



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD IRAPUATO

Evaluación de la actividad antifúngica del filtrado libre de células (FLC) de *Aspergillus niger*
ATCC 1015 sobre *Fusarium oxysporum* KFM05 de agave.

Tesis que presenta
LQA. Estefanía Espinoza Márquez

Para Obtener el Grado de
Maestra en Ciencias
En la especialidad de Biotecnología de Plantas.

Directora de Tesis.
Dra. Dora Linda Asunción Guzmán Ortiz.

Irapuato, Guanajuato

Agosto, 2017.

UBICACIÓN DEL TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Micotoxinas, Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, bajo la dirección de la Dra. Dora Linda A. Guzmán de Peña.

Irapuato, Guanajuato. Agosto, 2017

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el financiamiento económico que otorgó para la realización de este proyecto.

Al CINVESTAV- Irapuato por ofrecerme un espacio para continuar el desarrollo de mi formación en el área de investigación.

A mi familia por su guía y apoyo incondicional.

A la Dra. Doralinda Guzmán por la enseñanza y orientación que me brindó durante la realización de este proyecto, así como de su apoyo y amistad.

Al Dr. José Ruíz y al Dr. Octavio Martínez por sus observaciones y opiniones que enriquecieron y perfeccionaron mi forma de trabajo.

Al Laboratorio de Desarrollo y diferenciación de hongos por su atenta ayuda para el uso equipo y técnicas.

Al laboratorio de Microbiología ambiental y sus estudiantes por su apoyo.

Al Cinvestav -Querétaro en especial a los estudiantes del laboratorio de Propiedades multifuncionales nanométricas Eleazar León y Edgar Cruz por su aporte en este proyecto.

A mis compañeras y amigas de laboratorio Magda, Viviana, Rocío, Lupita y en especial a Karina por su ayuda y por los momentos divertidos.

A Laura Valdés por su ayuda en experimentos y aclaración de dudas.

Al Dr. Lino Sánchez por su ayuda con las técnicas de microscopía y por su amistad.

A Dora Elia, Diana y Juan Pablo por los apoyos administrativos

A mis compañeros de generación por compartir esta etapa conmigo.

A mis amigos Ana Laura, Eliana, Hugo, Luis Fer y Pablo por darme siempre ánimo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUCCIÓN.....	17
I. HIPÓTESIS.....	36
II. OBJETIVOS.....	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
1. Cepas utilizadas.....	38
2. Medios de cultivo.....	38
2.1 Medio de cultivo líquido.....	39
2.2 Inoculación y condiciones de cultivo.....	39
2.2.1 Conservación de las cepas utilizadas.....	39
2.2.2 Obtención del inóculo.....	39
2.2.3 Condiciones de incubación.....	40
2.3. Reactivos para microscopía.....	40
2.3.1 Componentes utilizados para las observaciones por microscopía de luz.....	40
2.3.2 Componentes del kit de tinción de ácidos nucleicos.....	40
2.3.3 Componentes utilizados para las observaciones por la técnica de Microscopía de Fuerza Atómica.....	41

IV. MÉTODOS EXPERIMENTALES	42
4.1 Determinación de la actividad antagónica de <i>Aspergillus niger</i> sobre diversos hongos fitopatógenos por medio de confrontaciones en medio sólido.....	42
4.2 Producción del Filtrado Libre de Células de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015.....	43
4.3 Liofilización del FLC de <i>A. niger</i> ATCC 1015.....	43
4.4 Efecto del Filtrado Libre de Células de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 sobre <i>Fusarium oxysporum</i> KFM05.	43
4.5 Efecto del Filtrado Libre de Células de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 sobre el Crecimiento radial de <i>Fusarium oxysporum</i> KFM05 de agave.	45
4.6 Efecto del FLC de <i>Aspergillus niger</i> sobre la viabilidad e integridad de las esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	46
4.6.1. Determinación del efecto del Filtrado Libre de Células de <i>Aspergillus niger</i> sobre la viabilidad de las esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> KFM05 por tinción utilizando el kit LIVE/DEAD en medio líquido.....	46
4.7 Determinación del efecto del FLC sobre la morfología y las características elásticas de la pared de <i>F. oxysporum</i> KFM05 por Microscopía de Fuerza Atómica.....	46
4.7.1 Protocolo para las mediciones mecánicas por Microscopía de Fuerza Atómica.....	47
4.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del FLC de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 sobre <i>F. oxysporum</i> KFM05.....	48
4.8.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del FLC de <i>A. niger</i> sobre <i>F. oxysporum</i> KFM05 de agave por medio de la evaluación del crecimiento micelial en medio líquido.....	48

4.8.2 Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del FLC de <i>A. niger</i> sobre <i>F. oxysporum</i> en medio sólido.....	51
--	----

V. RESULTADOS..... 51

5.1 Determinación de la actividad antagónica de *Aspergillus niger* sobre diversos hongos fitopatógenos por medio de confrontaciones en medio sólido..... 51

5.1.1. *Aspergillus niger* vs *Fusarium oxysporum* KFM05 de agave..... 51

5.1.2 *Aspergillus niger* vs *Alternaria alternata*..... 65

5.1.3. *Aspergillus niger* vs *Sclerotium cepivorum*..... 56

5.2. Producción del Filtrado Libre de Células de *Aspergillus niger* ATCC 1015 y su procesamiento..... 59

5.3 Efecto del Filtrado Libre de Células de *Aspergillus niger* ATCC 1015 sobre *Fusarium oxysporum* KFM05..... 62

5.3.1. Características de la germinación de *Fusarium oxysporum* KFM05 de agave en condiciones *in vitro*..... 63

5.3.1.1 Determinación del tiempo de germinación de *Fusarium oxysporum* KFM05 de agave en medio líquido..... 64

5.3.1.2 Determinación del Porcentaje de Germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* con 8 y 10 horas de incubación en medio líquido..... 64

5.3.2 Efecto del Filtrado Libre de Células de *Aspergillus niger* ATCC 1015 sobre la germinación de *Fusarium oxysporum* KFM05..... 66

5.4 Efecto del Filtrado Libre de Células de *Aspergillus niger* ATCC 1015 sobre el Crecimiento de *Fusarium oxysporum* KFM05 de agave.....68

5.4.1 Crecimiento radial de <i>Fusarium oxysporum</i> expuesto al Filtrado Libre de Células de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 en medio sólido.....	69
5.5 Efecto del Filtrado Libre de Células de <i>Aspergillus niger</i> sobre la viabilidad e integridad de las esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>.....	75
5.5.1 Determinación del efecto del Filtrado Libre de Células de <i>Aspergillus niger</i> sobre la viabilidad de las esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> KFM05 por tinción utilizando el kit LIVE/DEAD en medio líquido.....	75
5.6 Análisis de la integridad de las esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> KFM05 de agave tratadas con el Filtrado Libre de Células de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 por medio de Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).....	79
5.7 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del FLC de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 sobre <i>Fusarium oxysporum</i> KFM05.....	80
5.7.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del FLC de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	80
5.7.2. Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del FLC de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	81
5.7.3. Evaluación de la relación lineal entre el efecto fungicida del FLC de <i>A. niger</i> sobre el crecimiento de UFC de <i>F. oxysporum</i> KFM05 por análisis estadístico en R.....	85
5.7.4.1. Datos numéricos y sus características dentro de cada variable.....	86
5.7.4.2. Datos de la concentración en mg FLC / 100 µl de FLC de <i>A. niger</i> , en el eje x, y los valores de UFC en el eje y.....	87
5.7.4.3. Relación entre los datos de los valores de logUFC contra los valores de concentración de FLC.....	88

5.7.4.4. Resumen de la adaptación del modelo lineal de la relación entre la concentración de FLC y el LogUFC.....	88
5.7.4.5. Resumen de la adaptación del modelo lineal de la relación entre los diferentes Experimentos y el log10 UFC.....	90
5.7.4.6. Intervalos de confianza previstos para los valores LogUFC ajustados al 95% de confianza, dentro de la relación lineal entre LogUFC y la concentración de FLC.....	91
5.7.4.7. Intervalos de confianza previstos para los valores LogUFC ajustados al 99% de confianza, obtenidos de la relación lineal entre LogUFC y la concentración de FLC.....	92
5.7.4.8. Modelo de la relación lineal entre los valores de FLC (mg/100 µl) de <i>A. niger</i> y de logUFC que entran dentro de los límites de confianza del 95 %	93
VI. DISCUSIÓN.....	95
VII. CONCLUSIONES.....	103
VIII. PERSPECTIVAS.....	105
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> en forma individual y en confrontación.	53
Figura 2. Crecimiento micelial de <i>Alternaria alternata</i> y <i>Aspergillus niger</i> en forma individual y en confrontación.	56
Figura 3. Crecimiento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> y <i>Aspergillus niger</i> en forma individual y en confrontación.	59
Figura 4. Esporas de <i>F. oxysporum</i> incubadas a diferentes tiempos de incubación en medio líquido.	64
Figura 5. Esporas germinadas de <i>F. oxysporum</i> a las 8 y 10 horas de incubación.....	66
Figura 6. Efecto del FLC de <i>Aspergillus niger</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> a diferentes tiempos.	68
Figura 7. Crecimiento radial de <i>F. oxysporum</i> expuesto a diferentes concentraciones de FLC de <i>A. niger</i> a través del tiempo en medio sólido PDA.....	71
Figura 8. Crecimiento radial de <i>Fusarium oxysporum</i> expuesto o no a FLC de <i>Aspergillus niger</i> en medio sólido a diferentes de incubación.....	72
Figura 9. Crecimiento radial de <i>F. oxysporum</i> expuesto o no al FLC de <i>Aspergillus niger</i> en medio sólido a los 8 días de incubación.....	73
Figura 10. Tinción de fluorescencia con el kit LIVE/DEAD de esporas de <i>F. oxysporum</i> tratadas con FLC de <i>A. niger</i> a diferentes tiempos con concentraciones de (a) 0 µg FLC/100 µl y (b) 930 µg FLC/100 µl. La numeración indica los tiempos de incubación de las esporas, siendo de 24, 48 y 120 horas para los números (1), (2) y (3), respectivamente.....	77
Figura 11. Imágenes del módulo de elasticidad (GPa) obtenidas por rastreo de resonancia en Microscopía Acústica de Fuerza Atómica (MAFA) de las esporas de <i>F. oxysporum</i> KFM05 tratadas con FLC	

de *A. niger* a concentraciones de (a) 0 µg FLC/100 µl y (b) 930 µg FLC/100 µl incubadas en medio líquido durante 19 horas.....**80**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> en forma individual y en confrontación.....	52
Tabla 2. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PIRC) de <i>F. oxysporum</i> a diferentes tiempos.	52
Tabla 3. Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Alternaria alternata</i> en forma individual y en confrontación.	54
Tabla 4. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PIRC) de <i>Alternaria alternata</i> a diferentes tiempos.	55
Tabla 5. Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Sclerotium cepivorum</i> en forma individual y en confrontación.	57
Tabla 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Sclerotium cepivorum</i> a diferentes tiempos	58
Tabla 7. Producción y rendimiento de los metabolitos de <i>A. niger</i> ATCC 1015.....	61
Tabla 8. Producción del liofilizado (mg) del FLC de <i>A. niger</i> obtenido de las fracciones de los lotes.....	62
Tabla 9. Porcentaje de germinación de las esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> KFM05 incubadas a diferentes tiempos en medio líquido PDB.....	65
Tabla 10. Efecto del FLC de <i>A. niger</i> sobre el porcentaje de germinación (%) de <i>F. oxysporum</i> en el transcurso del tiempo en medio líquido.....	67
Tabla 11. Medición del crecimiento radial de <i>F. oxysporum</i> expuesto al FLC de <i>A. niger</i> en medio sólido PDA a través del tiempo.....	70
Tabla 12. Velocidad de crecimiento radial y capacidad de esporulación de <i>F. oxysporum</i> KFM05 después de 8 días de incubación en medio sólido con FLC de <i>A. niger</i> a diferentes concentraciones.....	74
Tabla 13. Valores de porcentaje de viabilidad de las esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> tratadas con FLC de <i>A. niger</i> en medio líquido a diferentes tiempos.....	76
Tabla 14. Determinación de la CMI del FLC de <i>A. niger</i> sobre <i>F. oxysporum</i> KFM05 de agave por medio de la evaluación del crecimiento micelial en medio líquido.....	81
Tabla 15. Valores de UFC como indicativo del efecto del FLC sobre la viabilidad de <i>F. oxysporum</i> . Experimento 1.....	82

Tabla 16. Valores de UFC como indicativo del efecto del FLC sobre la viabilidad de <i>F. oxysporum</i> . Experimento 2.....	83
Tabla 17. Valores de UFC como indicativo del efecto del FLC sobre la viabilidad de <i>F. oxysporum</i> . Experimento 3.....	84
Tabla 18. Inhibición de la viabilidad de las esporas de <i>F. oxysporum</i> por el FLC <i>A. niger</i> expresada como porcentaje.....	85

RESUMEN.

Fusarium spp., ha sido uno de los géneros de hongos fitopatógenos más incidentes y devastadores de cultivos en el planeta en los últimos años. El control de hongos del género *Fusarium* ha sido considerado un reto importante para la medicina y la agricultura, ya que miembros relevantes en las áreas clínica y agrícola de este género son resistentes a la mayor parte de los antifúngicos actualmente utilizados, tales como los azoles, las equinocandinas y los polienos. Una alternativa para evitar que siga incrementando el grado de resistencia de estos patógenos ante el uso de los productos químicos, así como el daño ambiental y el severo riesgo para la salud humana que estos representan, es el uso de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana provenientes de plantas o microorganismos.

Los hongos filamentosos, producen una serie de diversos metabolitos secundarios que son moléculas cuya actividad ha sido de gran importancia contribuyendo a controlar las enfermedades en cultivos y animales. Algunos metabolitos secundarios sintetizados por hongos presentan actividad antimicrobiana lo que les brinda capacidad antagónica en su ambiente natural provocando una baja incidencia de hongos patógenos en áreas cercanas a su presencia. Un ejemplo de estos es el hongo *Aspergillus niger*. Este es un saprófito del suelo que, a través de diversos estudios, ha demostrado ser un agente potencial para el control biológico de diversos microorganismos fitopatógenos tales como *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium udum*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*. Estudios preliminares realizados en el Laboratorio de Micotoxinas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN en donde se evaluó la actividad de los metabolitos secundarios producidos por *Aspergillus niger* ATCC 1015 sobre el hongo productor de aflatoxinas *Aspergillus parasiticus*, mostraron que

éstos provocan la supresión en la producción de aflatoxinas, inhiben en el crecimiento micelial, y son capaces de producir la lisis de las esporas.

Debido a estas evidencias, en este trabajo se estudió el efecto de los metabolitos secundarios de *Aspergillus niger* ATCC 1015 secretados al medio líquido, sobre el hongo causante de la marchitez en el agave *Fusarium oxysporum* KFM05, que es una enfermedad económicamente importante en México.

Nuestros resultados indicaron que el Filtrado Libre de Células (FLC), que es el filtrado del cultivo de *A. niger* en medio líquido, provoca un efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas, inhibe la formación de micelio en cultivo líquido y disminuye la velocidad de crecimiento radial de forma muy notoria en medio sólido. Se observó que el FLC disminuye la viabilidad de las esporas, en un 98% de esporas viables totales al quinto día de incubación. También se determinó su Concentración Mínima Inhibitoria, siendo de 2.3 mg de FLC, la que tiene un efecto fungicida total sobre 1×10^4 esporas de *F. oxysporum*.

Por medio de la técnica de Microscopía de Fuerza Atómica, se determinó el grado de daño que causó el FLC de *A. niger* sobre la pared celular de las esporas de *F. oxysporum*. Los resultados demostraron que la exposición de las esporas al FLC provocó un ablandamiento de ella.

Los resultados obtenidos en estos ensayos indican que el FLC de *A. niger* tiene potencial para utilizarse como una alternativa para controlar a los hongos del género *Fusarium* causantes de enfermedades en plantas.

ABSTRACT.

Fusarium spp., has been one of the most incidental and devastating phytopathogenic fungi in the world in recent years. Controlling the fungus of the genus *Fusarium* has been considered a major challenge for medicine and agriculture, since relevant members of this genus in the clinical and agricultural areas are resistant to most of the antifungal agents currently used, such as azoles, echinocandins and polyenes. An alternative to avoid increasing the degree of resistance of these pathogens to the use of chemicals, as well as the environmental damage and the serious risk to human health that these compounds represent, is the use of secondary metabolites with antimicrobial activity from plant or microbial extracts. Filamentous fungi produce a series of various secondary metabolites that are molecules whose activity has been of great importance contributing to the ability to control diseases in crops and animals. Some secondary metabolites synthesized by fungi present antimicrobial activity which gives them an antagonistic capacity in their natural environment reducing the incidence of pathogenic fungi in nearby areas. An example of his kind of microorganisms is *Aspergillus niger*. This is a soil saprophyte which, various studies, have shown to be a potential agent for the biological control of various phytopathogenic microorganisms such as *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium udum*, *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*. Preliminary studies carried out in our laboratory evaluated the activity of the secondary metabolites produced by *Aspergillus niger* ATCC 1015 over the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus parasiticus*, showing that these metabolites cause suppression in the production of aflatoxins, inhibit mycelial growth , and cause lysis of the spores. Due to these evidences, in this work we studied the effect of the secondary metabolites of *Aspergillus niger* ATCC 1015 secreted to the culture in liquid medium, on the fungus *Fusarium oxysporum* KFM05, responsible for wilting in agave plants, which is a disease economically

important

in

Mexico.

Our results indicated that the *A. niger* FCF, the Free Cell Filtration obtained from *A. niger* liquid culture, provokes an inhibitory effect on spore germination, inhibits the formation of mycelium in liquid culture and decreases the radial growth rate in solid medium. It was observed that FCF decreases the viability of the spores by 98%, the fifth day of incubation. Their minimum Inhibitory Concentration was also determined, being 2.3 mg of FCF, which has a total fungicidal effect on 1×10^4 spores of *F. oxysporum*. By means of the atomic force microscopy technique, the degree of damage caused by the *A. niger* FCF on the cell wall of the *F. oxysporum* spores was determined. The results showed that the exposure of the spores to the FCF caused its softening. The results obtained in these experiments indicate that *A. niger* FCF has potential to be used as an alternative to control fungi belonging to the genus *Fusarium* responsible for causing wilt diseases in plants.

INTRODUCCIÓN.

Interacciones Microbianas.

La biosfera es donde los organismos vivos interactúan con las rocas y minerales (geosfera), el agua (hidrosfera), la atmósfera y la materia orgánica muerta (detritosfera). El hábitat del suelo se define como la totalidad de los organismos vivos que habitan el suelo, incluidas las plantas, los animales y los microorganismos, y su entorno abiótico tienen un efecto final en el suelo que se ajusta al crecimiento y desarrollo de plantas superiores. Algunas de las interacciones entre poblaciones dentro de una comunidad son benéficas para una población en particular, mientras que para otras son perjudiciales. Estas interacciones positivas y negativas mantienen un balance ecológico dentro de la comunidad (Eldor, 2007). Las posibles interacciones entre las poblaciones microbianas pueden ser reconocidas como interacciones negativas (competitividad y amensalismo); interacciones positivas (comensalismo, sinergismo y mutualismo); y las interacciones que son positivas para una población, pero negativas para otra (parasitismo y depredación) (Alexander, 1971).

Aprendiendo a controlar las actividades de los microorganismos dañinos y favoreciendo los procesos provocados por los organismos beneficiosos, es posible contribuir de muchas maneras a la capacidad para controlar las enfermedades en cultivos y animales.

Una de las interacciones cuyo estudio nos ayuda a comprender como pueden aprovecharse las sustancias sintetizadas por microorganismos para el control de otros microorganismos patógenos, es el amensalismo. El amensalismo es una interacción que explica como los microorganismos condicionan su entorno excretando metabolitos orgánicos o inorgánicos

deletéreos a poblaciones cohabitantes o transitorias, sustancias que pueden servir como reguladores químicos de la composición de la comunidad. (Alexander, 1971).

Amensalismo.

Las toxinas sintetizadas microbiológicamente se separan en tres categorías: sustancias inorgánicas, orgánicas de baja potencia y compuestos orgánicos altamente tóxicos. Los inhibidores inorgánicos tales como el peróxido de hidrógeno, amoníaco, nitrito, CO₂, O₂ y H₂S están implicados en cambios biológicos en la naturaleza, y su importancia, desafortunadamente, es a menudo pasada por alto. Según su nivel de potencia, cada tipo de toxina se sintetiza en la concentración necesaria para su actividad, la que en algunos casos es grande, pero frecuentemente solo se requieren cantidades mínimas para causar un efecto inhibitorio contra organismos específicos. Un ejemplo son los inhibidores orgánicos, como los ácidos grasos simples y el etanol, que deben estar presentes en altas concentraciones para tener un efecto eficaz sobre microorganismos adyacentes, pues así se requiere debido a su baja potencia. Los inhibidores orgánicos altamente potentes son excretados por un conjunto diverso de heterótrofos y fotoautótrofos. Estos son generalmente metabolitos químicamente complejos, y a ellos se les aplica el término antibiótico. (Alexander, 1971).

Aunque la elaboración de un principio antimicrobiano puede ser ventajosa para el productor y contribuye en el éxito en la competencia, esta no es una determinante para que este organismo suprima a todas las poblaciones en la comunidad, pues pocos productos microbianos son tan potentes o no selectivos y las especies resistentes prosperarán en áreas donde los metabolitos son de hecho generados (Alexander, 1971).

El amensalismo tiene ocasionalmente un impacto generalizado. Un ejemplo es el caso de la protección de una célula contra la invasión por parásitos, cuyo efecto solamente tendrá influencia a distancias cortas de la célula o filamento responsable de la síntesis. En este sentido, los productos nocivos producidos en el amensalismo pueden verse como factores que contribuyen a la constitución de la comunidad y no como los únicos determinantes responsables de la dominación de una especie en particular. (Alexander, 1971).

Con respecto a las interacciones microbianas ha habido pocos informes de investigación sobre casos documentados de amensalismo. Esto puede deberse a la dificultad de resolver el límite entre el amensalismo, el parasitismo y la competencia. Existen reportes en donde se menciona la presencia de esta interacción, tales como el estudio de la interacción entre dos cepas productoras de alcohol, *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* realizado por Bull y Slater (1982). Ellos investigaron el desarrollo y la aplicación de un sistema para la evaluación cuantitativa en tiempo real de las actividades celulares individuales en un sistema de cultivo mixto, encontrando que había inhibición en el crecimiento de *S. cerevisiae* por el acetaldehído producido por *Z. mobilis* en condiciones aerobias (Lartey, 2006).

