

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Doctorado en Ciencias Aplicadas

Doctoranda
Lic. Marcela P. Barengo

Caracterización de cepas fúngicas de *escovopsis* nativas de misiones antagonistas de *leucoagaricus* para control biológico de hormigas cortadoras de hojas

Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de “Doctora en Ciencias Aplicadas”

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto, queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Director
Dr. Pedro Darío Zapata

Co-Directora
Dra. María Lorena Castrillo

Posadas, 2023



Esta obra está licenciada bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

- Tesis Doctoral -
Marcela Paola Barengo

A circular inset image showing a microscopic view of a leaf surface. The surface is heavily colonized by a dark, fuzzy fungal growth, likely Escovopsis. There are also several small, red, elongated structures scattered across the surface, which are likely ant mandibles or other biological debris. The background is a light, yellowish-brown color, possibly representing the leaf's natural color or a specific growth medium.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS DE
ESCOVOPSIS NATIVAS DE MISIONES
ANTAGONISTAS DE *LEUCOAGARICUS* PARA
CONTROL BIOLÓGICO DE HORMIGAS
CORTADORAS DE HOJAS

Año 2023



Universidad Nacional de Misiones
Facultad de Ciencias Exactas Químicas y
Naturales



**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS DE *ESCOVOPSIS* NATIVAS DE MISIONES
ANTAGONISTAS DE *LEUCOAGARICUS* PARA CONTROL BIOLÓGICO DE HORMIGAS
CORTADORAS DE HOJAS**

Por Lic. Marcela P. BARENGO

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la
Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de
DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS

Posadas, República Argentina
2023

Director

Dr. Pedro Darío ZAPATA

Co-Directora

Dra. María Lorena CASTRILLO

TRIBUNAL EXAMINADOR (Resolución Consejo Directivo N°644/2023)

Titulares

Dra. Cecilia Cristina CARMARÁN	Universidad de Buenos Aires
Dr. Javier Domingo LIOTTA	Universidad Nacional de Misiones
Dra. Graciela Beatriz GAVAZZO	Universidad Nacional de Misiones

Suplentes

Dra. Adriana Mabel TORRES	Universidad Nacional de Río Cuarto
Dra. María Evangelina VALLEJOS	Universidad Nacional de Misiones
Dra. Marina Inés QUIROGA	Universidad Nacional de Misiones

DEFENSA ORAL Y PUBLICA (Resolución Consejo Directivo N°)

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS DE *ESCOVOPSIS* NATIVAS DE MISIONES
ANTAGONISTAS DE *LEUCOAGARICUS* PARA CONTROL BIOLÓGICO DE HORMIGAS
CORTADORAS DE HOJAS**

Marcela P. BARENGO

Lugar de desarrollo del trabajo de tesis

**Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones
“María Ebe Reca” (InBioMis), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad
Nacional de Misiones**

COMISION DE SUPERVISION (Resolución Consejo Directivo N° 089-18)

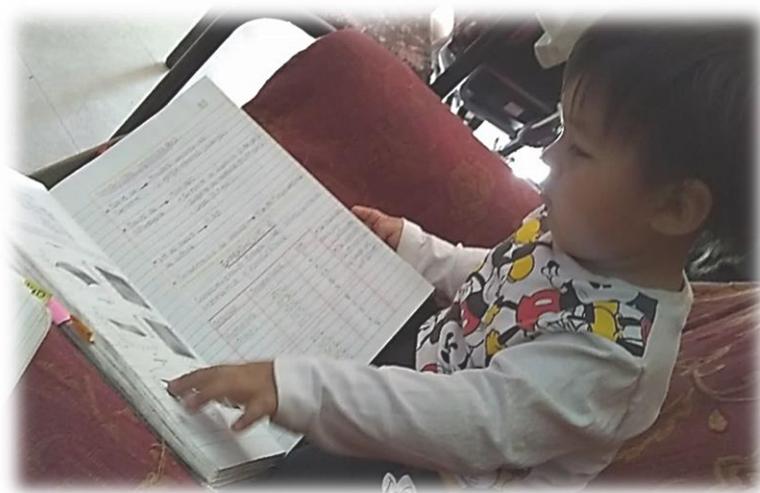
Dra. Martha VON SPECHT	Universidad Nacional de Misiones
Dra. Marta YAJIA	Universidad Nacional de Misiones
Dr. Sergio KAUFMAN	Universidad de Buenos Aires

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS

Proyecto de Carrera N° 10933/11

Con reconocimiento de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación
Universitaria (CONEAU) N° 344/11.

Esta tesis está dedicada a mi primer sobrino, Lucio,
que llego para motivarme más q nunca a poner un granito de arena
para verlos a él y a Bauti crecer a en un mundo mejor



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a quienes dirigieron mi trabajo doctoral.

A Pedro, por su confianza, desde mi tesis de grado brindándome la oportunidad de seguir trabajando y creciendo en este equipo hermoso. Gracias por tu generosidad al dirigir esta tesis incentivándome en cada etapa, con mucha energía.

A Loli, quien fue la primera en abrirme las puertas a este mundo de la investigación, guiando e impulsando mis pasos durante mi tesis de grado y confiando en mí, apoyándome y brindándome todo lo necesario para poder cumplir mis objetivos en esta tesis doctoral. Pero, sobre todo, mostrándome su calidad humana, al aconsejarme y apoyarme cuando me tocó pasar momentos difíciles, siempre transmitiéndome un gran cariño. ¡¡Gracias por todo Lo!! Sos una ídola, te quiero.

A Nati, mi compañera, colega y por sobre todo mi amiga!!; con quien transitamos a la par este camino, festejando juntas cada triunfo y apuntalándonos en cada tropiezo. Estoy segura que nada habría sido igual de no haber trabajado juntas. Le debo los mejores momentos, las risas mas efusivas y la contención eterna. Te quiero mi hermana de la vida.

A todos los miembros del InBioMis, muchos de los cuales formaron parte técnica a espiritual de todo este proceso. A sus directoras María K. y Adri, a la directora anterior María F. Al primer grupo de contención cuando empezó esta tesis, Nati (de nuevo), Gastón, Sergio, Marilyn, Max. A Emi, un gran compañero; con su predisposición, sus ideas, su calidad de persona, me dio un gran impulso para poder cumplir los primeros objetivos de esta tesis. A Marcelita, una genia, siempre dispuesta a ayudarnos, tomándose el tiempo para transmitirnos bien todo. A Dani, quien me presentó el mundo de las enzimas durante mi tesis de grado, y a quien recurro siempre que tengo una duda al respecto, es lo más!!.

Particularmente al grupo hermoso de la pecera, Gus siempre predispuesto y pendiente a ayudarnos en lo q necesitemos junto con Lo; ambos nos dan una gran seguridad y apoyo como equipo, para



lograr cualquier objetivo que nos propongamos. Juli y Andre, unas genias en mayuscula, estos años con la mejor de las energías siempre, que manera de reírnos!!, de compartir experiencias, cursos, charlas. Tani y Ceci, con quienes fui compartiendo mucho más estos últimos años y son excelentes personas y profesionales.

A mi comisión de Seguimiento del Doctorado en Ciencias Aplicadas, los Dres. Sergio Kaufman, Martha Von Spetch y Marta Yajia. Muchas gracias por el tiempo dedicado a cada seminario, y por brindarme su conocimiento y recomendaciones para cada etapa de este trabajo.

A las personas más importantes de mi vida, mis pilares, los Barengo. Gracias por su amor incondicional, a mis viejitos Pato y Ramon, a mis hermanos Majo, Gi, Leo, Mariu que me dio el título de tía de Lucio; y Tony que me dio a mi sobri más bebé, Bautista.

A quienes fueron mi segunda familia desde que llegue a Misiones, siempre alentándome y brindándome su cariño fraternal. A Miguel, Anita que se convirtió en un ángel, a Marieta.

A Horacio, quien fue mi compañero durante 18 años, bancándome y alentándome más que nadie, si bien no llegamos juntos al terminar esta tesis, no habría sido nada sin él y el amor q nos tenemos va a ser eterno.

A mis mejores amigos: A Caro, Gastón y Nati, mis compañeros de camino. A mi Mariel siempre haciéndome el aguante desde el norte. Los amo!!!

Y a Ariel, quien fue mi compañero este último año, me amó, me alentó... Eligió mis caratulas y estoy segura q me vio defender esta tesis desde el cielo. Te ♥

Al igual que en mi tesis de grado, termino agradeciendo a aquellos que pusieron piedras en mi camino, que me enseñaron a caer con estilo.



LISTA DE ABREVIATURAS

GC: guanina citosina
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNr: ADN ribosómico
ANOVA: análisis de la varianza
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
CYAm: medio Czapek extracto de levadura modificado
DMSO: dimetilsulfóxido
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatos
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
InBioMis: Instituto de Biotecnología Misiones
ITS: región espaciadora transcrita interna
LBM: Laboratorio de Biotecnología Molecular
ME: extracto de malta
MIP: Manejo Integrado de Plagas
ML: Máxima Verosimilitud
N: Norte
NCBI: del inglés, National Center for Biotechnology Information; Centro Nacional para Información Biotecnológica
ND-PAGE: del inglés, Non Denaturing PolyAcrylamide Gel Electrophoresis; electroforesis no desnaturalizante
NJ: del inglés, Neighbor Joining; vecino más cercano
O: Oeste
p: valor estadístico "p"
Pb: pares de bases
PCR: del inglés, Polymerase Chain Reaction; reacción en cadena de la polimerasa
PDA: del inglés, Potato Dextrose Agar; agar papa dextrosa
pH: potencial hidrógeno
PM: Marcador de peso molecular
p/v: peso/volumen
RSM: del inglés, Response Surface Methodology; metodología de superficie respuesta,
S: Sur
SDS-PAGE: Electroforesis desnaturalizante con sulfato dodecílico de sodio
sp: especie
spp: especies

TBE: Tris-Borato-EDTA (Ácido etilendiaminotetracético)

TCA: ácido tricloroacético

Tm: Temperatura de hibridación

U: Unidad de actividad enzimática

v/v: volumen/volumen

UNaM: Universidad Nacional de Misiones

U.V: Ultra Violeta



LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

LISTA DE TABLAS	Página
Tabla 1. Grados de virulencia de <i>Escovopsis</i> sobre el hongo simbiote <i>L. gongylophorus</i> (Wallace et al., 2014).	28
Tabla 2. Procedimiento para la extracción de paredes celulares fúngicas (Clavijo & Cotes, 1998).	30
Tabla 3. Combinación de niveles para cada factor ensayado y los valores de concentración para cada uno.	33
Tabla 4. Fuentes de nitrógeno evaluadas y los valores de concentración reales para cada nivel.	34
Tabla 5. Variables físico-químicas evaluadas y los valores reales de cada una para cada nivel.	35
Tabla 6. Temperaturas y pHs de reacción ensayados para cada enzima micolítica.	36
Tabla 7. Secuencias depositadas en el NCBI-GenBank, obtenidas para a partir de marcadores ITS, utilizadas para la identificación de los aislamientos de <i>Escovopsis</i> .	49
Tabla 8. ANOVA de RSM de las fuentes de nitrógeno, para la actividad proteasa en <i>Escovopsis primorosea</i> HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza.	58
Tabla 9. ANOVA de RSM de las fuentes de nitrógeno, para la actividad β -1,3-glucanasa en <i>Escovopsis primorosea</i> HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza.	59
Tabla 10. ANOVA de RSM de las fuentes de nitrógeno, para la actividad quitinasa en <i>Escovopsis primorosea</i> HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza.	60
Tabla 11. ANOVA de RSM de factores físico-químicos, para la actividad proteasa en <i>E. primorosea</i> HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza.	63
Tabla 12. ANOVA de RSM de factores físico-químicos, para la actividad β -1,3-glucanasa en <i>E. primorosea</i> HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza.	63
Tabla 13. ANOVA de RSM de factores físico-químicos, para la actividad quitinasa en <i>E. primorosea</i> HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza.	64
Tabla 14. Validación experimental de las condiciones óptimas predichas para la actividad de las enzimas micolíticas de <i>E. primorosea</i> HMP9, en fermentación líquida.	67

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Distribución de las plantaciones forestales en la provincia de Misiones **(a)**. Plantaciones de *Pinus* spp. **(b)**, *Eucaliptus* spp. **(c)** y *Araucaria* spp **(d)**. (tomado de Uasuf & Hilbert con modificaciones [9]). 3
- Figura 2.** Resumen de las interacciones simbióticas existentes en este sistema coevolutivo tripartito: Las hormigas cortadoras de hojas, alimentan con fragmentos vegetales frescos a su hongo mutualista *L. gongylophorus*. y este proporciona la fuente de alimento para sus larvas. El micoparásito *Escovopsis* también se alimenta de *L. gongylophorus*, pero mediante una relación antagónica, que puede comprometer su colonia. Para evitarlo, las hormigas cortadoras de hojas elaboran defensas químicas y físicas para combatir a *Escovopsis*. Las fotografías de esta imagen son de fuente propia. 8
- Figura 3.** Representación de la pared celular fúngica. Los componentes principales de la pared celular fúngica son glucanos, quitina y glucoproteínas. Aunque existen variaciones específicas de especie, se cree que los componentes de la pared celular se organizan como se muestra. La mayor parte de la quitina se considera ubicada cerca de la membrana plasmática. Los β -1,3-glucanos se extienden a lo largo de la pared celular. Las glicoproteínas se modifican ampliamente con oligosacáridos ligados a N y O. Tomado de Bowman [96] con modificaciones. 12
- Figura 4.** Principales enzimas del complejo micolítico que degradan la pared celular del huésped. a) Hidrolisis de un enlace β -1,3-glucosídico por una β -1,3-glucanasa, b) Hidrolisis de un enlace β -1,4 de la quitina por una quitinasa y c) Hidrolisis de un enlace peptídico en una mananoproteína por una proteasa lítica. 13
- Figura 5.** Pellets de un aislamiento de *Escovopsis* creciendo en sistemas de fermentación sumergida. Fotografías tomadas para el presente trabajo. 17
- Figura 6.** Trabajo de campo. **a-b)** Sitios de muestreo. **c-d)** Cámaras superficiales con hongueras expuestas. **e)** InBioMis. 24
- Figura 7.** Aislamiento de los géneros fúngicos *Escovopsis* y *Leucoagaricus*, en Misiones. Colonias de *Escovopsis* creciendo sobre las muestras de hongueras (a y b). Colonias de *Escovopsis* creciendo en placas con medio de cultivo PDA (c y d). *Leucoagaricus* creciendo directamente sobre la muestra de honguera (e). *L. gongylophorus* creciendo en medio de cultivo PDA (f). Las flechas indican las colonias fúngicas de interés. 39
- Figura 8.** Características macroscópicas de los aislamientos de *Escovopsis*. Anverso del crecimiento colonial en placas con medio de cultivo PDA a los 10 días de incubación. 40

- Figura 9.** Características macroscópicas de los aislamientos de *Leucoagaricus*. Anverso del crecimiento colonial en placas con medio de cultivo PDA a los 30 días de incubación. Las flechas señalan la presencia de estáfilas. 41
- Figura 10.** Características microscópicas de los aislamientos de *Escovopsis*. Las flechas negras indican a las vesículas presentes en los conidióforos, con fiálides dispuestas a lo largo de cada una. Se observaron con aumento 40X y las barras negras representan 22 μm . Las flechas rojas indican los conidios globosos a ovoides, con un aumento 100X, y las barras rojas representan 8 μm . 42
- Figura 11.** Características microscópicas particulares de los aislamientos de *Escovopsis* HMP2, HMP3, HMP4, HMP7, HMP8, HMP9, HMP10 y HMP11. Las flechas indican el punto de unión entre dos vesículas catenuladas. Aumento 40X. 43
- Figura 12.** Características microscópicas de los aislamientos de *L. gongylophorus*. Las flechas indican los gongilidios. Aumento 40X, las barras representan 22 μm . 43
- Figura 13.** Colonias de *Escovopsis* creciendo en medio mCYA, a los cuatro días de incubación. Las flechas indican zonas de conidios con coloración rosa pálido. 44
- Figura 14.** Gel de agarosa 1,5% con los productos de PCR obtenidos con ADN de 11 aislamientos de *Escovopsis*. El carril PM corresponde al marcador de peso molecular BioRad Ladder 100 pb DNA 100 mg/mL, el carril C- al control negativo, y los carriles 1 al 11 son las bandas de 500 pb que corresponden a los amplicones de los aislamientos HMP1, HMP2, HMP3, HMP4, HMP5, HMP6, HMP7, HMP8, HMP9, HMP10 y HMP11 respectivamente. 45
- Figura 15.** Análisis de las secuencias consenso, correspondientes a las regiones ITS1-5,8S-ITS2 del ADN ribosomal, de los aislamientos de *Escovopsis*. Se muestran en rosa los espaciadores internos ITS1 e ITS2 y en verde las regiones génicas 18S parcial, 5,8S completo y 28S parcial. 46
- Figura 16.** Árboles filogenéticos construidos a partir de secuencias ITS1-5,8S-ITS2 de los aislamientos de *Escovopsis* HMP1, HMP2, HMP3, HMP4, HMP5, HMP6, HMP7, HMP8, HMP9, HMP10 y HMP11 junto con secuencias recuperadas del NCBI-GenBank. Distancias genéticas calculadas de acuerdo al modelo de sustitución nucleotídica de Kimura-2 parámetros (K2 + I), mediante los métodos de NJ (a) y ML (b). Los números en las ramas representan el soporte probabilístico por el análisis de *Bootstrap* de 1000 réplicas. Los rombos coloreados indican la ubicación de cada aislamiento de interés. Los números de acceso van seguidos de los nombres de las especies. 48
- Figura 17.** Ensayos de patogenicidad: Enfrentamientos *in vitro* y controles experimentales. La imagen superior izquierda muestra cómo se componen los controles y cultivos duales modificados, para cada enfrentamiento: (E) representa a cada aislamiento de *Escovopsis* y (L) a *L. gongylophorus*. 50
- Figura 18.** Evaluación de las pruebas de patogenicidad: a) Según los grados de virulencia de *Escovopsis*, representados por las barras (grado medio \pm desvío estándar) en función del tiempo, para cada enfrentamiento, b) según el grado 52

de inhibición (porcentaje medio \pm desvío estándar) del crecimiento de *L. gongylophorus* por parte de cada aislamiento de *Escovopsis*, y c) Gráfico de comparaciones múltiples del crecimiento radial (en cm) de *L. gongylophorus* en los distintos enfrentamientos, donde las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Test de Tukey, 95,0% de confianza.

Figura 19. Microcultivos analizados mediante microscopia convencional: Las flechas rojas representan a *E. primorosea* HMP9 y las flechas azules a *L. gongylophorus*. a) control de *L. gongylophorus*, aumento 100X, b) control de *E. primorosea* HMP9, aumento 100X, c) enfrentamiento entre *E. primorosea* HMP9 y *L. gongylophorus*, aumento 4X, d) y e) hifas de *E. primorosea* HMP9 entrelazadas, aumento 100X, f) y g) enrollamiento de hifas *L. gongylophorus*, sobre *E. primorosea* HMP9, aumento 100X, h) degradación de hifas de *L. gongylophorus*, sin contacto con *E. primorosea* HMP9, aumento 40X, y i) degradación de hifas de *L. gongylophorus*, en contacto con *E. primorosea* HMP9, aumento 40X. Las barras representan 8 μ m. 54

Figura 20. Efecto de las fuentes de carbono (a) y nitrógeno (b) sobre la actividad enzimática proteasa del aislamiento *E. primorosea* HMP9. Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95,0%. Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$). 55

Figura 21. Efecto de las fuentes de carbono (a) y nitrógeno (b) sobre la actividad enzimática β -1,3-glucanasa del aislamiento *E. primorosea* HMP9. Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95,0%. Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$). 56

Figura 22. Efecto de la interacción entre las variables fuente de carbono y nitrógeno sobre la actividad enzimática quitinasa del aislamiento *E. primorosea* HMP9. Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95,0%. F: *Fusarium*, L: *L. gongylophorus*, EL: extracto de levadura y M: Mandels. 56

Figura 23. Efecto de las concentraciones de fuente de carbono (paredes celulares de *L. gongylophorus*) sobre (a) la actividad proteasa, (b) la actividad β -1,3-glucanasa y (c) la actividad quitinasa, del aislamiento *E. primorosea* HMP9. Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95,0%. Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$). 57

Figura 24. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b) con los factores en orden de significancia decreciente, para la actividad proteasa de *E. primorosea* HMP9. El largo de las barras es proporcional al efecto estandarizado de cada fuente de nitrógeno sobre la actividad enzimática, con el 95,0% de confianza. 59

Figura 25. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b), con los factores significativos, para la actividad β -1,3-glucanasa de *E. primorosea* HMP9. El largo de las barras es proporcional al efecto estandarizado de cada fuente de nitrógeno sobre la actividad enzimática, con el 95,0% de confianza. 60

Figura 26. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b), con los factores significativos, para la actividad quitinasa de *E. primorosea* HMP9. El largo de las barras es proporcional al efecto estandarizado de cada fuente de nitrógeno sobre la actividad enzimática, con el 95,0% de confianza. 61

Figura 27. RSM tridimensional estimada y contorno de respuesta para las concentraciones de nitrógeno, con los puntos óptimos (+) dentro del diseño experimental, para maximizar la deseabilidad en <i>E. primorosea</i> HMP9.	62
Figura 28. Diagrama de Pareto (a) y grafico de efectos principales (b), con el factor significativo, para la actividad proteasa de <i>E. primorosea</i> HMP9, con el 95,0% de confianza.	63
Figura 29. Diagrama de Pareto (a) y grafico de efectos principales (b), con los factores significativos, para la actividad β -1,3-glucanasa de <i>E. primorosea</i> HMP9, con el 95,0% de confianza.	64
Figura 30. Diagrama de Pareto (a) y grafico de efectos principales (b), con los factores significativos, para la actividad quitinasa de <i>E. primorosea</i> HMP9, con el 95,0% de confianza.	65
Figura 31. RSM tridimensional estimada y contorno de respuesta para las variables físico-químicas, con los puntos óptimos (+) dentro del diseño experimental, para maximizar la deseabilidad en <i>E. primorosea</i> HMP9.	66
Figura 32. Optimización total de la actividad enzimática, obtenida para proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas en <i>E. primorosea</i> HMP9.	67
Figura 33. Prueba de diferencia entre medias para las actividades enzimáticas: proteasa (a y b), β -1,3-glucanasa (c y d) y quitinasa (e y f) a diferentes temperaturas y pHs de reacción. Test de Tukey con un nivel de confianza del 95,0%. Las medias con una letra diferente son diferentes significativamente ($p < 0,05$).	69
Figura 34. Termoestabilidad de las actividades enzimáticas proteasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa de <i>E. primorosea</i> HMP9. Estabilidad enzimática residual en el tiempo, cuando los sobrenadantes optimizados se incubaron refrigerados a 5°C (a, d, g); a temperatura ambiente (b, e, h) y a la temperatura de reacción óptima de cada enzima (c, f, i). Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95%. Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).	70
Figura 35. pH estabilidad de la actividad micolítica de <i>E. primorosea</i> HMP9. Actividad residual en el tiempo para proteasas: pHs 3, 4 y 5 (a, b, c); β -1,3-glucanasas: pH 4, 5 y 6 (d, e, f); y quitinasas: pH 3, 4 y 5 (g, h, i). Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95%. Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).	72
Figura 36. Detección de enzimas micolíticas de <i>E. primorosea</i> HMP9. ND-PAGE de los sobrenadantes optimizados, sembrados por duplicado, donde se visualiza la presencia de isoenzimas para (a) proteasas, utilizando tinción con azul de coomasie, (b) β -1,3-glucanasas y (c) quitinasas, utilizando tinción con Rojo Congo. Las flechas indican las regiones donde se detectó actividad enzimática.	73

RESUMEN

En la provincia de Misiones, una de las principales plagas que afecta el sector forestal primario, son las hormigas cortadoras de hojas. Su actividad forrajera consiste en cortar y transportar hasta su nido material vegetal fresco, sobre el cual crece el hongo *Leucoagaricus gongylophorus*, que es su principal fuente de alimento. Por su parte, los hongos del género *Escovopsis*, se consideran parásitos especialistas de *L. gongylophorus*. Por tanto, *Escovopsis*, se representa como un potencial biocontrolador, comprometiendo de manera indirecta la salud y supervivencia de las colonias de hormigas. Entonces, un mejor entendimiento de su biología y mecanismos de acción son determinantes para su aplicación biotecnológica. El objetivo general del presente trabajo fue, aislar, identificar y caracterizar cepas fúngicas del género *Escovopsis* nativas de Misiones con capacidad biocontroladora del hongo simbiote *Leucoagaricus*.

