores en imágenes. Ars Medica. [Internet]. Barcelona. 2008. [Cited 2019 Sep 16]. Disponible en: <https://seq.es/wp-content/uploads/2011/02/imageneshongos.pdf>.
 79. Yi R, Ling Q, Jie J, Wu F, Chen J. Fruit internal brown rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on pitahaya in Guangdong province, China. Australas Plant Dis Notes. [Internet]. 2015; 10 (1): 10-13. Available at: DOI: 10.1007/s13314-015-0166-1

80. Kee Y, Suhaimi N, Zakaria L, Mohd M. Characterisation of *Neoscytalidium dimidiatum* causing leaf blight on *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. *Australas Plant Dis Notes*. [Internet]. 2017; 12 (1): 60. [Cited 2019 Sep 16]. Available at: DOI: 10.1007/s13314-017-0284-z.
81. Padin C, Fernandez G, Yegres F, Yegres N. *Scytaalidium dimidiatum*: hongo oportunista para el hombre y árboles de *Mangifera indica* en Venezuela. *REV IBEROAM MICOL*. [Internet]. 2005; 22 (3): 172-173. [Cited 2019 Sep 16]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(05\)70035-8](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70035-8)
82. Sánchez K, Blanco-M, Castro O. Etiología del cáncer del tallo provocado por *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz) en *Hylocereus costaricensis*, en Costa Rica. *Agron. Costarricense*. [Internet]. 2019; 43 (1): [Citado 2019 Sep 16]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15517/rac.v43i1.35646>
83. Mishra R, Barik R, Arif M, Malempati A. Right atrial fungal endocarditis with bilateral extensive pulmonary infiltration caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in an immunocompetent child: first case report from India. *Indian J Thorac Cardiovasc Surg*. [Internet]. 2016; 32 (1): 23-26. [Cited 2019 Sep 16]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12055-015-0405-2>
84. Madrid H, Ruíz M, Cano J, Stchigel A, Orofino R, Guarro J. Genotyping and in vitro antifungal susceptibility of *Neoscytalidium dimidiatum* isolates from different origins. *Int J Antimicrob Agents*. [Internet]. 2009;34 (4):351-354. [Cited 2019 Sep 16]. Available at: doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.05.006.
85. Backer M, Raponi M, Arndt G. RNA-mediated gene silencing in non-pathogenic and pathogenic fungi. *CURR OPIN MICROBIOL*. [Internet]. 2003; 5 (2). 323-329. [Cited 2019 Sep 16]. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00319-3)

Tabla 1. Características macroscópicas de aislamientos fúngicos

Muestra	Anverso	Reverso	Microscopia
30			
6			
50			
60			
15			

34			
4			  <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <div data-bbox="1179 667 1292 709">Blanca</div> <div data-bbox="1344 667 1458 709">Verde</div> </div>
19			
48			
36			
31			