Otro ejemplo en donde se observó la interacción de amensalismo, fue el estudio de Domínguez et al., (2014) quienes determinaron la naturaleza de la interacción a lo largo del tiempo de incubación, entre *Rhizobium etli* CE3 y *Saccharomyces cerevisiae*, sembrándolos en un cultivo mixto en medio líquido durante 9 días. Esto permitió establecer una relación causal entre los cambios en el medio ambiente causados por la levadura y su efecto sobre la naturaleza de la interacción. Al comienzo de la interacción, la levadura secretaba simultáneamente un inhibidor (ácido orótico, AO) del crecimiento bacteriano y promotores del crecimiento (C4-dicarboxilatos) que bloqueaban el efecto del AO, y permitía establecer una relación comensal. Cuando los

promotores de crecimiento se agotaron (cambio ecológico), la interacción cambió de comensalismo a amensalismo.

La interacción del amensalismo está relacionada con la capacidad de algunos microorganismos de producir antibióticos. Un ejemplo de estos estudios es el de Pandey et al. (2011), quienes aislaron 15 cepas de actinomicetos identificadas por su actividad antibacteriana, pero sólo seis aislados mostraron una buena producción de antibióticos. La actividad inhibitoria se evaluó contra 3 cepas de microorganismos (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*), y comprobaron que existía actividad de los compuestos contra el cultivo bacteriano por antibiograma, la mezcla de los compuestos intracelulares y extracelulares mostraron resultados positivos, los compuestos intracelulares no mostraron ninguna actividad inhibitoria, en cambio, los extracelulares formaron una zona de inhibición de 30 mm de inhibición contra *S. aureus* con una Concentración Mínima de 0,0009 mg /ml.

La metabolómica y su uso para el estudio de las interacciones microbianas.

Mediante el estudio del metaboloma, que es el conjunto completo de metabolitos dentro de un microorganismo, la supervisión del resultado global de las interacciones entre sus procesos de desarrollo y el medio ambiente puede proporcionar una imagen más exacta del estado fisiológico real de la célula. Actualmente, estudiar el metabolismo microbiano en el contexto comunitario (en oposición a los cultivos puros) revela nuevos fenotipos, permite cultivar los microorganismos “incultivables” y ayuda a diseñar comunidades sintéticas para el control biológico (Tang et al., 2011).

Sin embargo, cambiar la atención del metabolismo aislado de los cultivos puros al de las comunidades microbianas es un reto y requiere nuevas herramientas y métodos.

Entender las interacciones metabólicas a nivel global es indispensable en la ecología y evolución microbiana. La metabolómica se ha convertido recientemente en un enfoque clave para el estudio de las respuestas de las comunidades microbianas a los distintos fenómenos que ocurren durante sus interacciones. Sin embargo, este enfoque analítico sigue siendo muy difícil porque no existe una única técnica de extracción o análisis que sea adecuada para todos los metabolitos de bajo peso molecular. Entre las diferentes técnicas enlistadas para el análisis metabolómico se encuentran la espectrometría de masas (EM) y la resonancia magnética nuclear (RMN), que también siguen presentando problemas técnicos. (Gopal et al., 2012).

Diferentes ventajas e inconvenientes están asociados con cada sistema analítico. La separación de metabolitos por cromatografía combinada con la detección por MS (GC-MS) o LC-MS) constituye un medio poderoso para generar datos metabólicos multivariados. Sin embargo, se requiere un mayor desarrollo para lograr un estudio cuantitativo completo de todos los metabolitos sobre una gama dinámica significativa en un extracto de hongos. (Gopal et al., 2012).

Los crecientes intereses en la metabolómica a la ampliación continua de sus aplicaciones se evidencian a partir de una oleada de publicaciones en este campo desde el año 2003. Se cree que ha llegado el momento de iniciar una fase de integración de la biología de sistemas, que reúna el enfoque anterior y más tradicional de "recolectar" información celular de la organización biológica individual y su regulación (genómica, transcriptómica y proteómica). Como un complemento metabólico de la genómica funcional, la metabolómica permite un cuadro más completo porque los intermediarios de las reacciones bioquímicas desempeñan un papel crucial en la conexión de las diferentes vías que operan en una célula viva. (Jane Tang, 2011).

Múltiples estudios muestran que los intercambios de metabolitos entre los microorganismos constituyen una estrategia para el éxito del grupo. Las interacciones metabólicas frecuentemente contribuyen, a través de la división del trabajo, a las habilidades emergentes a nivel comunitario, como la biodegradación, el crecimiento más rápido, o el aumento de la virulencia. La aparición y el mantenimiento de los intercambios metabólicos dependen de circunstancias particulares, como la estructura espacial de la comunidad microbiana, la disponibilidad de nutrientes, las restricciones de difusión y la rentabilidad de los procesos biosintéticos en cuestión. Por otra parte, bajo condiciones pobres en nutrientes las especies pueden ser fácilmente incitadas a compartir los metabolitos y, por tanto, complementar las capacidades biosintéticas de cada uno.

A pesar de que el estudio de las interacciones metabólicas a nivel global no permite distinguir entre especies, estos resultados dan una idea de la complejidad y la escala de los ajustes metabólicos que ocurren en las comunidades "del mundo real". A mayor escala, la meta-proteómica, en combinación con la meta-genómica, permite revelar dependencias metabólicas, ya que una especie responde dinámicamente al cambio en la abundancia del otro. La metagenómica es una herramienta particularmente poderosa para discernir la identidad de las especies y para detectar patrones de asociaciones entre ellas. La transcriptómica y proteómica se utilizan comúnmente para complementar la metagenómica y para deducir qué codificado metabólico potencial del genoma se está utilizando (Ponomarova et al., 2015).

Metabolitos Secundarios y su uso contra las enfermedades de plantas.

Los hongos filamentosos producen una serie de diversos metabolitos secundarios que son moléculas pequeñas necesarias para el crecimiento normal o el desarrollo. El estudio de su actividad ha sido de gran importancia y estos han sido aprovechados generando un tremendo impacto en la sociedad. Algunos de los metabolitos secundarios son explotados por sus actividades antibióticas y farmacéuticas, otros están involucrados con interacciones relacionadas a enfermedades de plantas y animales. El papel de muchos de los metabolitos secundarios producidos por hongos sigue siendo un misterio. Muchos hongos viven como saprófitos en el suelo y tales moléculas pueden proporcionar protección contra otros habitantes en este nicho ecológico.

Las clases de metabolitos secundarios de hongos que han logrado aislarse e identificarse incluyen a los poliquétidos (por ejemplo, aflatoxinas y fumonisinas), péptidos no ribosómicos (por ejemplo, sirodesmina, peramina) y sideróforos tales como ferricrocin, terpenos (por ejemplo la toxina T-2, desoxinivalenol (DON), indol terpenos (por ejemplo, paxillina y Lolitrems) (Fox, 2008).

Los metabolitos secundarios mejor conocidos son los antibióticos, de los que se han descubierto más de 5000, cifra que aumenta a razón de una media aproximada de 300 por año, aunque la mayoría carecen de utilidad pues son tóxicos para los organismos. Aproximadamente el 75% de los antibióticos conocidos son producidos por actinomicetos. Algunas especies son excepcionales productores de antibióticos, por ejemplo, *Streptomyces griseus* produce al menos 40 antibióticos diferentes (Mateos, 2000).

Los antibióticos son productos orgánicos de microorganismos, que son perjudiciales en bajas concentraciones para el crecimiento y el metabolismo de otros microorganismos. Existen

varios reportes en donde se describe cómo la inhibición causada por antibióticos en el suelo ocurre como una forma de antagonismo. Un ejemplo es el estudio de Chang y Kommendahl (1968) y Kommendahl y Mew (1975) que inocularon granos de maíz con *Bacillus subtilis* o *Chaetomium globosum* y observaron protección contra la plaga de plántulas causada por *Fusarium roseum*; El patógeno aparentemente fue inhibido por los antibióticos producidos por los agentes de control biológico durante el período de máxima susceptibilidad. La bacteriosis de la corona causada por *Aspergillus tumefaciens* ha sido controlada por la cepa 84 de *Agrobacterium radiobacter*, que indujo la antibiosis después de la inoculación de las semillas o de las raíces de las plantas de vivero antes de la siembra (Kerr, 1972; Moore y Warren, 1979). También se sabe que las especies de *Streptomyces Pseudomonas*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus* producen antibióticos. Las fenaminas antibióticos producidos por *Pseudomonas aureofaciens* han sido descritas como clave para su antagonismo competitivo contra algunos patógenos fúngicos tales como *Geumanomuces graminis* (Pierson y Pierson, 1996). Según Aluko y Hering et al. (1970), *Trichoderma virens* produce dos antibióticos antifúngicos, gliotoxina y viridina y también un antibiótico no volátil que es activo contra *Heterobasidion annosum* y otros hongos. Tu et al. (1980) observaron la inhibición de la formación de esclerocios por *Sclerotinia sclerotiorum*; Además, los esclerocios que ya estaban formados fueron parasitados por *T. virens*. (Lartey, 2006).

Muchos otros metabolitos secundarios sintetizados por microorganismos tienen gran importancia para los seres humanos. Son ampliamente utilizados como ingredientes activos de fármacos en medicina (por ejemplo, muchos antibióticos, agentes antitumorales y antivirales se derivan de los metabolitos secundarios, al igual que los antipiréticos como la aspirina, alucinógenos como el LSD y fármacos hipolipemiantes como lovastatina), herbicidas o fitotoxinas en la agricultura, como aditivos alimentarios (color, aromas y edulcorantes),

fragancias e incluso como precursores para la síntesis de plásticos. La mayoría de estos nuevos metabolitos secundarios sólo se predice por el análisis bioinformático de “clusters” de genes putativos de metabolitos secundarios en genomas secuenciados, pero no se producen naturalmente en condiciones de laboratorio o están presentes en niveles que son demasiado bajos para ser detectados por métodos rutinarios (Breitling, 2013).

Control biológico de los patógenos de plantas:

El control biológico, utilizando microorganismos para suprimir las enfermedades de las plantas, ofrece una poderosa alternativa al uso de productos químicos sintéticos, los que representan un severo riesgo para la salud humana, contribuyen al aumento de la contaminación al medioambiente, y provocan la aparición de microorganismos altamente resistentes que conducen a enfermedades con mayor incidencia que antes (Monahim et al., 2011).

La rica diversidad del mundo microbiano proporciona un recurso muy amplio para el uso del control biológico. Aumentar la abundancia de una cepa en particular en el ambiente de una planta puede suprimir la enfermedad sin producir efectos duraderos en el resto de la comunidad microbiana u otros organismos en el ecosistema. El modo de acción del control biológico también puede ser más complejo que el control de una enfermedad que se basa en productos químicos sintéticos. La complejidad de las interacciones del organismo, la implicación de numerosos mecanismos de supresión de enfermedades por un solo microorganismo y la adaptabilidad de la mayoría de los agentes de biocontrol al medio en el que se utilizan, contribuyen a que se llegue a pensar que el biocontrol será más duradero que los químicos sintéticos.

Muchos agentes de biocontrol son difíciles de formular como productos. Una serie de organismos han tenido éxito en las parcelas de investigación, pero los problemas en el aumento de la producción, la formulación eficaz y la producción de un producto estable y barato, les han hecho debilitarse como productos prometedores de investigación que no llegan al mercado.

La prohibición del bromuro de metilo y varios otros fungicidas químicos ha reavivado el interés en los agentes de biocontrol microbiano contra fitopatógenos presentes en el suelo, en particular integrando otras prácticas agronómicas o variedades resistentes o tolerantes. Los mecanismos de acción de los agentes de biocontrol microbiano frente a patógenos vegetales incluyen la antibiosis directa, el parasitismo, la inducción de resistencia y la competencia por el espacio y los nutrientes. Algunos agentes microbianos también actúan como biofertilizantes y promotores de crecimiento de plantas fijando N_2 , solubilizando fosfatos, quelando Fe, produciendo sustancias similares a hormonas, degradando 1-aminociclopropano-carboxilato (ACC) deaminasa. Esta enzima degrada al precursor inmediato del etileno, degradando materia orgánica y liberando nutrientes en el suelo.

Varios microorganismos (estimados en unos pocos cientos de cepas) han demostrado eficacia en los últimos 50 años frente a patógenos y nemátodos transmitidos por el suelo (Pertot, 2015). Ha habido informes extensos sobre control de patógenos bacterianos utilizando otras bacterias. Por ejemplo, se aplicó *Pseudomonas fluorescens* para controlar a *Erwinia carotovora* causante de la pudrición blanda de la papa (Cronin et al., 1997). También se han aplicado agentes bacterianos para controlar otros patógenos de plantas tales como hongos y nemátodos. La bacteria *Pseudomonas putida* se aplicó para controlar la marchitez de *Fusarium* en rábano (De Boer et al., 2003) y *Paenibacillus* sp. 300 para controlar la marchitez de *Fusarium* del pepino. *Pseudomonas putida* se aplicó semanalmente al suelo durante las temporadas de riego entre

1997-1998 y suprimió las poblaciones de *Phytophthora parasiticum* en dos huertos de cítricos durante tres temporadas de cultivo (Steddom et al., 2002). Shaukat y Siddiqui (2003) observaron una inhibición significativa del nemátodo *Meloidogyne javanica* por *Rhizobia* antagonistas. Se han identificado y documentado varias especies de actinomicetos para controlar una variedad de patógenos vegetales en el suelo. En un estudio reciente en Turquía, se evaluaron 50 actinomicetos diferentes y 34% mostraron actividad antibacteriana contra al menos una de las seis bacterias fitopatógenas probadas, incluyendo *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora* y *Pseudomonas viridiflova* (Oskay et al., 2004). En un experimento de invernadero de dos años, *Streptomyces griseovirides* y el hongo *Gliocladium catenulatum* fueron los más efectivos en reducir la mortalidad de plantas por incidencia de *Pythium aphanidermatum* en pepinos (Punja y Yip, 2003). (Lartey, 2006).

Uso de *Aspergillus niger* como agente de control biológico:

Aspergillus niger es un miembro del género que incluye un conjunto de hongos que generalmente se consideran asexuales, aunque se han encontrado formas perfectas. Están ampliamente distribuidos geográficamente y se han observado en una amplia gama de hábitats porque pueden colonizar una amplia variedad de sustratos. *A. niger* es uno de los hongos que ha sido etiquetado con el estado GRAS (generalmente reconocido como seguro) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. Este organismo es un saprófito del suelo con una amplia gama de enzimas hidrolíticas y oxidativas implicadas en la descomposición de lignocelulosas de las plantas. Debido a su capacidad para producir ácidos orgánicos extracelulares algunos de ellos se utilizan comúnmente en la industria alimentaria. (Sharma R. et al., 2012)

En reportes previos se ha demostrado que *A. niger* presenta capacidad antagónica en su ambiente natural al provocar una baja incidencia de hongos patógenos en áreas cercanas a su presencia.

Uno de estos fue el estudio de Murthy y Bgyaraj (1978) quienes al estudiar la microbiota en la rizósfera de plantas de chícharo, observaron que cuando se encontraban concentraciones de unidades formadoras de colonias (UFC) de *A. niger* altas, las cantidades de UFC del patógeno de chícharo, *Fusarium udum*, eran bajas. Sin embargo, cuando las plantas de chícharo se encontraban enfermas, las cantidades de UFC de *A. niger* que se encontraban eran escasas. Fue así como ellos concluyeron que *A. niger* funciona como un organismo protector de las plantas de chícharo ejerciendo control biológico.

Pandey y Upadhyay (2000) reportan datos similares, en donde plantas sanas de chícharo presentaron una fuerte colonización por *A. niger* y *Penicillium sp*, contrario a lo que se encontró en plantas infectadas por *Fusarium udum*.

Mirsha et al. (2005) también estudiaron el efecto protector que ejerce *A. niger* sobre plantas de chícharo. Ellos observaron que al inocular suelo estéril con *F. udum*, se provocó una alta incidencia de marchitamiento en las plantas de chícharo cultivadas en este suelo. En cambio, cuando se inoculó suelo no esterilizado con *F. udum*, las plantas cultivadas presentaron una incidencia baja de la enfermedad.

Otro ejemplo del uso de *Aspergillus niger* como agente de control biológico, es el estudio descrito por Kandhari et al. (2000), quienes observaron que las raíces de plantas de melón sanas

estaban colonizadas por *A. niger*, en cambio las zonas de las plantas marchitas no presentaban poblaciones de *A. niger*. Los autores sugieren que *A. niger* es un agente potencial en el control biológico contra *Rhizoctonia solani*.

Además, se han realizado estudios *in vitro* que han identificado a *Aspergillus niger* como un agente potencial para su uso en el control biológico. Uno de estos ejemplos es el trabajo de Adebola et al. (2010), que utilizaron la técnica de doble cultivo para evaluar el potencial de tres especies de *Aspergillus*, *A. fumigatus*, *A. repens* y *A. niger* como agentes de control biológico contra *Phytophthora palmivora*, el patógeno de la enfermedad de la vaina negra del cacao. Los organismos de ensayo se aislaron de la misma granja de cacao donde se produjo la enfermedad. Los resultados revelaron que todos los antagonistas de ensayo controlaron eficazmente el crecimiento del patógeno. Los filtrados de cultivo de los hongos de ensayo también inhibieron el crecimiento de *P. palmivora* con *A. niger* mostrando el mayor porcentaje de inhibición (54%) y *A. repens* el menor (44,5%).

Otro ejemplo es el estudio de Sharma et al. (2011), quienes a diferentes tipos de agentes de control biológico como *Trichoderma* spp. (28 aislados), *Aspergillus niger* (un aislado), *Pseudomonas* spp. (10 aislados) y *Bacillus* spp. (13 aislamientos) de la rizosfera del cultivo y se les evaluó su eficacia *in vitro* frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi* (FOL). Entre ellos *A. niger* registró 74,0% de inhibición del crecimiento micelial de FOL seguido por *T. viride*-Tv5 (62,4%), *T. harzianum*-TM (61,1%), *B. subtilis*-Bs-2 (31,2%) y *P. fluorescens* - P - 3 (27,0%). De forma similar, se ensayaron todos los agentes de biocontrol frente a la incidencia de marchitez en condiciones de invernadero. Entre los tratamientos, *A. niger* registró una incidencia de marchitez del 0% en 30 y 45 días después de la inoculación, mientras que el efecto protector de la protección demostrada por *T. viride* (Tv5), *T. harzianum* (Th4) y *P. fluorescens* (P3) 30 días después la inoculación desaparece se descompone al 45º día después de la inoculación.

En un trabajo similar, Dwivedi et al. (2013) estudió la posibilidad de controlar las enfermedades causadas por *Fusarium solani* y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizando ocho agentes de control biológico, siendo, cuatro especies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. sulphureus*, *A. luchuensis*), dos especies de *Trichoderma* (*T. viride*, *T. koningii*) y dos especies de *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. italicum*). La evaluación de la fungotoxicidad se llevó a cabo mediante la mezcla de los extractos de las cepas agentes de control biológico en medio PDA a tres concentraciones diferentes, es decir, 25, 50, 75% (v/v) contra los que se sembraron los hongos de ensayo. Entre los diferentes bioagentes, *A. luchuensis* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se encontró significativamente superior al resto en el control del crecimiento de patógenos y mostró 100% de inhibición en todas las concentraciones, mientras que *A. niger* contra *F. solani* y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* fue más eficaz e inhibió completamente el crecimiento micelial a una concentración de 50 y 75%.

Uso de los metabolitos secundarios de *A. niger* como agentes antifúngicos.

Debido al potencial como agente de biocontrol que ha mostrado tener el hongo *A. niger*, como se han descrito en reportes anteriores, el interés por el estudio de la actividad de los metabolitos secundarios que este hongo produce ha incrementado.

En estudios preliminares, Rodríguez-Sixtos et al. (2011), evaluaron la actividad de los metabolitos secundarios producidos por *A. niger* ATCC1015 sobre el hongo fitopatógeno y productor de aflatoxinas *Aspergillus parasiticus*. Se observó que cuando la cepa *Aspergillus niger* 1015 era co-inoculada con el hongo *A. parasiticus*, presentaba una capacidad inhibitoria sobre la síntesis de aflatoxina B₁ mayor al 90%. Al utilizar el filtrado libre de células (FLC) de *A. niger* 1015 hubo inhibición en el crecimiento de *A. parasiticus* y la síntesis de aflatoxina B₁.

Se observó que el efecto de *A. niger* 1015 sobre *A. parasiticus* era retrasar el proceso de germinación, permitiendo que a los 7 días de incubación el hongo formara solamente primordios de colonias sin producción de aflatoxinas.

Se identificaron los componentes del filtrado libre de células de *A. niger* ATCC 1015 por Vicencio-Toriz (2015), utilizando la separación por peso molecular entre 3kDa y 1 kDa en una columna de cromatografía de fase reversa C-18 a pH 8 y pH 3. Las fracciones obtenidas se identificaron por DIESIS-MS y se utilizó la base de datos METLIN. Los grupos funcionales encontrados fueron: aminas, epóxidos, cetonas, hidrocarburos lineales e hidrocarburos aromáticos. Algunas de ellas también presentan estructuras conformadas por grupos de 2 a 3 aminoácidos unidos.

Vale la pena mencionar que las fracciones de 3 y 1 kDa y algunas de las fracciones obtenidas por fase reversa presentaban actividad inhibitoria del crecimiento de *A. parasiticus* (Vicencio-Toriz, 2015).

***Fusarium oxysporum* KFM05 de agave y su control.**

Los hongos de la especie *Fusarium oxysporum* son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas, que muestran un alto nivel de especificidad del huésped y, en base a las especies vegetales y cultivares de plantas que pueden infectar, se clasifican en más de 120 formas especiales. La enfermedad que provocan en diversos tipos de plantas es conocida como marchitez (Michielse, 2009).