En primera instancia, se aislaron 11 cepas del género *Escovopsis* a partir de nidos de hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex*, en ecosistemas naturales de la provincia de Misiones. Los aislamientos obtenidos fueron identificados y caracterizados mediante un estudio polifásico: la cepa HMP1 (LBM269) se identificó como *E. microspora*, las cepas HMP2 (LBM270), HMP3 (LBM271), HMP4 (LBM272), HMP7 (LBM275), HMP9 (LBM277), HMP10 (LBM278) y HMP11 (LBM279) como *E. primorosea*, las cepas HMP5 (LBM273) y HMP6 (LBM274) como *E. weberi*; y la cepa HMP8 (LBM276) se identificó como *E. catenulata*. Para evaluar su capacidad antagónica frente a *L. gongylophorus* (LBM265), las pruebas de patogenicidad mostraron que todos los aislamientos de *Escovopsis* alcanzaron el máximo de virulencia (grado 4) frente a *L. gongylophorus*. Particularmente, *E. primorosea* HMP9 además de presentar una capacidad antagónica satisfactoria, obtuvo el mayor grado de inhibición (mayor al 90%) y redujo de manera significativa el crecimiento de *L. gongylophorus*. Por tanto, este aislamiento fue seleccionado como promisorio. En los ensayos de microcultivos fue caracterizado como un micoparásito necrotrófico de contacto. Posteriormente se seleccionaron y optimizaron los parámetros de fermentación líquida más relevantes que promovieron una mayor secreción de enzimas micolíticas en este micoparásito promisorio. Mediante diseños experimentales factoriales y de RSM Box-Behnken, fue posible optimizar la actividad enzimática, empleando como fuente de carbono paredes celulares de *L. gongylophorus* (0,36 g/L), y como fuente de nitrógeno el complejo Mandels cuya concentración de componentes nitrogenados fueron, urea (0,1 g/L), extracto de levadura (1,86 g/L) y sulfato de amonio (0,21 g/L). El pH inicial del medio de cultivo fue de 4,63 y la concentración de inóculo 4×10^6 esporas/mL. Con respecto a la actividad proteasa la actividad enzimática se incrementó en un 71,4% (3,5 veces); la actividad β -1,3-glucanasa se optimizó

un 85,1% (6,7 veces); y la actividad quitinasa se optimizó un 85,2% (6,8 veces) en comparación al medio de cultivo sin optimizar.

Una vez obtenidos los sobrenadantes optimizados, se caracterizaron bioquímicamente. Con respecto a las condiciones de reacción óptimas, la actividad proteasa, presentó la máxima actividad a 85°C y pH 7,4. Para la actividad quitinasa no se observaron diferencias significativas en el rango de temperatura de 37 a 55°C, y entre los pHs 4 a 5, obteniéndose una mayor actividad a 45°C y pH 4. Para β -1,3-glucanasas se obtuvo la máxima actividad a 60°C y pH 5.

Con respecto a la estabilidad en el tiempo, a temperatura ambiente la actividad residual proteasa fue mayor al 70% durante 25 días de incubación; para β -1,3-glucanasas fue mayor al 90% durante los 30 días y para quitinasas, superó 70% durante 15 días. En heladera, la actividad residual de proteasas y β -1,3-glucanasas se mantuvo por encima de 90 y 80% respectivamente, durante los 30 días. Para quitinasas, superó el 70% durante 25 días. Para temperaturas de reacción óptimas, la actividad residual de las tres enzimas disminuyó por debajo de 25% a los 5 minutos de incubación, con una vida media de 25 min. Con respecto a la estabilidad del pH en el tiempo, la actividad residual proteasa, se mantuvo por encima de 50% durante 30 días. Se observó una mayor estabilidad a pH 6 sin diferencias significativas; y los pHs 7,4 y 8 presentaron diferencias significativas al día 10 de incubación. Para β -1,3-glucanasas, la actividad residual se mantuvo mayor al 70% durante los 30 días de incubación para los pH 4, 5 y 6. La actividad quitinasa mostró diferencias significativas al día 10 de incubación, para pH 3, con una actividad residual menor al 50%. Para pH 4 y 5, se mantuvo por encima de 70% durante 20 días de incubación.

Finalmente se determinó el perfil isoenzimático para las tres enzimas micolíticas, detectándose que: *E. primorosea* HMP9, produce un sistema micolítico que consiste en al menos una enzima proteasa, una β -1,3-glucanasa y dos quitinasas en condiciones inductivas con paredes celulares fúngicas de *L. gongylophorus* como fuente de carbono y el complejo nitrogenado Mandels como fuente de nitrógeno.

Los resultados obtenidos, representan un gran aporte al estudio de este micoparásito fúngico y sientan bases microbiológicas de gran importancia para la generación de un formulado enzimático micolítico y su posterior aplicación biotecnológica en el control biológico indirecto de hormigas cortadoras de hojas.

Palabras clave: *Escovopsis*, *Leucoagaricus*, Micoparasitismo, Proteasas, β -1,3glucanasas, Quitinasas, Optimización.



ABSTRACT

In the province of Misiones, leaf-cutter ants are one of the main plagues that affects the primary forest sector. These ants engage in foraging activities Its fodder activity by cutting and transporting to its nest fresh plant material, on which the fungus *Leucoagaricus gongylophorus* grows, which is its main source of food. On the other hand, the fungi of the *Escovopsis* genus, are considered specialist parasites of *L. Gongylophorus*. Therefore, *Escovopsis*, is represented as a potential biocontrol agent, indirectly compromising the health and survival of ants colonies. Then, a better understanding of their biology and mechanisms of action of *Escovopsis* crucial for its biotechnological application. The general objective of the present work was, to identify and characterize fungal strains *Escovopsis* genus native of Misiones with biocontrol capacity of the symbiont fungus *Leucoagaricus*.

In the first instance, 11 strains of the genus *Escovopsis* were isolated from nests of leaf-cutters ants of the genus *Acromyrmex*, in natural ecosystems of the province of Misiones. The isolates underwent a polyphasic study for identification and characterization. The HMP1 (LBM269) strain was identified as *E. microspora*, the strains HMP2 (LBM270), HMP3 (LBM271), HMP4 (LBM272), HMP7 (LBM275), HMP9 (LBM277), HMP10 (LBM278) and HMP11 (LBM279) were identified as *E. Primorosea*, HMP5 (LBM273) and HMP6 (LBM274) strains were identified as *E. Weberi*; and the HMP8 strain (LBM276) was identified as *E. catenulata*. In the evaluation of their antagonistic capacity against *L. gongylophorus* all isolates showed the highest virulence (Grade 4). Related to the latter, the isolate *E. primorosea* HMP9, in addition to presenting a good antagonistic capacity, obtained the highest degree of inhibition (greater than 90%) and reduced significantly the growth of *L. Gongylophorus*. Therefore, this isolate was selected as promising for further studies. In microculture tests it was characterized as a contact necrotrophic mycoparasite. Subsequently, the most relevant liquid fermentation parameters were selected and optimized to promoted a greater secretion of mycolitic enzymes in this promising mycoparasite. Through factorial and RSM Box-Behnken experimental designs, it was possible to optimize the enzymatic activity, using Cell walls of *L. Gongylophorus* (0.36 g/L) as a carbon source; and as a nitrogen source the Mandels complex whose concentration of nitrogen components were urea (0.1 g/L), yeast extract (1.86 g/L) and ammonium sulfate (0.21 g/L). The initial pH of the culture media was 4.63 and the inoculum concentration 4×10^6 spores/mL. Related to protease activity, enzymatic activity increased 71.4% (3.5 times); The activity β -1,3-glucanase was optimized 85.1% (6.7 times); and the chitinase activity was optimized 85.2% (6.8 times) compared to the culture media without optimizing.

Once the optimized supernatants were obtained, they were biochemically characterized. Related to the optimal reaction conditions, the protease activity, presented the maximum

activity at 85 °C and pH 7.4. For the chitinase activity, no significant differences were observed in the temperature range of 37 to 55 °C, and between pHs 4 to 5, obtaining greater activity at 45 °C and pH 4. For β -1,3-glycanases obtained maximum activity at 60 °C and pH 5.

Regarding time stability, at room temperature, protease residual activity was greater than 70% for 25 days of incubation; for β -1,3-glycanases it was greater than 90% during the 30 days and for chitinases, it exceeded 70% for 15 days. In refrigerator, the residual activity of proteases and β -1,3-glycanases remained above 90 and 80% respectively, during the 30 days. For chitinase, it exceeded 70% for 25 days. For optimal reaction temperatures, the residual activity of the three enzymes decreased below 25% to 5 min of incubation, with a half-life of 25 min. With respect to the stability of pH over time, protease residual activity remained above 50% for 30 days. Greater stability was observed at pH 6 without significant differences; and pHs 7.4 and 8 presented significant differences on the 10th day of incubation.

For β -1,3-glycanases, the residual activity remained greater than 70% during the 30 days of incubation for pH 4,5 and 6. The chitinase activity showed significant differences on the 10th day of incubation, for pH 3, with a residual activity less than 50%. For pH 4 and 5, it remained above 70% for 20 days of incubation.

Finally, the isoenzymatic profile for the three mycolitic enzymes was determined, revealing that *E. primorosea* HMP9, produces a mycolitic system consisting of at least one protease enzyme, one β -1,3-glycanase and two chitinases in conditions of induction with fungal cell walls of *L. Gongylophorus* as a carbon source and the Mandels nitrogen complex as a nitrogen source. To the best of our knowledge, these results makes a significant contribution to the study of this fungal mycoparasite and establish important microbiological foundation for the development of a mycolitic enzymatic formulation and its subsequent biotechnological application in the indirect biological control of leaf cutters ants.

Key words: *Escovopsis*, *Leucoagaricus*, Mycoparasitism, Proteases, β -1,3-glycanases, Chitinases, Optimization.

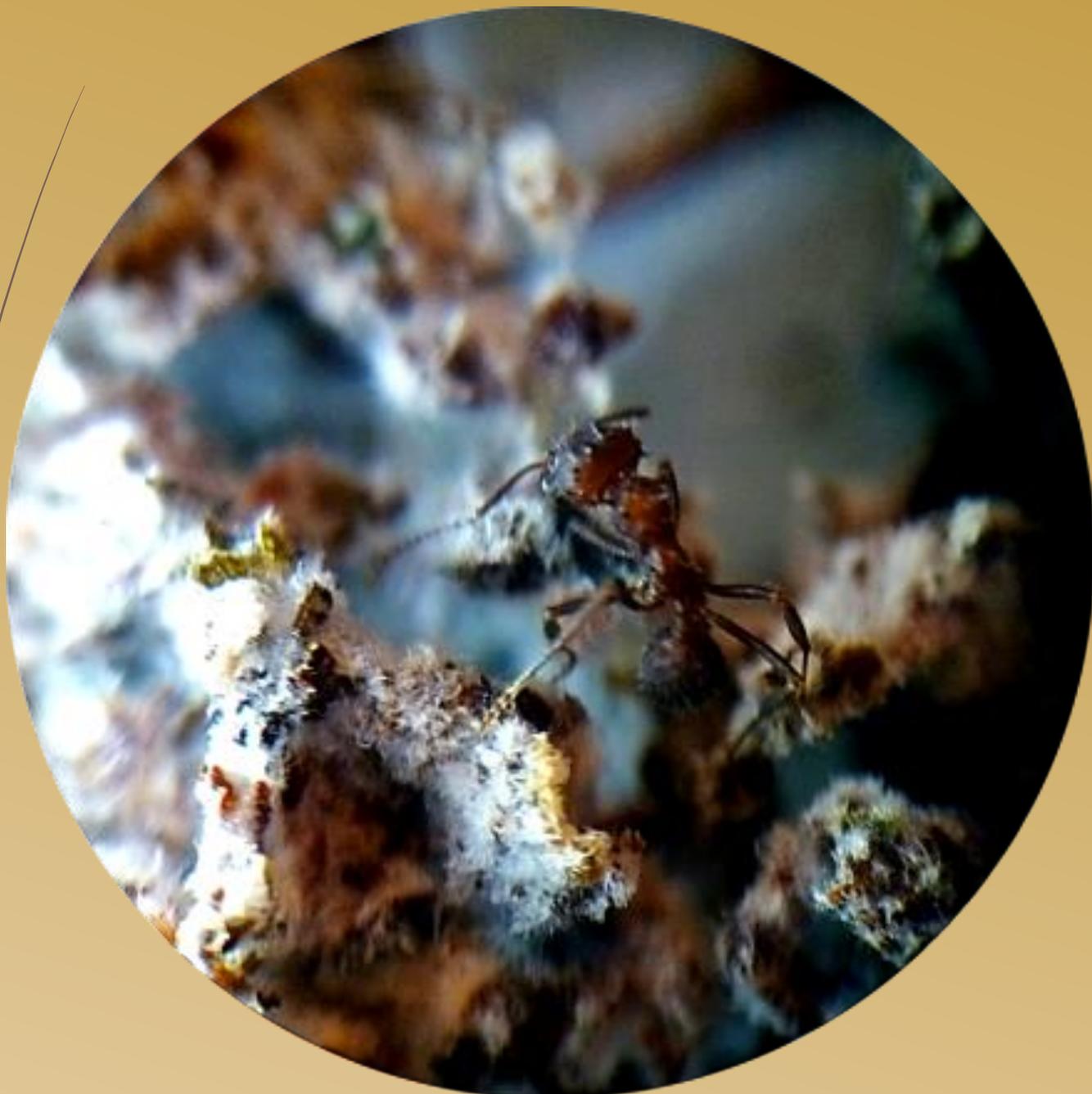
INDICE

1. INTRODUCCION.....	2
1.1. El sector foresto industrial en la Provincia de Misiones.....	2
1.2. Plagas forestales: Hormigas cortadoras de hojas.....	3
1.3. Actividad forrajera de las hormigas cortadoras de hojas en Argentina.....	4
1.4. Control de plagas	5
1.4.1. Control químico contra las hormigas cortadoras de hojas.....	5
1.4.2. Manejo integrado de plagas	6
1.4.3. Control biológico.....	6
1.5. Sistema coevolutivo tripartito	7
1.5.1. Hormigas cortadoras de hojas – <i>L. gongylophorus</i> : Mutualismo obligado.....	8
1.5.2. El género <i>Escovopsis</i>	9
1.5.3. <i>Escovopsis</i> – <i>L. gongylophorus</i> : Micoparasitismo	10
1.6. Micoparasitismo	10
1.6.1. Paredes celulares fúngicas.....	11
1.6.2. Enzimas micolíticas extracelulares.....	12
1.7. Obtención de hongos biocontroladores	14
1.7.1. Aislamiento e identificación de hongos.....	14
1.7.2. Selección de hongos promisorios.....	15
1.7.3. Incremento de la eficacia de los agentes de biocontrol	15
1.8. Optimización de medios de cultivo para microorganismos	15
1.8.1. Sistemas de fermentación sumergida.....	16
1.8.2. Optimización de la secreción de enzimas micolíticas	17
1.9. Bioprospección del género <i>Escovopsis</i>	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
3 MATERIALES Y METODOS.....	23
3.1. Obtención de aislamientos fúngicos de <i>Escovopsis</i> y <i>Leucoagaricus</i> , asociados a nidos de hormigas cortadoras de hojas en Misiones.	23
3.1.1. Trabajo de campo: Obtención de muestras.....	23
3.1.2. Trabajo de laboratorio: Siembra, resiembra y conservación.	24
3.2. Identificación polifásica de los aislamientos fúngicos obtenidos	25
3.2.1. Identificación y caracterización morfológica macro y microscópica	25
3.2.1.1. Caracterización macroscópica	25
3.2.1.2. Caracterización microscópica.....	25
3.2.2. Caracterización e identificación molecular de los aislamientos de <i>Escovopsis</i>	26
3.2.2.1. Extracción de ADN	26
3.2.2.2. Amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2 por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
3.2.2.3. Verificación por electroforesis en gel de agarosa	27
3.2.2.4. Análisis bioinformático y construcción de árboles filogenéticos.....	27
3.3. Selección de una cepa fúngica promisoriosa mediante pruebas de patogenicidad.....	28
3.3.1. Ensayos de patogenicidad in vitro: método de enfrentamiento por cultivo dual.	28

3.3.1.1.	Grados de virulencia.....	28
3.3.1.2.	Grados de Inhibición.....	29
3.3.1.3.	Análisis estadístico.....	29
3.3.2.	Mecanismos de micoparasitismo: microcultivos en cámara húmeda.....	29
3.4.	Optimización de la secreción de enzimas micolíticas en un aislamiento de <i>Escovopsis</i> promisorio.....	30
3.4.1.	Medios de cultivo líquidos: fuentes de carbono y nitrógeno.....	30
3.4.2.	Condiciones de cultivo en fermentación líquida: Inóculo, incubación y muestreo.....	31
3.4.3.	Determinación enzimática cuantitativa.....	31
3.4.3.1.	Actividad proteasa: Método de la Azocaseína (Modificado de Charney y Tomarelli [182]).....	31
3.4.3.2.	Actividad β -1,3-glucanasa (Modificado de Masih y Paul [183]).....	32
3.4.3.3.	Actividad quitinasa (Modificado de Wen <i>et al.</i> , De Marco <i>et al.</i> , y Kyoung-Ja Kim <i>et al.</i> , [184–186]).....	32
3.4.4.	Análisis estadísticos.....	32
3.4.5.	Selección de fuentes de carbono y nitrógeno que promuevan la secreción de enzimas micolíticas.....	32
3.4.6.	Optimización de la fuente de carbono seleccionada que promueva la secreción de enzimas micolíticas.....	33
3.4.7.	Optimización de la fuente de nitrógeno seleccionada que promueva la secreción de enzimas micolíticas.....	34
3.4.8.	Optimización de variables físico-químicas que promuevan la secreción de enzimas micolíticas: concentración de inóculo, pH inicial del medio y concentración de urea.....	34
3.4.9.	Validación de las variables experimentales optimizadas.....	35
3.5	Caracterización bioquímica de las enzimas micolíticas presentes en los sobrenadantes optimizados.....	35
3.5.1.	Temperatura y pH de reacción óptimos.....	35
3.5.2.	Termoestabilidad y pH estabilidad.....	36
3.5.3.	Análisis estadísticos.....	36
3.5.4.	Detección de isoenzimas con actividad micolítica en ND-PAGE: Zimogramas.....	37
3.5.4.1.	Detección de isoenzimas para proteasas.....	37
3.5.4.2.	Detección de isoenzimas para β -1,3-glucanasas.....	37
3.5.4.3.	Detección de isoenzimas para quitinasas.....	37
4	RESULTADOS.....	39
4.1	Obtención de aislamientos fúngicos de <i>Escovopsis</i> y <i>L. gongylophorus</i>, asociados a nidos de hormigas cortadoras de hojas en Misiones.....	39
4.2	Identificación polifásica de los aislamientos fúngicos obtenidos.....	40
4.2.1.	Caracterización macroscópica.....	40
4.2.2.	Caracterización microscópica.....	41
4.2.3.	Identificación morfológica de los aislamientos de <i>Escovopsis</i>	43
4.2.4.	Caracterización e identificación molecular de los aislamientos de <i>Escovopsis</i>	44
4.3	Selección de una cepa fúngica promisorio mediante pruebas de patogenicidad.....	49
4.3.1.	Ensayos de patogenicidad in vitro: método de enfrentamiento por cultivo dual.....	49
4.3.2.	Mecanismos de micoparasitismo: microcultivos en cámara húmeda.....	53
4.4	Optimización de la secreción de enzimas micolíticas en un aislamiento de <i>Escovopsis</i> promisorio.....	54
4.4.1.	Selección de fuentes de carbono y nitrógeno que promuevan la secreción de enzimas micolíticas.....	54

4.4.2	Optimización de la fuente de carbono seleccionada que promueve la secreción de enzimas micolíticas	57
4.4.3	Optimización de la fuente de nitrógeno seleccionada que promueve la secreción de enzimas micolíticas	58
4.4.4	Optimización de variables físico-químicas que promuevan la secreción de enzimas micolíticas: concentración de inóculo, pH inicial del medio y concentración de urea	62
4.4.5	Validación de las variables experimentales optimizadas	66
4.5	Caracterización bioquímica de las enzimas micolíticas presentes en los sobrenadantes optimizados	68
4.5.1	Temperatura y pH de reacción óptimos.....	68
4.5.2	Termoestabilidad y pH estabilidad	69
4.6	Detección de isoenzimas con actividad micolítica en ND-PAGE: Zimogramas	73
5	DISCUSION.....	75
5.1	Obtención de aislamientos fúngicos de <i>Escovopsis</i> y <i>Leucoagaricus</i>, asociados a nidos de hormigas cortadoras de hojas en Misiones.	75
5.2	Identificación polifásica de los aislamientos fúngicos obtenidos	76
5.3	Selección de una cepa fúngica promisorio mediante pruebas de patogenicidad.....	78
5.4	Optimización de la secreción de enzimas micolíticas en un aislamiento de <i>Escovopsis</i> promisorio.....	81
5.4.1	Selección de fuentes de carbono y nitrógeno que promuevan la secreción de enzimas micolíticas	81
5.4.2	Optimización de las fuentes de carbono y nitrógeno seleccionadas que promueven la secreción de enzimas micolíticas.....	84
5.4.3	Optimización de variables físico-químicas que promuevan la secreción de enzimas micolíticas: concentración de inóculo, pH inicial del medio y concentración de urea	86
5.5	Caracterización bioquímica de las enzimas micolíticas presentes en los sobrenadantes optimizados.....	88
5.5.1	Temperatura y pH de reacción óptimos.....	88
5.5.2	Termoestabilidad y pH estabilidad	90
5.5.3	Detección de isoenzimas con actividad micolítica en ND-PAGE: Zimogramas	93
6	CONCLUSIONES.....	97
7	RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS	100
8	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	100
8.1	Publicaciones en Revistas	100
8.2	Presentaciones a Congresos	100
9	PROYECTO/S DE INVESTIGACIÓN DENTRO DEL/LOS CUAL/ES SE DESARROLLÓ LA TESIS	102
10	BECA/S Y SUBSIDIO/S CON LOS QUE SE FINANCIÓ LA TESIS.....	102
11	ANEXOS.....	104
12	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	109

INTRODUCCION



1. INTRODUCCION

1.1. El sector foresto industrial en la Provincia de Misiones

Las plantaciones forestales se están convirtiendo de forma creciente en la principal fuente de provisión de madera y papel en el mundo [1,2]. En vista del abastecimiento a partir de bosques naturales de coníferas, la presión por parte de organizaciones ambientalistas ha creado una ventaja para países como Argentina, que se está expandiendo sobre la base de bosques implantados, en contra de la explotación de los bosques nativos [3]. Misiones constituye actualmente la principal provincia forestal de la Argentina. Una de las bases de la economía de la provincia se representa en la actividad foresto-industrial, ya que gran parte de su superficie posee fuertes pendientes, que no son aptas para la agricultura, pero sí para la forestación [4]. Tal es así que Misiones posee la mayor superficie implantada del país, con valores que oscilan entre 352.392 y 428.650 hectáreas. El uso predominante de la tierra es con plantaciones forestales de especies exóticas (*Pinus* spp., *Eucalyptus* spp.) y plantaciones de árboles nativos como *Araucaria angustifolia*, [5,6] (Figura 1). El proceso de deforestación y siembra de especies comerciales, incentivado por la Ley 25.080 de inversiones para bosques cultivados, la estabilidad fiscal de 30 y hasta 50 años para los proyectos foresto-industriales y los beneficios impositivos de la jurisdicción nacional y provincial, hacen de ésta una actividad en expansión que, si bien señala un incremento positivo en la economía, produce no sólo una demanda constante de territorio sino también una creciente presión sobre el medio biofísico de la provincia con mayor biodiversidad [7]. Esta situación promueve priorizar la relación del sector foresto-industrial con instituciones de I+D que favorezcan la incorporación de nuevas tecnologías, en busca de mayores rendimientos, sin ir en detrimento de la riqueza y biodiversidad de la región [3,8].

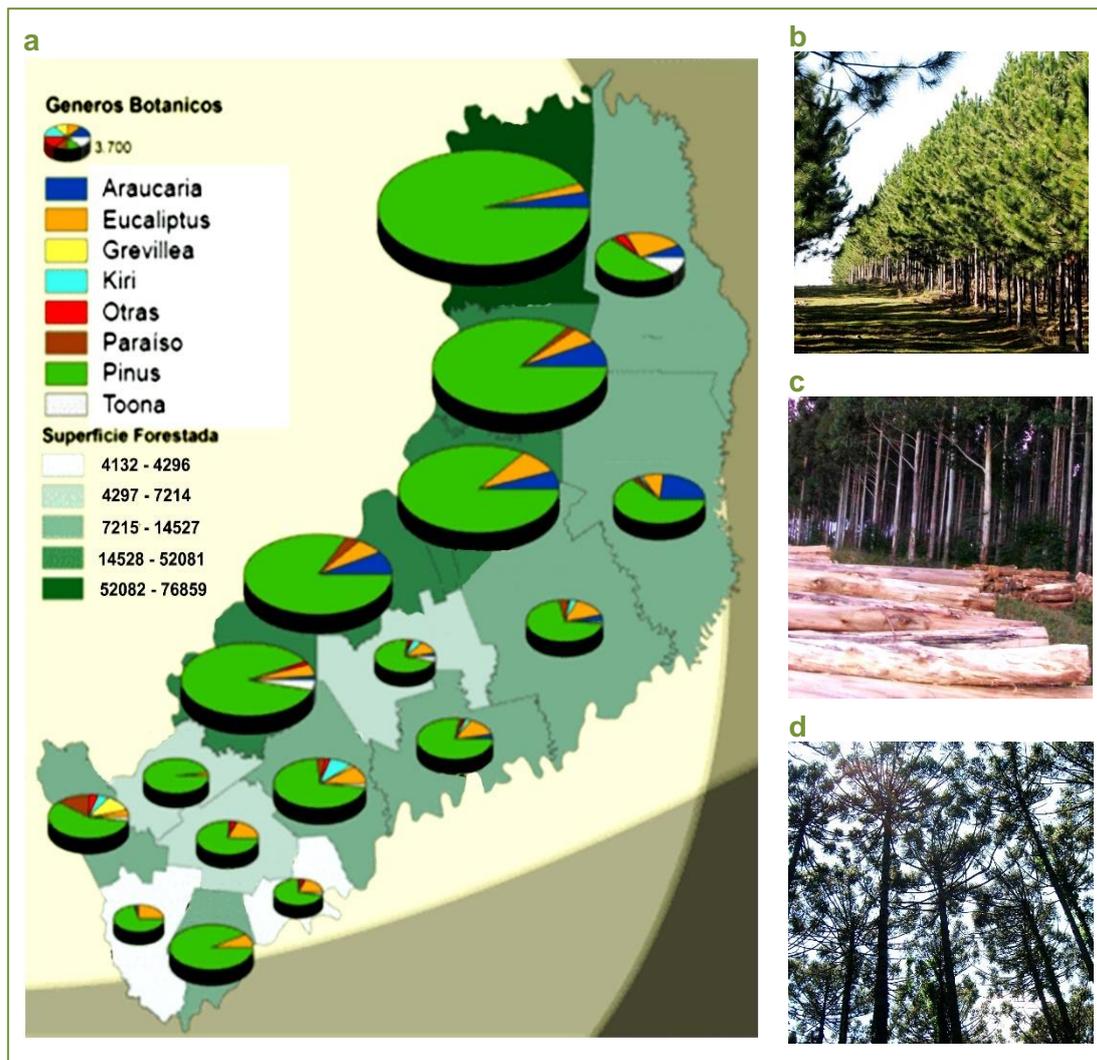


Figura 1. Distribución de las plantaciones forestales en la provincia de Misiones **(a)**. Plantaciones de *Pinus* spp. **(b)**, *Eucaliptus* spp. **(c)** y *Araucaria* spp. **(d)**. (tomado de Uasuf & Hilbert con modificaciones [9])

1.2. Plagas forestales: Hormigas cortadoras de hojas

Las plantaciones forestales son susceptibles a diversas alteraciones producidas tanto por factores bióticos como abióticos. Dentro de los factores bióticos, las plagas representan una de las mayores amenazas, ocasionando un efecto negativo en la productividad, con consecuencias económicas para el sector forestal [10,11]. Las principales plagas que afectan las plantaciones forestales de la provincia de Misiones pertenecen a la clase Insecta [12]. Dentro de esta clase, las especies de mayor impacto pertenecen a la tribu Attini y son conocidas vulgarmente como “hormigas cortadoras de hojas”.