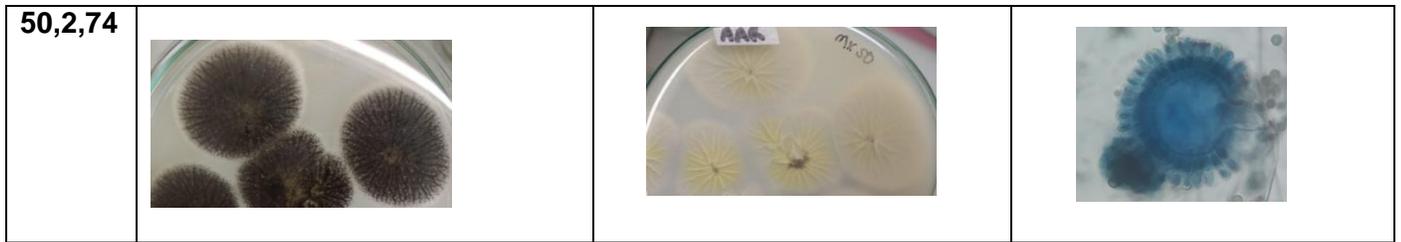


Tabla 2. Características microscópicas en tinción de Gram

AISLAMIENTO	DESCRIPCIÓN
82	Coco bacilos Gram negativos
68	Bacilos Gram positivos
68 (b)	Coco Gram negativos
54	Levaduras
15	Bacilos Gram positivos
15 (b)	Levaduras
31	Cocobacilos Gram negativos
77	Cocos Gram positivos
47	Cocos Gram negativos
30	Cocos Gram Negativos
64	Bacilos Gram positivos
25	Cocos Gram negativos
75	Levaduras y cocobacilos
84	Bacilos Gram positivos y levaduras
84 (b)	Cocos Gram negativos
24	Cocos Gram positivos
24 (b)	Bacilos Gram negativos
28	Bacilos Gram positivos y levaduras
21	Cocos Gram negativos
6	Levaduras
83	Cocobacilos Gram negativos y bacilos Gram positivos
53	Cocos Gram negativos y bacilos Gram positivos
17	Cocos Gram negativos y bacilos Gram positivos
47	Cocos Gram negativos y bacilos Gram positivos
58	Bacilos Gram negativos
78	Levaduras
49	Cocos Gram negativos
11	Cocos Gram negativos
62	Cocos y bacilos Gram positivos
42	Bacilos Gram negativos
72	Cocos Gram negativos, bacilos Gram negativos y levaduras
7	Levaduras
19	Cocos Gram negativos y levaduras
65	Bacilos Gram positivos y levaduras
35	Levaduras
12	Levaduras
76	Cocobacilos Gram negativos
18	Cocos Gram positivos

37	Levaduras
11	Levaduras
61	Bacilos Gram negativos y levaduras
79	Levaduras

Tabla 3. Métodos de conservación fúngica ensayados.

Muestra	Discos en 1.3 ml de glicerol al 10% y a -80°C	Discos en 1.3 ml de glicerol al 10%, nitrógeno y a -80°C	Suspensión de esporas en agua destilada estéril más 0.5 ml de glicerol al 25% y a -80°C	Suspensión de esporas en agua destilada estéril más 0.5 ml de glicerol al 25%, nitrógeno y a -80°C
4	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento
4 Cartagena	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento
6	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Contaminado	Contaminado
13 Cartagena	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Contaminado	Contaminado
15	Buen crecimiento	Contaminado	No creció	No creció
7 Cartagena	Buen crecimiento	Contaminado	Contaminado	Contaminado
30	Buen crecimiento	Contaminado	No creció	No creció
31	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento
34	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento
36	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Poco crecimiento	No creció
38	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento	No creció
48	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento
49	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Contaminado	Contaminado
60	Contaminado	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento
X maceración	Contaminado	Buen crecimiento	Buen crecimiento	Buen crecimiento
X	Buen crecimiento	Contaminado	Contaminado	Contaminado

Anexo 4. Porcentajes de daño en ensayo en hojas.