Se ha reportado que la marchitez del agave *tequilana* Weber var. Azul, es causado por dos tipos de *Fusarium*: *F. oxysporum* y *F. solani* (Ávila-Miranda, 2010). En el trabajo de Ramírez-Ramírez (2017) se determinó la diversidad genética de aislamientos de *Fusarium* del tallo o el

tejido de la corona de plantas de agave con síntomas de marchitez de agave, evidenciando que *F. solani* está muy relacionado con esta enfermedad. Este descubrimiento agrega información que explica la alta incidencia y gravedad de esta enfermedad que se observa con frecuencia en los campos comerciales de agave, siendo necesario para diseñar mejores estrategias de su manejo de esta enfermedad. (Ramírez-Ramírez, 2017).

El control del hongo del género *Fusarium* ha sido considerado un reto importante ya que, además de provocar pérdidas importantes en un gran número de cultivos, han mostrado tener una capacidad alta para generar resistencia a los compuestos fungicidas que se utilizan para su tratamiento (Abdullah-M. S et al, 2016).

En el tratamiento de las enfermedades de plantas causadas por *Fusarium spp.* se utilizan fungicidas sistémicos como los benzimidazoles, en este grupo se incluyen el benomilo, carbendazim, tiabendazol, y tiofanato. (Villa-Martínez, 2014). Los fungicidas sistémicos son absorbidos por las plantas brindando la ventaja de funcionar como un tratamiento interno cuyo modo de acción es altamente específico. Este modo de acción, más que ser una de sus fuerzas aparentes, ha demostrado ser una debilidad grave, ya que un número significativo de patógenos han desarrollado resistencia a estos compuestos (Fernández-Ortuño, 2008).

Control biológico de *Fusarium oxysporum*.

Varios informes han demostrado previamente el uso exitoso de agentes de control biológico contra las enfermedades de marchitez causadas por *Fusarium*. La mayoría de estos agentes han sido aislados de suelos naturalmente supresores de la enfermedad provocada por los hongos de este género. En estos suelos, la incidencia de la enfermedad sigue siendo baja, a pesar de la presencia de un huésped susceptible y del patógeno. Los organismos que contribuyen a esta supresión incluyen a *F. oxysporum* (no patógeno), *Bacillus spp.*, *Trichoderma spp.*, *Pseudomonas spp.* y actinomicetos. Los principales grupos de organismos que controlan las enfermedades de la marchitez de *Fusarium* son especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, y *F. oxysporum* no fitopatogénos. Se ha reportado que varios otros microorganismos reducen la incidencia de la marchitez causada por *Fusarium*. Estos incluyen actinomicetos y hongos tales como *Trichoderma spp.* y *Gliocladium spp.* Los organismos de biocontrol por sí solos tienen la capacidad de reducir la incidencia de la enfermedad, pero a menudo se comportan de manera más eficiente cuando se usan en combinación con otros agentes de control biológico y con diferentes estrategias integradas de manejo de enfermedades. (Belgrove, 2007).

Las cepas no patógenas de *F. oxysporum* muestran varios modos de acción que contribuyen a su capacidad de control biológico. Son capaces de competir por nutrientes en el suelo, afectando la tasa de germinación de las clamidosporas de *F. oxysporum*. También pueden competir por sitios de infección en la raíz, y pueden desencadenar reacciones de defensa en las plantas, que inducen resistencia sistémica. Esto se explica porque en suelos supresores, las interacciones entre cepas patógenas y no patógenas dan como resultado el control de la enfermedad. Por lo tanto, las cepas no patógenas se desarrollan como agentes de biocontrol.

Estos mecanismos son más o menos importantes y dependiendo de la cepa *F. oxysporum* no patógena es fácil de producir en masa y obtener formulaciones, pero aún no se han determinado las condiciones de aplicación para la eficacia del biocontrol en condiciones de campo.

Otro ejemplo en donde se mencionan agentes de biocontrol contra *Fusarium* es el estudio de Akköprü et al. (2005), que evaluaron los efectos del hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* y cuatro rizobacterias (RB) sobre el patosistema de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersi* (FOL) en tomate, examinando los parámetros morfológicos (peso de raíz fresca y seca) y concentración de fósforo (P) en las raíces. Los tratamientos con inoculación simple y doble con *G. intraradices* y cepas RB redujeron la gravedad de la enfermedad en un 8,6-58,6%. Las inoculaciones de bacterias individuales fueron más efectivas que las inoculaciones de AMF simple y doble (*G. intraradices* + RB).

En otro ejemplo, Rojo et al. (2007) evaluaron a las especies de *Trichoderma* como posibles agentes de biocontrol para reducir el impacto de la enfermedad de marchitamiento en cacahuate. En el ensayo en invernadero seleccionaron la concentración óptima de inóculo de *T. harzianum* ITEM 3636 y *T. longibrachiatum* ITEM 3635 para ensayos de campo. Ambas especies fueron evaluadas en un ensayo de campo realizado en los años 2003/04, en un campo comercial con antecedentes de la enfermedad. Se evaluaron dos tratamientos de semillas: semillas recubiertas con una suspensión de conidios usando carboximetilcelulosa (CMC) como adhesivo y semillas recubiertas con la biomasa del hongo antagonista en partículas de Biodac. En ambos tratamientos de semillas *T. harzianum* fue más eficaz que *T. longibrachiatum* en la disminución del índice medio de gravedad de la enfermedad el aumento de la frecuencia de las plantas sanas, y el aumento de rendimiento.

Con estos antecedentes, en el presente estudio se evaluó la actividad inhibitoria y antifúngica del filtrado libre de células de los cultivos de *A. niger* ATCC 1015 sobre el hongo *F. oxysporum* KFM05 de agave, para su posible uso en el control de la marchitez que causa en agave.

I. HIPÓTESIS:

El Filtrado Libre de Células de *A. niger* ATCC 1015 podría tener un efecto fungicida sobre el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* KFM05 causante de la marchitez del agave.

II. OBJETIVO GENERAL:

El objetivo del presente trabajo es determinar si el Filtrado Libre de Células de *A. niger* ATCC 1015 inhibe la germinación, crecimiento, esporulación, y viabilidad de *F. oxysporum* KFM05, así como determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y su posible modo de acción por microscopía de fuerza atómica.

Objetivos Específicos:

1. Determinar el efecto inhibitorio de *A. niger* por confrontación contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* KFM05 de agave en medio de PDA.
2. Cultivar *A. niger* ATCC 1015 en PDA, obtener el filtrado libre de células (FLC) y liofilizarlo.
3. Determinar la actividad del FLC sobre el proceso de germinación de las esporas de *F. oxysporum* y su alargamiento micelial lineal por medio de observaciones microscópicas a diferentes tiempos de incubación.
4. Determinar la actividad del FLC sobre la tasa de crecimiento de *F. oxysporum* KFM05 a diferentes tiempos de incubación por crecimiento radial en medio sólido.
5. Confirmar el efecto fungicida del FLC sobre las esporas por medio de la tinción LIVE/DEAD Backlight utilizando microscopía de fluorescencia.
6. Determinar Si el FLC sobre afecta las propiedades mecánicas de la pared de las esporas de *F. oxysporum* por medio de microscopía de fuerza atómica.

7. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y Mínima Fungicida (CMI y CMF) del FLC sobre *F. oxysporum* KFM05 mediante: (1) Observación macroscópica del crecimiento fúngico; (2) Viabilidad por formación de Unidades Formadoras de Colonias en medio PDA después del tratamiento con el FLC.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Cepas utilizadas

En este presente estudio se utilizaron las siguientes cepas fúngicas:

- ***Aspergillus niger* 1015:** Adquirida de la American Type Collection (ATCC). Cepa productora de ácido cítrico, y enzimas como glucoamilasa, pectinas, proteasa y amilogluconidasa. Identificada por la región ITS-5.8.
- ***Fusarium oxysporum* KFM05:** Aislada de agave e identificada en el Laboratorio de Micotoxinas de la Unidad Irapuato del CINVESTAV del PN. Fue obtenida de tejido de tallo de una planta de agave e identificada por medio de la región Box A1R. (Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul (Ávila-Miranda Martín, 2010).
- ***Alternaria alternata:*** Aislada de hojas de albahaca e identificada por la región ITS-5.8 Rdna en el mismo Laboratorio. Esta es agente causal de la mancha negra de albahaca.
- ***FLCerotium cepivorum:*** aislado de cebolla, obtenido e identificado por del laboratorio del Laboratorio de Bioquímica Ecológica, de la Unidad Irapuato del CINVESTAV del PN

2. Medios de cultivo

Medio de Papa Dextrosa Agar (PDA) Difco TM BD ®. El medio se preparó según las indicaciones del fabricante, 39 g/L. El medio fue esterilizado y distribuido en cajas de Petri estériles (90 X 15 mm), aproximadamente 20 ml por caja.

2.1 Medio de cultivo líquido

Caldo de Papa Dextrosa (PDB) DIFCO. Una vez preparado como indica el fabricante, 24 g/L, fue agregado en matraces de diferentes volúmenes (250, 125, 25, ml) según las condiciones del experimento fue esterilizado a 15 lb durante 20 min.

2.2 Inoculación y condiciones de cultivo

2.2.1 Conservación de las cepas utilizadas

Todas las cepas utilizadas en el presente trabajo fueron crecidas en cajas de PDA y se incubaron durante 4 días en el caso de *A. niger*, *A. alternata*: 20 días para *S. cepivorum* y durante 11 días en el caso de *F. oxysporum*, hasta que los cultivos presentaron producción de macro y microconidias. A los cultivos se les agregó agua destilada estéril adicionada de Tritón al 0.01 %, se dejaron reposar quince min y las esporas fueron obtenidas raspando la colonia fúngica con un asa recta estéril. Las suspensiones así obtenidas fueron colocadas en viales ámbar que contenían 1.5 de agua destilada estéril y fueron mantenidas a 4 °C.

2.2.2 Obtención del inóculo

Para obtener el inóculo de las cepas, estas se sembraron en cajas de PDA por separado utilizando 100 µl de la suspensión de esporas (obtenida en el punto 2.2.1 de materiales y métodos) de cada cepa. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 4 días para las cepas de *A. niger*, *A. alternata*; 20 días para *S. cepivorum*, y 11 días en el caso de *F. oxysporum*. Finalizado el tiempo de incubación se preparó la suspensión de esporas como se describe a continuación:

- En condiciones estériles, se agregan 15 ml de agua destilada estéril con Tritón X-100 al 0.01%, a los cultivos fúngicos.

- Se dejó reposar el cultivo 10 min y con una varilla de vidrio estéril se talla la superficie de las colonias, para obtener las esporas del cultivo.

- La suspensión de esporas se transfirió a un tubo Falcón estéril de 50 ml, con ayuda de una pipeta Pasteur estéril.

- La suspensión de esporas fue sometida a choque térmico (4 °C por 12 h para homogenizar la germinación. Este procedimiento se realizó para cada uno de los experimentos.

2.2.3 Condiciones de incubación

En todos los experimentos realizados los cultivos fueron incubados a 28 °C, en condiciones estacionarias a diferentes tiempos como se describe en cada experimento.

2.3. Reactivos para microscopía.

2.3.2 Componentes utilizados para las observaciones por microscopía de luz.

Para realizar las observaciones por microscopía de luz de las muestras fúngicas estas se fijaron utilizando formaldehído al 10 % y para la tinción se utilizó azul de algodón.

2.3.2 Componentes del kit de tinción de ácidos nucleicos.

Se utilizó el kit de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™ L-13152 para la prueba de viabilidad de las esporas. Este contiene como (Componente A) las tintas SYTO 9®, presentado en

estado sólido dentro de 10 pipetas aplicadoras. El yoduro de propidio (Componente B), presente como un sólido en 10 pipetas aplicadoras selladas. Un aceite de montaje BacLight (Componente C), 10 ml, para bacterias o membranas inmobilizadas. El índice de refracción a 25°C es 1.517 ± 0.003 . Para el uso de las pipetas aplicadoras, cortar los finales sellados para disolver el contenido en agua desionizada. (Ficha Técnica Live/Dead Viability Kits, Molecular Probes, 2001).

2.3.3 Componentes utilizados para las observaciones por la técnica Microscopía de Fuerza Atómica.

La preparación de las muestras de esporas previas a su análisis por AFM, fueron fijadas utilizando p-formaldehído al 16% para fijarse después sobre un cubreobjetos (20 mm x 20 mm) por evaporación.

IV. MÉTODOS EXPERIMENTALES.

4.1 Determinación de la actividad antagónica de *Aspergillus niger* sobre diversos hongos fitopatógenos por medio de confrontaciones en medio sólido.

Con el fin de determinar si *A. niger* ATCC 1015 pudiera tener efecto inhibitorio sobre diversos hongos fitopatógenos en medio sólido, se utilizó la técnica del cultivo doble para realizar las siguientes confrontaciones: 1) *A. niger* ATCC 1015 vs. *F. oxysporum* KFM05 de agave, 2) *A. niger* ATCC 1015 vs *A. alternata* y 3) *A. niger* ATCC 1015 vs *S. cepivorum*.

Las confrontaciones se realizaron sobre medio de papa dextrosa agar (PDA) contenido en cajas Petri de 90 x 150 mm. En cada caja se colocaron dos círculos de papel filtro estéril de 4 mm de diámetro, colocados de manera opuesta en dos extremos de la caja y alejados de la orilla a 1.5 cm. Los dos hongos a confrontarse se inocularon, uno en cada círculo de papel, utilizando inóculos con 1×10^3 esporas contenidas en 10 μ l. Para los controles, se realizaron siembras individuales de cada especie en las cajas con PDA. Las cajas se incubaron en oscuridad a 28 °C, con humedad relativa alta durante 8 días. Se utilizaron 7 réplicas y dos repeticiones.

Se realizaron mediciones diariamentedel diámetro colonial de los hongos confrontados y de los controles. También se midió la distancia entre las colonias en cada confrontación. Utilizando las mediciones anteriores se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PIRC) de los hongos fitopatógenos que se confrontaron con *A. niger*.

Los resultados se analizaron por el estadísticamente por la R. Prueba Anova ($P \leq 0.0001$)

4.2 Obtención del filtrado libre de células del medio de cultivo de *A. niger* ATCC 1015.

Se sembraron 5×10^7 esporas en 250 ml de PDB contenidos en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml. Se inocularon 7 matraces con este contenido para producir siete lotes. Los matraces se incubaron durante 7 días a 28 °C en oscuridad y condiciones húmedas. Tras haber transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el micelio por filtración en condiciones estériles. En la primera filtración se utilizó papel filtro grueso o de filtrado rápido, siguiendo con papel Prefiltro (APIS Prefiltler Millipore, 47 mm) seguido por un filtrado con una membrana hidrofílica Millipore de 0.45 µm. Para cada tipo de filtración se utilizaron dos papeles filtro. El filtrado final (FLC) se almacenó en volúmenes de 20 ml en tubos Falcon de 50 ml estériles a temperatura de – 70 °C para su posterior uso.

4.3 Liofilización del FLC de *A. niger* ATCC 1015.

El FLC se liofilizó en una liofilizadora Sentry 2.0, VirTis SP Scientific y se calculó el rendimiento de producción por cada lote de Filtrado Libre de Células producido obteniendo el peso promedio de FLC (g) producido por lote.

4.4 Determinación del efecto del FLC sobre *F. oxysporum* KFM05.

Se analizaron los siguientes parámetros:

- Determinar el tiempo de germinación de *F. oxysporum*.
- Determinar el porcentaje de los diferentes estadios de la germinación de las esporas.
- Determinar el efecto del FLC sobre la germinación y los diferentes estadios.

- Determinar el efecto del FLC sobre el tamaño de las germínulas de las esporas tratadas.

Para la determinación del tiempo de germinación y su porcentaje se procedió de la siguiente manera:

En una microplaca Eliza de 96 pozos se agregaron 1×10^5 esporas de *F. oxysporum* por cada pozo contenidas en un volumen de 50 μ l, añadiendo después a cada uno de ellos 200 μ l de PDB utilizando tres réplicas. Las placas fueron incubadas a 28 °C y a diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h) se tomaron alícuotas de 30 μ l de cada réplica y se observaron en un microscopio Olympus Zeiss (ICS Standard 25) determinando el tiempo en el que ocurrieron las diferentes etapas de la germinación: 1) esporas hinchadas de 3 a 4 veces su tamaño; 2) aparición de primordios; 3) germínulas del tamaño del diámetro de la espora; 4) germínulas de 2 a 3 diámetros de la espora y 5) micelio. Cumplidos los tiempos de incubación de 8 y 10 h las muestras fueron fijadas con 100 μ l de formaldehído al 10 % para su posterior análisis. Se determinó el número total, esporas germinadas, esporas no germinadas y esporas con primordio.

- Efecto del FLC sobre el tamaño de las germínulas (μ m): Los tratamientos se realizaron haciendo mezclas de FLC en PDB con concentraciones de 930 μ g FLC/ 100 μ l PDB, 726 μ g FLC/100 μ l y un control de PDB sin adición de FLC. El volumen total de los tratamientos (300 μ l) se inoculó con 1×10^5 esporas de *F. oxysporum* contenidas en 30 μ l de volumen y se utilizaron 5 réplicas.

Las mediciones se hicieron utilizando el programa de microscopía image J. Ya que en cada alícuota las longitudes de las esporas germinadas y los micelios era variable, se obtuvo el promedio de las longitudes de todas las mediciones realizadas en cada réplica.

4.5 Efecto del Filtrado Libre de Células de *Aspergillus niger* ATCC 1015 FLC sobre el crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* KFM05 de agave.

Se prepararon los tratamientos con las concentraciones 72.6 mg FLC / 10 ml PDA, 93.6 mg FLC / 10 ml PDA y teniendo como control PDA sin adición de FLC. Al estar los medios sólidos, se realizaron siembras en el centro de la caja de cortes de 4 mm de diámetro de una colonia de *F. oxysporum* KFM05 de agave, previamente sembrado en PDA e incubado durante 11 días a 28 °C, en oscuridad y alta humedad. Se realizaron 8 réplicas de cada tratamiento. Los datos de las mediciones de crecimiento se obtuvieron a los 0, 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8 días de incubación, midiendo el diámetro de los ejes “X” y “Y” de las colonias y obteniendo el promedio de ambos. Al tener todos los datos, se graficó el crecimiento del diámetro (cm) a través del tiempo para cada tratamiento.

Para realizar el conteo de esporas a los 8 días de incubación, a cada caja de todos los tratamientos se agregaron 5 ml de H₂O destilada estéril, se raspó la colonia para liberar las esporas, se tomaron alícuotas de 30 µl, y utilizando el microscopio de luz se contó el número de esporas.

Para calcular la velocidad de crecimiento del diámetro (cm/día) de las colonias de cada tratamiento utilizando la siguiente fórmula: $(R_f - R_i) / (t_f - t_i)$, en donde R_f y R_i son el radio final y el radio inicial de las colonias, respectivamente; y t_f y t_i , son el tiempo final y el tiempo inicial. Para el análisis estadístico de los resultados se realizó la prueba de ANOVA y de Tukey utilizando el programa R.

4.6 Efecto del FLC sobre la viabilidad e integridad de las esporas de *F. oxysporum*.

4.6.1. Determinación del efecto del FLC sobre la viabilidad de las esporas.

Los tratamientos utilizados para las esporas de *F. oxysporum* fueron la mezcla de medio líquido PDB con FLC de *A. niger* con concentración de 930 µg FLC/ 100 µl PDB y el tratamiento control que fue PDB sin adición de FLC. El volumen utilizado por unidad experimental fue de 1200 µl, Se inocularon por triplicado 1.2 ml de PDB con 11.16 mg de FLC con 1×10^5 esporas de *F. oxysporum* ml y se incubaron a 28 °C durante 24, 48 y 120 horas. Cumplidos los tiempos de incubación se tiñeron con el kit LIVE/DEAD® BacLight™ L-13152, siguiendo el protocolo de los productores, observando las células en un microscopio de fluorescencia.

4.7 Determinación del efecto del FLC sobre la morfología y las características elásticas de la pared de *F. oxysporum* KFM05 por microscopía de fuerza atómica.

Las esporas de *F. oxysporum* (5×10^4) por triplicado se incubaron en 1 ml de PDB con 9.3 mg FLC/ ml PDB y como control PDB sin FLC, y se incubaron durante 19 horas a 28 °C, en oscuridad. Al cumplirse el tiempo de incubación, se les agregaron 200 µL de paraformaldehído al 16% para fijar las esporas y se observaron utilizando un sistema de rastreo de resonancia de microscopía acústica de fuerza atómica MAFA (ó, AFAM - Atomic Force Acoustic Microscopy). El sistema de rastreo de resonancia está formado por varios componentes, comenzando con un sistema comercial de Microscopía de Sonda de Barrido (SPM-Scanning Probe Microscopy), un Bruker/Veeco/Digital Instruments Nanoscope IV Dimension 3100 AFM. Este AFM se actualizó con un sensor de nanoposicionamiento x-y de bucle cerrado, nPoint, Inc. NPXY100. Se utilizó un accesorio de módulo de acceso de señal (SAM) para la entrada / salida de señal al AFM. La señal del fotodiodo no filtrada se introdujo con un amplificador de

bloqueo de alta frecuencia Stanford Research Systems SR844. Un generador de funciones HP / Agilent 33120A produce la señal de excitación de frecuencia de barrido. Se utilizaron sondas de silicio recubiertas de Cr / Pt, ó, de diamante de Budget Sensors, de 225 μm de longitud con una constante de resorte de 3,0 N m^{-1} . Se utilizó una tarjeta DAQ NI-PCI-6133 de National Instruments para la adquisición de datos.

Posteriormente se llevó a cabo el protocolo para las mediciones de Microscopía de Fuerza Atómica como se describe a continuación.

4.7.1 Protocolo para las mediciones mecánicas por Microscopía de Fuerza Atómica.

Se tomaron 20 μL de del fondo del tubo Eppendorf y se dispusieron sobre un sustrato de vidrio. Se esperó a que la muestra secase y ésta se montó en un transductor piezoeléctrico. Por medio de barridos de una sonda sobre la muestra a medirse, se realizaron rastreos de resonancia sobre la superficie de esporas de *F. oxysporum*. De los barridos de frecuencia rápida se obtuvieron los espectros de resonancia que se midieron con un amplificador de bloqueo SR844. Se realizó un análisis de los cambios en la amplitud, en la frecuencia de resonancia y el valor Q obtenidos como picos de resonancia.