Las hormigas de la tribu Attini, (Subfamilia: Myrmicinae, Familia: Formicidae, Orden: Hymenoptera, Clase: Insecta), son un grupo monofilético de 12 géneros y más de 210 especies [13,14]. Poseen un rango de distribución geográfica que se extiende a lo largo del

neotrópico, desde los 44°S (Patagonia, Argentina) hasta los 40°N (Nueva Jersey, Estados Unidos), [15–17].

Schultz & Brady [18] clasificaron a las hormigas de la tribu Attini en dos grandes grupos filogenéticos, el Paleoattini que comprende a las hormigas basales y el Neoattini que congrega especies basales y derivadas. Estos grupos también se diferencian por el tipo de material de forrajeo, las especies basales forrajean exoesqueletos y excrementos secos de insectos, material de hojarasca y hojas secas; mientras que las especies más derivadas son las únicas en forrajear hojas y material vegetal fresco [13]. Dentro del grupo Neoattini, se encuentran los géneros *Atta* (19 spp.) y *Acromyrmex* (63 spp.), conocidas como hormigas cortadoras de hojas. Estos géneros tienen la capacidad para defoliar parcial a totalmente numerosas especies vegetales, por lo que son considerados los principales herbívoros de la región neotropical [13,19–21]. La actividad forrajera que realizan estas hormigas implica buscar, seleccionar, cortar y transportar hacia el nido diversos fragmentos de vegetales frescos como hojas, flores, frutos y semillas [13,22]. El material vegetal es cuidadosamente seleccionado según parámetros físicos como la dureza, la composición química y el contenido de agua de las hojas [23,24].

Dentro del nido, el material se distribuye entre las diferentes cámaras para ser procesado [25,26]. Durante el procesamiento, las distintas castas de hormigas trabajan para eliminar los contaminantes del sustrato; el cual es lamido, molido, triturado y tratado con enzimas digestivas para finalmente ser utilizado como base para cultivar el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales: Agaricaceae). Este hongo representa la principal fuente de nutrientes para las larvas y la reina de la colonia [15,27–29].

1.3. Actividad forrajera de las hormigas cortadoras de hojas en Argentina

Estos insectos tienen una preferencia intrínseca por especies vegetales que no se encuentran en ecosistemas naturales, por tanto, resulta evidente que concentren su actividad en sistemas antrópicos. Utilizan vegetales frescos que cortan incesantemente, siendo capaces de aprovechar la mayoría de las especies cultivadas, causando daños económicos importantes en los cultivos forestales [30,31]. La magnitud del daño de las diferentes especies de hormigas cortadoras depende de la cantidad de hormigueros por hectárea y del uso al que se destina el suelo [21,24,25]. Una sola colonia de hormigas cortadoras de hojas por hectárea de bosque puede reducir el crecimiento anual de árboles en un 5% en *Eucalyptus* y en un 10% en *Pinus* [32,33]. Además, cuando las plantas jóvenes son atacadas por estas hormigas, las pérdidas pueden alcanzar el 100% [34]. Las nuevas prácticas agrícolas han incrementado la incidencia

de la plaga. Particularmente, *Acromyrmex* spp. ocupa más de un 90% de las áreas cultivadas de *Pinus* de la Mesopotamia Argentina, por ende, se considera el género más perjudicial [31,35]. Las pérdidas causadas por las hormigas cortadoras pueden alcanzar miles de millones de dólares en todo el mundo y los costos de controlar estos insectos representa gran parte del presupuesto destinado al manejo de plagas de una plantación. Se ha estimado que el 30% del gasto total en plantaciones de tres ciclos de cosecha de *Eucalyptus* fue destinado al control de hormigas [30,36].

1.4. Control de plagas

Desde el surgimiento y desarrollo del hombre en la actividad agrícola, se tuvo la necesidad de combatir a las plagas que afectaban a los cultivos mediante el uso de sustancias capaces de eliminarlas. En consecuencia, a lo largo de la historia se han desarrollado diversas tecnologías e implementado infinidad de programas de control de plagas [37]. En cuanto al manejo de las hormigas cortadoras existen distintas estrategias de control: químico, mecánico, físico, biológico y cultural [38], siendo el control químico el método tradicional de mayor difusión [39].

1.4.1. Control químico contra las hormigas cortadoras de hojas

Con el desarrollo de insecticidas sintéticos, los métodos químicos se han utilizado eficazmente para el control de *Atta* spp. y *Acromyrmex* spp. [20,40,41]. La mayoría de los productores y empresas agropecuarias utilizan insecticidas químicos como el único método, aplicando los productos sintéticos de manera directa sobre las colonias de hormigas, a través de diferentes formulaciones: cebos granulados o líquidos, y en forma gaseosa por medio de nebulizaciones [20,34,39,42].

Los principios activos más utilizados como insecticidas corresponden al fipronil (del grupo de los fenil pirazoles), sulfuramida (sulfonamida fluoroalifática) y otros productos organofosforados como el clorpirifós y el fenitrotion [39]. Sin embargo, se ha demostrado que el uso indiscriminado de estos compuestos, puede provocar perjuicios ambientales de difícil cuantificación, dado que la mayor parte de estos insecticidas son inespecíficos. Es decir que sólo una escasa proporción podría afectar a la plaga, mientras que el resto continúa circulando en el ambiente, tanto en el suelo, como en el aire y el agua [30,33,42]. El uso cotidiano de estos químicos dificulta la preservación de los ecosistemas, los recursos naturales, y afecta la salud de las comunidades rurales y de los consumidores urbanos. La búsqueda de la productividad a corto plazo por encima de la sustentabilidad ecológica, ha generado un impacto preocupante a nivel mundial [43]. Los productores, por lo tanto, deben explorar

sustitutos menos perjudiciales, pero económicamente rentables. En consecuencia, surge la necesidad de contar con distintas alternativas para reducir los perjuicios ocasionados por las hormigas cortadoras de hojas.

Una herramienta muy importante para disminuir el uso exclusivo de químicos sintéticos y trabajar en la prevención de los daños causados por el mal uso de los plaguicidas, es el Código Internacional de Conducta para la Distribución y Uso de Plaguicidas. Este documento de orientación de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), tiene como objetivo la reducción de los riesgos asociados con la distribución y uso de plaguicidas, la protección de la salud humana y el medio ambiente y el apoyo al desarrollo agrícola sostenible, incluida la aplicación de un Manejo Integrado de Plagas (MIP) [44,45].

1.4.2. Manejo integrado de plagas

El MIP se refiere a un sistema que utiliza técnicas adecuadas en una forma compatible, para reducir las poblaciones de organismos nocivos y mantenerlas por debajo de los niveles que causan daño económico, aprovechando en la mayor medida posible, los factores naturales que limitan la propagación de dichos organismos [11,46]. Se basa en combinar e integrar los métodos químicos, culturales, físicos, etológicos, genéticos y biológicos, con el propósito de reducir las pérdidas económicas. La FAO promueve el MIP como la forma preferencial de abordar la protección de los cultivos, y lo considera un pilar para la agricultura sustentable. Esta filosofía se enmarca dentro de un contexto más amplio, el desarrollo sustentable, que refiere a la administración eficiente y racional de los recursos naturales, de manera tal que sea posible incrementar el bienestar de la población humana, sin comprometer la calidad de vida de las generaciones futuras. Dentro de las estrategias empleadas en el marco del MIP, el control biológico representa una alternativa promisorio en el combate contra los insectos plaga [47].

1.4.3. Control biológico

Debido a las restricciones respecto a la utilización de productos químicos en la actividad forestal, comenzó a implementarse el control biológico de plagas mediante el uso de organismos benéficos como antagonistas naturales contra aquellos que causan daño [48]. Esta práctica representa una alternativa sustentable y ha recibido notable atención en los últimos años. Tiene como objetivo reducir las poblaciones de organismos plaga a niveles poblacionales en que no generen perjuicios económicos y que garanticen la supervivencia del agente controlador, evitando que la plaga retorne a proporciones poblacionales dañinas. Su

valor recae en que puede resultar en un control eficiente de plagas, tanto a mediano como a largo plazo, compatible con un bajo riesgo ambiental y una producción sustentable [49].

Actualmente, se utilizan como agentes de control biológico, organismos vivos como hongos, bacterias, virus e insectos, que reducen la población de insectos plaga y patógenos que afectan a los cultivos [47]. Entre estos grupos de organismos, los hongos poseen mecanismos únicos de invasión y propagación que los caracterizan como excelentes agentes de control biológico [50]. De este modo, despiertan el interés de empresas y programas de investigación por su papel en el control de plagas, sin dañar el medio ambiente y la salud [47]. En el contexto de las hormigas cortadoras de hojas, el empleo de hongos patógenos se presenta como una de las estrategias más prometedoras para el control de estas plagas, siendo objeto de un gran número de trabajos de investigación [35,51,52].

1.5. Sistema coevolutivo tripartito

Las relaciones coevolutivas implican un cambio evolutivo recíproco entre especies que interaccionan. Es decir, se trata de un proceso por el cual dos o más organismos ejercen una presión selectiva mutua y sincrónica, en tiempos evolutivos, que resulta en adaptaciones específicas y recíprocas [53].

En el caso particular de las hormigas cortadoras de hojas existe una relación coevolutiva tripartita que data de hace aproximadamente 50 millones de años [54] y que albergaría un potencial agente biocontrolador para las mismas. Esta relación incluye a las hormigas cortadoras de hojas, al hongo *L. gongylophorus* y a los hongos pertenecientes al género *Escovopsis* (Ascomycota: Hipocreales) [55].

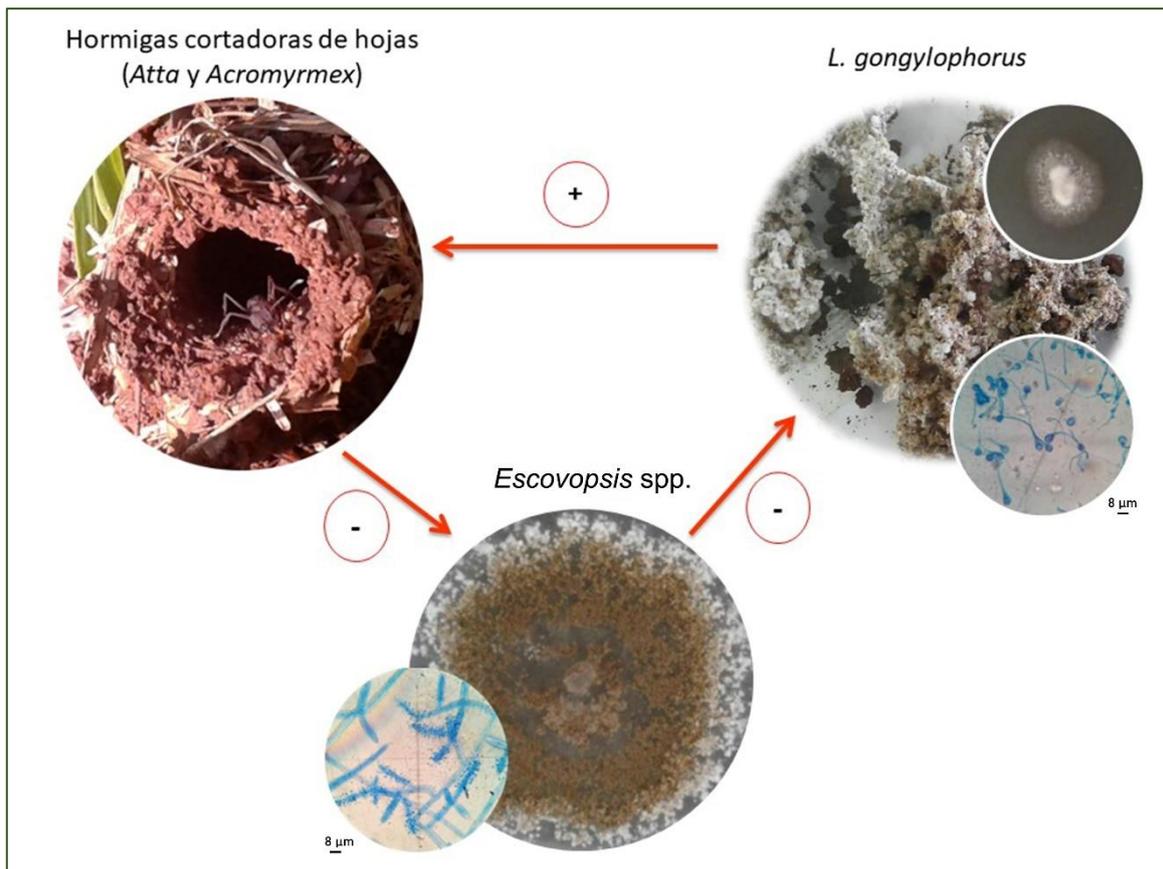


Figura 2. Resumen de las interacciones simbióticas existentes en este sistema coevolutivo tripartito: Las hormigas cortadoras de hojas, alimentan con fragmentos vegetales frescos a su hongo mutualista *L. gongylophorus*, y este proporciona la fuente de alimento para sus larvas. El micoparásito *Escovopsis* también se alimenta de *L. gongylophorus*, pero mediante una relación antagónica, que puede comprometer su colonia. Para evitarlo, las hormigas cortadoras de hojas elaboran defensas químicas y físicas para combatir a *Escovopsis*. Las fotografías de esta imagen son de fuente propia.

1.5.1. Hormigas cortadoras de hojas – *L. gongylophorus*: Mutualismo obligado

Las hormigas de la tribu Attini han desarrollado el fascinante hábito de cultivar hongos y usarlos como alimento. En los géneros *Atta* y *Acromyrmex*, el cultivo del hongo está caracterizado por el uso de hojas, flores y tallos frescos como sustrato para el crecimiento de *L. gongylophorus* [56]. En esta asociación las hormigas dependen de *L. gongylophorus* para su alimentación, debido a que este hongo realiza el metabolismo de los polisacáridos y compuestos recalcitrantes del material vegetal que colectan [57,58]. Asimismo, *L. gongylophorus* depende exclusivamente de las hormigas que le proveen protección y el sustrato vegetal necesario para su desarrollo, además de garantizar su propagación dentro de cada colonia y durante la formación de nuevas colonias. Este hongo mutualista exhibe una característica particular considerada un hito evolutivo [18], sus hifas tienen el ápice dilatado formando una estructura llamada gongilidio, donde se acumulan los nutrientes necesarios para alimentar a la reina y a las larvas de cada colonia [15,59–61]. Por otro lado, los nidos de estas hormigas albergan varias cámaras subterráneas, donde el sustrato procesado se

acumula en una estructura de aspecto esponjoso conocida como "honguera", donde crece el micelio del hongo mutualista [62]. Los estudios relacionados con la diversidad genética del hongo indican que en una colonia sólo se encuentra una cepa del mutualista, dispersa en las diversas cámaras. En este sentido, las hormigas cortadoras de hojas tienen monocultivos de hongos, y las teorías evolutivas sugieren que organismos con baja variabilidad genética son más vulnerables a las infecciones parasitarias [55]. Por tanto, la subsistencia de las colonias de hormigas podría verse amenazada si el balance sanitario de la honguera se encuentra alterado [63–65]. Debido al hábito forrajero de las hormigas, es frecuente el ingreso de diversos microorganismos que pueden perjudicar al hongo mutualista [61]. Para evitar la proliferación o el desarrollo de microorganismos contaminantes y mantener la honguera libre de patógenos, las hormigas desarrollaron medidas profilácticas, entre las que se destacan la limpieza del material vegetal recolectado [29,66], la producción de secreciones glandulares que contienen compuestos antimicrobianos [67–69], asociaciones con actinomicetos que producen antibióticos [70–72], y la eliminación mecánica de fragmentos de honguera contaminados con esporas de otros hongos [73]. Tradicionalmente se consideraba que la honguera estaba libre de parásitos, sin embargo, Currie *et al.* [70] encontraron que hay numerosos hongos filamentosos que interactúan con el hongo mutualista y los más frecuentes son los pertenecientes al género *Escovopsis*, un parásito especializado que no ha sido encontrado en ningún otro hábitat [63,64,74,75].

1.5.2. El género *Escovopsis*

Las primeras observaciones de *Escovopsis* datan del siglo XIX, cuando Alfred Möller [76] documentó la presencia de varias especies fúngicas en la honguera cultivada por las hormigas cortadoras de hojas. Dos de estas especies eran hongos anamórficos que Möller describió e ilustró. Durante el siglo XX, Kreisel [77] y Weber [78] realizaron estudios en nidos de hormigas de la tribu Attini e informaron la presencia de los hongos documentados por Möller. Sin embargo, el género y las dos primeras especies de *Escovopsis* no se describieron formalmente hasta la década de 1990 [63,64]. Durante dos décadas no hubo estudios taxonómicos en el género; sin embargo, en los últimos años, varios trabajos centraron su interés en la diversidad morfo-genética de este género a fin de identificar y caracterizar nuevas especies [74]. Es así que en la actualidad, el género anamórfico *Escovopsis* cuenta con catorce especies formalmente descritas: *E. weberi* [63], *E. aspergilloides* [64], *E. Lentecrescens*, *E. Microspora*, *E. Moelleri* [74], *E. trichodermoides* [79], *E. Kreiselii* [80], *E. atlas*, *E. catenulata*, *E. Longivesica*, *E. Pseudoweberi*, *E. Primorosea* [75], *E. clavatus* y *E. multiformis* [81].

1.5.3. *Escovopsis* – *L. gongylophorus*: Micoparasitismo

El parasitismo es una interacción simbiótica, en la cual un organismo, el parásito, encuentra su nicho ecológico en otro organismo, el huésped, y puede usarlo como hábitat y fuente de nutrición [82,83]. Los hongos pertenecientes al género *Escovopsis* son parásitos especialistas de las hongueras [71,84,85]. El nivel de especificidad es tal que, en la naturaleza, *Escovopsis* se encuentra asociado exclusivamente a hongueras cultivadas por las hormigas de la tribu Attini [64,70,86]. Sin embargo, la frecuencia de *Escovopsis* es variable. Aparentemente es más frecuente en colonias de *Acromymex* spp. que en colonias de *Atta* spp. [84]. La evidencia indica que la transmisión del patógeno entre las colonias de hormigas es de tipo horizontal, aunque no se sabe exactamente cuál es el mecanismo que utiliza para ingresar a las colonias. Algunos autores sugieren que es transmitido por vectores mecánicos, es decir, a través de la transmisión de esporas asexuales unidas al cuerpo de artrópodos que visitan los nidos [84], [87]; otros señalan que la transmisión podría estar relacionada con los depósitos de basura del nido, ya que éstos son colonizados por *Escovopsis* y representan un peligro para la integridad de las colonias [74]. Varios estudios han demostrado que la presencia de *Escovopsis* tiene un impacto negativo en el desarrollo de la honguera, ya que se nutre exclusivamente de los tejidos de *L. gongylophorus* [88]. De esta manera, la presencia de *Escovopsis* puede causar la reducción de la biomasa del hongo mutualista, lo que conlleva a cambios etológicos de las hormigas cortadoras de hojas durante el forrajeo y el cuidado de las crías. Además, su presencia causaría una marcada disminución en la producción de larvas, pupas y adultos, comprometiendo la supervivencia de las colonias, dando como resultado una disminución significativa del tamaño del hormiguero, que en ocasiones conlleva a la muerte de la colonia [84,88,89].

1.6. Micoparasitismo

Las interacciones micoparasíticas son comunes entre los hongos y comprenden tanto relaciones biotróficas como necrotroóficas [90]. Los micoparásitos biotróficos obtienen los nutrientes desde los tejidos vivos del hospedador, a través del desarrollo de estructuras especializadas para la penetración llamadas haustorios. Son capaces de parasitar las células huésped sin que el daño sea destructivo, pueden vivir en una relación fisiológicamente equilibrada durante etapas prolongadas de sus ciclos de vida y generalmente, muestran un rango estrecho de huéspedes [55,90–92]. Los micoparásitos necrotroóficos ocasionan la muerte del hospedador a través del contacto físico y la liberación de sustancias tóxicas, producen la degradación del micelio, sin necesidad de penetración, y obtienen los nutrientes

desde los tejidos muertos del hospedador [88]. Se trata de relaciones antagónicas muy agresivas, en las que las hifas del parásito entran en contacto con las del huésped, crecen junto a ellas, en ocasiones se enrollan, y destruyen las hifas del mismo. Asimismo, el parásito secreta enzimas que degradan las paredes celulares y causan la muerte citoplasmática del huésped, incluso antes del contacto físico [55]. En general, se sabe que los micoparásitos no tienen un único modo de acción, y la multiplicidad de mecanismos es importante a tener en cuenta para seleccionar a un antagonista. Si posee varios mecanismos de acción reduce el riesgo de desarrollo de resistencia en el hospedador [93]. Por tanto, establecer los mecanismos de acción involucrados en el micoparasitismo es uno de los factores clave para el desarrollo y la aplicación intencional de los agentes de biocontrol [94].

1.6.1. Paredes celulares fúngicas

La pared celular de los hongos, además de la función de barrera física a los ataques de parásitos, es responsable de la forma celular de los hongos, permite la integridad osmótica, actúa como filtro para la secreción e incorporación de sustancias y es una buena reserva de carbono, movilizándose ciertos componentes de la misma en situación de déficit nutricional [95].

La composición química de la pared puede variar cuantitativa y cualitativamente con las condiciones de cultivo, la edad del micelio o el estado de crecimiento [95]. Sin embargo, los β -1,3-glucanos, la quitina y las proteínas son los polímeros mayoritarios de la pared para todos los grupos de hongos; formando una red compleja que es la base estructural de la pared celular [96,97] (Figura 3). Por tanto, las enzimas líticas secretadas por los micoparásitos juegan un papel fundamental en los mecanismos de antagonismo, para la destrucción de sus huéspedes [98,99].

Los β -glucanos son los principales polisacáridos de la pared celular fúngica, constituyendo aproximadamente el 50-60% del peso seco de la pared [100,101]. Los polímeros de glucanos están compuestos por residuos de glucosa ligados por una variedad de enlaces químicos. Entre el 65% y el 90% son β -1,3-glucanos, y son el principal constituyente estructural de la pared celular [96].

La quitina, es un homopolímero lineal de residuos de N-acetilglucosamina ligados por enlaces β -1,4; se considera un componente relativamente escaso (10–20% en hongos filamentosos) [102,103], pero estructuralmente importante, de la pared celular fúngica. Estos polímeros cristalinos tienen una enorme resistencia a la tracción y contribuyen significativamente a la

integridad general de la pared celular. Cuando se interrumpe la síntesis de quitina, la pared se desordena y la célula fúngica se vuelve malformada y osmóticamente inestable [104,105].

Las proteínas de la pared celular están entretejidas dentro de la matriz estructural a base de quitina y glucanos. Representan aproximadamente el 20-30% de peso seco de la pared en hongos filamentosos. La mayoría de las proteínas se integran en la pared a través de enlaces covalentes entre los azúcares presentes en los sitios ligados a N y O, formando glucoproteínas. Funcionan en el mantenimiento de la forma celular, mediando la adhesión para la migración y la fusión celular, protegiendo la célula contra sustancias extrañas, mediando la absorción de moléculas, transmitiendo señales intracelulares de estímulos externos y sintetizando y remodelando los componentes de la pared celular [96].