CONTROL SANO		
		
23,59%	0%	0%
		
1,64%	0%	0%
		
1,3%	1,9%	3,7%
Benomyl		
		
10.33%	94.52%	4.4%
		
0%	2.0%	0%

CONTROL PATÓGENO		
		
100%	93.25%	96.79%
		
91.4%	8.72%	8.3%
		
11.7%	97%	70.8%
406		
		
82.88%	6.92%	18.42%
		
94.1%	6.5%	5.3%
		
53.4%	65.3%	23.7%

34		
		
8.71%	2,09%	0%
		
100	12.1%	3.0%
		
5.0%	11.1%	5.6%
48		
		
100%	9.59%	64.9%
		
25.32%	9.5%	18.6%

		
37.1%	40.7%	33.7%
13C		
		
4.87%	0%	96%
		
2.69%	8.1%	4.7%
		
19.2%	27.4%	22%
447		
		
1.56%	57.07%	4.4%
		
61.53%	4.5%	2.6%

		
39.4%	27.2%	52.0%

482

		
---	---	---

4.33%	7.89%	49.59%
-------	-------	--------

		
---	---	---

42.5%	4.1%	11.1%
-------	------	-------

		
---	---	---

23.6%	81.8%	18.5%
-------	-------	-------

484

		
---	---	---

8.79%	9.35%	4.0%
-------	-------	------

		
---	---	---

0.27%	2.1%	2.7%
-------	------	------

		
8.1%	0%	0%

478

		
1.16%	3.62%	6.8%

		
2.82%	1.0%	5.1%

		
0%	9.2%	0%

486

		
5.04%	3.36%	39.9%

		
---	---	---

2.64%	4.8%	8.5%
		
0%	29.2%	40.8%

489		
		
41.03%	17.73%	15.1%
		
5.35%	3.0%	76.5%
		
26.4%	12.8%	56.8%

Anexo 5. Resultados ensayo *in vitro*

LECTURA	Porcentajes de daño									Promedio	Desviación Estándar
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Control sano	23,59	0	0	1,64	0	0	3,7	1,3	1,9	3,57	7,176
Benomyl	10,33	94,52	4,4	0	0	8,1	96,1	99,3		19,56	33,741
Control patógeno	93,25	96,79	91,4	8,72	8,3	11,7	96,1	99,3	70,8	64,04	39,300
406	82,88	6,92	94,1	18,42	5,3	6,5	53,4	65,3	23,7	39,60	32,885
34	8,71	2,09	0	100	12,1	3,0	5,0	11,1	5,6	16,39	29,806
48	100,00	9,59	64,9	25,32	9,5	18,6	37,1	40,7	33,7	37,71	27,383
13C	4,87	0	96,0	2,69	8,1	4,7	19,2	27,4	22,0	20,56	28,150
447	1,56	57,07	4,4	61,53	4,5	2,6	39,4	27,2	52,0	27,82	23,870
482	4,33	7,89	42,5	49,59	4,1	11,1	23,6	81,8	18,5	27,05	24,703
484	8,79	9,35	4,0	0,27	2,1	2,7	8,1	0	0	3,91	3,644
478	1,16	3,62	6,8	2,82	1,0	5,1	0	9,2	0	3,30	3,014
486	5,04	3,36	39,9	2,64	4,8	8,5	0	29,2	40,8	14,93	15,804
489	39,31	17,73	13,6	10,71	3,0	76,5	26,4	12,8	42,8	26,99	21,502

Se realizó el Test de Grubbs con el fin de determinar datos atípicos y poder evaluar de mejor forma los resultados.

Muestra	Prueba de Grubbs								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control sano	2,79	0,50	0,50	0,27	0,50	0,50	0,02	0,32	0,23
Benomyl	0,27	2,22	0,45	0,58	0,58	0,34			
Control patógeno	0,74	0,83	0,70	1,41	1,42	1,33	0,82	0,90	0,17
406	1,32	0,99	1,66	0,64	1,04	1,01	0,42	0,78	0,48
34	0,26	0,48	0,55	2,81	0,14	0,45	0,38	0,18	0,36
48	2,27	1,03	0,99	0,45	1,03	0,70	0,02	0,11	0,15
13C	0,56	0,73	2,68	0,63	0,44	0,56	0,05	0,24	0,05
447	1,10	1,23	0,98	1,41	0,97	1,06	0,49	0,02	1,01
482	0,92	0,78	0,63	0,91	0,93	0,64	0,14	2,22	0,35
484	1,34	1,49	0,02	1,00	0,51	0,34	1,15	1,07	1,07
478	0,71	0,11	1,16	0,16	0,75	0,60	1,10	1,95	1,10
486	0,63	0,73	1,58	0,78	0,64	0,41	0,94	0,91	1,64
489	0,57	0,43	0,62	0,76	1,12	2,30	0,03	0,66	0,74
G Tabulado (10)				2,290					
G Tabulado (9)				2,215					
G Tabulado (6)				1,887					

Resultados obtenidos sin dato atípico

LECTURA	Porcentajes de daño								Promedio	Desviación estándar
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Control sano	0	0	1,64	0	0	3,7	1,3	1,9	1,07	1,19
Benomyl	10,33	4,4	0	0	8,1				4,57	3,82
Control patógeno	93,25	96,79	91,4	8,72	11,7	96,1	99,3	70,8	71,00	34,01
406	82,88	6,92	94,1	18,42	6,5	53,4	65,3	23,7	43,89	30,57
34	8,71	2,09	0	12,1	3,0	5,0	11,1	5,6	5,94	3,83
48	9,59	64,9	25,32	9,5	18,6	37,1	40,7	33,7	29,93	16,28
13C	4,87	0	2,69	8,1	4,7	19,2	27,4	22,0	11,13	9,03
447	57,07	4,4	61,53	4,5	2,6	39,4	27,2	52,0	31,10	21,99
482	4,33	7,89	42,5	49,59	4,1	11,1	23,6	18,5	20,21	15,35
484	8,79	4,0	0,27	2,1	2,7	8,1	0	0	3,23	3,10
478	1,16	3,62	6,8	2,82	1,0	5,1	0	0	2,57	2,18
486	5,04	3,36	39,9	2,64	4,8	8,5	0	29,2	11,69	12,88
489	39,31	17,73	13,6	10,71	3,0	26,4	12,8	42,8	20,80	12,49