Se hicieron sobre esporas de *F. oxysporum* barridos por la técnica RT-AFAM utilizando una sonda de silicona recubierta de diamante para AFM (BudgetSensors model Multi75DLC) con una longitud nominal de 225 μm y frecuencias de resonancia entre 60-450 kHz , constante de spring de 3.0 N m^{-1} y radio de punta inferior a 15 nm . Las imágenes AFAM fueron adquiridas trabajando con un setpoint de 0.5 V y una deflexión vertical de -0.1 V , lo que corresponde a una fuerza normal de 180 Nm .

Las muestras que se eligieron para hacer las mediciones tenían longitudes alrededor de 70 μm y 17 μm para los tratamientos sin FLC y 9.30 mg FLC/1 ml PDB, respectivamente. En el caso del tratamiento sin FLC, las muestras se encontraban como micelio. Las áreas de los rastreos que se hicieron sobre las superficies de las muestras fueron de magnitudes nanométricas, siendo las menores de 1000x1000 nm^2 y las mayores de 3480x3480 nm^2 .

4.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del FLC sobre *F. oxysporum* KFM05.

4.8.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del FLC.

En una microplaca de de 96 pozos se prepararon diluciones secuenciales de una solución con el FLC disuelto en PDB. El experimento se realizó tres veces, utilizando en cada uno, una solución madre con una concentración ligeramente menor a la utilizada en el experimento anterior. De las diluciones secuenciales realizadas en cada experimento se obtuvieron las siguientes concentraciones (mg FLC/100 μl PDB):

Experimento	SLC mg /100 μl					
1	25 ;	1.5 ;	6.3 ;	3.1 ;	1.6 ;	0.0
2	18.5 ;	9.5 ;	4.6 ;	2.3 ;	1.2 ;	0.0
3	20.5 ;	10.3 ;	5.1 ;	2 ;	1.3 ;	0.0

El PDB sin adición del FLC, representa los controles. El volumen total utilizado por unidad experimental fue de 100 μl , contenidos por pozo, cada uno de los cuales fue después inoculado

con 10 µl conteniendo 1×10^4 esporas de *F. oxysporum*. Se utilizaron 5 réplicas de cada tratamiento, se incubaron a 28 °C, en oscuridad y humedad relativa alta durante 3 días. Terminando el tiempo de incubación, se realizó un examen visual de las microplacas para determinar las concentraciones en las que no había crecimiento micelial. La concentración del compuesto más baja obtenida de los tres experimentos, donde no hubo crecimiento micelial se denominó como la Concentración Mínima Inhibitoria. Una vez realizada esta observación, las mezclas fueron sembradas en cajas de PDA para determinar la Concentración Mínima Fungicida como se explica a continuación.

4.8.2 Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del FLC de *A. niger* sobre *F. oxysporum* en medio sólido.

El volumen contenido en cada pozo (100 µl) con los diferentes tratamientos descritos en el inciso anterior, se utilizó para hacer diluciones. Estas diluciones se realizaron para las 5 réplicas de cada tratamiento, en los 3 experimentos. De cada dilución 1:1000, 1:100 y 1:10 se tomaron 10 µl y se sembraron en cajas de Petri de 90x15 mm con medio PDA esparciendo este inóculo utilizando un asa de siembra triangular estéril. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 48 h, y se realizó un conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), solamente en la dilución 1:1000 porque las diluciones 1:10 y 1:100 las UFC fueron incontables. Al determinar la menor concentración de los tres experimentos que no presentó crecimiento de UFC, se determinó la Concentración Mínima Fungicida.

En los tratamientos que sí presentaron crecimiento de UFC, se utilizó el número de UFC obtenido en cada caja, para a partir de él calcular el número de UFC que habría en la dilución 1:1000. A continuación, se calculó el número de UFC que habría en la dilución 1:100 y finalmente se calculó el número total de UFC que habría en cada unidad experimental de 100

μl contenida en cada pozo de la microplaca en donde se expusieron las esporas de *F. oxysporum* al FLC en diferentes concentraciones. El número de UFC totales obtenidos de los diferentes tratamientos, representa el número de esporas que sobrevivieron a la exposición de las esporas al FLC de *A. niger*. De los tratamientos control sin FLC, se obtuvo el número de UFC que representa el porcentaje de supervivencia total de las esporas. De cada experimento se obtuvo un porcentaje de supervivencia total que se calculó del número de UFC de los controles, y con estos se calcularon los porcentajes de supervivencia de los tratamientos. Se realizó un análisis de la linealidad de los datos de UFC obtenidos de los tratamientos de los tres experimentos por medio del programa R, para evaluar si el aumento en la concentración del FLC afectó de la misma manera a las esporas de *F. oxysporum* en los tres experimentos, y así asegurarnos de la confiabilidad de los datos obtenidos.

V. RESULTADOS.

5.1 Determinación de la actividad antagónica de *Aspergillus niger* sobre diversos hongos fitopatógenos por medio de confrontaciones en medio sólido.

5.1.1. *Aspergillus niger* vs *Fusarium oxysporum* KFM05 de agave.

Los resultados de la confrontación entre *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* muestran que el crecimiento de *F. oxysporum* se ve limitado por la presencia de *A. niger*. Como se puede ver en la Tabla 1, a las primeras 48 h se observa una disminución en el crecimiento de *A. niger* durante la confrontación y un aumento en el crecimiento de *Fusarium*, sin embargo, al séptimo día se puede observar que, aunque *A. niger* no creció demasiado se observó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *F. oxysporum* durante la confrontación (Figura 1).

Tabla 1. Crecimiento radial de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* en forma individual y en confrontación.

Tiempo de Incubación (días)	Número de Repeticiones	Crecimiento radial (cm)		Crecimiento radial en confrontación (cm)	
		<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. niger</i> + <i>F. oxysporum</i>	
1	n = 14	1.86 ± 0.76 a	0.82 ± 0.0 a	1.50 ± 0.49 a	0.88 ± 0.33 a
2	n = 14	2.94 ± 0.03 b	1.64 ± 0.04 b	2.39 ± 0.34 b	1.86 ± 0.31 b
5	n = 14	4.01 ± 0.20 c	4.19 ± 0.2 c	4.59 ± 1.11 c	3.94 ± 0.05 d
7	n = 14	6.25 ± 1.38 d	6.00 ± 0.700 d	5.35 ± 1.21 d	4.49 ± 0.36 e

Los valores son media de 2 repeticiones con 7 réplicas (n = 14). Las letras diferentes indican los valores de crecimiento significativamente diferentes entre los tiempos. Análisis estadístico: R. Pueba ANOVA y Test Tukey, (P≤0.05).

Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PIRC) de *F. oxysporum* a diferentes tiempos.

Tiempo de Incubación (días)	Número de Repeticiones	Radio del Crecimiento Colonial (cm)		PIRC %
		<i>F. oxysporum</i>	Confrontación <i>F. oxysporum</i>	
1	n = 14	0.41 ± 0.0	0.43 ± 0.21	-4.87
2	n = 14	0.82 ± 0.04	0.95 ± 0.21	-15.85
5	n = 14	2.69 ± 0.2	2.39 ± 0.01	11.15
7	n = 14	4.50 ± 0.7	2.97 ± 0.38***	34.00

Cálculo de PIRC = $(100 \times (R1 - R2) / R1)$. R1 = crecimiento radial solo del patógeno y R2 = crecimiento radial del patógeno en confrontación (Royse y Ries, 1978). Análisis estadístico: R. Prueba ANOVA ($P \leq 0.0001$). (***) Diferencia altamente significativa entre el crecimiento individual y la confrontación.

Figura 1. Crecimiento radial de *A niger* y *F. oxysporum* en forma individual y en confrontación.



A) *F. oxysporum*; B) *A. niger*; C) Confrontación entre *A. niger* y *F. oxysporum*. Incubados durante 7 días.

5.1.2 *A. niger* vs *A. alternata*.

Por medio de esta confrontación se observó que *A. niger* presentó un efecto inhibitorio sobre *A. alternata*. *A. niger* presenta un crecimiento semejante cuando se cultiva solo o en confrontación. En cuanto que *A. alternata* presenta un crecimiento ligeramente mayor durante los primeros 5 días en la confrontación con respecto al crecimiento individual.

Sin embargo, el crecimiento de *A. alternata* fue menor desde el quinto día de la confrontación (Tabla 3).

Tabla 3. Crecimiento radial de *Aspergillus niger* y *Alternaria alternata* en forma individual y en confrontación.

Tiempo de Incubación (días)	Número de Repeticiones	Crecimiento radial (cm)		Crecimiento radial en confrontación (cm)	
		<i>A. niger</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. niger</i> + <i>A. alternata</i>	
1	n = 14	1.40 ± 0.02 a	1.20 ± 0.11 a	1.05 ± 0.28 a	1.44 ± 0.43 a
2	n = 14	2.00 ± 0.19 b	2.02 ± 0.17 b	2.20 ± 0.59 b	2.15 ± 0.21 ab
3	n = 14	3.20 ± 0.47 c	3.00 ± 0.11 c	3.63 ± 0.72 c	2.90 ± 0.17 b
5	n = 14	4.30 ± 0.81 d	3.60 ± 0.41 d	4.25 ± 0.64 d	3.75 ± 0.07 c
7	n = 14	5.40 ± 0.39 e	5.00 ± 0.28 e	5.30 ± 1.24 e	4.10 ± 0.40 c

Los valores son media de 2 repeticiones con 7 réplicas (n = 14). Las letras diferentes indican los valores de crecimiento significativamente diferentes entre los tiempos. Análisis estadístico: R; Prueba ANOVA y Test Tukey, (P≤0.05).

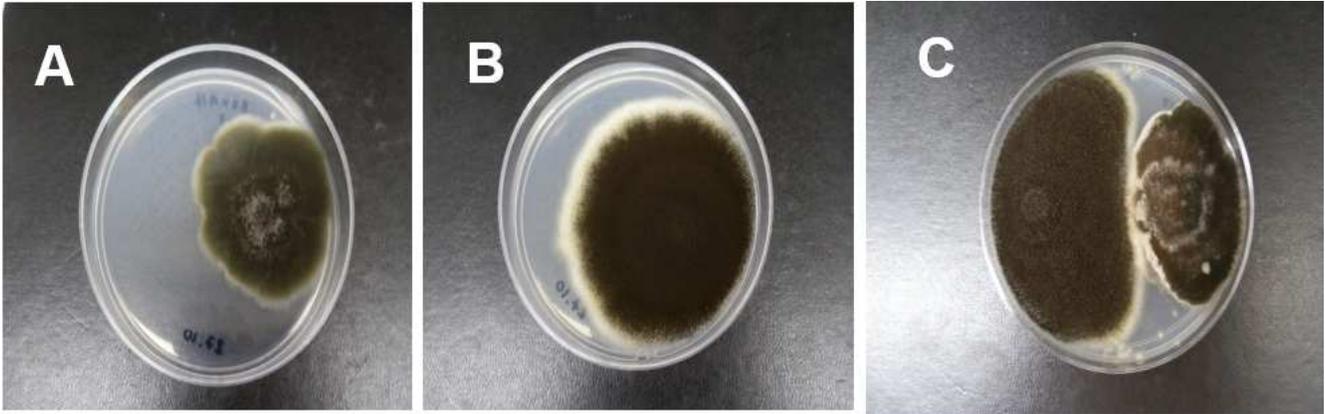
El comportamiento de *A. alternata* se confirma cuando se calcula el PICR, el cual es mayor al séptimo día (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PIRC) de *Alternaria alternata* a diferentes tiempos.

Tiempo de Incubación (días)	Número de Repeticiones	Radio del Crecimiento Colonial (cm)		PICR %
		<i>A. alternata</i>	Confrontación <i>A. alternata</i>	
1	n = 14	0.6 ± 0.11	0.68 ± 0.16	-13.33
2	n = 14	1.01 ± 0.17	0.95 ± 0.03	5.94
3	n = 14	1.50 ± 0.11	1.37 ± 0.12	8.66
5	n = 14	2.10 ± 0.41	1.90 ± 0.42	9.52
7	n = 14	3.50 ± 0.28	2.04 ± 0.85***	41.71

Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR). Cálculo de PIRC = $(100 \times (R1 - R2) / R1)$. R1 = crecimiento radial solo del patógeno y R2 = crecimiento radial del patógeno en confrontación. (Royse y Ries, 1978). Análisis estadístico: R; Prueba ANOVA ($P \leq 0.0001$). (***) Diferencia altamente significativa entre el crecimiento individual y la confrontación.

Figura 2. Crecimiento micelial de *Alternaria alternata* y *Aspergillus niger* en forma individual y en confrontación.



A) *Alternaria alternata*; B) *Aspergillus niger*; C) Confrontación entre *A. niger* y *A. alternata*. Incubados durante 7 días.

5.1.3. *A. niger* vs *S. cepivorum*.

En la confrontación de *A. niger* versus *S. cepivorum*, se observó una inhibición de *A. niger* sobre *S. cepivorum*. El crecimiento de *S. cepivorum* es notablemente menor al de su crecimiento en cultivo individual, al tercer y quinto día. En cambio, el crecimiento de *A. niger* en confrontación es muy parecido a su crecimiento en cultivo individual (Tabla 5).

Tabla 5. Crecimiento radial de *Aspergillus niger* y *Sclerotium cepivorum* en forma individual y en confrontación.

Tiempo de Incubación (días)	Número de Repeticiones	Crecimiento radial (cm)		Crecimiento radial en confrontación (cm)	
		<i>A. niger</i>	<i>S. cepivorum</i>	<i>A. niger</i> + <i>S. cepivorum</i>	
3	n = 14	3.23 ± 0.04 c	1.52 ± 0.72 a	3.32 ± 0.04 c	1.17 ± 0.95 b
5	n = 14	4.38 ± 0.40 d	4.86 ± 1.1 ab	4.56 ± 0.04 d	3.10 ± 0.69 c
7	n = 14	5.36 ± 0.61 e	6.30 ± 1.15 b	5.32 ± 1.17 e	3.01 ± 0.38 c

Los valores son media de 2 repeticiones con 7 réplicas (n = 14). Las letras diferentes indican los valores de crecimiento significativamente diferentes entre los tiempos. Análisis estadístico: R. Pueba ANOVA y Test Tukey, (P≤0.05).

La tasa de crecimiento de *A. niger* es mayor en comparación con *S. cepivorum* y que su crecimiento a partir del quinto día.

Este comportamiento se confirma cuando se calcula el PICR en donde al tercer y quinto día el porcentaje de inhibición es alto (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Sclerotium cepivorum* a diferentes tiempos.

Tiempo de Incubación (días)	Número de Repeticiones	Radio del Crecimiento Colonial (cm) <i>S. cepivorum</i>	Radio del Crecimiento Colonial (cm) Confrontación <i>S. cepivorum</i>	PICR %
3	n = 14	0.76 ± 0.72	0.54 ± 0.04	28.9
5	n = 14	3.36 ± 1.10	1.02 ± 0.11	69.64
7	n = 14	4.80 ± 1.15	0.99 ± 0.27***	79.38

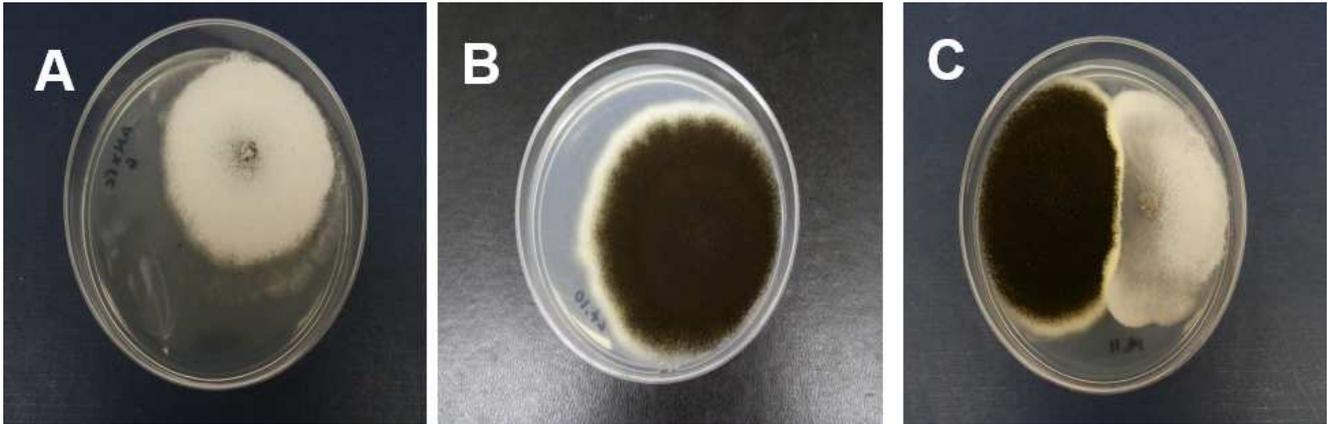
Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR).

Cálculo de PIRC = $(100 \times (R1 - R2) / R1)$. R1 = crecimiento radial solo del patógeno y R2 = crecimiento radial del patógeno en confrontación. (Royse y Ries, 1978). Análisis estadístico: R. Prueba ANOVA ($P \leq 0.0001$).

(***) Diferencia altamente significativa entre el crecimiento individual y la confrontación.

La Figura 3 ilustra el fenómeno de antagonismo observado a los 7 días de incubación en medio PDA demostrando de manera clara el alto grado de inhibición que produce *A. niger* sobre *S. cepivorum*.

Figura 3. Crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* y *Aspergillus niger* en forma individual y en confrontación.



A) *Sclerotium cepivorum*; B) *Aspergillus niger*; C) Confrontación entre *A. niger* y *S. cepivorum*. Incubados durante 7 días.

5.2. Producción del Filtrado Libre de Células de *Aspergillus niger* ATCC 1015 y su procesamiento.

En su hábitat natural *A. niger* secreta grandes cantidades de una gran variedad de enzimas que se necesitan para liberar nutrientes de los biopolímeros.

A. niger también es utilizado como huésped para la producción de proteínas heterólogas y para la producción de ácido cítrico y ácido glucónico. *A. niger* exhibe un metabolismo notablemente versátil, que permite el crecimiento en una amplia gama de sustratos bajo diversas condiciones ambientales.

Trabajos previos en el laboratorio de micotoxinas demostraron que los metabolitos de *A. niger* ATCC 1015 producidos en PDB o en medio sintético de Heiss y Matell tenía la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *A. parasiticus*, hongo productor de aflatoxinas.

El hongo fue cultivado en medio de cultivo líquido y mediante filtración se obtuvo el Filtrado Libre de Células (FLC).

Las fracciones de menos de 3 Kda y menos de 1 Kda fueron efectivas inhibiendo la germinación de las esporas y el crecimiento fúngico. El análisis preliminar de las fracciones por espectrometría de masas indicó que las fracciones contienen aminas, epóxidos, cetonas, hidrocarburos lineales y aromáticos.

En el presente trabajo se produjeron 7 lotes de FLC de *A. niger* de volúmenes totales entre 160 y 180 ml, por lote (Tabla 7), para evaluar su efecto sobre el hongo

F. oxysporum KFM05.

Los lotes 1 y 2 del FLC se llevaron a volúmenes de 10 ml por evaporación en rotavapor, y posteriormente, se secaron por medio de la técnica de secado por aspersión. El primer lote se perdió por caramelización, pero el segundo lote si pudo ser secado; sin embargo, no fue posible medir su producción, ya que el FLC fue mezclado con aditivos para facilitar su secado (Tabla 7).

Tabla 7. Peso seco y capacidad fungicida de los lotes de FLC de *A. niger* ATCC 1015.

Lote	FLC (mg)	Número de dosis ** por lote
1 *	0	0
2 *	-	-
3	1864.4	405.3
4	1973.1	428.93
5	1720.7	374.07
6	1440.4	313.13
7	-	-

(*) Secado por aspersión.

(**) Dosis: mg FLC en 100 µl con efecto fungicida en 10^4 esporas de *F. oxysporum*.

Los lotes del 3 al 6 fueron fraccionados en volúmenes de 20 ml y posteriormente sus fracciones se secaron por liofilización (Tabla 8). El lote de la Tabla 7 fue almacenado a -70°C sin ningún procesamiento.

La concentración mínima fungicida (4.6 mg FLC/ L) con efecto sobre 1×10^4 esporas de *F. oxysporum* KFM05 que se determinó previamente (punto 3.9, Materiales y Métodos), fue denominada como “una dosis con efecto fungicida” y a partir de ella se calculó el número de dosis contenidas por cada lote de FLC de *A. niger* producido. Estos valores se muestran en la Tabla 7, con el fin de saber la cantidad de FLC disponible que se tiene para la planeación de su posterior uso.

Tabla 8. Producción del liofilizado (mg) del FLC de *A. niger* obtenido de las fracciones de los lotes.

Lote 3		Lote 4		Lote 5		Lote 6	
* Fracción de 20 ml	FLC (mg)	Fracción de 20 ml	FLC (mg)	Fracción de 20 ml	FLC (mg)	Fracción de 20 ml	FLC (mg)
1	200	10	186.2	19	157.0	28	189
2	209	11	197.3	20	214.8	29	211.8
3	209.9	12	204.7	21	192.1	30	186.6
4	210	13	207.9	22	167.2	31	184.5
5	219.5	14	170.0	23	164.4	32	163.8
6	193.4	15	245.3	24	206.3	33	160.0
7	214.4	16	204.0	25	341.3	34	162.2
8	235.9	17	184.5	26	139.0	35	182.5
9	172.3	18	373.2	27	138.6		
Total (mg)	1 864.4	Total (mg)	1 973.1	Total (mg)	1 720.7	Total (mg)	1 440.4

5.3 Efecto del FLC de *A. niger* ATCC 1015 sobre *Fusarium oxysporum* KFM05.

La forma de reproducción de *F. oxysporum* es a través de microconidias asexuales, las cuales son un medio de dispersión muy efectivo que le permite sobrevivir en condiciones secas durante su dispersión en el aire. El uso de compuestos inhibidores de la germinación de esporas puede ser una alternativa muy efectiva para el control de dispersión de las enfermedades de plantas que son causadas por el género *Fusarium*. Antes de evaluar la capacidad inhibitoria de un compuesto sobre una especie fúngica, es necesario conocer cómo se lleva a cabo la germinación de la espора a partir del estado de reposo, así como la posterior secuencia de eventos que la convierte en un tubo germinal a partir del cual el micelio se formará por elongación y ramificación. Al conocer este proceso podremos compararlo con el

desarrollo de la espora al tratarse con el compuesto inhibidor de prueba y así evaluar su efecto (D'Enfert, 1997).