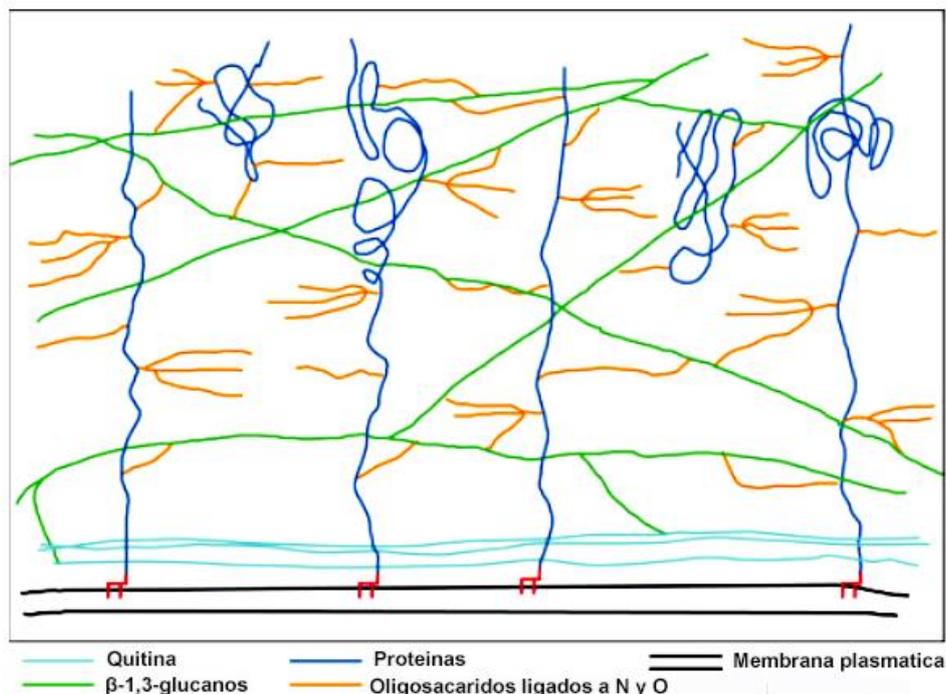


Figura 3. Representación de la pared celular fúngica. Los componentes principales de la pared celular fúngica son glucanos, quitina y glucoproteínas. Aunque existen variaciones específicas de especie, se cree que los componentes de la pared celular se organizan como se muestra. La mayor parte de la quitina se considera ubicada cerca de la membrana plasmática. Los β-1,3-glucanos se extienden a lo largo de la pared celular. Las glucoproteínas se modifican ampliamente con oligosacáridos ligados a N y O (Tomado de Bowman con modificaciones [96]).

1.6.2. Enzimas micolíticas extracelulares

El complejo proceso micoparasitario ha sido ampliamente estudiado [106]. El último paso es la penetración del micelio huésped, que está habilitado por la degradación parcial de su pared celular a través de la secreción de enzimas hidrolíticas, principalmente, glucanasas, quitinasas

y proteasas. El rol de cada una en el complejo enzimático micolítico es diferente y sinérgico, para el efecto antifúngico máximo en diferentes patógenos [107,108].

Las β -1,3-glucanasas (E.C. 3.2.1.39) (1,3- β -D-glucanohidrolasas) catalizan la hidrólisis de los enlaces β -1,3-glucosídicos presentes en los glucanos, liberando unidades de glucosa a partir de los extremos no reductores de las moléculas (Figura 4a). Las quitinasas (EC 3.2.1.14) {poli [1,4- (N-acetil- β -D-glucosamina)] glucanohidrolasas} catalizan la hidrólisis de enlaces β -1,4 de la quitina, liberando moléculas de N-acetil-glucosamina (Figura 4). Las proteasas (3.4.21.12) también llamadas α -endopeptidasas líticas, catalizan la reacción de hidrólisis de proteínas. Preferiblemente actúa sobre la elastina y los enlaces peptídicos que involucran ala⁺ y val⁺ en proteínas en la pared celular (Figura 4c).

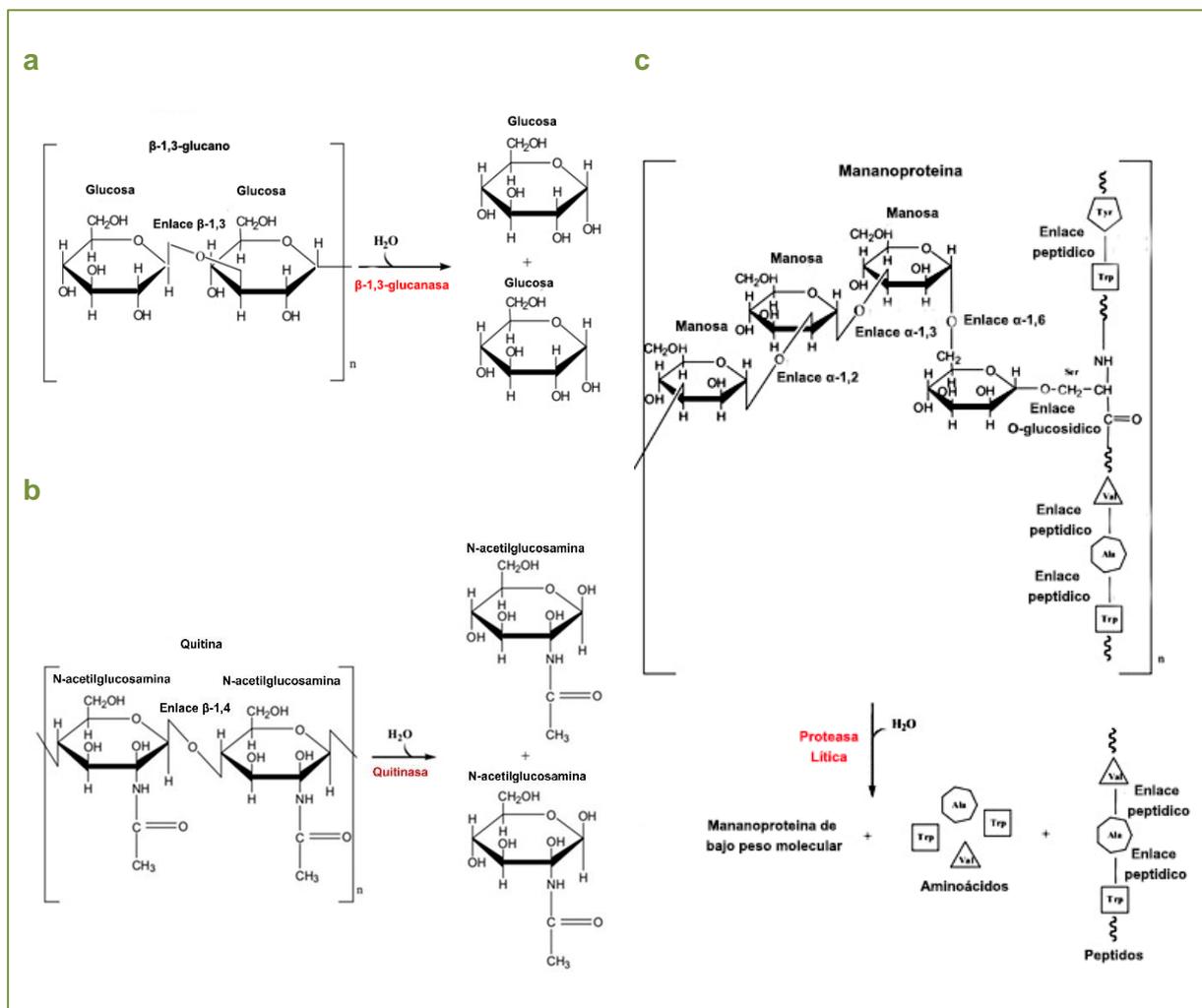


Figura 4. Principales enzimas del complejo micolítico que degradan la pared celular del huésped. a) Hidrólisis de un enlace β -1,3-glucosídico por una β -1,3-glucanasa, b) Hidrólisis de un enlace β -1,4 de la quitina por una quitinasa y c) Hidrólisis de un enlace peptídico en una mananoproteína por una proteasa lítica (Tomado de Fleuri con modificaciones [109]).

1.7. Obtención de hongos biocontroladores

Los estudios realizados en una gran variedad de especies fúngicas están orientados a sus posibles aplicaciones biotecnológicas, como en programas de control biológico [110,111].

La industria agrícola constantemente necesita nuevos biocontroladores, el desarrollo y la producción a gran escala, ya sean células fúngicas o componentes fúngicos bioactivos. La identificación y mejoramiento de una cepa fúngica con actividad plaguicida es el paso principal en el desarrollo de propágulos infecciosos como conidios, blastosporas, clamidosporas; así como en la preparación de mezclas de enzimas hidrolíticas [112].

Una de las mayores dificultades en el empleo de hongos para el biocontrol, consiste en entender y estudiar las interacciones que tienen lugar entre el huésped, el patógeno y posiblemente otros microorganismos presentes en la zona de interacción. Un conocimiento exhaustivo de las bases de estas interacciones no es un requisito para tener éxito en la aplicación de un biocontrolador. Sin embargo, puede facilitar el desarrollo de sistemas de biocontrol que den mejores resultados. Por tanto, los ensayos *in vitro* para la obtención de aislamientos y estudios sobre los mecanismos de acción, pueden ser cruciales para la aplicación de biocontroladores efectivos [112,113]. Por tanto, conocer el modo de acción de los antagonistas es importante, para el desarrollo de formulaciones apropiadas, ya que proporciona una buena base para la selección de nuevos antagonistas efectivos, para la optimización de los métodos de aplicación [114,115].

1.7.1. Aislamiento e identificación de hongos

La etapa principal para obtener un agente biocontrolador, corresponde a la recolección de los posibles antagonistas con el fin de obtenerlos puros, y posteriormente conocer su potencial capacidad patogénica e inhibidora [115].

El éxito de estos aislamientos como productos biológicos, está amparado en una selección de cepas, la cual parte de una correcta identificación. Es preciso conocer la variabilidad entre los aislamientos de una colección o, incluso, entre especies de un género, a fin de conseguir una correcta selección de las cepas más promisorias [116].

Para llegar a la clasificación de los aislamientos, se deben caracterizar, tanto a nivel morfológico macro y microscópico, como fisiológico y molecular, mediante diferentes técnicas, lo cual se define como una identificación polifásica [116–119]. Este aspecto es vital para el registro de un bioproducto proveniente de un microorganismo, además de la importancia que reviste para la autenticación y protección del mismo, así como su monitoreo una vez liberado en campo [116].

1.7.2. Selección de hongos promisorios

Una vez que se han obtenido e identificado los aislamientos fúngicos, la siguiente etapa corresponde a la selección de los mejores antagonistas mediante diversos ensayos *in vitro* [115]. Con ello se desea evaluar la capacidad del microorganismo de interferir en el crecimiento del patógeno, es decir, inhibir su desarrollo o actividad, ya que los hongos presentan múltiples mecanismos de control sobre el patógeno de interés [120–122]. Mediante estos ensayos se pretende determinar la existencia de capacidad antagónica, que es la base sobre la cual se sustenta el verdadero control biológico de microorganismos [122,123].

1.7.3. Incremento de la eficacia de los agentes de biocontrol

Después del aislamiento, identificación y selección de potenciales antagonistas, se debe mejorar su efectividad como agente biocontrolador, profundizando en sus mecanismos de acción y los factores que rigen su actividad micolítica [124,125]. Para ello, un camino es optimizar experimentalmente sus condiciones de fermentación, con el fin de potenciar la acción antagónica detectada y/o aumentar el espectro de acción [115,126,127].

1.8. Optimización de medios de cultivo para microorganismos

Los medios de cultivo constituyen el micro mundo de los microorganismos en condiciones de laboratorio, intentando simular su hábitat natural. El principal objetivo de los medios de cultivos es crear un ambiente adecuado para su crecimiento, simulando las condiciones lo más cercanas posibles a las naturales, asegurando así el apropiado funcionamiento de la maquinaria enzimática de los microorganismos [128]. Para el desarrollo de un medio de cultivo es necesario seleccionar adecuadamente sus componentes. Esto incluye el tipo y concentración de nutrientes, como las fuentes de carbono y nitrógeno; y otras condiciones físico-químicas como temperatura, pH inicial del medio y concentración del inóculo entre otras [129,130]. Asimismo, el efecto de las combinaciones entre los parámetros del medio y la producción del compuesto deseado, son numerosas, por tanto, es necesario optimizar las condiciones de fermentación seleccionadas mediante un diseño experimental eficaz.

Los diseños experimentales factoriales y de superficie de respuesta (RSM), son muy aplicados en el campo de la investigación [131,132]. El diseño factorial de un conjunto limitado de variables, es ventajoso en relación con el método convencional de manipulación de un ensayo de un solo parámetro, porque dicho enfoque con frecuencia no localiza las condiciones

óptimas para el proceso debido a que no considera el efecto de la posible interacción entre factores. La experimentación factorial es altamente eficiente porque cada observación proporciona información sobre todos los factores incluidos en el experimento.

Por su parte, la metodología de RSM, es una forma concisa de describir y predecir la respuesta de un sistema de variables [132,133]. Consiste en un grupo de técnicas empíricas dedicadas a la evaluación de las relaciones existentes, entre un conjunto de factores experimentales controlados y las respuestas medidas, de acuerdo con uno o más criterios seleccionados [134–136]. Esta metodología presenta una colección de parámetros estadísticos para el diseño de experimentos, evaluación de los efectos de los factores y la búsqueda de las condiciones óptimas, la cual se viene utilizando con éxito en la optimización de bioprocesos [137–141].

Por otra parte, utilizando esta metodología se requiere un menor número de experimentos, lo cual permite una detección más rápida de los efectos significativos [142–144]. Por lo tanto, estas herramientas son muy efectivas en biología experimental, ya que disminuye el costo y tiempo experimental para la optimización de los parámetros seleccionados.

1.8.1. Sistemas de fermentación sumergida

Desde el punto de vista biotecnológico un sistema de fermentación es un proceso mediante el cual, los microorganismos emplean distintos sustratos para la producción de biomasa y compuestos bioactivos, como metabolitos y enzimas [145–147]. Particularmente, la fermentación sumergida es una técnica de crecimiento en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos o suspendidos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas. Este método es muy usado por la industria biotecnológica, y su aplicación se ha divulgado extensamente debido a que permite un mejor monitoreo, y presenta mayor facilidad para controlar los factores del sistema de fermentación (temperatura, aireación, agitación y pH), mejor distribución del oxígeno y del calor suministrado al sistema, mantiene una mayor homogeneidad y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa [148,149] (Figura 5). Por otra parte, favorece la formación de pellets, por tanto el propio microorganismo como los productos enzimáticos y no enzimáticos extracelulares que exhiben actividad biocontroladora, pueden obtenerse fácilmente [150].

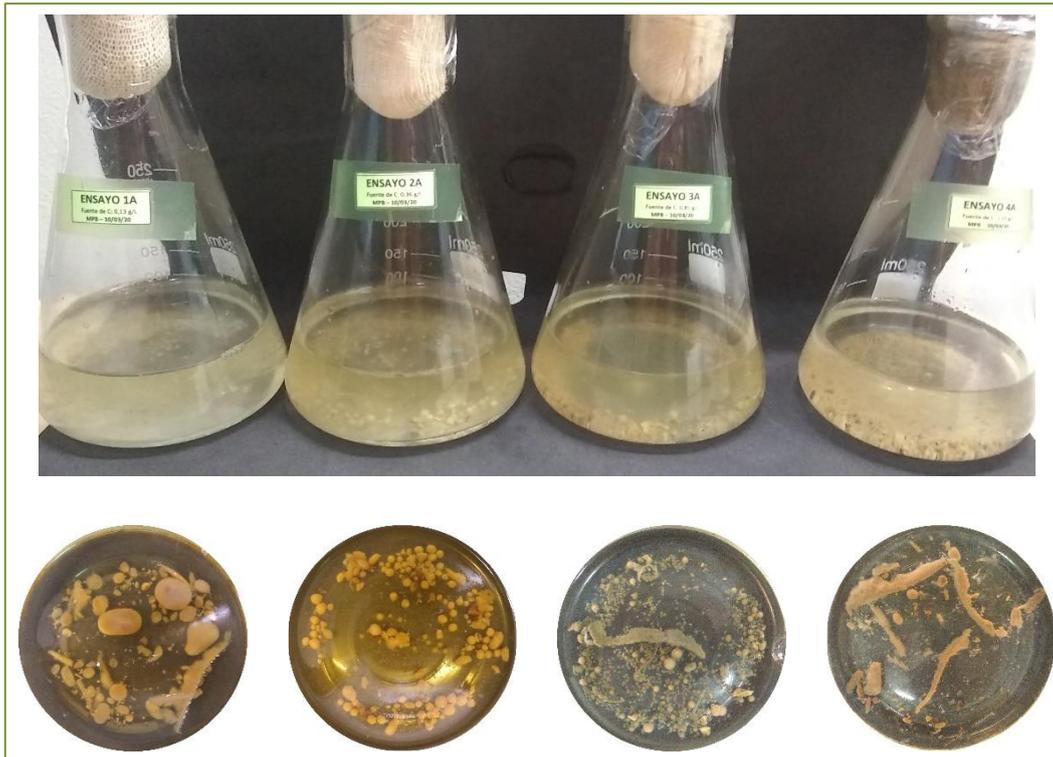


Figura 5. Pellets de un aislamiento de *Escovopsis* creciendo en sistemas de fermentación sumergida. Fotografías tomadas para el presente trabajo

1.8.2. Optimización de la secreción de enzimas micolíticas

Es ampliamente estudiado que la optimización de los parámetros de fermentación conduce a un aumento significativo en la producción de enzimas micolíticas [124,125]. A este respecto, la comprensión de los factores que rigen la actividad enzimática es crítica y vale la pena investigar. Dependiendo del microorganismo utilizado y del tipo de enzima que se produzca, los principales factores que influyen en la actividad enzimática son, el pH, la temperatura y las fuentes de carbono y nitrógeno ya que interactúan con las funciones metabólicas y de crecimiento de los microorganismos, y por tanto condicionan el tipo de respuesta metabólica [146,151,152].

El pH puede afectar de manera variable los niveles de producción de enzimas, de manera que, en la mayoría de los estudios de optimización, se toma en cuenta como una de las variables más relevantes del proceso. Generalmente en hongos el pH óptimo se encuentra en un rango de 4,0 a 7,0 [153]. Por su parte la temperatura puede influir en las velocidades de las reacciones químicas, enzimáticas y de crecimiento; si se sobrepasan las temperaturas óptimas, las funciones metabólicas pueden decaer drásticamente [153].

Por otra parte, los hongos pueden utilizar una variedad de fuentes nitrogenadas para la expresión de enzimas micolíticas [154]. Sin embargo, varios autores consideran al medio de

cultivo Mandels como un complejo nitrogenado que induce la secreción enzimática, tanto por su composición como por la combinación de sus fuentes de nitrógeno orgánicas, iones metálicos y soluciones trazas [155–158].

Con respecto a las fuentes de carbono, en condiciones de fermentación se necesitan inductores para la síntesis e interacción aditiva y sinérgica de las enzimas micolíticas, β -1,3-glucanasas, proteasas y quitinasas, [159–162]. Por tanto, varios autores han estudiado el efecto de diferentes inductores sobre la actividad enzimática, probando medios de cultivo suplementados con sustratos simples, los cuales en general inducen baja actividad; y sustratos más complejos generando actividades enzimáticas más elevadas [163]. En presencia de polímeros como laminarina y quitina, para cada enzima se observaron actividades enzimáticas variables [127,164–166]. Sin embargo, se ha reportado que la secreción de las 3 enzimas micolíticas extracelulares aumentó de manera significativa cuando el hongo se cultiva en un medio suplementado con micelio fúngico autoclavado o paredes celulares fúngicas extraídas del huésped [161,167,168].

1.9. Bioprospección del género *Escovopsis*

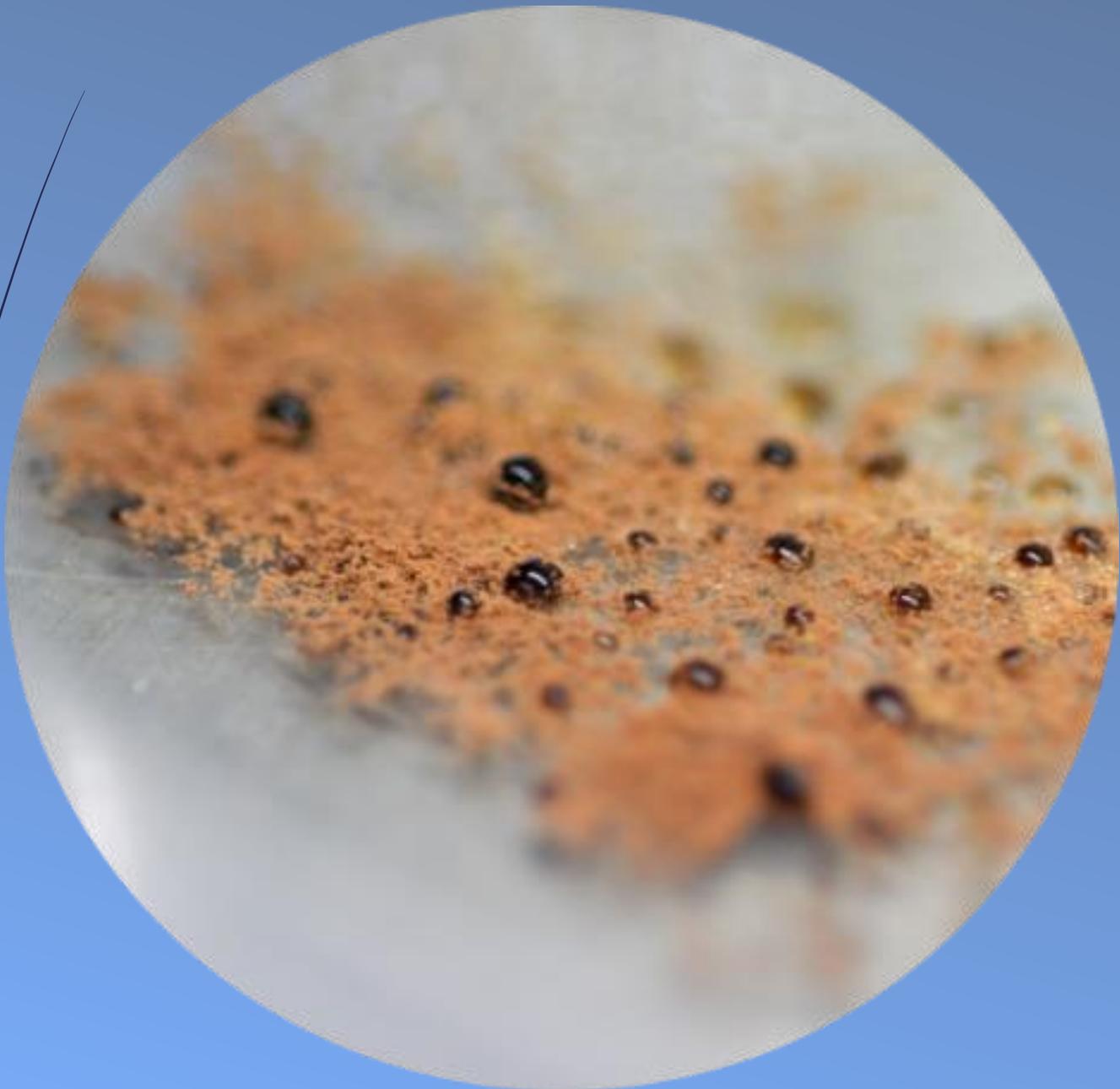
A nivel mundial existen fórmulas comerciales basadas en el uso de especies fúngicas para el control de plagas, las cuales no tienen el mismo efecto en todas las regiones agrícolas, debido a que la diversidad de condiciones ambientales existentes en la naturaleza disminuye la efectividad de estos productos [47]. En consecuencia, es necesaria la búsqueda de aislamientos de *Escovopsis* autóctonos o nativos, que tengan efecto biocontrolador sobre las hormigas cortadoras de hojas, bajo las condiciones ambientales particulares de la región. Además, se ha reportado que diferentes cepas pueden presentar diferentes mecanismos parasíticos [89,92,169]. Por tanto, el empleo de cepas altamente virulentas, podría establecer una infección persistente en las colonias de hormigas cortadoras de hojas; parasitando al hongo simbiote, sin poner en riesgo a otras especies o afectar al ambiente [84,170]. En este sentido, la evaluación de la capacidad antagónica por parte de *Escovopsis* en contra del hongo *L. gongylophorus*, representa una herramienta fundamental a fin de seleccionar cepas con características implicadas en el nivel de patogenia y especificidad, determinantes para el control biológico de hormigas cortadoras de hojas.

Por otra parte, a pesar de los avances en las investigaciones sobre la biología de *Escovopsis*, sus mecanismos de acción exactos se desconocen. La evidencia sugiere que es un hongo micoparásito, que obtiene nutrientes exclusivamente del micelio del hongo mutualista [70] y

que no se trata de un competidor por los recursos [88]. Asimismo, los estudios son limitados en lo referente a la caracterización de sus enzimas hidrolíticas [158,162,171].

Por tanto, con la finalidad de aportar información de utilidad en el marco del empleo de hongos patógenos como posibles herramientas en el control biológico, el presente trabajo está centrado en el aislamiento, caracterización y evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de hongos nativos del género *Escovopsis* frente a *L. gongylophorus*, así como en la optimización de los parámetros relevantes de fermentación líquida para inducir la actividad micolítica de un aislamiento de *Escovopsis* promisorio.

OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar, identificar y caracterizar cepas fúngicas del género *Escovopsis* nativas de Misiones con capacidad biocontroladora del hongo simbiote *Leucoagaricus*.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar e identificar cepas fúngicas del género *Escovopsis* asociados a nidos de hormigas cortadoras de hojas.
- Seleccionar las cepas fúngicas promisorias mediante pruebas de patogenicidad.
- Optimizar la secreción de enzimas con capacidad biocontroladora de las cepas fúngicas de *Escovopsis* promisorias.
- Caracterizar bioquímicamente las enzimas con capacidad biocontroladora optimizadas.

MATERIALES Y METODOS



3 MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención de aislamientos fúngicos de *Escovopsis* y *Leucoagaricus*, asociados a nidos de hormigas cortadoras de hojas en Misiones.

3.1.1. Trabajo de campo: Obtención de muestras

Con el fin de obtener aislamientos pertenecientes a los géneros *Escovopsis* y *Leucoagaricus*, se tomaron muestras de hormigueros pertenecientes al género *Acromyrmex* (Figura 6 a-b). Los muestreos se llevaron a cabo en las localidades de Posadas (27°22'25.2"S, 55°54'07.8"O), Candelaria (27°27'0"S, 55°44'0"O) y Profundidad (27°33'42.48"S, 55°42'16.03"O), en la Provincia de Misiones.

Se recolectaron fragmentos de jardines del hongo simbiote, en las cámaras superficiales de los hormigueros, los cuales se utilizaron para obtener tanto aislamientos de *L. gongylophorus* como *Escovopsis* (Figura 6 c-d). También se tomaron muestras de depósitos externos cercanos al nido, donde las hormigas eliminan residuos, con el fin de obtener aislamientos de *Escovopsis*.

Cabe destacar, que para el muestreo se tuvieron en cuenta ciertos factores ecológicos, que podían incrementar la susceptibilidad de un nido a ser contaminado por *Escovopsis*. Por ej. hormigueros de reciente formación o aquellos con síntomas de estrés ecológico (por ej. después de un periodo de lluvias).

Todas las muestras obtenidas fueron transportadas en placas de Petri previamente esterilizadas, al Laboratorio de Biotecnología Molecular (BIOTECMOL) del Instituto de Biotecnología Misiones (InBioMis), Universidad Nacional de Misiones (UNaM), donde se procesaron para la obtención de los cultivos puros (Figura 6 e). Inicialmente, se utilizaron datos de referencia correspondientes a sus lugares de aislamiento para codificarlas de manera provisoria y posteriormente fueron identificadas con el código de cepario del BIOTECMOL.



Figura 6. Trabajo de campo. **a-b)** Sitios de muestreo. **c-d)** Cámaras superficiales con hongueras expuestas. **e)** InBioMis.

3.1.2. Trabajo de laboratorio: Siembra, resiembra y conservación.

Para obtener aislamientos de *Escovopsis*, se buscó incrementar la susceptibilidad de las muestras, por lo tanto, se conservaron durante 10 a 14 días en el laboratorio en condiciones controladas de temperatura y humedad antes de ser procesadas. Por el contrario, para la obtención de aislamientos de *L. gongylophorus* las muestras se procesaron de manera inmediata, precisamente para evitar la contaminación con otros hongos.

En ambos casos, las muestras se sembraron de forma directa, con ayuda de una pinza estéril, en placas de Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo PDA como medio de cultivo (Anexo 1). Las placas se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad, y se controlaron periódicamente para determinar macroscópicamente la presencia de ambos hongos.

Para la obtención de cultivos puros de *Escovopsis* y *L. gongylophorus*, se realizaron resiembras en placas de Petri con medio PDA (Anexo 1), por el método de punción con ansa aguja y se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad. Los aislamientos obtenidos en cultivo puro, fueron conservados a 4°C , en el cepario de interés biotecnológico del InBioMis.

3.2. Identificación polifásica de los aislamientos fúngicos obtenidos

Para la identificación de los aislamientos hasta el nivel de especie, se realizó un estudio polifásico basado en la combinación de características macro-micromorfológicas y moleculares.

3.2.1. Identificación y caracterización morfológica macro y microscópica

A partir de los aislamientos fúngicos obtenidos, se realizó la caracterización e identificación morfológica, tanto macroscópica como microscópica. Para este fin, se utilizaron claves de identificación taxonómica y bibliografía de referencia para poder determinar de manera presuntiva la identificación hasta el nivel de especie [63,64,74,75,81,172].

3.2.1.1. Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica de los aislamientos se realizó empleando los medios de cultivo PDA y mCYA (Anexo 1), registrando las características relevantes del crecimiento in vitro: tamaño, forma y textura de las colonias, color de anverso y reverso, presencia de exudados, entre otras [75].

3.2.1.2. Caracterización microscópica

Para la caracterización microscópica se realizaron preparados en fresco mediante la técnica de montaje con lactofenol azul de algodón por el método de la cinta scotch y se observaron en microscopio óptico. Se tuvieron en cuenta características como forma, tamaño y pigmentación de hifas, conidióforos, vesículas, fiálides y conidios, entre otras. Se tomaron fotografías a través de un ocular micrométrico y se midieron las estructuras utilizando el programa ImageJ 1.51n (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

3.2.2. Caracterización e identificación molecular de los aislamientos de *Escovopsis*

La caracterización e identificación molecular de los aislamientos, se realizó mediante la amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2, considerada el código de barras universal primario para hongos. Esta región forma parte de la unidad de repetición del complejo del ADN ribosomal, que abarca segmentos codificantes que brindan información sobre las relaciones filogenéticas, y segmentos no codificantes, útiles en la identificación y tipificación de especies fúngicas [173,174].

3.2.2.1. Extracción de ADN

Para ambos casos, en primer lugar, se inocularon en medio ME (Anexo 1), discos de micelio esporulado de cada aislamiento previamente reactivado, y se incubaron durante 7 días a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Para la extracción de ADN genómico a partir de micelio fúngico se emplearon dos procedimientos. Se siguió el protocolo propuesto por Fonseca [175] (Anexo 2), y también se utilizó el kit de extracción y purificación rápida ADN PuriPrep-T de INBIO HIGHWAY, siguiendo las especificaciones del fabricante. Las muestras de ADN genómico se conservaron en freezer a -20°C . La integridad del ADN extraído se verificó en geles de agarosa al 1% (Sección 3.2.2.3).

3.2.2.2. Amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2 por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de esta región mediante PCR, se utilizaron los cebadores universales ITS1 (5'-TCC gTA ggT gAA CCT gCg g-3') e ITS4 (5'-TCC TCC gCT TAT TgA TAT gC-3') [176]. Se partió de una master mix con un volumen final de 20 μL , conteniendo agua libre de ADNasas, *Buffer* 1 X, MgCl_2 a una concentración entre 2 mM y 3 mM, dNTPs 200 μM , 10 pmol de cada cebador universal, Taq polimerasa 0,5 U y ADN genómico 5-10 ng. Asimismo, se agregó a la reacción estándar DMSO 5% (v/v), para mejorar la unión de los cebadores, debido a su alto contenido de GC.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Hangzhou Bioer Technology CO (GenePro Thermal Cyclor, modelo TC-E-48D, B-48D), y las condiciones de ciclado fueron:

- Desnaturalización inicial: 4 min a 94°C .
- 30 ciclos: 50 seg a 94°C , 50 seg a 51°C (T_m), y 1 min a 72°C .
- Extensión final: 10 min a 72°C .

3.2.2.3. Verificación por electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar la calidad del ADN genómico y verificar los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 1% y 1,5% (p/v) respectivamente, preparados en buffer TBE 0,5 X (Tris-Borato-EDTA). Las muestras se sembraron en los pocillos del gel mezclando 2,5 µL del producto de PCR con 0,5 µL de buffer de siembra (Glicerol 60%; EDTA 0,01 M; azul de bromofenol 0,1%) conteniendo Gel Red (Biotium, 10000 X; 10 mg/mL) el cual se intercala entre las bases del ADN y absorbe la radiación ultravioleta, con emisión de color por parte de las bandas obtenidas. Además, se sembró un marcador de peso molecular de 100 pb (BioRad Ladder 100 pb DNA 100 mg/mL) para determinar el tamaño de las bandas. La corrida electroforética se realizó a 110 V y 500 A por 20 min en una cuba horizontal SubSystem 70 modelo E-0310 (Labnet International, Inc.). Los geles se observaron bajo luz UV de un transiluminador y se fotografiaron.

3.2.2.4. Análisis bioinformático y construcción de árboles filogenéticos

Los productos de amplificación fueron procesados por el servicio de secuenciación automática de la compañía Macrogen Inc. (Corea). Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante el programa Geneious 8.1.8. Posteriormente se realizaron análisis de similitud e identidad mediante el recurso bioinformático BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide), de la base de datos primaria del NCBI (National Center of Biotechnology Information) y la herramienta Parwise sequence alignment de la base de datos secundaria "curada" Fungal barcoding.

Con el fin de construir los árboles filogenéticos, además de contar con las secuencias obtenidas de los aislamientos, se extrajeron del NCBI-GenBank secuencias ITS de referencia pertenecientes a especies de *Escovopsis* y afines. Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando la herramienta ClustalW. Los árboles se construyeron utilizando el programa MEGA 6 mediante los métodos Neighbor-Joining (NJ) y Máxima verosimilitud (ML) utilizando el test de Bootstrap con 1000 réplicas. Se utilizó el modelo de Kimura-2 parámetros (K2+I), que describió mejor los patrones de sustitución. Para el enraizamiento de los árboles, como grupo externo se utilizaron secuencias ITS1-5,8-ITS2 pertenecientes a *Hypocrea rufa*, *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma pubescens* publicadas por Meirelles [172] (Números de acceso: X93980.1, EU280124.1, NR077179.1 respectivamente).

3.3. Selección de una cepa fúngica promisorio mediante pruebas de patogenicidad

A fin de seleccionar los aislamientos fúngicos promisorios con características implicadas en el control biológico se realizaron ensayos de antagonismo enfrentando los aislamientos de *Escovopsis* contra el hongo *L. gongylophorus*.

3.3.1. Ensayos de patogenicidad in vitro: método de enfrentamiento por cultivo dual.

La patogenicidad de los micoparásitos fúngicos se evaluó mediante ensayos de antagonismo, enfrentando directamente cada aislamiento de *Escovopsis* contra un aislamiento de *L. gongylophorus*, siguiendo una variante de la metodología de enfrentamiento por cultivo dual, estandarizada por Acevedo [177,178]. En primer lugar, se sembraron dos discos de 7 mm² de agar recubiertos con micelio de *L. gongylophorus*, en puntos opuestos de placas de Petri de 90 mm con 20 mL de PDA (Anexo 1), y se incubaron a 28 ± 1 °C durante 15 días, en oscuridad. Transcurrido este periodo, se agregó un disco de 7 mm² con micelio esporulado de *Escovopsis* en el centro de la placa. Cada ensayo se realizó por triplicado y como control experimental todos los aislamientos de *Escovopsis* fueron cultivados en ausencia de *L. gongylophorus* y viceversa.

Se obtuvieron registros fotográficos durante un periodo de 10 días para evaluar el crecimiento colonial. Mediante el programa ImageJ 1.51n (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), se midió el crecimiento radial de *L. gongylophorus* en los enfrentamientos y controles.

La evaluación de los antagonismos se realizó teniendo en cuenta tres criterios de análisis:

3.3.1.1. Grados de virulencia.

La evaluación de la capacidad antagónica de cada aislamiento de *Escovopsis* frente a *L. gongylophorus*, se determinó empleando una escala de grados de virulencia (Tabla 1) asignados de acuerdo al crecimiento de *Escovopsis* sobre el hongo simbiote [179]. Se consideró promisorio un grado de inhibición igual o mayor a 3.

Tabla 1. Grados de virulencia de *Escovopsis* sobre el hongo simbiote *L. gongylophorus* [179].

Grado	Capacidad antagónica
0	Hongo simbiote saludable, sin evidencia de micelio y/o esporas de <i>Escovopsis</i> .
1	Hongo simbiote cubierto de micelio de <i>Escovopsis</i> .
2	Micelio y esporas blancas de <i>Escovopsis</i> crecen en exceso sobre el hongo simbiote.
3	Micelio, esporas blancas y marrón claras de <i>Escovopsis</i> crecen en exceso sobre el hongo simbiote.
4	Micelio y esporas marrón oscuras de <i>Escovopsis</i> , crecen en exceso sobre el hongo simbiote; colapso total de la estructura

3.3.1.2. Grados de Inhibición.

Se determinó la inhibición del crecimiento micelial del hongo simbionte *L. gongylophorus*, mediante una adaptación de la fórmula de Abbott:

$$GI = \frac{(Ap - Ap + a) \times 100}{Ap} \quad (1)$$

Donde, GI representa el grado de inhibición del crecimiento micelial (%), Ap representa el crecimiento radial del hongo simbionte y, Ap + a representa el crecimiento radial del hongo simbionte en presencia del antagonista [180]. Se consideró promisorio un grado de inhibición igual o mayor a 50%.

3.3.1.3. Análisis estadístico.

Los valores de crecimiento radial de *L. gongylophorus*, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de diferencia entre medias, utilizando el test de Tukey, con un nivel de confianza del 95,0%. Se utilizó el programa estadístico InfoStat versión 2018 (Grupo InfoStat, Argentina).

3.3.2. Mecanismos de micoparasitismo: microcultivos en cámara húmeda.

Con la finalidad de observar la interacción entre *Escovopsis* y *L. gongylophorus* durante el proceso de micoparasitismo, se realizaron enfrentamientos en microcultivo. Para tal fin, se seleccionó un aislamiento promisorio de *Escovopsis*, con el cual se analizaron estrategias y mecanismos estructurales de micoparasitismo sobre *L. gongylophorus*.

Cada ensayo se realizó en una cámara húmeda, compuesta por una caja de Petri, conteniendo dos portaobjetos cruzados y un fragmento de algodón humedecido con agua destilada. Todos los componentes fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión superior a la normal durante 15 min.

Sobre el portaobjetos superior, donde se colocó una fina capa de medio de cultivo AA (Anexo 1); se inoculó un fragmento micelial de *L. gongylophorus* sobre un extremo del portaobjeto y se incubó a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad, durante un periodo de 7 días. Posteriormente se inoculó el aislamiento de *Escovopsis* seleccionado como promisorio sobre el otro extremo del portaobjeto, y se incubó bajo las mismas condiciones. Los ensayos se evaluaron periódicamente hasta detectar la interacción entre los aislamientos, la cual se observó mediante microscopía óptica convencional, utilizando la técnica de montaje con lactofenol azul de algodón.

3.4. Optimización de la secreción de enzimas micolíticas en un aislamiento de *Escovopsis* promisorio

Con el fin de aumentar la actividad de las enzimas micolíticas (proteasas, quitinasas y β -1,3-glucanasas), en el aislamiento de *Escovopsis* seleccionado como promisorio, se llevó a cabo una serie de ensayos en fermentación líquida. Se realizó una selección de fuentes de carbono y nitrógeno seguida de la optimización, de las fuentes de carbono y nitrógeno seleccionadas, así como de las variables pH inicial del medio y concentración de inóculo. Fueron empleados distintos diseños experimentales, para analizar de manera simultánea el efecto de las variables con todas sus combinaciones.

3.4.1. Medios de cultivo líquidos: fuentes de carbono y nitrógeno

Para los ensayos de optimización de la secreción de enzimas micolíticas, se emplearon medios de cultivo líquidos compuestos por una combinación de diferentes tipos y concentraciones de fuentes de carbono y nitrógeno.

Como fuentes de carbono se emplearon paredes celulares fúngicas pertenecientes a *L. gongylophorus* y *Fusarium* las cuales debieron ser tratadas, mediante un proceso de extracción [181]. Para la producción de micelio fúngico, los hongos se inocularon en medio líquido ME (Anexo 1) y se incubaron durante 15 días a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, en luz continua (*Fusarium*) y oscuridad (*L. gongylophorus*). Posteriormente se procesaron como se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Procedimiento para la extracción de paredes celulares fúngicas [181].

Filtración del micelio	→	H ₂ O destilada
Purificación	→	NaCl 0,85% (p/v) (2 h)
Solubilización de tejidos internos	→	SDS 2% (p/v) (5 min)
Lavados y centrifugado	→	Cloroformo:Metanol (1:1) Acetona
Secado	→	Temperatura ambiente (24 h)
Triturado de paredes celulares	→	Mortero

Las fuentes de nitrógeno ensayadas fueron los componentes del medio Mandels [155] el cual es ampliamente citado por favorecer la secreción enzimática. El mismo se compone de: KH₂PO₄ (2 g/L), CaCl₂·2H₂O (0,4 g/L), MgSO₄·4H₂O (0,3 g/L), FeSO₄·7H₂O (0,005 g/L), MnSO₄·4H₂O (0,0016 g/L), ZnSO₄·7H₂O (0,0014 g/L), CoCl₂·6H₂O (0,02 g/L); y los componentes nitrogenados, urea (0,3 g/L), extracto de levadura (0,25 g/L) y sulfato de amonio (1,4 g/L).

3.4.2. Condiciones de cultivo en fermentación líquida: Inóculo, incubación y muestreo

Para todos los ensayos, el aislamiento de *Escovopsis* seleccionado, mantenido y conservado en cepario, se reactivó en placas de Petri conteniendo PDA como medio de cultivo (Anexo 1), y se incubó alrededor de 7 días a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad.

Una vez lograda la esporulación, se preparó una suspensión de esporas en una solución estéril de agua destilada con agregado de Tween 80 0,1% (v/v). El recuento de esporas se realizó utilizando una cámara de Neubauer, hasta alcanzar una concentración de 1×10^7 esporas/mL.

Para cada ensayo, se utilizaron frascos erlenmeyers de 250 mL, conteniendo 75 mL del medio de cultivo a ensayar, los cuales se esterilizaron en autoclave. Posteriormente se inocularon con 3 mL de suspensión de esporas y se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad y 100 rpm de agitación, durante 16 días. Periódicamente, se tomaron muestras de 3 mL de sobrenadante, en condiciones de esterilidad.

3.4.3. Determinación enzimática cuantitativa

La respuesta de los ensayos se cuantificó determinando la capacidad de *Escovopsis* para secretar enzimas micolíticas. Los métodos para determinar las actividades fueron estandarizados por nuestro equipo de trabajo empleando los sobrenadantes enzimáticos.

3.4.3.1. Actividad proteasa: Método de la Azocaseína (Modificado de Charney y Tomarelli [182])

Se utilizó el sustrato cromogénico, azocaseína al 0,5% (p/v), en buffer Tris-HCl (0,2 M a pH 7,4). Las mezclas de reacción (300 μL de azocaseína + 300 μL del sobrenadante enzimático), se incubaron durante 50 min a 37°C , en baño termostático sin agitación.

Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 600 μL de ácido tricloroacético al 10% (p/v). Las muestras se centrifugaron a 7000 rpm durante 5 min y los sobrenadantes obtenidos se neutralizaron con NaOH (1 M). Las determinaciones se llevaron a cabo a 440 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-Vos 1900. La actividad enzimática se expresó en términos de unidades equivalentes a la actividad de un mg de papaína (1 unidad = 1 mg de papaína).

3.4.3.2. Actividad β -1,3-glucanasa (Modificado de Masih y Paul [183])

Se empleó el sustrato laminarina 1% (p/v), en buffer acetato (0,2 M; pH 5). Las mezclas de reacción (250 μ L de laminarina + 250 μ L del sobrenadante enzimático) se incubaron durante 40 min a 50°C, en baño termostático sin agitación. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 500 μ L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), se hirvieron por 10 min y se adicionaron 4 mL de agua destilada. Las determinaciones se llevaron a cabo a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis 1900. Una unidad de β -1,3-glucanasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de glucosa por min.

3.4.3.3. Actividad quitinasa (Modificado de Wen *et al.*, De Marco *et al.*, y Kyoung-Ja Kim *et al.*, [184–186])

Se utilizó como sustrato quitina coloidal 0,5% (v/v) en buffer acetato (0,05 M; pH 4,8). Las mezclas de reacción (300 μ L de quitina coloidal + 300 μ L del sobrenadante enzimático) se incubaron durante 60 min a 37°C, en baño termostático a 90 rpm. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 600 μ L de DNS, se hirvieron por 10 min y se adicionaron 4 mL de agua destilada. Las determinaciones se llevaron a cabo a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis 1900. Una unidad de quitinasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de N-acetilglucosamina (NAG) por min.

3.4.4 Análisis estadísticos

Para cada ensayo se realizó un ANOVA en función del diseño experimental seleccionado. Con el fin de analizar las variables con efecto significativo sobre la actividad enzimática, todos los datos obtenidos fueron procesados y analizados utilizando los programas estadísticos InfoStat versión 2018 (Grupo InfoStat, Argentina) y Statgraphics Centurion XVI (StatPoint, Inc., USA).

3.4.5 Selección de fuentes de carbono y nitrógeno que promuevan la secreción de enzimas micolíticas

Con el fin de evaluar el efecto de distintas fuentes de carbono y nitrógeno sobre la actividad micolítica del aislamiento seleccionado, se empleó un diseño experimental factorial de dos y cuatro niveles. Cada ensayo se diseñó en función de la combinación de los niveles de cada factor (Tabla 3). Todos los ensayos se realizaron por duplicado y bajo las condiciones de cultivo descritas anteriormente (Sección 3.4.2).

Para el factor fuente de carbono fueron considerados dos niveles: paredes celulares de *Fusarium* y paredes celulares de *L. gongylophorus*, con una concentración de 0,36 g/L. Para el factor fuente de nitrógeno fueron considerados cuatro niveles: urea, extracto de levadura, sulfato de amonio y Mandels. Con respecto a este factor, se utilizó una solución general de Mandels con modificaciones para los distintos ensayos; y se emplearon las concentraciones de los componentes nitrogenados citadas para este medio (sección 3.4.1).

Análisis estadísticos: Los datos fueron procesados utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2018 (Grupo InfoStat, Argentina). Con el fin de seleccionar las variables que tuvieron efecto significativo sobre la actividad enzimática, se realizó un ANOVA y una prueba de diferencia entre medias, mediante el test de Tukey, con un nivel de confianza de 95,0%.

Tabla 3. Combinación de niveles para cada factor ensayado y los valores de concentración para cada uno.

FUENTES DE CARBONO	FUENTES DE NITROGENO			
	Urea (0,3 g/L)	Sulfato de amonio (1,4 g/L)	Extracto de levadura (0,25 g/L)	Mandels Urea (0,3 g/L), Sulfato de amonio (1,4 g/L), Extracto de levadura (0,35 g/L)
Paredes celulares de <i>Fusarium</i> (0,36 g/L)	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3	ENSAYO 4
Paredes celulares de <i>L. gongylophorus</i> (0,36 g/L)	ENSAYO 5	ENSAYO 6	ENSAYO 7	ENSAYO 8

3.4.6 Optimización de la fuente de carbono seleccionada que promueva la secreción de enzimas micolíticas

Con el fin de obtener la concentración óptima de la fuente de carbono seleccionada previamente, se estudiaron cuatro niveles de la misma para incrementar la actividad de las enzimas micolíticas. Se utilizó la fuente de nitrógeno seleccionada y las concentraciones de carbono ensayadas fueron las siguientes: 0,13 g/L; 0,36 g/L; 0,81 g/L y 1,25 g/L.

Análisis estadísticos: Los datos fueron procesados utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2018 (Grupo InfoStat, Argentina). Con el fin de seleccionar la concentración de fuente de carbono con un efecto significativo sobre la actividad enzimática, se realizó un ANOVA y una prueba de diferencia entre medias, mediante el test de Tukey, con un nivel de confianza de 95,0%.

3.4.7 Optimización de la fuente de nitrógeno seleccionada que promueva la secreción de enzimas micolíticas

Con el fin de optimizar las concentraciones de la fuente de nitrógeno seleccionada previamente, se utilizó un diseño experimental de superficie de respuesta (RSM) denominado Box-Behnken. Se ensayó el efecto de tres niveles de concentración (+1, 0 y -1) para cada uno de los factores, es decir, cada uno de los componentes nitrogenados del medio Mandels (urea, extracto de levadura y sulfato de amonio). Se realizaron 17 ensayos, incluyendo un punto central por quintuplicado, que son ensayos adicionales localizados en el nivel medio de los factores, los cuales permiten una estimación más uniforme de la varianza en el espacio del diseño. Las concentraciones ensayadas se detallan en la Tabla 4.

Análisis estadísticos: los datos fueron analizados mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (StatPoint, Inc., USA). Con el fin de analizar el efecto de los distintos niveles de cada factor sobre la actividad de cada enzima, se realizó un ANOVA de RSM con un nivel de confianza de 95,0%. Para el correcto análisis de RSM, las concentraciones reales fueron expresadas en las unidades estándar (-1, 0 y +1) donde +1 representa la concentración más alta y -1 la más baja. Asimismo, para obtener los valores de concentración óptimos para cada componente nitrogenado, se realizó un análisis de optimización de múltiples respuestas, para incrementar de manera conjunta la actividad de las enzimas micolíticas.

Tabla 4. Fuentes de nitrógeno evaluadas y los valores de concentración reales para cada nivel.