5.3.1. Características de la germinación de *F. oxysporum* KFM05 de agave en condiciones *in vitro*.

5.3.1.1 Determinación del tiempo de germinación de *F. oxysporum* KFM05 de agave en medio líquido.

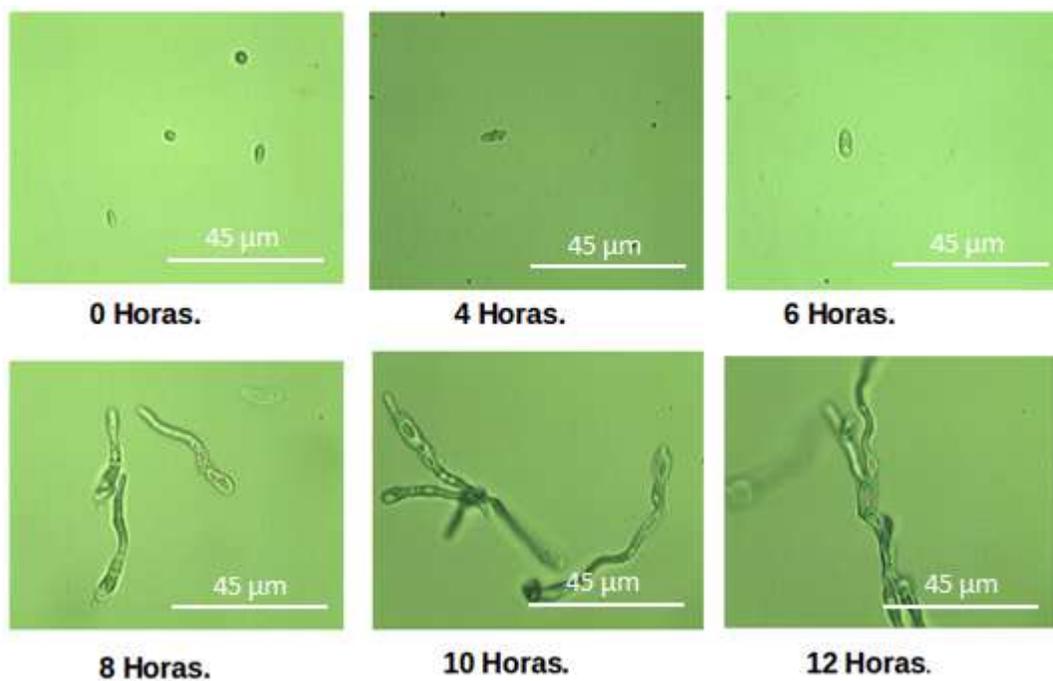
Las esporas de *F. oxysporum* fueron obtenidas como se describió en Materiales y Métodos.

Las esporas (1×10^5) fueron inoculadas en PDB e incubadas a 28 ° C, mostrando que a las 6 h estas comenzaron a hincharse, y a las 8 h ya había esporas germinadas. A las 12 h de incubación (Figura 4) pudo observarse formación de micelio.

Se calculó el porcentaje de esporas germinadas de *F. oxysporum* a los tiempos de incubación de 8 y 10 horas. Se eligieron estos tiempos porque antes de las 8 horas aún no había esporas germinadas y después de las 10 horas las esporas ya se encontraban con micelio.

A las 8 horas de incubación el porcentaje de esporas germinadas fue de 82.99 % y a las 10 horas de incubación de 92.52 %.

Figura 4. Esporas de *F. oxysporum* incubadas por diferentes tiempos en medio líquido.



5.3.1.2 Determinación del porcentaje de germinación de esporas de *F. oxysporum* a las 8 y 10 h de incubación en medio PDB líquido.

Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de germinación de las esporas de *Fusarium oxysporum* KFM05 incubadas a diferentes tiempos en medio líquido PDB.

Tiempo de Incubación (h)	Estadio	Porcentaje (%)	Porcentaje de Germinación Total (%)
6	Esporas hinchadas	-	-
8	Esporas con primordios	50.59	82.99 ± 2.53
	Esporas con germínula	32.4	
10	Esporas con primordios	13.12	92.57 ± 0.30
	Micelio	79.45	

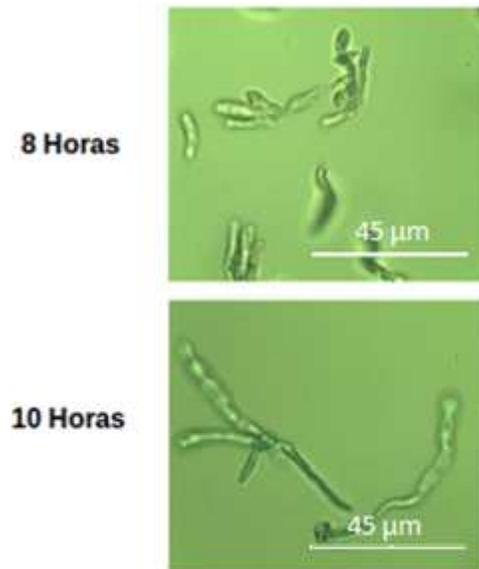
Concentración del inóculo 1×10^4 esporas en 100 μ l. Los valores son media de 3 repeticiones con conteos de 100 esporas por repetición.

En este experimento se definió una espora como germinada tan pronto como se observó la primera deformación de la capa superficial de la espora mostrando que el filamento de germinación comenzaba a emerger. A las esporas que mostraban esta primera deformación se les llamó primordios de germínula y se determinó el porcentaje presente.

La espora se consideró una germínula cuando tenían un tamaño de tres veces el diámetro de la espora.

A las 8 h de incubación el 50 % de las esporas se encontraban como primordios de germínula y el resto como germínula. A las 10 h el 13 % eran primordios de germínula (Tabla 9).

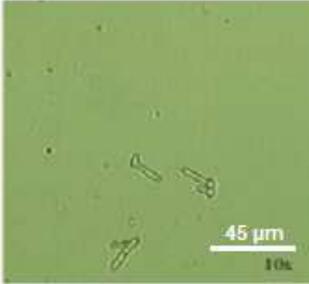
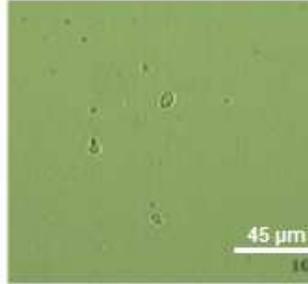
Figura 5. Esporas germinadas de *F. oxysporum* a las 8 y 10 h de incubación.



5.3.2 Efecto del Filtrado Libre de Células de *A. niger* ATCC 1015 sobre la germinación de *Fusarium oxysporum* KFM05.

Se observó un efecto inhibitorio de 92 % del FLC a las 24 h de incubación cuando se utilizó una concentración 930 μg FLC/ 100 μl . La concentración de 726 μg FLC/100 μl no inhibió la germinación (Tabla 10). Sin embargo, esta concentración disminuye el crecimiento, ya que las germínulas en este tratamiento fueron de 20 μm de longitud, en comparación con las germínulas en el tratamiento sin FLC (70 μm) (Figura 6).

Tabla 10. Efecto del FLC de *A. niger* sobre el porcentaje de germinación (%) de *F. oxysporum* en medio líquido.

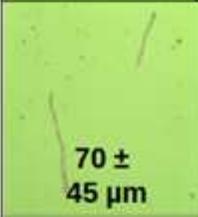
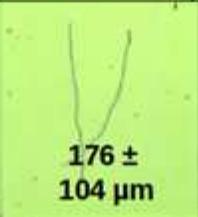
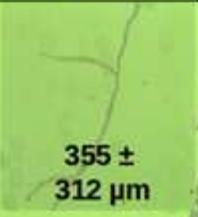
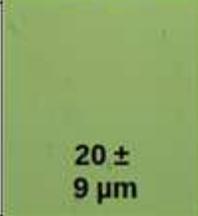
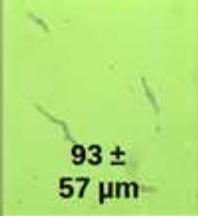
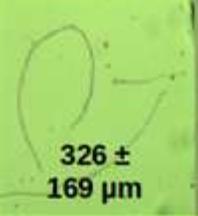
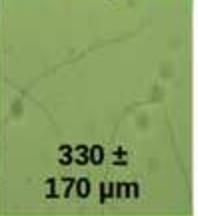
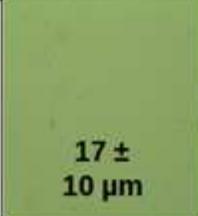
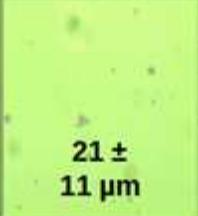
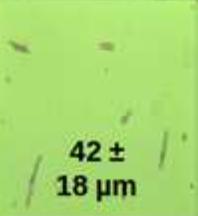
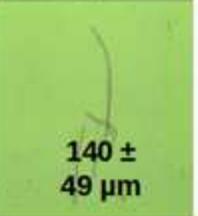
Tiempo de incubación (días)	* Porcentaje de esporas germinadas (%)		
	0 μg FLC /100 μl	726 μg FLC /100 μl	930 μg FLC /100 μl
1	80 \pm 22	81 \pm 12	8 \pm 7
**			

(*) Los valores son la media del conteo de 100 esporas, con 3 repeticiones.

(**) Crecimiento de la espora al día 1 de incubación.

Tratamientos de 1×10^4 esporas en 100 μl .

Figura 6. Efecto del FLC de *A. niger* sobre el crecimiento de *F. oxysporum* a diferentes tiempos.

	1 días	2 días	3 días	4 días
0 µg FLC/ 100 µl	 70 ± 45 µm	 176 ± 104 µm	 355 ± 312 µm	 430 ± 315 µm
726 µg FLC/ 100 µl	 20 ± 9 µm	 93 ± 57 µm	 326 ± 169 µm	 330 ± 170 µm
930 µg FLC/ 100 µl	 17 ± 10 µm	 21 ± 11 µm	 42 ± 18 µm	 140 ± 49 µm

Los valores son la media del conteo de 100 esporas, con 3 repeticiones.

Observaciones a escala 10 x.

5.4. Efecto del Filtrado Libre de Células de *A. niger* ATCC 1015 sobre el crecimiento de *F. oxysporum* KFM05 de agave.

Con la excepción de las levaduras unicelulares, los hongos típicamente crecen por medio de hifas que se extienden sólo en sus ápices y se ramifican en un micelio. Este modo de crecimiento proporciona a los hongos una cierta movilidad y la capacidad de invadir sustratos orgánicos vivos y muertos (Wessels, 1993). Los mecanismos implicados en el control y regulación del crecimiento micelial se estudian mejor en medio sólido que en cultivos sumergidos, ya que los hongos se adaptan al crecimiento en sustratos sólidos. Además, en

medio sólido, es fácil calcular la tasa de crecimiento radial (K_r), la que se define como $K_r = (R_1 - R_0) / (t_1 - t_0)$, en donde R_0 y R_1 son los radios de las colonias en los tiempos t_0 y t_1 , respectivamente. (Reeslev y Kjoller, 1995).

Otro método que proporciona una determinación relativamente rápida, simple y sensible del crecimiento micelial en hongos es la determinación de la proteína celular, aplicada a la biomasa de hongos. Puede ser fiable y conveniente para las determinaciones de rutina (Jernejc, 1986).

5.4.1 Crecimiento radial de *F. oxysporum* expuesto al SCL de *A. niger* ATCC 1015 en medio sólido.

Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección 3.5 de Materiales y Métodos.

El FLC de *A. niger* inhibió el crecimiento radial de *F. oxysporum* de manera apreciable observándose que desde el segundo día de incubación, el diámetro de las colonias de *F. oxysporum* sin FLC tenía el doble de tamaño que los diámetros de las colonias cepas en los medios con 7.26 mg FLC/ml y 9.3 mg FLC/ ml, los cuales tuvieron una diferencia muy pequeña entre sus diámetros, siendo de 0.43 y 0.42 cm, respectivamente (Tabla 11).

Al cuarto día de incubación, las colonias de los hongos en medio sin FLC presentaban un diámetro de casi el triple de tamaño del diámetro de las colonias de los hongos crecidas en presencia de FLC creciendo con las concentraciones 72.6 y 93.0 mg FLC/10 ml. Este comportamiento continuó, hasta que finalmente en el octavo día de incubación, el diámetro de las colonias de los hongos sin FLC eran casi 4 veces el tamaño del diámetro de las colonias de los hongos en los medios con 72.6 y 93.0 mg FLC/10 ml (Tabla 11 y Figura 7).

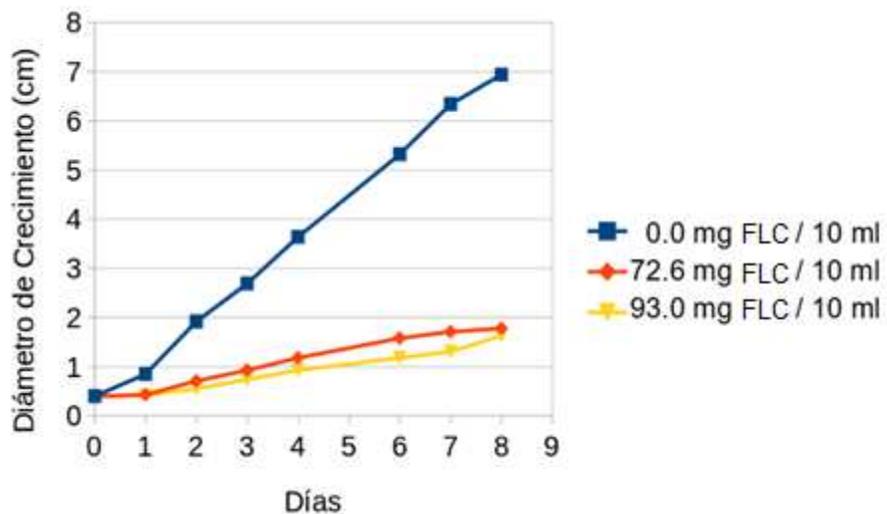
El comportamiento en el crecimiento radial de *F. oxysporum* en medio sólido adicionado con el FLC se ilustra de manera gráfica en la Figura 9 y de manera visual en la Figura 10 se ilustra el crecimiento radial de *F. oxysporum* a diferentes tiempos de incubación expuesto a diferentes concentraciones del FLC.

Tabla 11. Medición del crecimiento radial de *F. oxysporum* expuesto al FLC de *A. niger* en medio sólido PDA a través del tiempo.

Tiempo de Incubación (días)	Diámetro Micelial (cm)		
	0.0	72.6	93.0
0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
1	0.85 ± 0.12	0.43 ± 0.02	0.42 ± 0.02
2	1.92 ± 0.12	0.71 ± 0.03	0.55 ± 0.06
3	2.69 ± 0.14	0.93 ± 0.1	0.74 ± 0.13
4	3.64 ± 0.20	1.18 ± 0.11	0.93 ± 0.12
6	5.32 ± 0.32	1.58 ± 0.19	1.18 ± 0.24
7	6.34 ± 0.43	1.71 ± 0.21	1.31 ± 0.28
8	6.94 ± 0.37	1.78 ± 0.23	1.63 ± 0.86

Media de la medición de 8 réplicas, 3 repeticiones.

Figura 7. Crecimiento radial de *F. oxysporum* expuesto a diferentes concentraciones de FLC de *A. niger* a través del tiempo en medio sólido PDA.



Los valores son la media de las mediciones de 8 réplicas, con 3 repeticiones.

Figura 8. Crecimiento radial de *F. oxysporum* expuesto o no a FLC de *A. niger* en medio sólido a diferentes tiempos de incubación.

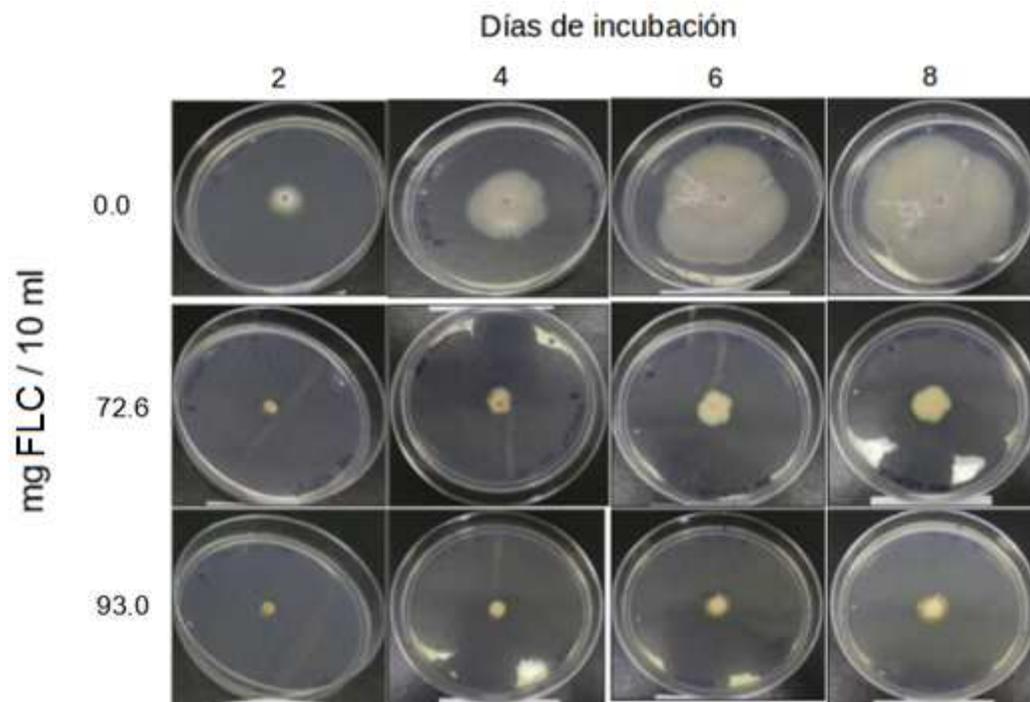
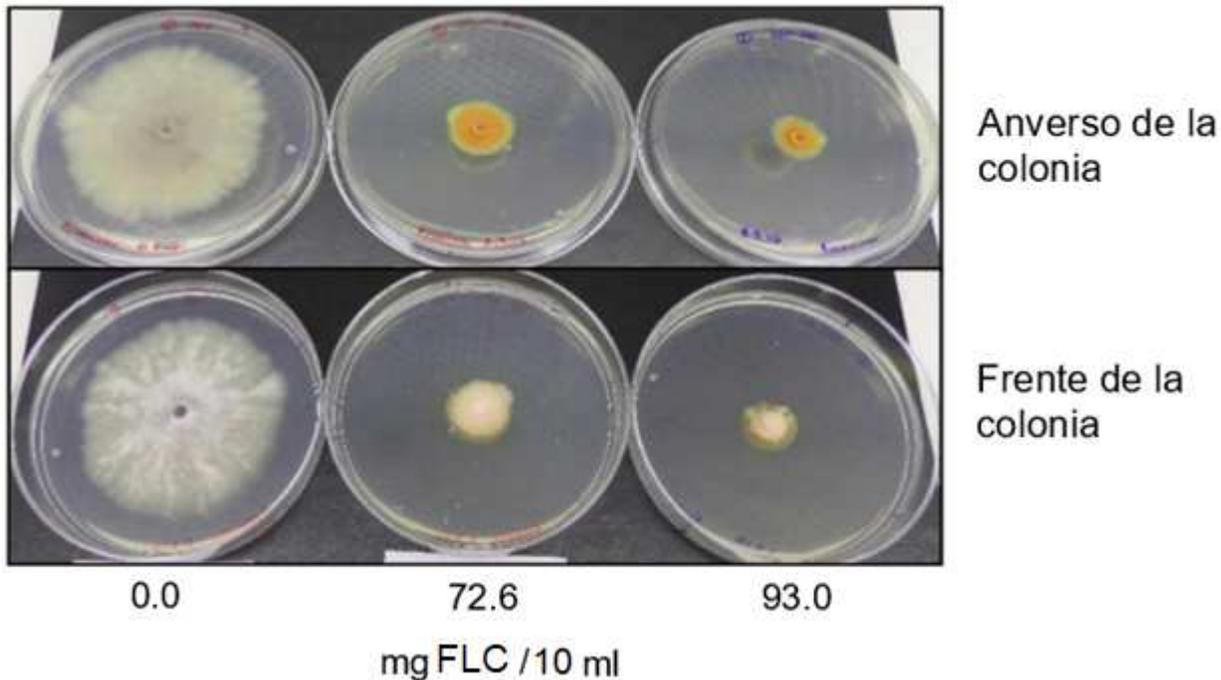


Figura 9. Crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* expuesto o no al FLC de *Aspergillus niger* en medio sólido a los 8 días de incubación.



Después de los 8 días de incubación se determinó crecimiento radial y se determinó el número de esporas producidas por colonia.

En la Tabla 12 se muestran las medidas de diámetro radial, velocidad de crecimiento radial y conteo de esporas totales calculados al octavo día de incubación.

Se realizó la prueba Tukey comparando el diámetro de crecimiento del octavo día de incubación entre los tratamientos, demostrando que el crecimiento sin FLC es significativamente más grande que el crecimiento en PDA más 72.6 mg FLC y 93.0 mg FLC. De la misma forma, las velocidades de crecimiento radial calculado del crecimiento sin adición de FLC fue más grande que las velocidades de crecimiento en PDA con 72.6 y 93.0 mg de FLC.

Los conteos de esporas por colonia demostraron un número de 1.4×10^8 esporas totales en medio sin FLC, mientras que las esporas fueron en menor concentración cuando el hongo

creció en presencia del FLC: 2.5×10^6 cuando el hongo creció en 10 ml PDA + 72.6 mg de FLC y de 1.8×10^6 cuando creció en 10 ml PDA + 93.0 mg del FLC.

Tabla 12. Velocidad de crecimiento radial y capacidad de esporulación de *F. oxysporum* KFM05 después de 8 días de incubación en medio sólido con o sin FLC de *A. niger* a diferentes concentraciones.

mg FLC / 10 ml PDB	Diámetro radial (cm)	Velocidad de crecimiento radial (cm/día)	Conteo de esporas por colonia (Número de esporas)
0.0	6.94 ± 0.63 a	0.5502	$1.4 \times 10^8 \pm 2.5 \times 10^7$
72.6	1.78 ± 0.23 b	0.0189	$2.5 \times 10^6 \pm 5.5 \times 10^5$
93.0	1.63 ± 0.86 b	0.0239	$1.8 \times 10^6 \pm 7.7 \times 10^5$

Los valores son media de 3 repeticiones con 8 réplicas. Las letras diferentes indican los valores de crecimiento significativamente diferentes entre las concentraciones de FLC.

Análisis estadístico: R. Pueba ANOVA y Test Tukey, ($P \leq 0.05$).

5.5 Efecto del Filtrado Libre de Células de *Aspergillus niger* sobre la viabilidad e integridad de las esporas de *Fusarium oxysporum*.

Para analizar el cambio que sufre *F. oxysporum* en la integridad de su pared celular al ser expuesto al FLC de *A. niger* en medio líquido se utilizaron dos métodos, la técnica de tinción por medio del kit LIVE/DEAD, y el análisis por microscopía de Fuerza atómica.

5.5.1 Determinación del efecto del FLC de *A. niger* sobre la viabilidad de las esporas de *F. oxysporum* KFM05 por tinción utilizando el kit LIVE/DEAD en medio líquido.

Los kits de viabilidad bacteriana LIVE / DEAD ® BacLight TM de Molecular Probes proporcionan un ensayo de fluorescencia bicolor de viabilidad que ha demostrado ser útil para una variedad diversa de géneros bacterianos y de hongos. Este kit de viabilidad permite a los investigadores distinguir fácil, confiable y cuantitativamente los organismos vivos y muertos en minutos (Ficha técnica kit LIVE/DEAD).

Este experimento fue realizado en medio líquido PDB de acuerdo a la sección 4.8 de Materiales y Métodos. De las concentraciones utilizadas se observó que una concentración de 9.3 mg FLC / ml PDB tenía un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las esporas de *F. oxysporum*. A las 24 h de incubación, las esporas tratadas con esta concentración presentaron un porcentaje de viabilidad del 16.5 %. Este porcentaje es bajo al compararlo con el tratamiento sin FLC, el que presentó un 98.3 % de esporas viables. A las 48 h de incubación el porcentaje de viabilidad en el tratamiento con FLC fue del 27.3 % mientras que el porcentaje de viabilidad de las esporas sin FLC fue de 93.5 % (Tabla 13 y Figura 10).

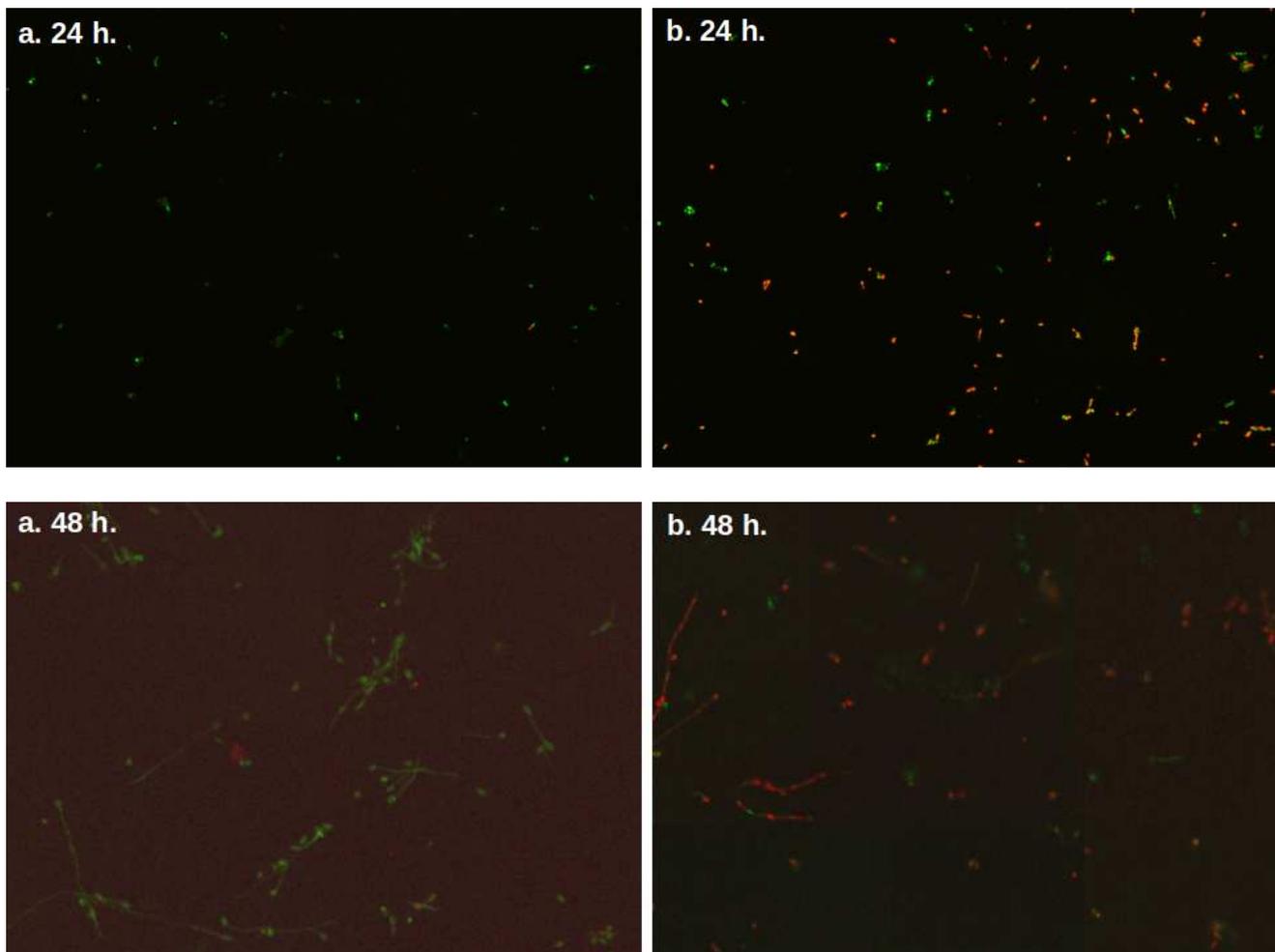
A las 120 h de incubación, las esporas expuestas al FLC (9.3 mg FLC / ml) presentaron un porcentaje de esporas viables de 1.3 %, teniendo casi un total de esporas muertas. Mientras que el tratamiento sin FLC mostró un porcentaje de esporas viables del 95.5 % (Tabla 13).

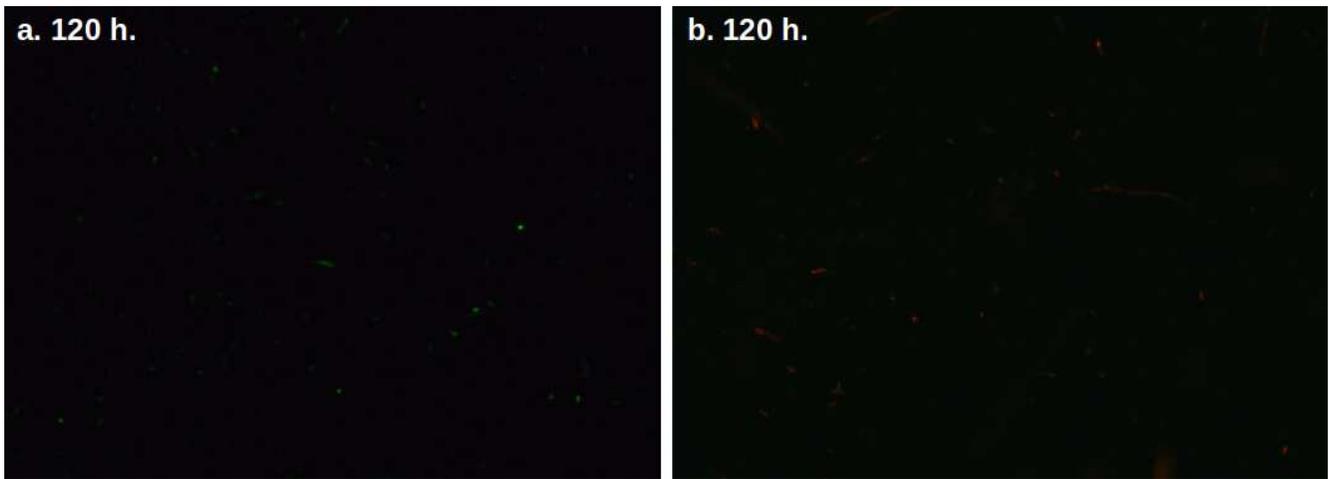
Tabla 13. Valores de porcentaje de viabilidad de las esporas de *F. oxysporum* tratadas con FLC de *A. niger* en medio líquido a diferentes tiempos.

Tiempo (horas)	Porcentaje de Esporas Viables (%)	
	mg FLC / 1 ml PDB	
	0.0	9.3
24	98.3 ± 0.5	16.5 ± 10.0
48	93.5 ± 1.7	27.33 ± 1.9
120	95.5 ± 0.7	1.3 ± 0.9

Los valores son la media del porcentaje de esporas vivas obtenida del conteo de 300 esporas con dos repeticiones.

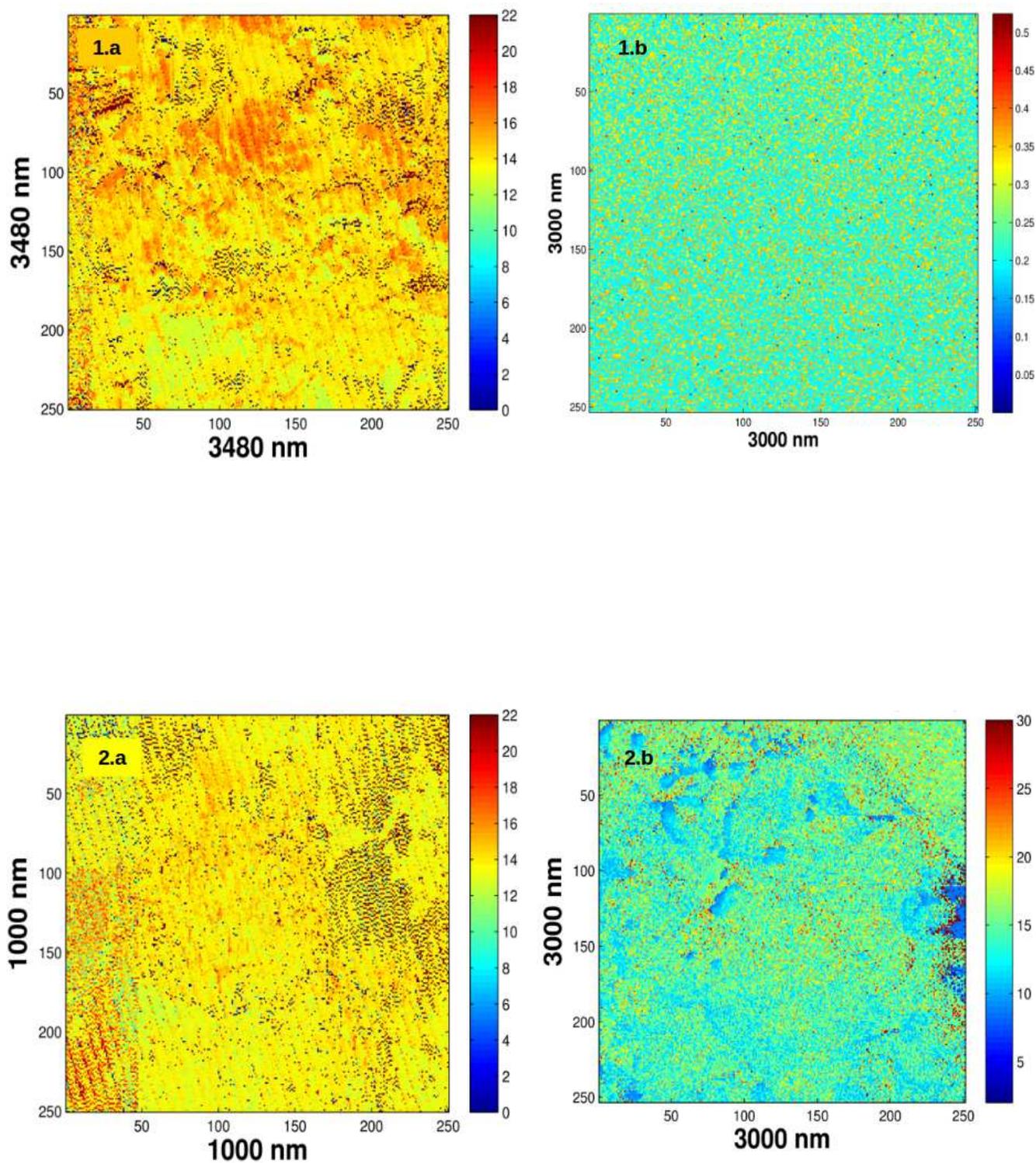
Figura 10. Tinción de fluorescencia con el kit LIVE/DEAD de esporas de *F. oxysporum* tratadas con FLC de *A. niger* a diferentes tiempos sin y con FLC (a) y (b), respectivamente . La numeración indica los tiempos de incubación de las esporas, siendo de 24, 48 y 120 h para los números (1), (2) y (3), respectivamente.





Los porcentajes de esporas viables en el tratamiento control no tuvieron grandes variaciones (Tabla 13). Sin embargo, con la concentración de .3 mg FLC / ml, el porcentaje de esporas viables tuvo un aumento de las 24 a las 48 h de incubación. Esta variación es causada por la generación de nuevas esporas, como se explicó en el experimento que describe el efecto del FLC de *A. niger* ATCC 1015 sobre la germinación de las esporas de *F. oxysporum* KFM05.

5.6 Análisis de la integridad de las esporas de *F. oxysporum* KFM05 de agave tratadas con el FLC de *A. niger* ATCC 1015 por medio de microscopía de fuerza atómica (MFA).



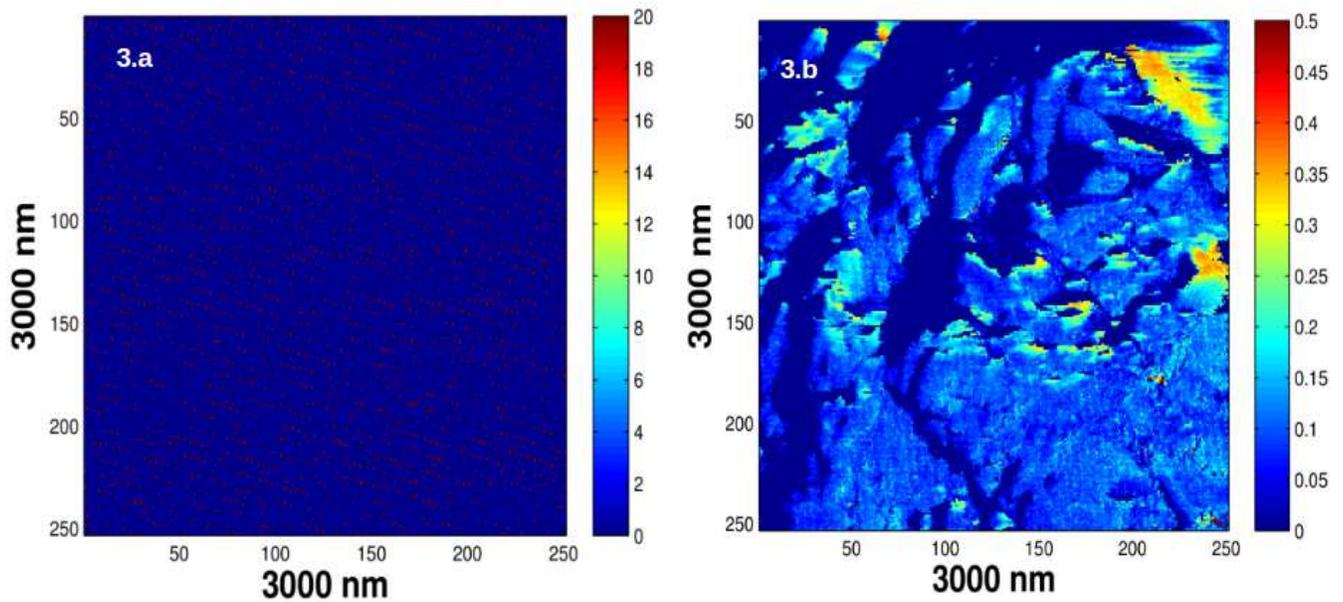


Figura 11. Imágenes del módulo de elasticidad (GPa) obtenidas por rastreo de resonancia en Microscopía Acústica de Fuerza Atómica (MAFA) de las esporas de *F. oxysporum* KFM05 tratadas con FLC de *A. niger* a concentraciones de (a) 0 µg FLC/100 µl y (b) 930 µg FLC/100 µl incubadas en medio líquido durante 19 horas.

5.7 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del FLC de *A. niger* ATCC 1015 sobre *F. oxysporum* KFM05.

5.7.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del FLC de *A. niger* ATCC 1015 sobre *F. oxysporum*.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del FLC de *A. niger* de acuerdo a lo descrito en la Sección 4.9.1 de Materiales y Métodos a las 72 h de incubación (Tabla 14).

Los resultados muestran que concentraciones de 12 a 16 mg de FLC/ L de PDB permitieron el crecimiento. Concentraciones mayores, inhibieron crecimiento micelial (Tabla 14). Estos resultados se obtuvieron de 3 experimentos con 5 réplicas cada uno.

Tabla 14. Determinación de la CMI del FLC de *A. niger* sobre *F. oxysporum* KFM05 de agave por medio de la evaluación del crecimiento micelial en medio líquido.

Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
mg FLC/ L	* Crecimiento de Micelio	mg FLC/ L	* Crecimiento de Micelio	mg FLC/ L	* Crecimiento de Micelio
0	+	0	+	0	+
250	-	185	-	205	-
125	-	95	-	103	-
63	-	46	-	51	-
31	-	23	-	25	-
16	+	12	+	13	+

(*) El crecimiento de micelio se determinó por análisis visual.

Las pruebas se realizaron cuando 10^4 esporas de *F. oxysporum*.

5.7.2. Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) del FLC de *Aspergillus niger* ATCC 1015 sobre *Fusarium oxysporum*.

Para determinar la CMF se procedió como indica en la Sección 3.9.2 de Materiales y Métodos. Los resultados ilustran que en los tratamientos control se presentaron supervivencias mayores que los tratamientos adicionados con FLC ya que fueron de 8.5×10^5 a 7.8×10^5 UF de colonias.

Al aumentar la concentración a 1.6 mg/100 µl la viabilidad del hongo no llega a ser como los valores del control (sin adición del FLC). Cuando la concentración del FLC sube a 3.1 mg/100 µl las esporas tienen una viabilidad de alrededor de 1.8×10^2 a 4.9×10^2 UF de colonias.

En contraste, cuando se utilizan las concentraciones de 250, 125 y 63 mg/ L no hubo crecimiento de colonias (Tabla 15).

Tabla 15. Valores de UFC como indicativo del efecto del FLC sobre la viabilidad de *F. oxysporum*. Experimento 1.

Número de Unidades Formadoras de Colonia / 100 µl *					
mg FLC / L	1	2	3	4	5
0	8.5×10^5	8.4×10^5	8.0×10^5	8.5×10^5	7.8×10^5 ***
16	1.8×10^3	2.7×10^3	2.8×10^3	2.5×10^3	2.8×10^3
31	1.8×10^2	3.1×10^2	4.0×10^2	4.9×10^2	2.5×10^2
63	0	0	0	0	0 **
125	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0

(*) UFC formadas de un total de 10^4 esporas expuestas al FLC de *A. niger* durante 72 h.

(** 0) Sin crecimiento de UFC.

(***) Diferencia altamente significativa al comparar el control con las concentraciones 16 y 31 mg FLC/ L.

Las pruebas del efecto del FLC se realizaron utilizando 5 réplicas.

Los valores de UFC del tratamiento control en el experimento 2 (Tabla 19) fueron cercanos a los del experimento 1, siendo de 8.4×10^5 a 9.0×10^5 UFC. La concentración 12 mg/ L de FLC disminuyó la viabilidad obteniendo valores de 1.0×10^4 a 2.3×10^4 de UFC, obteniendo una escala menor que los valores del control. Con la concentración 23 mg/ L la viabilidad fue de 1.1×10^3 a 4.6×10^3 UFC. Las concentraciones 46, 95 y 185 mg/ L no permitieron la formación de UFC (Tabla 16).

Tabla 16. Valores de UFC como indicativo del efecto del FLC sobre la viabilidad de *F. oxysporum*. Experimento 2.

Número de Unidades Formadoras de Colonia / 100 μl *					
mg FLC /L	1	2	3	4	5
0	8.5×10^5	8.4×10^5	8.5×10^5	9.0×10^5	8.6×10^5 ***
12	1.2×10^4	2.3×10^4	2.7×10^4	2.0×10^4	1.0×10^4
23	1.7×10^3	4.1×10^3	4.6×10^3	4.2×10^3	1.1×10^3
46	0	0	0	0	0 **
95	0	0	0	0	0
185	0	0	0	0	0

(*) UFC formadas de un total de 1×10^4 esporas expuestas al FLC de *A. niger* durante 72 h.

(** 0) Sin crecimiento de UFC.

(***) Diferencia altamente significativa al comparar el control con las concentraciones 12 y 23 mg FLC/ L.

Las pruebas del efecto del FLC se realizaron utilizando 5 réplicas.

En el experimento 3 (Tabla 17), el tratamiento control presentó una viabilidad similar a la de los experimentos 1 y 2, con 8.5×10^5 a 7.1×10^5 UFC. La viabilidad utilizando la concentración 1.3 mg FLC/100 μ l, que presentó entre 8.0×10^3 a 3.6×10^4 UF de colonias. La concentración 2.5 presentó valores de 1.2×10^3 a 3.4×10^2 . Las concentraciones 51, 103 y 205 mg FLC/ L no mostraron formación de UFC.

Tabla 17. Valores de UFC como indicativo del efecto del FLC sobre la viabilidad de *F. oxysporum*. Experimento 3.

Número de Unidades Formadoras de Colonia / 100 μl *					
mg FLC /L	1	2	3	4	5
0	8.5×10^5	8.4×10^5	7.5×10^5	8.4×10^5	7.1×10^5 ***
13	8.0×10^3	1.7×10^4	3.6×10^4	2.1×10^4	1.2×10^4
25	3.0×10^2	1.2×10^3	3.0×10^3	3.4×10^3	3.1×10^3
51	0	0	0	0	0 **
103	0	0	0	0	0
205	0	0	0	0	0

(*) UFC formadas de un total de 1×10^4 esporas expuestas al FLC de *A. niger* durante 72 h.