Factores	Urea		
	Extracto de levadura	Sulfato de amonio	
Niveles	-1	0	+1
Concentraciones	0,2 g/L	1,1 g/L	2 g/L

3.4.8 Optimización de variables físico-químicas que promuevan la secreción de enzimas micolíticas: concentración de inóculo, pH inicial del medio y concentración de urea

Con el fin de seguir incrementando la actividad de las enzimas micolíticas del aislamiento de *Escovopsis* seleccionado, se optimizó la concentración del componente nitrogenado urea, la variable pH inicial del medio y la concentración del inóculo. Se utilizó un diseño experimental RSM Box-Behnken. Se ensayó el efecto de tres niveles (+1, 0 y -1) para cada uno de los factores, es decir, cada variable físico-química. Se realizaron 17 ensayos, incluyendo un punto central por quintuplicado. Los factores y niveles ensayados se detallan en la Tabla 5. Para cada medio de cultivo ensayado se incluyeron las variables optimizadas previamente.

Análisis estadísticos: los datos fueron analizados mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (StatPoint, Inc., USA). Con el fin de evaluar el efecto de los distintos niveles de cada factor se realizó un ANOVA de RSM con un nivel de confianza de 95,0%; y se obtuvieron los valores óptimos de cada variable físico-química, mediante un análisis de optimización de múltiples respuestas.

Tabla 5. Variables físico-químicas evaluadas y los valores reales de cada una para cada nivel

Niveles		-1	0	+1
Factores	Concentración de Urea	0 g/L	0,1 g/L	0,2 g/L
	pH	4	5,5	7
	Concentración de inoculo	1 x 10 ⁶ esporas/mL	1 x 10 ⁷ esporas/mL	2 x 10 ⁷ esporas/mL

3.4.9 Validación de las variables experimentales optimizadas

Con el fin de validar las condiciones óptimas predichas para cada factor en los análisis de optimización de múltiples respuestas, se realizó un ensayo por quintuplicado empleando los valores óptimos para cada variable ensayada. Los ensayos se incubaron bajo las condiciones descritas anteriormente (Sección 3.4.2). Finalmente se realizó la comparación entre los valores obtenidos y los valores predichos para cada actividad enzimática.

3.5 Caracterización bioquímica de las enzimas micolíticas presentes en los sobrenadantes optimizados

Luego de ensayar las distintas variables físico-químicas, y obtener las condiciones de cultivo en fermentación líquida óptimas para el aislamiento de *Escovopsis* promisorio, se procedió a la caracterización bioquímica de las enzimas micolíticas presentes en los sobrenadantes optimizados.

3.5.1 Temperatura y pH de reacción óptimos

El efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas micolíticas (proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas) se evaluó incubando las mezclas de reacción a diferentes temperaturas, con un pH estándar de reacción. Posteriormente, el efecto del pH se determinó incubando las mezclas de reacción a temperatura óptima, usando diferentes buffers para variar el pH de reacción. La actividad enzimática se determinó empleando los protocolos descritos en la sección 3.4.3, con las respectivas modificaciones (Tabla 6). Las demás condiciones de reacción se mantuvieron constantes y los ensayos se realizaron por duplicado.

Tabla 6. Temperaturas y pHs de reacción ensayados para cada enzima micolítica.

Enzimas micolíticas	Proteasas	β -1,3-glucanasas	Quitinasas
Temperatura (°C)	25	25	25
	37	40	37
	45	50	45
	55	60	55
	65	70	65
	75		
	85		
	95		
pH	5	3	3
	6	4	4
	7	5	4,8
	7,4	6	5
	8	7	6
	9		7

3.5.2 Termoestabilidad y pH estabilidad

Para determinar la estabilidad enzimática en el tiempo, los sobrenadantes optimizados se incubaron post-fermentación a diferentes temperaturas y pHs. Posteriormente se midió la actividad residual de cada ensayo, la cual se expresó en porcentaje tomando la actividad en tiempo cero como el 100%. La actividad enzimática se determinó empleando los protocolos descritos en la sección 3.4.3, a las temperaturas y pHs de reacción optimizados en la sección 3.5.1.

Con respecto a la termoestabilidad en el tiempo, los sobrenadantes se incubaron a temperatura ambiente (entre 24 y 28°C) y en heladera (5°C), durante 30 días, retirando las muestras cada 5 días; y a la temperatura de reacción óptima de cada enzima, retirando las muestras cada 5 min.

Con respecto a la estabilidad del pH en el tiempo a temperatura ambiente, para cada enzima se ensayó la estabilidad a su pH óptimo, y además se seleccionaron dos puntos de pH para cada una. Los sobrenadantes se incubaron durante 30 días, retirando las muestras cada 5 días.

3.5.3 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de las secciones 3.5.1 y 3.5.2 fueron procesados utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2018 (Grupo InfoStat, Argentina). Con el fin de analizar el efecto

de las variables descritas sobre la actividad enzimática, se realizó un ANOVA y una prueba de diferencia entre medias, mediante el test de Tukey, con un nivel de confianza de 95,0%.

3.5.4 Detección de isoenzimas con actividad micolítica en ND-PAGE: Zimogramas

La zimografía permite revelar selectivamente isoenzimas, que son diferentes formas moleculares de una enzima, capaces de catalizar la misma reacción. En este trabajo, se detectó la presencia de isoenzimas con actividad micolítica (proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas) mediante electroforesis no desnaturizante (ND-PAGE) en geles de poliacrilamida al 7,5% (p/v) [187,188]. Los sobrenadantes enzimáticos se clarificaron con solución acuosa de Tween 80 0,1% (v/v) en una proporción 2:1; y se sembraron 25 μ L por cada carril. La corrida electroforética se realizó a 120 V por 120 min en buffer Tris-Glicina 1,5 M, pH 8,3.

3.5.4.1 Detección de isoenzimas para proteasas

Para determinar la presencia de isoenzimas de proteasas, se realizó un gel ND-PAGE conteniendo leche descremada 0,3% (p/v). Luego de realizar la corrida electroforética, el gel se incubó en buffer Tris-HCl 0,2 M pH 7,4, en heladera durante 15 min, luego por 2 h a temperatura ambiente y después por 1 h a 37°C. Posteriormente el gel se tiñó durante 1 h con una solución de azul de Coomassie 0,25% (p/v), metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Finalmente se realizaron lavados con una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v), hasta visualizar las bandas claras en el fondo azul.

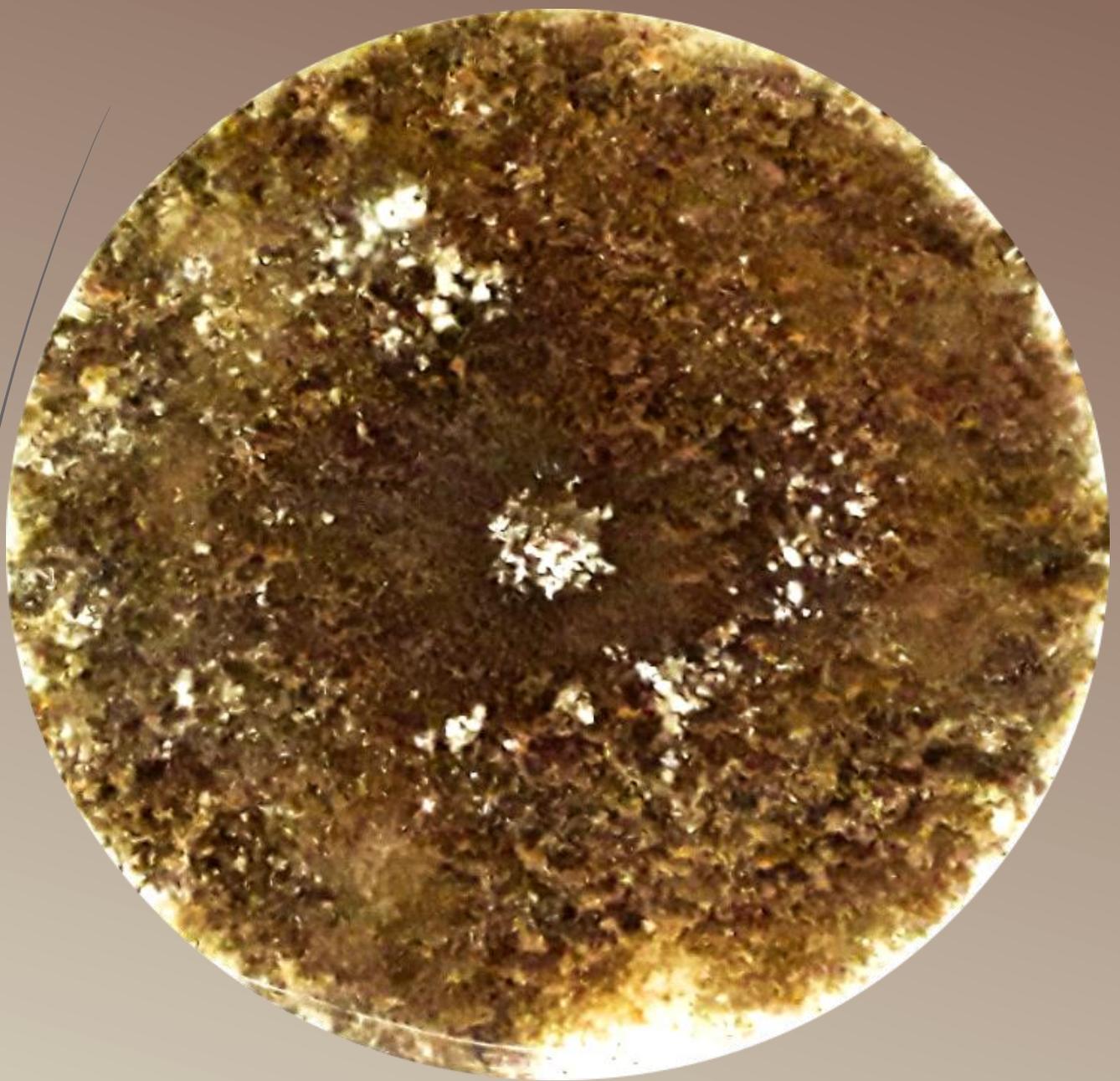
3.5.4.2 Detección de isoenzimas para β -1,3-glucanasas

Para determinar la presencia de isoenzimas de β -1,3-glucanasas, se realizó un gel ND-PAGE conteniendo laminarina 0,1% (p/v). Luego de realizar la corrida electroforética, el gel se incubó en buffer acetato 0,2 M pH 5, durante 40 min a 50°C. Posteriormente el gel se tiñó durante 15 min en agitación suave, con una solución de rojo congo 0,1% (p/v). Finalmente se realizaron lavados con una solución de NaCl 1 M, hasta visualizar las bandas en el gel.

3.5.4.3 Detección de isoenzimas para quitinasas

Para determinar la presencia de isoenzimas de quitinasas, se realizó un gel ND-PAGE conteniendo quitina coloidal 0,1% (v/v). Luego de realizar la corrida electroforética, el gel se incubó en buffer acetato 0,05 M pH 4,8, durante 1 h a 45°C. Posteriormente el gel se tiñó durante 15 min en agitación suave, con una solución de rojo congo 0,1% (p/v). Finalmente se realizaron lavados con una solución de NaCl 1M, hasta visualizar las bandas en el gel.

RESULTADOS



4 RESULTADOS

4.1 Obtención de aislamientos fúngicos de *Escovopsis* y *L. gongylophorus*, asociados a nidos de hormigas cortadoras de hojas en Misiones.

En primera instancia, con el fin de obtener aislamientos fúngicos pertenecientes a *Escovopsis* y *L. gongylophorus*, se muestrearon un total de 53 nidos de hormigas cortadoras de hojas, pertenecientes al género *Acromyrmex*. Una vez transportadas al laboratorio y al cabo de unos días sin ser procesadas, en varias muestras se pudo detectar a simple vista, de acuerdo a sus características macroscópicas, la presencia de colonias de *Escovopsis* creciendo sobre los fragmentos de hongueras (Figura 7 a-b). Asimismo, en las muestras que fueron sembradas e incubadas, también se pudo observar el crecimiento de colonias de *Escovopsis* (Figura 7 c-d). Con respecto a *L. gongylophorus*, las colonias se pudieron aislar a partir de la siembra directa de fragmentos de hongueras (Figura 7 e-f).

Posteriormente, mediante una serie de resiembras, se obtuvieron 11 aislamientos de *Escovopsis*, provisoriamente codificados desde HMP1 a HMP11; y 2 de *L. gongylophorus* denominados 136MIG y 173COR. Posteriormente cada uno de estos aislamientos fue identificado con el código de cepario del BIOTECMOL (Anexo 3).

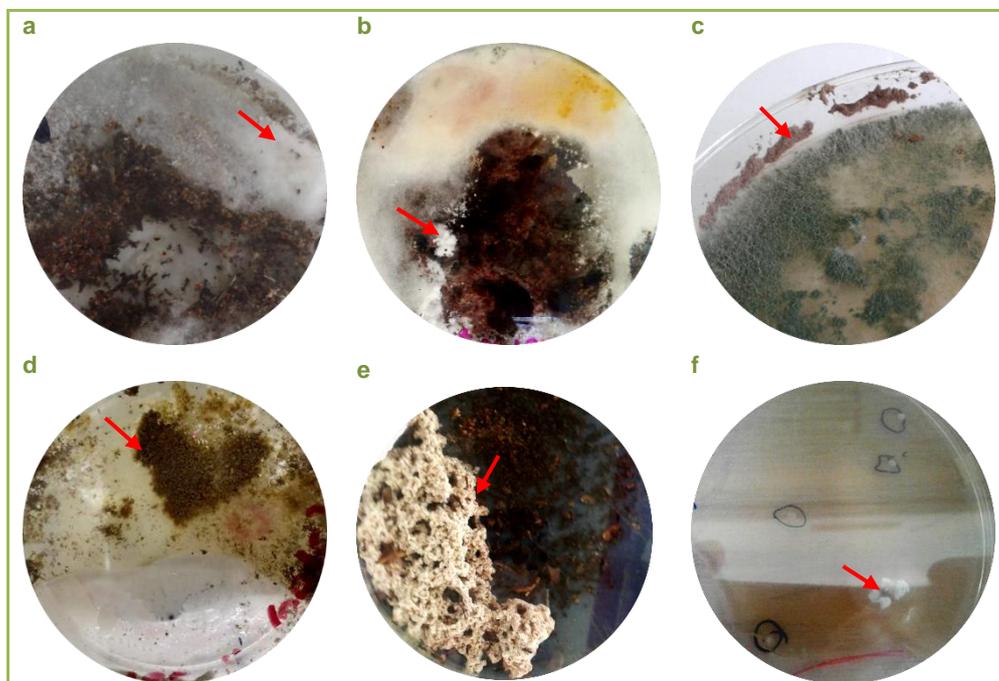


Figura 7. Aislamiento de los géneros fúngicos *Escovopsis* y *L. gongylophorus*, en Misiones. Colonias de *Escovopsis* creciendo sobre las muestras de hongueras (**a y b**). Colonias de *Escovopsis* creciendo en placas con medio de cultivo PDA (**c y d**). *L. gongylophorus* creciendo directamente sobre la muestra de honguera (**e**). *L. gongylophorus* creciendo en medio de cultivo PDA (**f**). Las flechas indican las colonias fúngicas de interés.

4.2 Identificación polifásica de los aislamientos fúngicos obtenidos

4.2.1 Caracterización macroscópica

Con respecto a los aislamientos de *Escovopsis*, se observaron colonias de crecimiento rápido, que cubrieron los 90 mm² de las placas de Petri en un periodo de 4 a 10 días de incubación. Todas las colonias presentaron bordes irregulares, con abundante micelio aéreo, de textura pulverulenta (Figura 8). Tanto el anverso como reverso presentaron coloración inicialmente blanca y posteriormente marrón. En todos los aislamientos se observó la presencia de exudados de color marrón.

Por otra parte, los aislamientos de *L. gongylophorus* presentaron crecimiento lento, sin cubrir las placas de Petri de 90 mm² a los 30 días de incubación. Se observaron colonias irregulares, con micelio aéreo de textura algodonosa y con agrupaciones visibles de gongilidios denominadas estáfilas (Figura 9). El anverso presentó coloración blanca y el reverso coloración inicialmente blanca, y posteriormente amarilla.

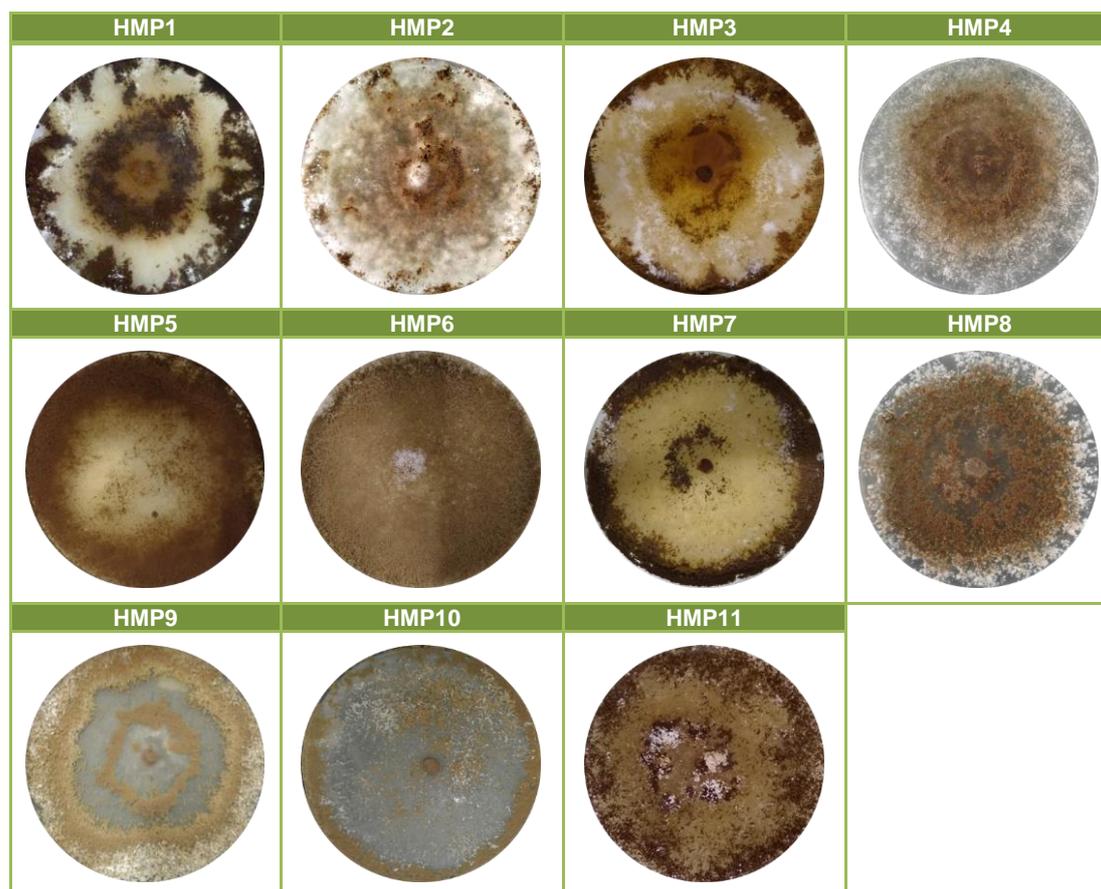


Figura 8. Características macroscópicas de los aislamientos de *Escovopsis*. Anverso del crecimiento colonial en placas con medio de cultivo PDA a los 10 días de incubación.

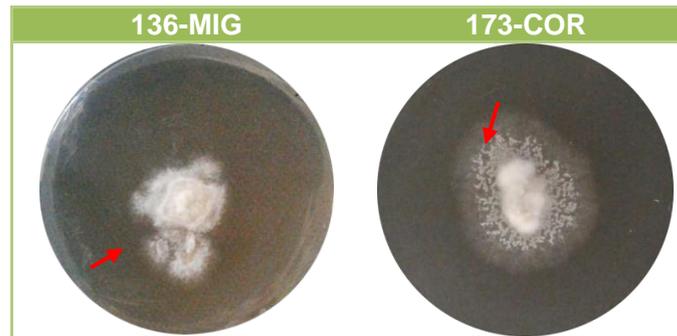


Figura 9. Características macroscópicas de los aislamientos de *L. gongylophorus*. Anverso del crecimiento colonial en placas con medio de cultivo PDA a los 30 días de incubación. Las flechas señalan la presencia de estáfilas.

4.2.2 Caracterización microscópica

Con respecto a la caracterización microscópica, de manera general los aislamientos de *Escovopsis* mostraron la presencia de hifas septadas, hialinas, de paredes delgadas, conidióforos cilíndricos, con ramificaciones cruciformes y en ocasiones monopodiales. Las ramas presentaron vesículas evanescentes, laterales y apicales, cilíndricas, ocasionalmente clavadas (Figura 10). Asimismo, todos los aislamientos presentaron fiálides ampuliformes, dispuestas a lo largo de las vesículas, a partir de las cuales se desprendían cadenas basipetales de conidios con paredes gruesas y ornamentadas, globosos a ovoides, inicialmente hialinos que se tornaban marrones al incrementar el tiempo de incubación. Particularmente, en 8 aislamientos (HMP2, HMP3, HMP4, HMP7, HMP8, HMP9, HMP10 y HMP11) se pudo observar ocasionalmente la presencia de vesículas catenuladas de a dos (Figura 11).

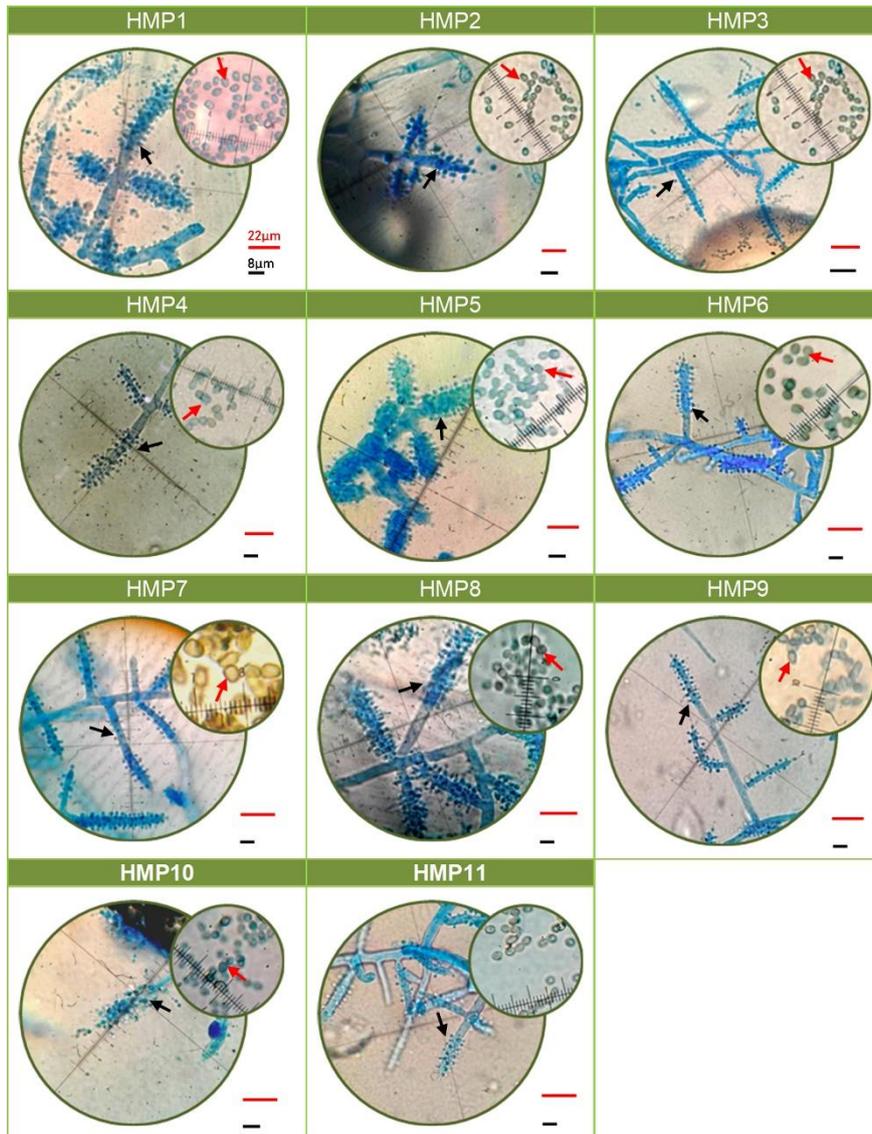


Figura 10. Características microscópicas de los aislamientos de *Escovopsis*. Las flechas negras indican a las vesículas presentes en los conidióforos, con fiáldes dispuestas a lo largo de cada una. Se observaron con aumento 40X y las barras negras representan 22 µm. Las flechas rojas indican los conidios globosos a ovoides, con un aumento 100X, y las barras rojas representan 8 µm.