(** 0) Sin crecimiento de UFC.

(***) Diferencia altamente significativa al comparar el control con las concentraciones 13 y 25 mg FLC/ L.

Las pruebas del efecto del FLC se realizaron utilizando 5 réplicas.

Se utilizaron los valores de los conteos de UFC resultantes de los tres experimentos para calcular el porcentaje de viabilidad obtenida de cada concentración de FLC probada, los cuales se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Inhibición de la viabilidad de las esporas de *F. oxysporum* por el FLC *A. niger* expresada como porcentaje.

Concentración (mg FLC / 100 μ l)	Porcentaje de Inhibición de Viabilidad (%)
0	0.0 \pm 0.0
1.2	97.6 \pm 0.8
1.3	97.6 \pm 1.4
1.6	99.6 \pm 0.1
3.1	99.7 \pm 0.2
4.6	100.0 \pm 0.0

(* Promedio de 5 réplicas. (**) Concentración Mínima Fungicida.

5.7.3. Evaluación de la relación lineal entre el efecto fungicida del FLC de *A. niger* sobre el crecimiento de UFC de *F. oxysporum* KFM05 por análisis estadístico en R.

Se realizó el análisis estadístico como se explica en la sección 3.9.3 de Materiales y Métodos, en donde se analizó la relación lineal entre los conteos de UFC de los tres experimentos agrupados en un conjunto y las concentraciones de FLC utilizadas.

5.7.4.1. Datos numéricos y sus características dentro de cada variable.

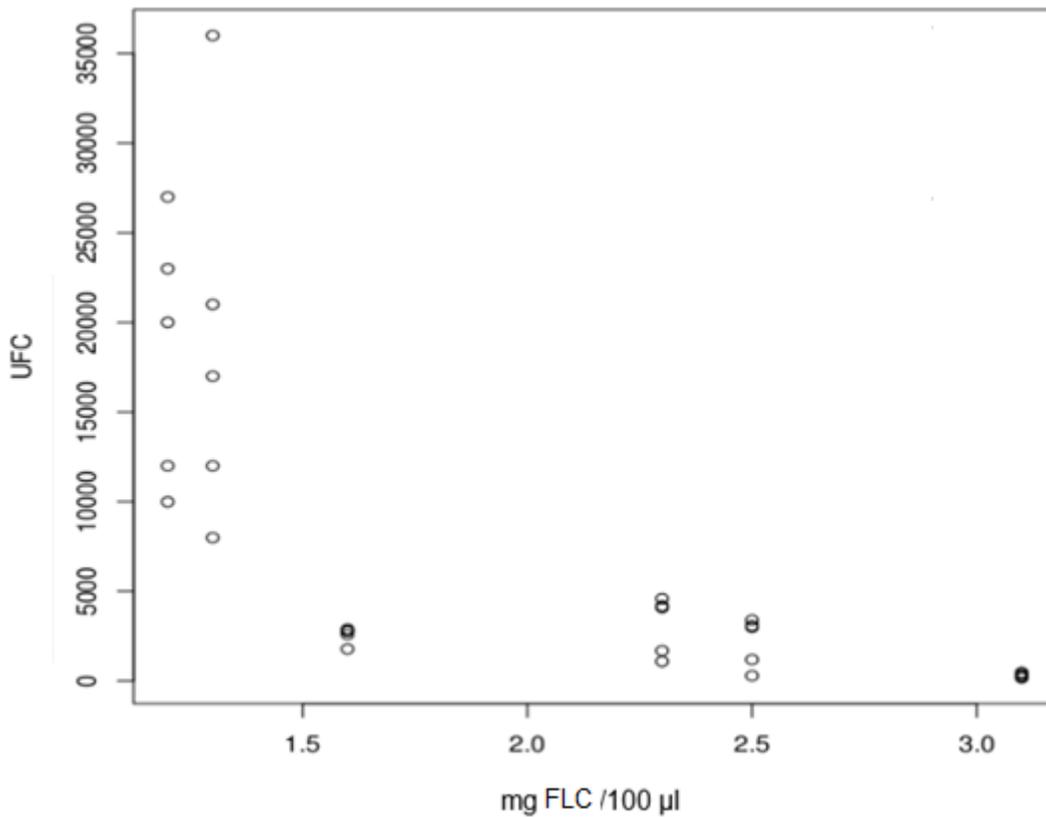
Se comenzó haciendo un resumen de las características de los datos numéricos que contiene los datos mínimos, máximos y la media dentro de cada variable.

```
> summary(es) # A brief numerical summary
      Exp      FLC      Rep      UFC
Min.   :1    Min.   :1.20  Min.   :1    Min.   : 180
1st Qu.:1    1st Qu.:1.30  1st Qu.:2    1st Qu.: 1325
Median :2    Median :1.95  Median :3    Median : 3050
Mean   :2    Mean   :2.00  Mean   :3    Mean   : 7574
3rd Qu.:3    3rd Qu.:2.50  3rd Qu.:4    3rd Qu.:11500
Max.   :3    Max.   :3.10  Max.   :5    Max.   :36000
```

5.7.4.2. Datos de la concentración en mg FLC / 100 μ l de FLC de *A. niger*, en el eje x, y los valores de UFC en el eje y.

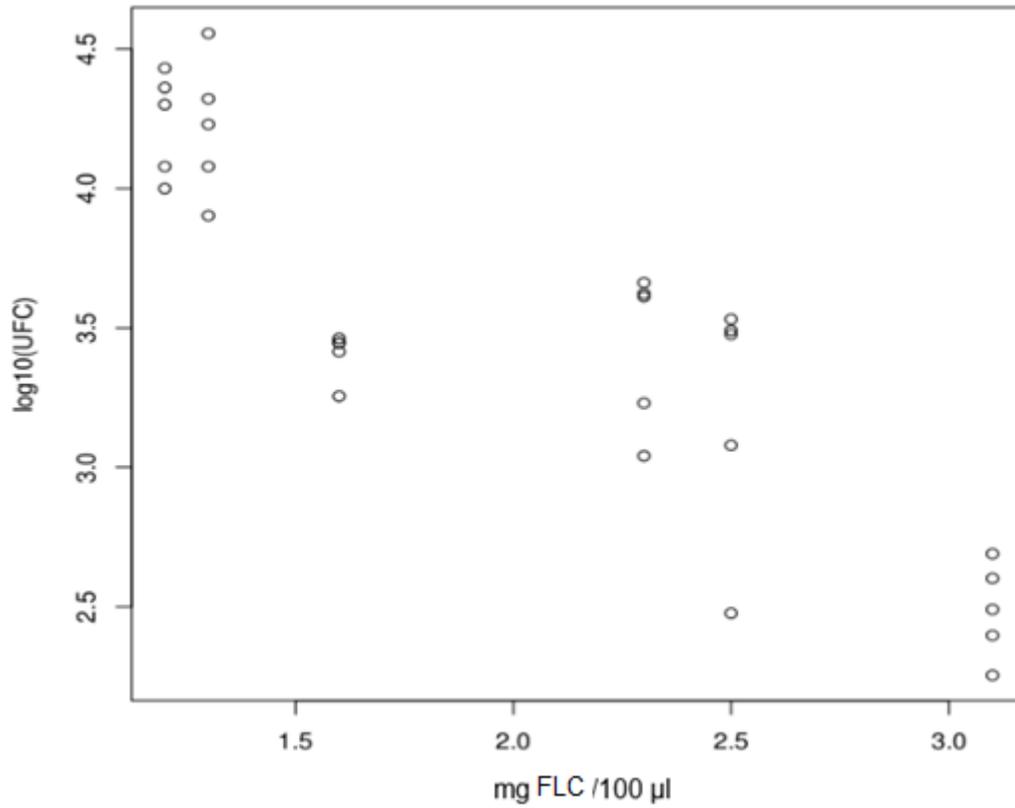
Se hizo una gráfica con los datos, graficando el número de colonias formadas dependiendo de la concentración de FLC.

A partir de esta gráfica podemos ver que no existe una relación lineal entre las UFC formadas y la concentración de FLC. Por ello se procedió a usar una gráfica logarítmica



5.7.4.3. Relación entre los datos de los valores del log de las UFC contra los valores de concentración de FLC.

De esta gráfica está claro que el log₁₀ de las UFC disminuye como una función lineal aproximada de la concentración, FLC.



5.7.4.4. Resumen de la adaptación del modelo lineal de la relación entre la concentración de FLC y el LogUFC:

Posteriormente se dio la orden al programa de ajustar los datos a un modelo lineal simple y a continuación obtuvimos un resumen de la adaptación del modelo:

Residuales:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.61105	-0.20765	-0.00139	0.26955	0.48333

Coefficientes:

	Estimado	Error estándar	t valor	Pr(> t)
(Intercept)	5.13984	0.18300	28.087	< 2e-16 ***
FLC	-0.82067	0.08652	-9.485	3.05e-10 ***

Códigos de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Error estándar residual: 0.326 en 28 grados de libertad (DF).

R-cuadrada Múltiple: 0.7626, * R-cuadrada ajustada : 0.7542

F-estadístico: 89.96 en 1 and 28 DF, * P-valor: 3.052 x 10⁻¹⁰

A partir de este análisis se observa que existe una relación lineal altamente significativa ($P = 3.052 \times 10^{-10}$) entre las dos variables (la respuesta de LogUFC y la concentración de FLC), digamos, obteniendo el siguiente modelo lineal:

- Modelo lineal obtenido:

$$\text{LogUFC} = a + b \text{ FLC}$$

Donde los valores estimados son $a = 5.13984$, $b = -0.82067$, y esta relación lineal explica alrededor del 75% de la varianza de LogUFC (R-cuadrado ajustado: 0.7542)

5.7.4.5. Resumen de la adaptación del modelo lineal de la relación entre los diferentes Experimentos y el log10 UFC:

También se analizó si los distintos experimentos (variables de la Columna Exp), están afectando a la respuesta, LogUFC. Con esto podemos saber si entre los tres Experimentos hay un comportamiento diferente de la respuesta de LogUFC, tomando en cuenta también la relación que existe entre LogUFC y la concentración de FLC.

Con este objetivo se obtuvo:

Residuales:

Min	1Q	Mediana	3Q	Max
-0.8132	0.1565	0.0305	0.1854	0.4171

Coefficientes:

	Estimado Est.	Error	t valor	Pr(> t)
(Interceptión)	4.60865	0.19346	23.822	< 2e-16 ***
as.factor(Exp)2	0.45006	0.12130	3.710	0.000990 ***
as.factor(Exp)3	0.46360	0.12484	3.713	0.000983 ***
FLC	-0.70735	0.07448	-9.498	6.13e-10 ***

Códigos de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Error estándar residual: 0.2607 en 26 grados de libertad (DF)

R-cuadrada múltiple: 0.8591, R-cuadrada ajustada: 0.8429

F-estadístico: 52.85 en 3 y 26 DF, p-valor: 3.358×10^{-11} .

Evidentemente de los cálculos anteriores, el Experimento (Exp) es un factor importante en la determinación de la respuesta, LogUFC. En otras palabras, la variación entre los tres experimentos es significativa (P alrededor de 0.001, 0.000990 y 0.000983), por lo que la respuesta no fue completamente homogénea en los tres experimentos. El modelo anterior explica alrededor del 84,29% de la variación de LogUFC, en comparación con el 75,42% del primer modelo ("**mod1**", en donde se analizó solamente la relación entre la concentración de FLC, eje x, con la respuesta LogUFC, eje y). Sin embargo, podemos suponer que el "mejor" modelo, es decir, el que permite predecir la salida de nuevos experimentos (futuros) es "mod1", porque la variación encontrada entre los tres experimentos realizados se debe a diferencias en los tratamientos (Por ejemplo, variación no deseada en la concentración FLC, o diferencias en el recuento de UFC, etc.). En resumen, "mod1" es aquel en el que deben basarse las inferencias sobre la relación lineal entre LogUFC y FLC.

5.7.4.6. Intervalos de confianza previstos para los valores LogUFC ajustados al 95% de confianza, dentro de la relación lineal entre LogUFC y la concentración de FLC:

Ahora determinamos los intervalos de confianza previstos para los valores LogUFC ajustados al 95% de confianza:

Ajustado	Menor	Mayor
1 3.826774	3.685727	3.967821
2 3.826774	3.685727	3.967821
3 3.826774	3.685727	3.967821

4	3.826774	3.685727	3.967821
5	3.826774	3.685727	3.967821
6	2.595775	2.365825	2.825725

5.7.4.7. Intervalos de confianza previstos para los valores LogUFC ajustados al 99% de confianza, obtenidos de la relación lineal entre LogUFC y la concentración de FLC:

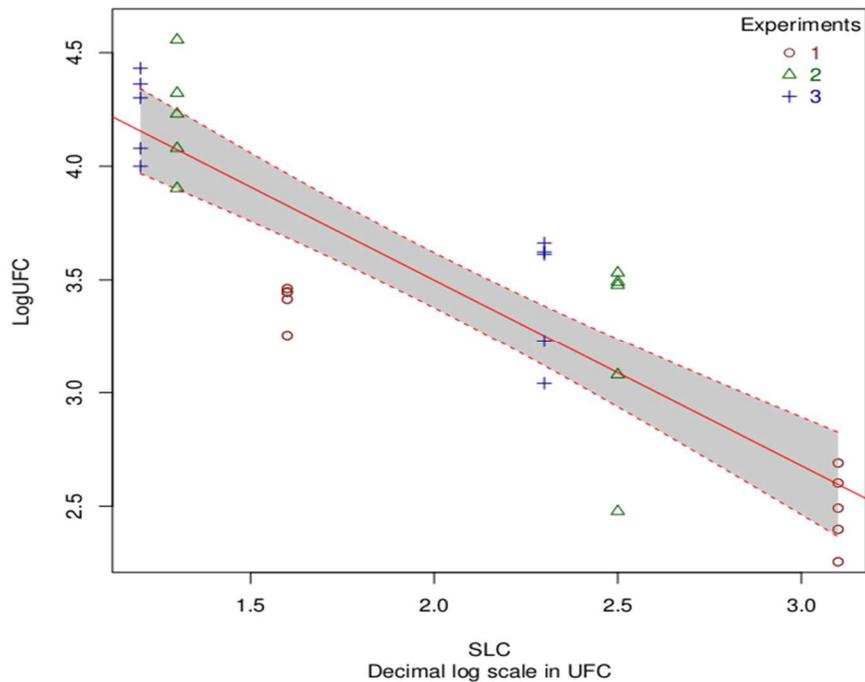
Se predijeron nuevos valores de LogUFC y su intervalo de confianza del 99%.

Primero, nuevas dosis de FLC para las cuales queremos predecir LogUFC.

Ajustado	Menor	Mayor
1 4.155041	3.968033	4.342049
2 4.139291	3.954848	4.323733
3 4.123540	3.941636	4.305445
4 4.107790	3.928396	4.287185
5 4.092040	3.915125	4.268955
6 4.076290	3.901824	4.250756

5.7.4.8. Modelo de la relación lineal entre los valores de FLC (mg/100 µl) de *A. niger* y de logUFC que entran dentro de los límites de confianza del 95 %.

Obtenemos una gráfica más elaborada en donde se presentan los valores de LogUFC que entran dentro de los límites de confianza del 95 %:



Se presentan los datos originales de tres experimentos, indicados como símbolos distintos con diferentes colores como se muestra en la leyenda. La línea roja representa el modelo estimado: $\text{LogUFC} = 5.13984 - 0.82067 \text{ FLC}$, mientras que las líneas rojas punteadas representan los límites de confianza inferior y superior del 95%. Gris muestra la región de confianza del 95%.

Finalmente, en la figura "Gráfica del punto # 9" podemos observar la heterogeneidad de la respuesta en los distintos experimentos. En particular, en el experimento 1 (círculos marrones) vemos que las cuatro observaciones en la dosis más baja están fuera del IC del 95% previsto;

En general 5, 6 y 6 para los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente (en total 17 de las 30 observaciones) caen de la región de confianza del 95%. Esto significa que incluso cuando la tendencia general es lineal, existe una incertidumbre relativamente grande en la predicción del Log de UFC como función de FLC.

VI. DISCUSIÓN.

El ecosistema microbiano está compuesto de componentes bióticos, que son la flora microbiana; y de componentes abióticos, que son la composición y características físicas del suelo. Estos componentes influyen sobre las asociaciones existentes entre diferentes microorganismos del suelo, las que pueden ser de naturaleza beneficiosa o perjudicial (Atlas, 1998). Las interacciones perjudiciales, conocidas como interacciones antagónicas, son las relaciones en las cuales una especie es inhibida o afectada adversamente por otra especie en el mismo ambiente. Este tipo de interacción se divide en las siguientes subdivisiones, que son: la competencia, el amensalismo, la depredación y el parasitismo (Alexander, 1971).

En la competencia dos o más microorganismos compiten por un factor limitante del entorno, como pueden ser nutrientes y espacio. Ambos pueden ser afectados, pero el mejor adaptado predominará o eliminará a los otros que dependen de la misma sustancia nutritiva limitada. (Alexander, 1971; Bartha, 1998).

El parasitismo y la predación son asociaciones que involucran un ataque directo entre dos organismos y uno de ellos se alimenta del otro, así el parásito o predador se beneficia y puede depender de esta interacción para vivir, el huésped es afectado y puede ser eliminado. El parásito depende del huésped y se alimenta de las células, tejidos o fluidos del organismo huésped. En la predación, el organismo depredador se alimenta directamente y mata al organismo (Alexander, 1971).

Las comunidades microbianas que apoyan altas densidades de poblaciones disímiles se caracterizan por presentar interacciones perjudiciales para muchos de los habitantes, en donde, un gran número de géneros y especies sintetizan y excretan compuestos que pueden ser

daños para el desarrollo de las poblaciones cercanas. A esta interacción se le conoce como amensalismo y se considera que los organismos responsables condicionan su entorno excretando o secretando metabolitos orgánicos o inorgánicos deletéreos a poblaciones cohabitantes o transitorias, sustancias que pueden servir como reguladores químicos de la composición de las comunidades (Alexander, 1971).

En este trabajo se evaluó la capacidad inhibitoria de *Aspergillus niger* ATCC 1015 contra diversos hongos fitopatógenos por medio de la técnica del co-cultivo en medio sólido.

Los resultados obtenidos indican que *A. niger* ATCC 1015 es capaz de inhibir el crecimiento micelial de *A. alternata*, *F. oxysporum* y *S. cepivorum*. Sharma-Sameer (2012) et al, describieron resultados similares sobre la interacción de *A. niger* contra *F. oxysporum* var. *Cumini*. Ellos observaron una supresión del crecimiento de *F. oxysporum* provocando la formación de clamidosporas. Además, el micelio mostró lisis y se observó la penetración de las hifas de *A. niger* dentro de las hifas de *F. oxysporum*, provocando también su lisis.

De manera similar, Takhur y Harsh. (2014), determinaron la eficacia inhibitoria de *A. niger* sobre el crecimiento de la colonia de *Alternaria alternata* al confrontarlos en medio sólido, evaluando este comportamiento por medio de la determinación del área de las cepas confrontadas, obteniendo un porcentaje de inhibición sobre *A. alternata* del 67.4%, a los 10 días de incubación.

En otro estudio, Vyas-Ashish et al. (2015), evaluaron la capacidad antagónica de *A. niger* demostrando que *A. niger* provocaba un 90.8%, 84.6%, 83.0% y 4.10% de inhibición sobre el crecimiento de *A. alternata*, *Alternaria* sp., *Geotrichum* sp. y *Gliocladium* sp. respectivamente.

Distintos resultados en donde varios autores han evaluado la capacidad inhibitoria de distintas cepas fúngicas por medio del cultivo doble en medio sólido, han presentado valores de porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PIRC) que indican que puede haber una variación significativa de estos entre las razas de la misma especie fúngica.

Los valores de PIRC obtenidos de las confrontaciones en este trabajo, han demostrado ser cercanos a los descritos al confrontar a las mismas especies de hongos.

En distintos reportes se ha confrontado a *A. niger* contra diferentes especies de hongos, presentando este hongo distintos patrones de crecimiento. Un ejemplo de esto es el estudio de Chatterjee et al. (2016), quienes demostraron que al cultivar *A. niger*, *Fusarium verticillioides* y *Clonostachys rosea* en cultivos simples y duales en medio sólido durante 30 días, la aptitud competitiva de cada hongo cambiaba con el tiempo. En el modo de comportamiento que predominó, *F. verticillioides* tuvo un efecto inhibitorio sobre *A. niger*, el cual inhibe a *C. rosea* y éste a su vez tiene la capacidad de inhibir a *F. verticillioides*. Una observación interesante sobre el comportamiento de *A. niger*, fue que mostró la mayor capacidad de supresión en la acumulación de metabolitos producidos por los otros hongos y fue también la especie con mayor capacidad de transformación de metabolitos producidos por ellos.

Las variaciones en el comportamiento que presenta *A. niger* al confrontarse con diferentes especies de hongos puede deberse al amensalismo, en donde los hongos reaccionan excretando compuestos que afectan al desarrollo del otro. (Alexander, 1971).

Existen varios reportes que indican que el hongo *A. niger* produce compuestos con actividad antifúngica, los cuales se han estudiado en el Laboratorio de Micotoxinas de esta Institución contra hongos fitopatógenos productores de micotoxinas.

Rodríguez Sixtos (2011) encontró que el filtrado libre de células (FLC) de cultivos de *A. niger* ATCC 19888, provocaban la inhibición del crecimiento de *A. parasiticus*. Al separar este filtrado en fracciones con PM de 3 kDa y 1 kDa y añadirlos a un cultivo líquido de *A. parasiticus*, ocurrió inhibición en el crecimiento, pero fue diferente, siendo de 309.mg y 297.90 mg de micelio, respectivamente comparado con el control sin adiciones que fue de 378.76 mg (Rodríguez-Sixtos, 2011).

Al utilizar el filtrado de los cultivos de *A. niger* ATCC 1015, en medio líquido HM a pH 4, ocurrió la inhibición del crecimiento de *A. parasiticus* del 19 % (Rodríguez-Sixtos, 2011).