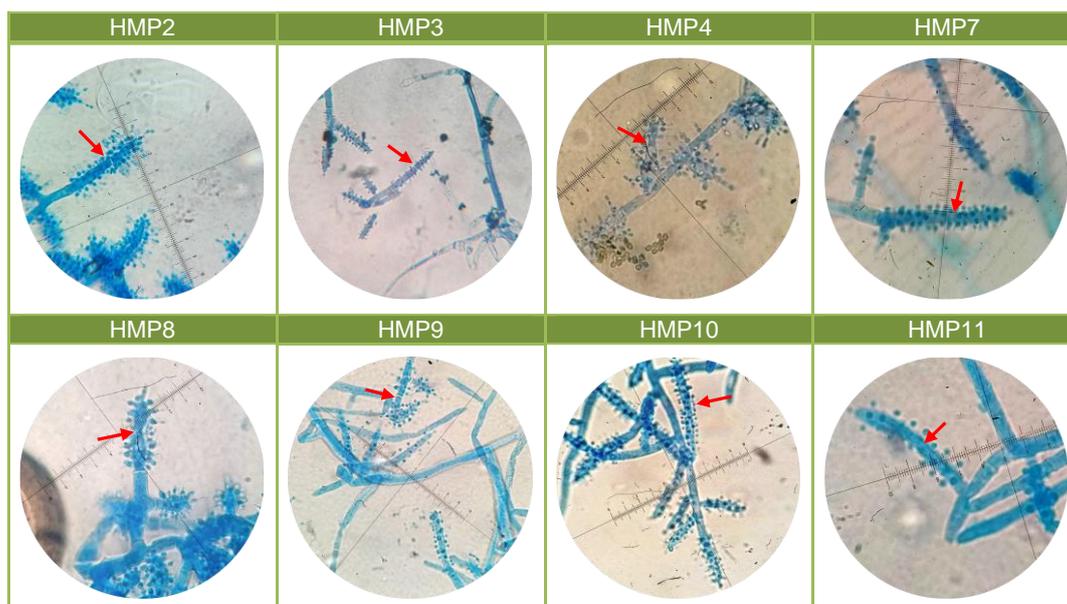


Figura 11. Características microscópicas particulares de los aislamientos de *Escovopsis* HMP2, HMP3, HMP4, HMP7, HMP8, HMP9, HMP10 y HMP11. Las flechas indican el punto de unión entre dos vesículas catenuladas. Aumento 40X.

Con respecto a los aislamientos de *L. gongylophorus* se observaron hifas hialinas de paredes delgadas, septadas y carentes de fíbulas. Asimismo, se observó la presencia de gongilidios, que son estructuras hifales ensanchadas características del hongo *L. gongylophorus* (Figura 12).

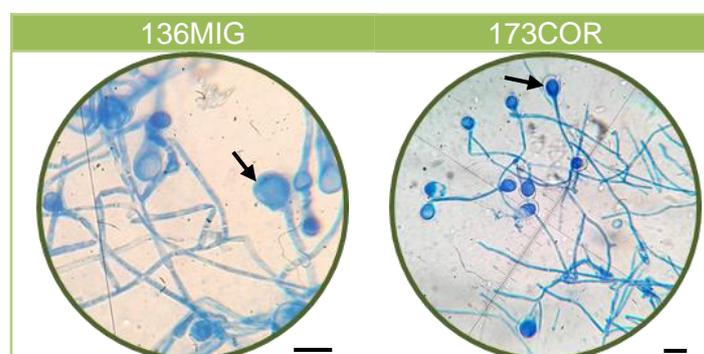


Figura 12. Características microscópicas de los aislamientos de *L. gongylophorus*. Las flechas indican los gongilidios. Aumento 40X, las barras representan 22 μm .

4.2.3 Identificación morfológica de los aislamientos de *Escovopsis*

Se utilizaron diferentes claves de identificación taxonómica junto con bibliografía de referencia, para ubicar los 11 aislamientos de *Escovopsis* hasta el nivel de especie. En base a las mediciones de las estructuras microscópicas, se determinó de manera presuntiva que el aislamiento identificado como HMP1 pertenecía a la especie *E. microspora* con vesículas de $5,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de diámetro, mientras que los aislamientos HMP5 y HMP6 pertenecían a la

especie *E. weberi* con vesículas de mayor diámetro ($6,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ y $6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ respectivamente). Asimismo, como se mencionó anteriormente (Sección 4.2.2), los aislamientos HMP2, HMP3, HMP4, HMP7, HMP8, HMP9, HMP10 y HMP11 presentaron ocasionalmente vesículas catenuladas. Esta característica se correspondió con la descripción de dos especies, denominadas *E. catenulata* y *E. primorosea*, las cuales se diferencian morfológicamente, por la coloración de sus conidios cuando crecen en medio mCYA (Anexo 1). Por tanto, se sembraron los ocho aislamientos en este medio y se pudo determinar a qué especie pertenecían. Se observó que las colonias correspondientes a los aislamientos HMP2, HMP3, HMP4, HMP7, HMP9, HMP10 y HMP11 presentaron conidios de color rosa pálido el día 4 de incubación, los cuales se tornaron marrones después del día 5 (Figura 13). Por tanto, se determinó su pertenencia a la especie *E. primorosea*. Por el contrario, en las colonias del aislamiento HMP8 se observaron conidios marrones durante todo el periodo de incubación. Por ello se determinó que correspondía a la especie *E. catenulata*.

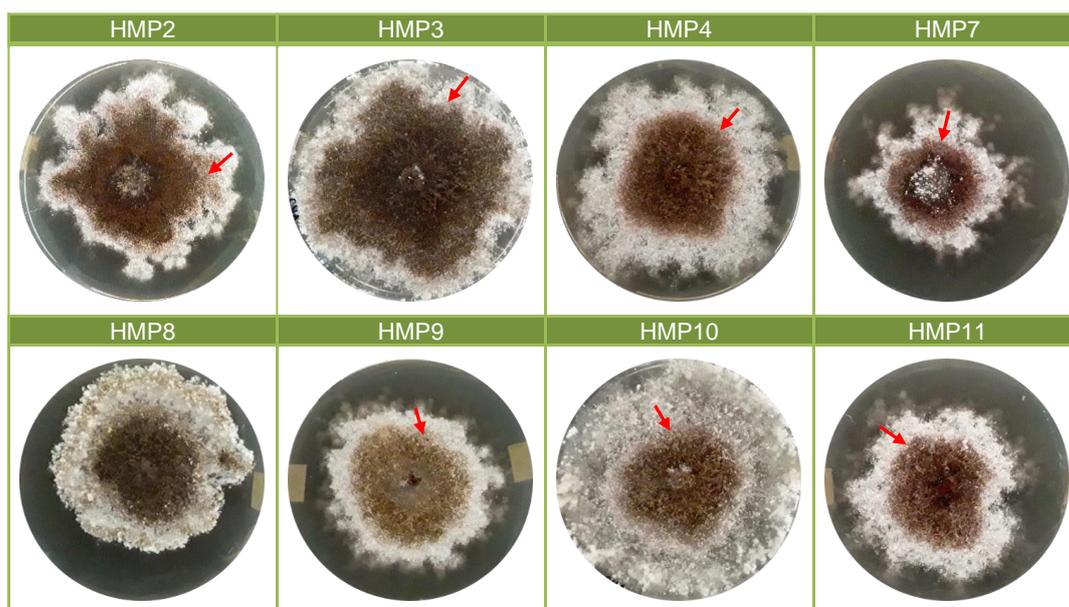


Figura 13. Colonias de *Escovopsis* creciendo en medio mCYA, a los cuatro días de incubación. Las flechas indican zonas de conidios con coloración rosa pálido.

4.2.4 Caracterización e identificación molecular de los aislamientos de *Escovopsis*

Mediante las metodologías de extracción empleadas se logró obtener material genético para todos los aislamientos. La calidad de los ácidos nucleicos extraídos se verificó por la observación de bandas nítidas de elevado peso molecular, en un gel de agarosa al 1% (datos no mostrados). Mediante la amplificación por PCR de la región ITS1-5,8S-ITS2 con los

cebadores universales ITS1 e ITS4, se obtuvieron amplicones de aproximadamente 500 pb para cada uno de los aislamientos fúngicos. Todos los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1,5% (p/v) (Figura 14) y se enviaron a secuenciar.

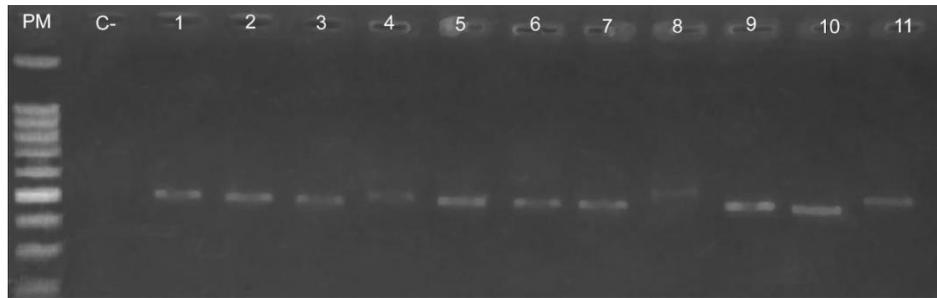


Figura 14. Gel de agarosa 1,5% con los productos de PCR obtenidos con ADN de 11 aislamientos de *Escovopsis*. El carril PM corresponde al marcador de peso molecular BioRad Ladder 100 pb DNA 100 mg/mL, el carril C- al control negativo, y los carriles 1 al 11 son las bandas de 500 pb que corresponden a los amplicones de los aislamientos HMP1, HMP2, HMP3, HMP4, HMP5, HMP6, HMP7, HMP8, HMP9, HMP10 y HMP11 respectivamente.

A partir de las secuencias obtenidas de los fragmentos amplificados, se realizó la identificación y localización de cada una de las regiones de interés, ITS1, 5,8S e ITS2 (Figura 15).



Figura 15. Análisis de las secuencias consenso, correspondientes a las regiones ITS1-5,8S-ITS2 del ADN ribosomal, de los aislamientos de *Escovopsis*. Se muestran en rosa los espaciadores internos ITS1 e ITS2 y en verde las regiones génicas 18S parcial, 5,8S completo y 28S parcial.

Mediante el análisis de las secuencias en las bases de datos primaria y secundaria, se pudieron determinar los porcentajes de identidad y similitud de cada uno de los aislamientos. Se cotejaron los datos moleculares con el análisis morfológico, y se comprobó la identidad del aislamiento HMP1 con *E. microspora* y la de los aislamientos HMP5 y HMP6 con *E. weberi*. Por otra parte, se observó que en las bases de datos no hay secuencias de ITS reportadas para las especies *E. primorosea* y *E. catenulata*, por lo que los datos moleculares de los aislamientos HMP2, HMP3, HMP4, HMP7, HMP8, HMP9, HMP10 y HMP11, mostraron identidad con *E. weberi* (menor a 95%). Este análisis discrepa con su caracterización morfológica que indica la pertenencia de estos aislamientos a *E. primorosea* y *E. catenulata*. Por tanto, el análisis de secuencias difiere con los resultados obtenidos de la caracterización morfológica macro y microscópica, las cuales adquieren mayor relevancia para la identificación de estos aislamientos.

A partir de las secuencias obtenidas para los aislamientos de *Escovopsis*, junto con otras secuencias recuperadas del NCBI-GenBank, se construyeron dos árboles filogenéticos, por los métodos NJ (Figura 16a) y ML (Figura 16b).

Todas las secuencias del género *Escovopsis* se presentaron en un mismo grupo monofilético, con un valor de Bootstrap de 90 por la metodología NJ y 92 por ML. Los aislamientos HMP1, HMP5 y HMP6 se agruparon con *E. microspora* y *E. weberi*, con un Bootstrap de 79 para NJ y 85 para ML. Por tanto, este árbol no permitió distinguir entre las dos especies. Sin embargo, los análisis previos, tanto morfológicos como bioinformáticos, permitieron establecer que HMP1 pertenecía a *E. microspora* y, HMP5 y HMP6 a *E. weberi*.

Por otra parte, los aislamientos HMP2, HMP3, HMP4, HMP7, HMP9, HMP10 Y HMP11 se agruparon juntos, con un Bootstrap de 73 para NJ y 84 para ML; y el aislamiento HMP8 se ubicó en una rama aparte, en ambos casos sin agruparse con ninguna secuencia de referencia. Con respecto a estos aislamientos, se puede inferir que las relaciones filogenéticas se correspondieron con los análisis morfológicos y bioinformáticos efectuados anteriormente, debido a que no hay secuencias de ITS publicadas en las bases de datos para estas especies. Por consiguiente, los 7 aislamientos pertenecientes a *E. primorosea* se agruparon juntos, por un lado, y el aislamiento perteneciente a *E. catenulata*, se ubicó aparte.

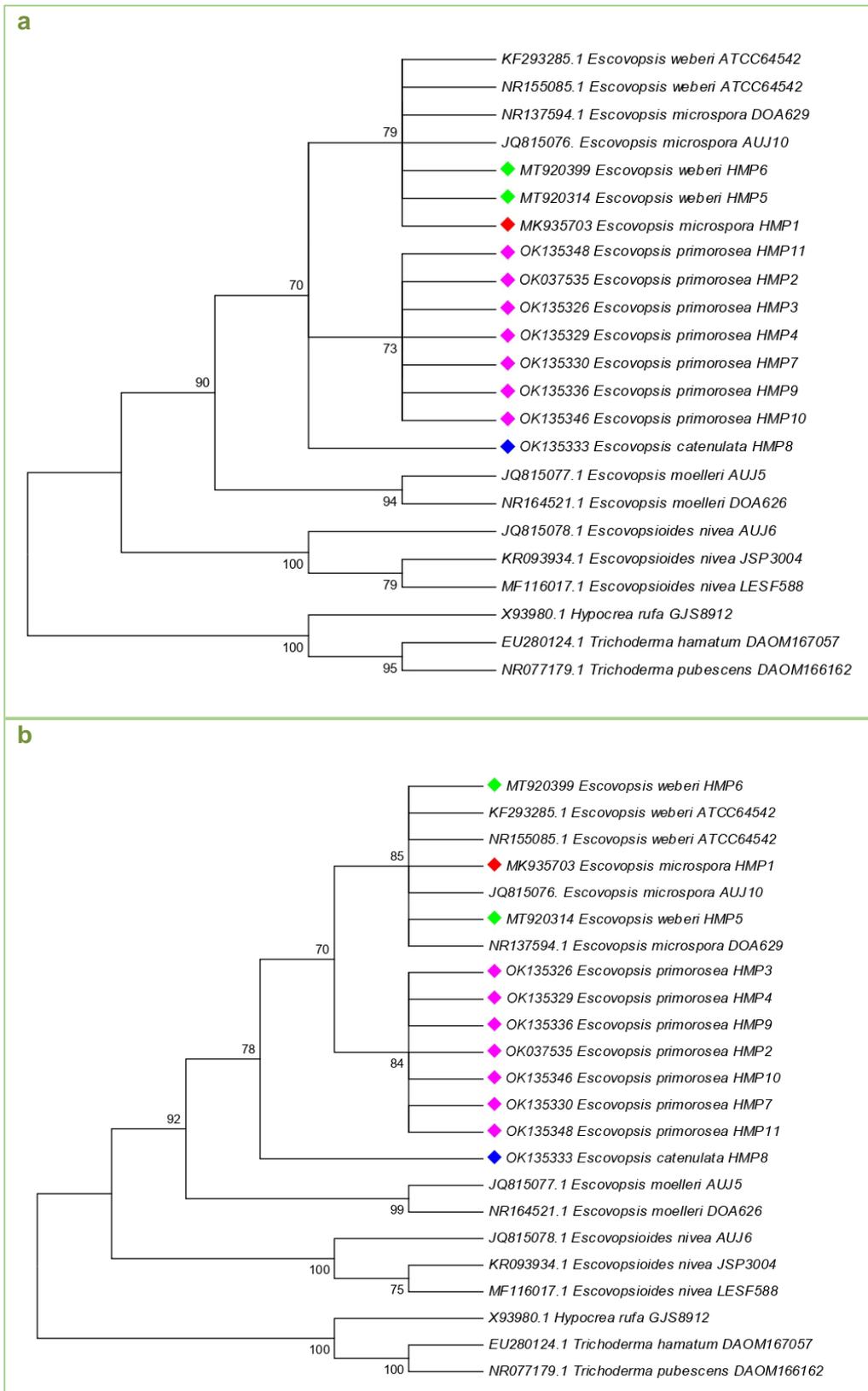


Figura 16. Árboles filogenéticos construidos a partir de secuencias ITS1-5,8S-ITS2 de los aislamientos de *Escovopsis* HMP1, HMP2, HMP3, HMP4, HMP5, HMP6, HMP7, HMP8, HMP9, HMP10 y HMP11 junto con secuencias recuperadas del NCBI-GenBank. Distancias genéticas calculadas de acuerdo al modelo de sustitución nucleotídica de Kimura-2 parámetros (K2 + I), mediante los métodos de NJ (a) y ML (b). Los números en las ramas representan el soporte probabilístico por el análisis de Bootstrap de 1000 réplicas. Los rombos coloreados indican la ubicación de cada aislamiento de interés. Los números de acceso van seguidos de los nombres de las especies.

Una vez realizado el análisis polifásico de todos los aislamientos de *Escovopsis*, sus secuencias, correspondientes a la región ITS1-5,8S-ITS2, se depositaron en el NCBI-Genbank (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencias depositadas en el NCBI-GenBank, obtenidas para a partir de marcadores ITS, utilizadas para la identificación de los aislamientos de *Escovopsis*.

Aislamiento	Amplicones (pb)	Numero de acceso	Especie
HMP1	472	MK935703	<i>E. microspora</i>
HMP2	582	OK037535	<i>E. primorosea</i>
HMP3	584	OK135326	<i>E. primorosea</i>
HMP4	592	OK135329	<i>E. primorosea</i>
HMP5	614	MT920314	<i>E. weberi</i>
HMP6	612	MT920399	<i>E. weberi</i>
HMP7	608	OK135330	<i>E. primorosea</i>
HMP8	553	OK135333	<i>E. catenulata</i>
HMP9	578	OK135336	<i>E. primorosea</i>
HMP10	568	OK135346	<i>E. primorosea</i>
HMP11	612	OK135348	<i>E. primorosea</i>

4.3 Selección de una cepa fúngica promisorio mediante pruebas de patogenicidad

A fin de seleccionar los aislamientos fúngicos promisorios con características implicadas en control biológico se realizaron ensayos de antagonismo enfrentando los aislamientos de *Escovopsis* contra el hongo *L. gongylophorus*.

4.3.1 Ensayos de patogenicidad in vitro: método de enfrentamiento por cultivo dual

Como resultado de las pruebas de patogenicidad, a simple vista todos los aislamientos de *Escovopsis* presentaron mayor esporulación en presencia de *L. gongylophorus*, en comparación con sus controles. Asimismo, se observó un mayor desarrollo hifal con crecimiento dirigido de *Escovopsis* hacia *L. gongylophorus*, con el deterioro progresivo de este hongo simbiote en la totalidad de los enfrentamientos (Figura 17).

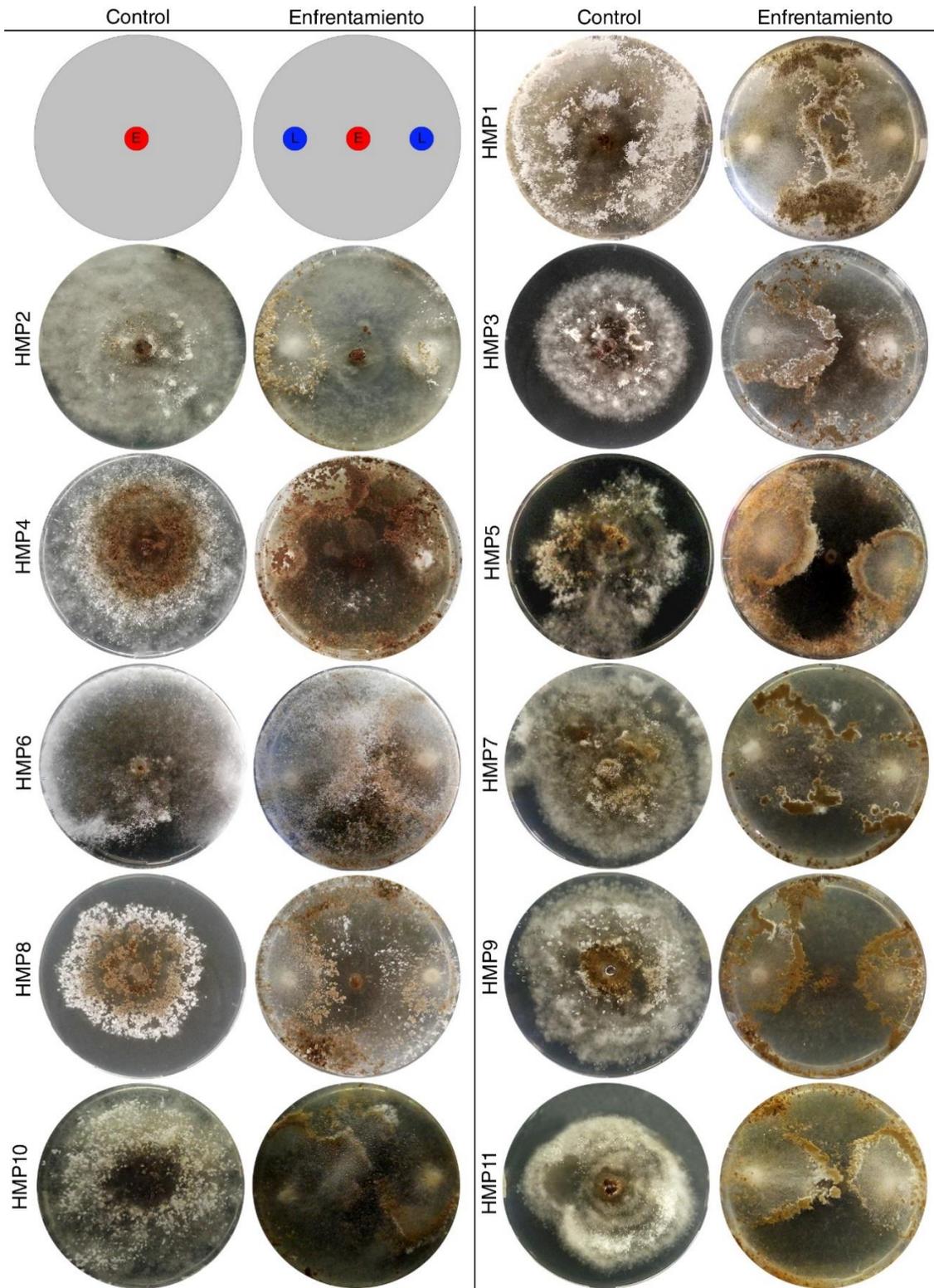


Figura 17. Ensayos de patogenicidad: Enfrentamientos *in vitro* y controles experimentales. La imagen superior izquierda muestra cómo se componen los controles y cultivos duales modificados, para cada enfrentamiento: (E) representa a cada aislamiento de *Escovopsis* y (L) a *L. gongylophorus*.

La patogenicidad de *Escovopsis* se estimó cualitativamente, mediante sus categorías de virulencia. Particularmente, cinco aislamientos de *Escovopsis*, (HMP1, HMP3, HMP7, HMP8 y HMP9), se destacaron por alcanzar un grado 4 de virulencia al sexto día del enfrentamiento

(Figura 18a), en el cual se observó el crecimiento de micelio y esporas de coloración marrón oscuras de *Escovopsis* sobre *L. gongylophorus*, con el posterior colapso total de su estructura. Los aislamientos restantes de *Escovopsis* alcanzaron un grado 4 de virulencia antes del día 10 de enfrentamiento.

Por otra parte, los grados de inhibición de *L. gongylophorus* se calcularon al segundo día de los enfrentamientos, ya que *Escovopsis* alcanzó el grado 1 de virulencia a partir del segundo día, cubriendo de micelio las colonias de *L. gongylophorus* lo cual dificultó seguir midiendo los halos de crecimiento del hongo simbiote los días restantes del ensayo. Con respecto a este índice, se observó un porcentaje de inhibición de *L. gongylophorus* mayor a 90%, por parte de *Escovopsis* HMP9 (Figura 18b). Los aislamientos restantes presentaron grados de inhibición satisfactorios mayores a 50%, a excepción de HMP4 cuya media no superó el 50%.

A partir del ANOVA realizado sobre los valores de crecimiento radial de *L. gongylophorus* se observó una influencia significativa ($p < 0,05$), por parte de ocho aislamientos de *Escovopsis*, HMP1, HMP3, HMP5, HMP6, HMP7, HMP8, HMP9 y HMP11, sobre el crecimiento de *L. gongylophorus*, con un nivel de confianza de 95,0% (Figura 18c). Sin embargo, *Escovopsis* HMP9 presentó el mayor efecto significativo sobre el crecimiento de *L. gongylophorus*. Por otra parte, se observó que los enfrentamientos de *Escovopsis* HMP2, HMP4 y HMP10 no presentaron diferencias significativas con el control de *L. gongylophorus*.

Como resultado de estas evaluaciones, el aislamiento *Escovopsis* HMP9, además de presentar una capacidad antagónica satisfactoria, obtuvo el mayor grado de inhibición y redujo de manera significativa el crecimiento de *L. gongylophorus*. Por tanto, este aislamiento fue seleccionado como promisorio.