En un estudio posterior, Toriz (2015) identificó los metabolitos presentes en la fracción de 1 kDa del FLC de *A. niger* ATCC 1015, la que fue purificada mediante cromatografía reversa, encontrando aminas primarias, secundarias y terciarias, epóxidos, cetonas, hidrocarburos lineales e hidrocarburos secundarios. Con respecto a su estructura, éstos pueden ser: polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos y pirimidinas fluoradas entre otros.

Con el interés de seguir estudiando la capacidad antifúngica del Filtrado Libre de Células (FLC) de *A. niger*, en este trabajo se obtuvieron 7 lotes del FLC. Estos mantenían la misma actividad antagónica que el Filtrado antes de ser liofilizado, y los metabolitos activos se mantuvieron estables a lo largo del estudio.

Al cultivar a *F. oxysporum* en medio líquido con FLC de *A. niger* se produjo una germinación del 8 % de de las esporas a las 24 h, en comparación con el control que presentó 80 % de esporas germinadas, durante el mismo tiempo de incubación

Un efecto similar se observó por Rodríguez-Sixtos (2011), quien al exponer esporas de *A. parasiticus* al filtrado de *A. niger* ATCC 1015 se observó un retraso en su germinación de las

esporas, ya que solo el 24% de ellas germinó a las 28 h de exposición. Otros resultados similares se obtuvieron del estudio de Setyawatidharmaputra (2003), quien cultivó a *A. flavus* toxigénico en un filtrado del cultivo de *A. niger* BIO 2132 inhibiendo su crecimiento en un 68 %.

Otra de las observaciones realizadas como parte de la evaluación del efecto del FLC de *A. niger* sobre *F. oxysporum* en medio líquido, fue que provocó una disminución notoria en la velocidad de alargamiento de las germínulas de *F. oxysporum*. Este resultado coincide con lo observado cuando se cultivó a *F. oxysporum* en medio sólido adicionado del FLC de *A. niger*, lo que provocó una disminución de la velocidad de crecimiento radial cuatro veces menor al del tratamiento sin FLC a los 8 días de incubación.

Estos resultados son similares a los descritos por Dwived-Enespa y col. (2013), quienes evaluaron el efecto del filtrado del medio de cultivo de *A. niger* sobre el crecimiento de *Fusarium solani* y *F. oxysporum* en medio sólido. La adición de 50 % o 70 % del filtrado causó una inhibición completa de su crecimiento micelial.

Nuestros datos también mostraron que el efecto del FLC sobre *F. oxysporum* en medio sólido afectó la producción de esporas, observándose una producción de 2 unidades exponenciales más baja que el control

El efecto del FLC de *A. niger* fue notorio sobre el crecimiento lineal del micelio de las esporas a través del tiempo. Se observó que al exponer a las esporas con 726 µg FLC/100µl PDB y sin FLC durante dos días de exposición, las longitudes de los micelios (µm) son mucho menores, siendo de 93 µm y 176 µm (con FLC y sin FLC, respectivamente), que a los 4 días de exposición, en donde se obtuvieron 330 µm y 430 µm (con FLC y sin FLC, respectivamente). Estos resultados demuestran que el efecto del FLC se rompió en el transcurso del tiempo ya que las longitudes miceliales en el tratamiento con FLC llegan a ser muy próximos a los de los tratamientos control.

Sin embargo, al probar la efectividad del FLC de *A. niger* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum* en medio sólido (Resultados 5.4), los crecimientos del tratamiento 72.6 mg FLC/10ml siempre permanecieron notoriamente menores a los del tratamiento sin FLC.

Para demostrar que el FLC de *A. niger* ATCC 1015 era un agente realmente efectivo para controlar a *F. oxysporum* KFM05, también fue necesario determinar el grado de disminución en la viabilidad que el FLC de *A. niger* provoca sobre las esporas de *F. oxysporum*. Se encontró que el FLC de *A. niger* causó una disminución de la viabilidad de las esporas de *F. oxysporum* que llegó a ser casi total (solo 1.3 % de esporas viables al quinto día de incubación).

Para evaluar la viabilidad de las esporas fúngicas en este estudio se utilizó el colorante de ácidos nucleicos, el yoduro de propidio, el cual no penetra en las células intactas y solo la hace cuando la membrana plasmática ha sido dañada. Este se utiliza para para la determinación de la viabilidad en células fúngicas y se ha descrito previamente en diferentes estudios. Uno de estos estudios fue el de Troskie y col. (2014), quienes analizaron el efecto del péptido tirocidina (mezcla Trc) y las tirocidinas sobre la morfología de las esporas de *Fusarium solani* y *Botrytis cinerea* utilizando los colorantes impermeables a las membranas, SYTOX verde y yoduro de propidio, revelando que dichos compuestos, además de ser letales, tenían un impacto significativo en la morfología, retardaban la germinación y pausaban la hiper-ramificación de las hifas.

El grado de daño que causó el FLC de *A. niger* sobre la pared celular de las esporas de *F. oxysporum* se midió por la técnica MFA (Microscopía de Fuerza Atómica) por medio de la determinación del módulo de elasticidad de la superficie de las esporas de *F. oxysporum*. El módulo de elasticidad es una medida de la rigidez de un material sólido (expresado en Pascales), en donde al ser los valores más altos, mayor es la rigidez del material

Los resultados demostraron que la exposición de las esporas a 9.3 mg/mL provocó un ablandamiento de la pared celular, pues los módulos de elasticidad sobre las tres muestras medidas tuvieron los valores entre (0.02-0.35 GPa), (0.05-0.35 GPa) y (10-25 GPa), siendo más bajos, en su mayoría, a los del tratamiento sin FLC que presentó valores de 10-18 GPa, 11-17 GPa y 0-16 GPa.

Schoffemeer et al. (1999) realizaron un estudio para determinar la composición química y estructural de la pared celular de *Fusarium oxysporum*. Los análisis químicos de su trabajo mostraron que las paredes de las hifas están compuestas de (N-acetil) -glucosamina, glucosa, manosa, galactosa, ácido urónico y proteínas. Ellos también realizaron un análisis de difracción de rayos X que reveló la presencia de N-acetil-glucosamina polimérica (quitina) y glucosa (β -1,3-glucano y α -1,3-glucano). Por medio de microscopía electrónica también demostraron que la pared celular estaba compuesta de dos capas, demostrando que la quitina está situada en el lado interno de la pared y está enmascarada en parte por una capa externa de glicoproteínas. Basándose en estudios en varios hongos, se ha demostrado que la pared celular está compuesta principalmente por quitina, glucanas, mananas y glicoproteínas. La estructura y la biosíntesis de la pared celular fúngica es única y, por lo tanto, es un excelente objetivo para el desarrollo de compuestos antifúngicos. A pesar de que no se han determinado los compuestos que se encuentran en el FLC de *A. niger* 1015, su efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas, del crecimiento y viabilidad de *F. oxysporum*, se sugiere que el FLC podría ser utilizado para el control de este hongo fitopatógeno. Vale la pena mencionar que la *A. niger* tiene una larga historia de uso seguro. Muchas de las aplicaciones industriales de su uso han recibido el estatus de GRAS (generalmente considerado seguro), por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos bajo la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos

Finalmente, para tener una referencia sobre la cantidad del FLC efectiva para su uso en pruebas de campo, en este estudio se determinó la concentración mínima inhibitoria que fue de 2.3 mg FLC/ L, la cual tiene un efecto sobre 10^4 esporas al haberlas expuesto estando contenidas en un volumen total de 100 μ l. En estas mismas condiciones se calculó la concentración mínima fungicida, que fue de 4.6 mg/L de FLC de *A. niger*. Este valor es una referencia con la cual podemos calcular la dosis letal para diferentes concentraciones de esporas de *F. oxysporum* y también para realización de posteriores pruebas con el fin de evaluar del FLC de *A. niger* en condiciones in vivo. De nuestros datos sobre el rendimiento calculamos que cada lote de 175 ml FLC produce en promedio 1749.65 mg de producto seco, lo que equivale a 380 dosis letales.

VII. CONCLUSIONES.

- *Aspergillus niger* ATCC 1015 provoca la inhibición del crecimiento radial sobre los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* KFM05, *Alternaria alternata* y *Sclerotium cepivorum*, en valores de 34%, 41.7 % y 79.4 %, respectivamente, al confrontarlos en medio sólido.
- Se logró estandarizar el proceso de producción del filtrado libre de células de *A. niger* ATCC 1015 y su liofilización.
- *Fusarium oxysporum* KFM05 de agave germina a las 8 h en medio de cultivo líquido.
- El FLC de *A. niger* ATCC 1015 tiene efecto inhibitorio sobre la germinación y el desarrollo del micelio de *F. oxysporum* KFM05 en medio de cultivo líquido PDB.
- El FLC de *A. niger* inhibe el crecimiento radial de *F. oxysporum* en medio de cultivo sólido PDA, disminuyendo 4 veces el tamaño del diámetro colonial.
- La exposición de *Fusarium* al FLC de *A. niger* disminuye su viabilidad llevándolo hasta el 1.3 % de esporas viables.
- El FLC de *A. niger* altera la estructura de la pared celular de las esporas de *Fusarium oxysporum* aumentando su elasticidad.

- La concentración mínima inhibitoria del FLC (1.2 mg FLC/100 μ l) disminuye 97.6 % la viabilidad de las esporas. La concentración mínima fungicida fue de 4.6 mg FLC/ 100 μ l.

VIII. PERSPECTIVAS.

- Realizar experimentos de efectividad en campo. Utilizar el FLC de *Aspergillus niger* ATCC 1015 sobre cultivos de agave infectado con *Fusarium oxysporum*. Además, estandarizar el procedimiento y condiciones para su aplicación.
- Determinar el efecto del FLC de *A. niger* sobre el contenido de los componentes estructurales de la pared y membrana celular del hongo *F. oxysporum*.
- Estudiar cómo se modula en *F. oxysporum* la expresión de genes homólogos relacionados a la producción de glucanas RKS1 y RHO1 y el gen *chs4* relacionado con la producción de quitinasas al momento de exponerlo al FLC de *A. niger*, así como su expresión diferencial de proteínas estructurales reguladas por el gen homólogo de WAEs y las glicosiltransferasas reguladas por el gen GAS, esto con el fin de comprender qué potencial metabólico del genoma se está afectando.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdullah M. S., Jacques F. M. (2016). Fusarium: Molecular Diversity and Intrinsic Drug Resistance, PLOS Pathogens, 12. doi:10.1371/journal.ppat.1005464
- Adebola M. O., Amadi J. E. (2010). Screening three *Aspergillus* species for antagonistic activities against the cocoa black pod organism (*Phytophthora palmivora*), Agriculture and Biology Journal of North America, **1**, 362-365.
- Akköprü A., Demir S. (2005). Biological Control of Fusarium Wilt in Tomato Caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some *Rhizobacteria*, Journal of Phytopathology, **153**, 544-550.
- Alexander M. (1967). Introduction to Soil Microbiology. Wiley. Part 2, 207-386.
- Aluko, M.O., and Hering T.F. (1970). The mechanisms associated with the antagonistic relationship between *Corticium solani* and *Gliocladium virens*. Trans. Br. Mycol. Soc. **55**, 173-179.
- Andrade-Domínguez A., Salazar E., Vargas-Lagunas M. C. (2014). Eco-evolutionary feedbacks drive species interactions. The ISME Journal, **8**, 1041-1054.
- Atlas R. M., Bartha R. (1998). Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th ed. p 10-11.
- Ávila-Miranda M., López-Zazueta J. G. (2010). Vascular wilt by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul), J. PACD, **12**, 166-180.

- Belgrove Aneen. (2007). Biological control of *Fusarium oxysporum* *F. sp. cubense* using non-pathogenic *F. oxysporum* endophytes. Thesis to obtain the degree of Masters in Science, especialidad en Ciencias Agrícolas, University of Pretoria.

- Bent K. J. (1967). Electrophoresis of proteins of 3 *Penicillium* Species on acrylamide gels. *J. gen. Microbiol*, **49**, 195-200.

- Bent K. J. (1967) Vapour action of fungicides against powdery mildews. *Annals of Applied Biology* An international journal of the QQB, **60**, 251-263.

- Breitling R., Ceniceros A. (2013). Metabolomics for Secondary Metabolite Research. *Metabolites*, **3**, 1076-1083.

- Bull y Slater. 1982. *Microbial interactions and communities*. Academic Press. 567 pg.

- Chang, I. P., Kommendhal, T. (1968). Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopathology*, **58**, 1395 – 1401.

- Chatterjee S., Kuang Y., Spivalio R. (2016). Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology*, **16**, 83-93.

- Cronin, D., Moënne-Loccoz. (1997). Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonas F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1357-1361.

- De Boer M., Bom P. (2003). Control of Fusarium Wilt of Radish by Combining *Pseudomonas putida* Strains that have Different Disease-Suppressive Mechanisms.

- D'Enfert C. 1997. Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 21:163–17
- Deising H. B., Reimann S., Pasholati S. F., (2008), Mechanisms and Significance of Fungicide Resistance, *Brazilian Journal Microbiology*, **39**, 286-295.
- Dwivedi S. K., Enespa. (2013). In vitro efficacy of some fungal antagonists against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing brinjal and tomato wilt.
- Eldor A. P. (2007) *Soil Microbiology Ecology, and Biochemistry*. Elsevier. Third Edition. 5-13.
- Enríquez-Flores C. I., Gervacio-Arciniega J. J., Cruz-Valeriano E. (2012). Fast frequency sweeping in resonance-tracking SPM for high-resolution AFAM and PFM imaging. *Nanotechnology*, **23**, 495705.
- Fernández-Ortuño D., Torés J. A., De Vicente A. (2008). Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi, *International Microbiology*, **11**, 1-9.
- Fothergill W. (2012). Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents: How to Detect Resistance. *Antifungal Susceptibility Testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Methods*. Chapter 2. Hall Ed. 65-74.
- Fox E. M., Howlett B. J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, **11**, 481-487.
- Fravel D., Olivain C., Alabouvette C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol, *New Phytologist*, **157**, 493-502.

- García R., Botet J., Rodríguez-Peña J. M., Bermejo C. (2015). Genomic profiling of cell Wall-interfering compounds: identification of a common gene signature. *BMC Genomics*, **16**:683.
- Gopal M., Gupta A., Thomas G. V. (2012). Bespoke microbiome therapy to manage plant diseases. *Frontiers Microbiology*, **4**, 355-361.
- Jernejc K, Cimemra A., Perdih A., (1986), Comparison of different methods for protein determination in *Aspergillus niger* mycelium, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **23**, 445-448.
- Kandhari J., Majumder S., Sem B., (2000). Impact of *Aspergillus niger* AN27 on growth promotion and sheath blight disease reduction in rice. *Pest Manage. Sci.*, **12**, 21-22.
- Kerr, A. (1972). Biological Control of Crown Gall: Seed Inoculation. *J. appl. Bact.*, **35**, 493 – 497.
- Kommendahl, T., and Mew, I. C. (1975). Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists. *Phytopathology* **65**, 296-300.
- Lartey R. T. (2006). Dynamics of Soil Flora and Fauna in Biological Control of Soil Inhabiting Plant Pathogens. *Asian Network for Scientific Information*, **5**, 125-142.
- Li X., Quan C. S., Fan S. D. (2007). Antifungal activity of a novel compound from *Burkholderia cepacia* against plant pathogenic fungi. *Letters in Applied Microbiology*, **45**, 508-514.
- Lionakis M. S., Lewis R. E., Samonis G., Kontoyiannis D. P. (2003). Pentamidine is active in vitro against *Fusarium* Species, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**, 3252-3259.

- LIVE/DEAD BacLight Bacterial ® Viability Kits™. 2006. Molecular Probes.
- Mateos P. (2008). Producción industrial de Metabolitos Secundarios. ResearchGate, 261983344.
- Mérillon J. M., Gopal K. (2012). Plant Defence: Biological Control. Progress in Biological Control. Chapter, **2**, 35-37.
- Michielse C. B., Rep M., (2009), Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*, Mol. Plant Pathol., **10**, 311-24.
- Mishra S. R., (2005), Plant Protection and Pest Management. Discovery Publishing House.
- Monahim A., M. F.; Abo-Elyousr K. A. M., y Morsy, K. M. (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). Crop protection, **30**, 185-191.
- Moore L. W., Warren G. (1979). *Agrobacterium Radiobacter* Strain 84 and Biological Control of Crown Gall. Phytopathol., **17**, 79-163.
- Murthy G.S., Bagyaraj D.J., (1978). Free amino nitrogen and amino acids in *Cajanus cajan* in relation to *Fusarium* wilt resistance. Indian Phytopathology, **31**, 482-485.
- Oskay M., Üsame A., (2004), Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African Journal of Biotechnology, **3**, 441-446.
- Pandey A., Ali I., Butola K. S., Chatterji T. (2011). Isolation and Characterization of Actinomycetes from soil and evaluation of antivacterial activities of Actinomycetes against

pathogens. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, **2**, 384-392.

- Pandey y Upadhyay (2000), Microbial population from Rhizosphere and Non-Rhizosphere soil of pigeonpea : Screening for Resident Antagonist and Mode of Mycoparasitism J. Mycol. Pl. Pathol. 30, 7 -10.
- Pertot Ilaria, Alabouvette C., Hinajeros E. E. (2015). Mini-paper- The use of microbial biocontrol agents against soil-borne diseases. Eip-agri, Agriculture and Innovation.
- Pierson LS., Pierson EA. (1996). Phenazine antibiotic production by the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens*: role in ecology and disease suppression. FEMS Microbiology Letters, **136**, 101–108.
- Pillet F., Lemonier S., Schiavone M. (2014). Uncovering by Atomic Force Microscopy of an original circular structure at the yeast cell Surface in response to heat shock. BMC Biology, 6-12.
- Ponomarova O., Patil K. R. (2015). Metabolic interactions in microbial communities: untangling the Gordian knot. Current Opinion in Microbiology, **27**, 37-44.
- Punja Z. K., Yip R., (2003), Biological control of damping-off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers, Canadian Journal of Plant Pathology, **25**, 411-417.
- Ramírez-Ramírez M. J., Mancilla-Margalli N. A., (2017), Epidemiology of Fusarium Agave Wilt in Agave tequilana Weber var. Azul, Plant Protect. Sci., **3**, 144-152.

- Reeslev M., Kjoller A., (1995), Comparison of Biomass Dry Weights and Radial Growth Rates of Fungal Colonies on Media Solidified with Different Gelling Compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 4236-4239.

- Rifat H., M. Minhaj A. K., Mahboob A. (2013). Chitinases: An update. *J. Pharm. Sci*, **5**, 9-21.

- Rojo F. G., Reynoso M. M., (2007), Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut Brown root rot under field conditions, *AGRIS: International Information System for the Agricultural Science and Technology*, **26**, 549-555.

- Rodríguez-Sixtos H. A., (2011). Estudio sobre la interacción entre *Aspergillus niger* (ATCC 16888 y 1015) y *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992 y su efecto sobre la síntesis de aflatoxinas. Tesis para obtener el grado de Maestra en ciencia, especialidad en biotecnología de plantas, CINVESTAV – Irapuato.

- Royse D. J., Ries S. M., (1978), The Influence of Fungi Isolated from Peach Twigs on the Pathogenicity of *Cytospora cincta*, *Ecology and Epidemiology*, **68**, 603-607.

- Setyawatidharmaputra Okky. 2003. Antagonistic effect of three fungal isolates to aflatoxin-producing. *Biotropia*. 21, 19-31.

- Sharma P. K., et al (2011), Synthesis and biological evaluation of some 4-functionalized-pyrazoles as antimicrobial agents, **64**, 120-127.

- Sharma R., (2012), Pathogenicity of *Aspergillus niger* in plants, *Cibtech Journal of Microbiology*, **1**, 47-51.

- Sharma S., Bohra A. (2012). Effect of Chemical fertilizers and organic manure of wilt disease of cumin caused by *Fusarium oxysporum* var. *cumini*. *Journal of Eco-Physiology*, **4**, 39-42.

- Shaukat S. S., Siddiqui I. A., (2003), Zinc Improves Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by the Antagonistic Rhizobia. Pakistan Journal of Biological Sciences, **6**, 575-579.
- Shelley D., Prajna L., Haug S., Fothergill A. W., Cevallos V. (2009). Activity of antibiotics against *Fusarium* and *Aspergillus*. Br. J. Ophthalmol., **93**, 116-119.
- Schoffelmeer. 1999. Biochemical aspects of the cell Wall of *Fusarium oxysporum*. Cornelissen adapted from Fungal Genetics and Biology. **27**, 275-281.
- Steddom K., Becker O., Menge J.A., (2002), Repetitive Applications of the Biocontrol Agent *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal and Effects on Populations of *Phytophthora parasitica* in Citrus Orchards.
- Tang J. (2011). Microbial Metabolomics. Current Genomics, **12**, 391-403.
- Thakur S., Harsh N. S. K. (2014). Phylloplane fungi as biocontrol agent against *Alternaria* leaf spot disease of (Akarkara) *Spilanthes oleracea*. Bioscience Discovery, **5**, 139-144.
- Troskie A. M. (2014). Inhibition of agronomically relevant fungal phytopathogens by tyrocidines, cyclic antimicrobial peptides isolated from *Bacillus aneurinolyticus*. Microbiology, **160**, 2089-2101.
- Tu J. C., (1980). The ontogeny of the sclerotia of *Colletotrichum coccodes*. Canadian Journal of Botany, **585**, 631-636.
- Vicencio-Toriz D. P. (2015). Identificación de los compuestos fungistáticos producidos por *Aspergillus niger* ATCC 1015 y sus efectos sobre hongos micotoxigénicos. Tesis para obtener el grado de Maestra en ciencia, especialidad en biotecnología de plantas, CINVESTAV – Irapuato.

- Villa-Martínez A., Pérez-Leal R., (2014), Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales, *Acta Agronómica*, **64**, 194-205.
- Vyas A., Kumari B., Putatunda C. (2015). Antagonistic effects of *Aspergillus niger* against Plant pathogenic fungi isolated from *Solanum tuberosum*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **6**, 5-12.
- Waterborg J. H. (2002). The Lowry Method for Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook*. 2nd Edition, 7-9.
- Wessels J. G. H., (1993), Wall Growth, Protein Excretion and Morphogenesis in Fungi, *New Phytologist*, **123**, 397-413.
- Zhao L, Schaefer D., Marten M. R. (2006), Assessment of Elasticity and Topography of *Aspergillus nidulans* Spores via Atomic Force Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 955-960.