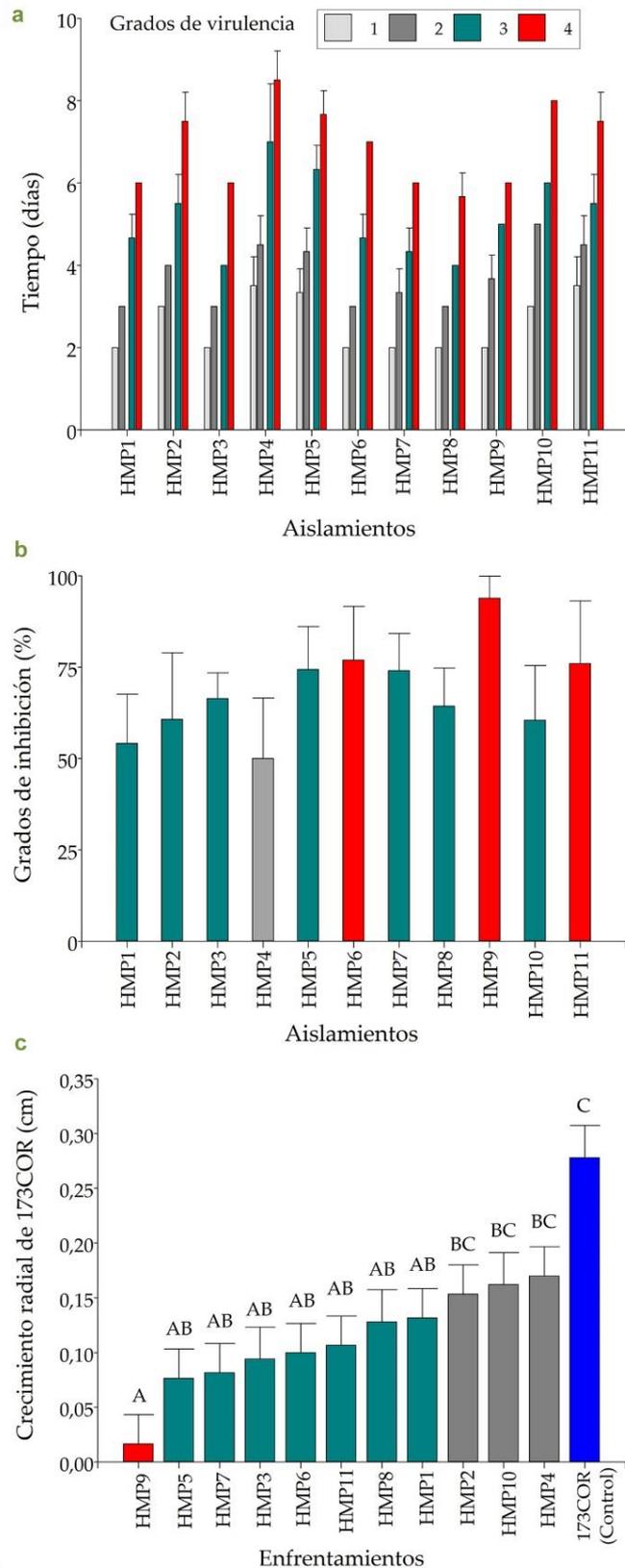


Figura 18. Evaluación de las pruebas de patogenicidad: a) Según los grados de virulencia de *Escovopsis*, representados por las barras (grado medio \pm desvío estándar) en función del tiempo, para cada enfrentamiento, b) Según el grado de inhibición (porcentaje medio \pm desvío estándar) del crecimiento de *L. gongylophorus* por parte de cada aislamiento de *Escovopsis*, y c) Gráfico de comparaciones múltiples del crecimiento radial (en cm) de *L. gongylophorus* en los distintos enfrentamientos, donde las medias con una letra común no son significativamente diferentes. Test de Tukey, 95,0% de confianza.

4.3.2 Mecanismos de micoparasitismo: microcultivos en cámara húmeda.

El aislamiento *E. primorosea* HMP9 promisorio contra *L. gongylophorus*, fue empleado para evaluar los mecanismos ocurridos durante el proceso de micoparasitismo.

Con respecto a los microcultivos controles, ambos hongos presentaron un crecimiento típico; *L. gongylophorus* con hifas carentes de fíbula y la formación de gongilidios, característicos de este hongo simbiote (Figura 19a); y *E. primorosea* HMP9, con conidióforos ramificados, vesiculados y fiálides ampuliformes (Figura 19b).

En los enfrentamientos, la primera característica que permitió distinguir entre ambos hongos fue la presencia de hifas con mayor número de ramificaciones en *E. primorosea* HMP9, en comparación con *L. gongylophorus* (Figura 19c). Con respecto a *L. gongylophorus*, no se detectó la presencia de gongilidios en ninguna réplica de microcultivo. Si bien, no se observaron diferencias notables en el diámetro de las hifas, en ciertos puntos de cercanía entre ambos hongos, las hifas de *E. primorosea* HMP9 se encontraban entrelazadas aparentando un mayor diámetro (Figura 19d y 19e). Asimismo, se observó un enrollamiento por parte de las hifas de *L. gongylophorus*, sobre las hifas entrelazadas de *Escovopsis* HMP9 (Figura 19f y 19g).

Por otra parte, en todas las réplicas de los enfrentamientos se observó una degradación de las hifas de *L. gongylophorus*, tanto en puntos de contacto con *E. primorosea* HMP9 (Figura 19i) como también en áreas contiguas, pero sin contacto entre las hifas (Figura 19h).

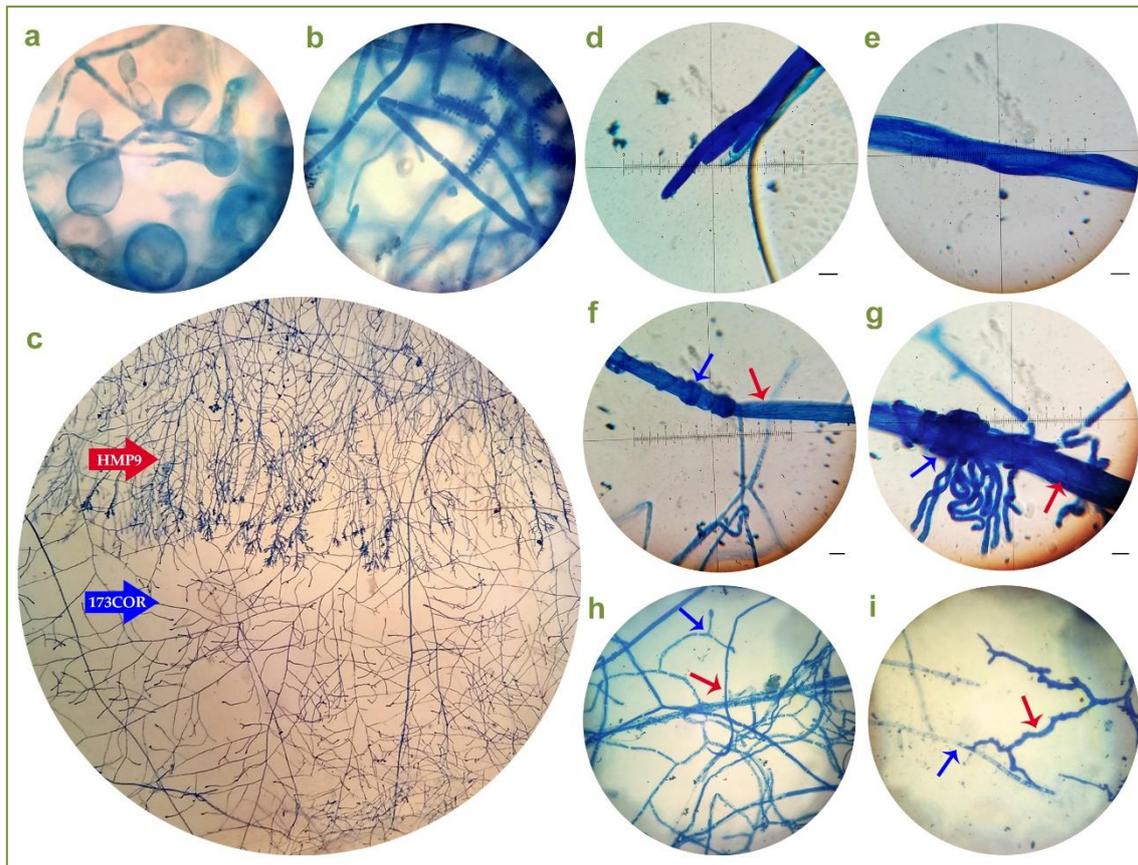


Figura 19. Microcultivos analizados mediante microscopía convencional: Las flechas rojas representan a *E. primorosea* HMP9 y las flechas azules a *L. gongylophorus*. a) control de *L. gongylophorus*, aumento 100X, b) control de *E. primorosea* HMP9, aumento 100X, c) enfrentamiento entre *E. primorosea* HMP9 y *L. gongylophorus*, aumento 4X, d) y e) hifas de *E. primorosea* HMP9 entrelazadas, aumento 100X, f) y g) enrollamiento de hifas *L. gongylophorus*, sobre *E. primorosea* HMP9, aumento 100X, h) degradación de hifas de *L. gongylophorus*, sin contacto con *E. primorosea* HMP9, aumento 40X, e i) degradación de hifas de *L. gongylophorus*, en contacto con *E. primorosea* HMP9, aumento 40X. Las barras representan 8 μm .

4.4 Optimización de la secreción de enzimas micolíticas en un aislamiento de *Escovopsis promisorio*

4.4.1 Selección de fuentes de carbono y nitrógeno que promuevan la secreción de enzimas micolíticas

Con el fin de evaluar el efecto de las distintas fuentes de carbono y nitrógeno sobre la actividad micolítica del aislamiento promisorio *E. primorosea* HMP9, se realizó un ensayo factorial, utilizando como fuentes de carbono, paredes celulares fúngicas extraídas de *Fusarium* sp. y de *L. gongylophorus*; y como fuentes de nitrógeno, extracto de levadura, urea, sulfato de amonio y el complejo nitrogenado Mandels.

En primer lugar, cabe destacar que los medios de cultivo que contenían individualmente urea y sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno, no presentaron actividad para las enzimas micolíticas ensayadas y se observó poco crecimiento de *E. primorosea* HMP9.

Por otra parte, en los ensayos que contenían extracto de levadura y Mandels, se pudo observar la formación de abundantes masas miceliares compactas o pellets, de coloración amarillada.

El efecto significativo de cada factor sobre la actividad enzimática, se evaluó mediante un ANOVA (Anexo 4), a partir del cual se realizó una prueba de diferencia entre medias para cada enzima micolítica. Con respecto a la actividad proteasa, se observó un efecto significativo por parte de los medios de cultivo que contenían paredes de *L. gongylophorus* como fuente de carbono ($p < 0,05$) (Figura 20a), con una actividad media de $21,84 \pm 5,3$ U/L. Con respecto a las fuentes de nitrógeno, no se detectaron diferencias significativas entre los distintos niveles ($p > 0,05$), presentando mayor actividad proteasa ($23,61 \pm 1,67$ U/L) los ensayos que contenían medio Mandels como fuente de nitrógeno (Figura 20b).

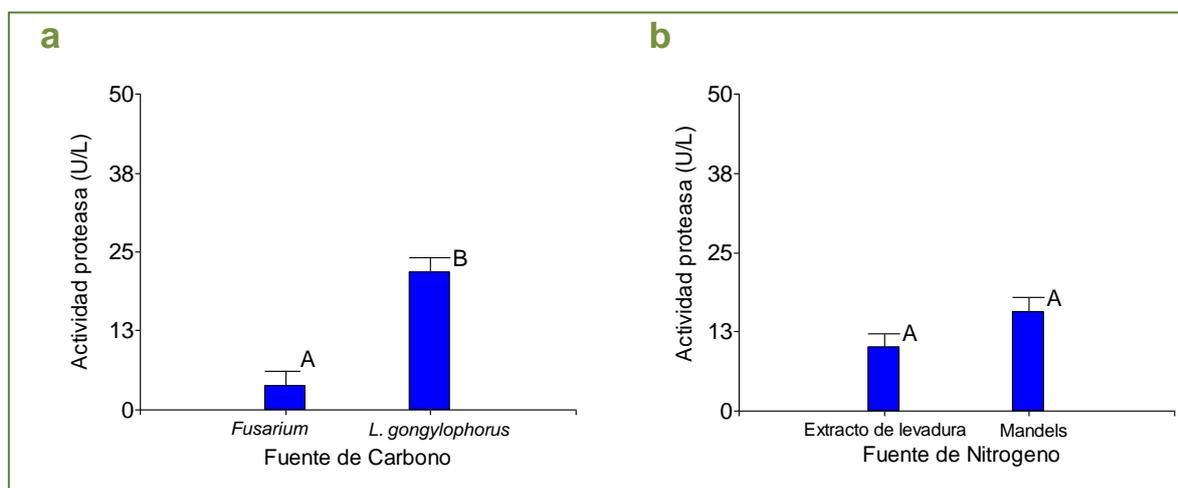


Figura 20. Efecto de las fuentes de carbono (a) y nitrógeno (b) sobre la actividad enzimática proteasa del aislamiento *E. primorosea* HMP9. Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95,0%. Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Con respecto a la actividad β -1,3-glucanasa, se observó un efecto significativo por parte de ambos factores estudiados ($p < 0,05$), presentando una mayor actividad enzimática los medios que contenían paredes celulares de *L. gongylophorus* como fuente de carbono (Figura 21a) y medio Mandels como fuente de nitrógeno (Figura 21b), con actividades de $54,27 \pm 12,8$ U/L y $67,74 \pm 9,75$ U/L respectivamente.

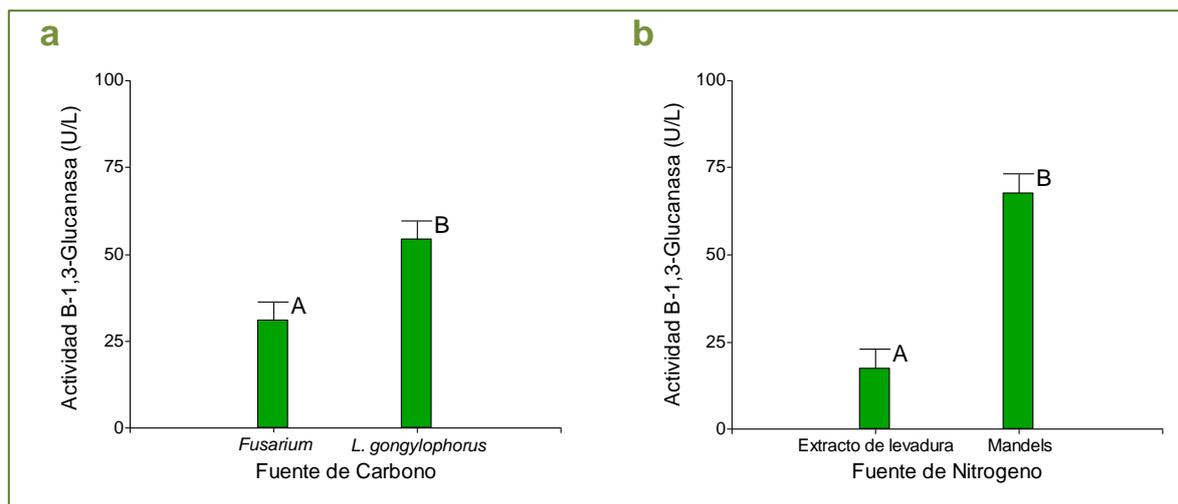


Figura 21. Efecto de las fuentes de carbono (a) y nitrógeno (b) sobre la actividad enzimática β -1,3-glucanasa del aislamiento *E. primorosea* HMP9. Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95,0%. Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Con respecto a la actividad quitinasa, además del efecto significativo por parte de las fuentes de carbono y nitrógeno, se observó una interacción significativa entre los factores ($p < 0,05$), presentando mayor actividad los ensayos que contenían conjuntamente paredes de *L. gongylophorus* y Mandels ($4,61 \pm 1,6$ U/L) (Figura 22).

A partir de estos resultados, se seleccionaron como fuente de carbono, paredes celulares de *L. gongylophorus* y como fuente de nitrógeno, el complejo Mandels.

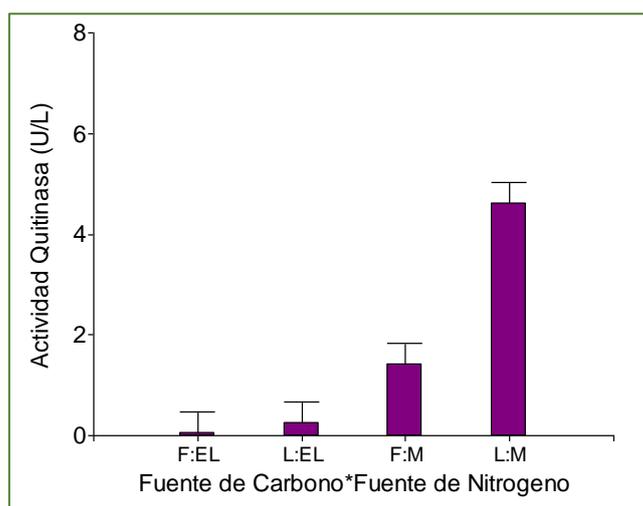


Figura 22. Efecto de la interacción entre las variables fuente de carbono y nitrógeno sobre la actividad enzimática quitinasa del aislamiento *E. primorosea* HMP9. Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95,0%. F: *Fusarium*, L: *L. gongylophorus*, EL: extracto de levadura y M: Mandels.

4.4.2 Optimización de la fuente de carbono seleccionada que promueve la secreción de enzimas micolíticas

En base a la selección de las fuentes de carbono y nitrógeno, se procedió en primera instancia, a la optimización de la fuente de carbono. Se ensayaron 4 concentraciones de paredes celulares extraídas del micelio de *L. gongylophorus* (0,13 g/L; 0,36 g/L; 0,81 g/L y 1,25 g/L). Los ensayos se realizaron por duplicado.

Con respecto a la actividad proteasa, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones de fuente de carbono ($p < 0,05$), presentando mayor actividad los ensayos con 0,36 g/L (Figura 23a). Sin embargo, esta concentración no fue significativa respecto a 0,81 g/L ($p > 0,05$ g/L).

Con respecto a la actividad β -1,3-glucanasa, se detectaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de fuente de carbono ($p < 0,05$), con mayor actividad para una concentración de 0,36 g/L, la cual no presentó diferencias significativas con 0,13 g/L ($p > 0,05$) (Figura 23b).

Finalmente, para la actividad quitinasa, se observó una actividad enzimática significativamente mayor para la concentración 0,36 g/L, respecto a las demás concentraciones ensayadas (Figura 23c).

Por tanto, las tres enzimas de estudio presentaron mayor actividad cuando los medios de cultivo contenían como fuente de carbono, una concentración de 0,36 g/L de paredes celulares de *L. gongylophorus*.

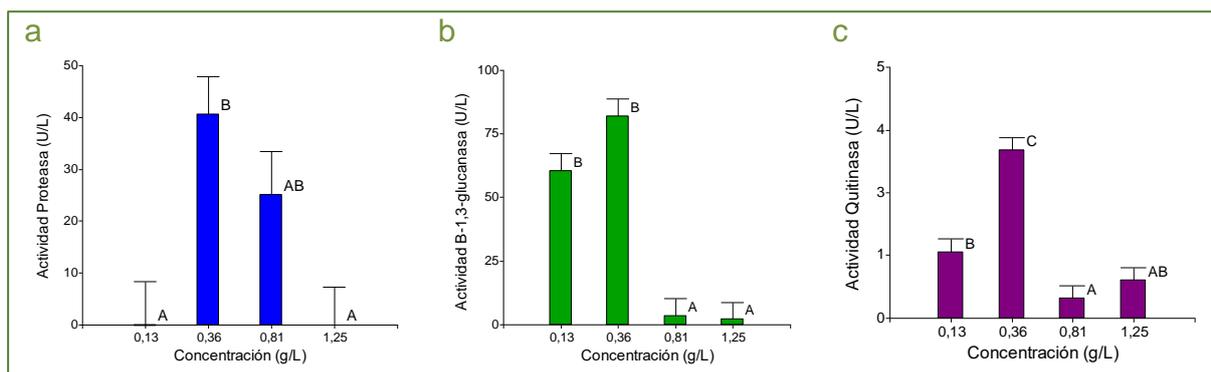


Figura 23. Efecto de las concentraciones de fuente de carbono (paredes celulares de *L. gongylophorus*) sobre (a) la actividad proteasa, (b) la actividad β -1,3-glucanasa y (c) la actividad quitinasa, del aislamiento *E. primorosea* HMP9. Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95,0%. Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.4.3 Optimización de la fuente de nitrógeno seleccionada que promueve la secreción de enzimas micolíticas

En base a la selección previa de una fuente nitrógeno, se procedió a la optimización de los componentes nitrogenados del medio Mandels (urea, extracto de levadura y sulfato de amonio). Se ensayó el efecto de tres concentraciones para cada fuente de nitrógeno mediante un diseño RSM Box-Behnken, y se empleó la fuente de carbono optimizada previamente.

Con respecto a la actividad proteasa, en el ANOVA de RSM, se obtuvo un valor de R^2 que explicó el 87,05% de la variabilidad en los resultados obtenidos y la prueba de falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$) con un nivel de confianza de 95,0% (Tabla 8). Esto indica que el modelo seleccionado fue apropiado para describir los datos observados.

Tabla 8. ANOVA de RSM de las fuentes de nitrógeno, para la actividad proteasa en *E. primorosea* HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Extracto de levadura	88328,8	1	88328,8	111,96	0,0005
B: Urea	21466,2	1	21466,2	27,21	0,0064
C: Sulfato de amonio	17730,7	1	17730,7	22,47	0,0090
AB	49004,5	1	49004,5	62,11	0,0014
BC	37490,6	1	37490,6	47,52	0,0023
Falta de ajuste	28656,7	7	4093,81	5,19	0,0654
Error puro	3155,8	4	788,949		
Total (corr.)	245833,	16			

Se observó un efecto estadísticamente significativo por parte de las 3 fuentes de nitrógeno ensayadas, así como de la interacción entre ellas ($p < 0,05$) con un nivel de confianza de 95,0% (Tabla 8). Asimismo, se realizó un diagrama de Pareto, que muestra los efectos en orden de significancia decreciente, sobre la actividad proteasa (Figura 24a). Se detectó una influencia positiva por parte de las tres fuentes de nitrógeno ensayadas en sus niveles superiores (+1), lo cual se puede observar en el gráfico de efectos principales (Figura 24b). Por otra parte, la interacción entre urea/extracto de levadura y urea/sulfato de amonio fue significativamente positiva (Figura 24a).

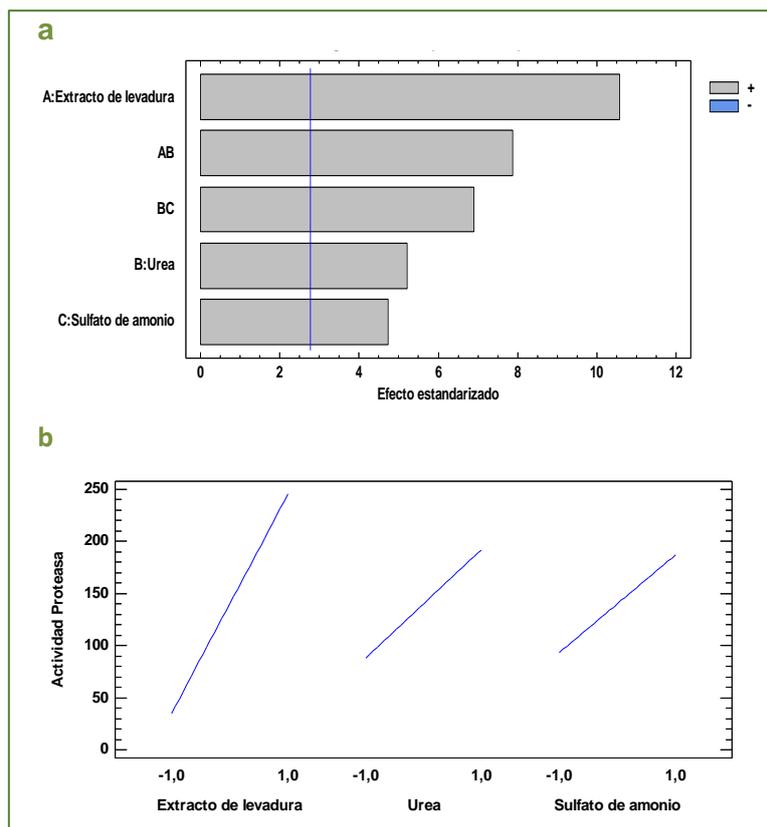


Figura 24. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b) con los factores en orden de significancia decreciente, para la actividad proteasa de *E. primorosea* HMP9. El largo de las barras es proporcional al efecto estandarizado de cada fuente de nitrógeno sobre la actividad enzimática, con el 95,0% de confianza.

Con respecto a la actividad β -1,3-glucanasa, se obtuvo un R^2 de 89,70% y la prueba de falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$) con un nivel de confianza de 95,0%. Por tanto, el análisis realizado fue adecuado para los datos obtenidos.

Se observó un efecto significativo por parte de las fuentes de nitrógeno, extracto de levadura y urea, así como la interacción entre ambas ($p < 0,05$) con un nivel de confianza de 95,0% (Tabla 9).

Tabla 9. ANOVA de RSM de las fuentes de nitrógeno, para la actividad β -1,3-glucanasa en *Escovopsis primorosea* HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Extracto de levadura	21395,5	1	21395,5	141,04	0,0000
B: Urea	79444,9	1	79444,9	52,37	0,0000
AB	12031,7	1	12031,7	7,93	0,0093
Falta de ajuste	4367,55	4	1091,89	0,72	0,5865
Error puro	37925,3	25	1517,01		
Total (corr.)	410488,	33			

Las fuentes de nitrógeno con efecto significativo sobre la actividad β -1,3-glucanasa se muestran en el diagrama de Pareto (Figura 25a). Se pudo observar que la variable extracto de levadura presentó un efecto positivo sobre la actividad enzimática, mientras que urea en sus niveles altos (+1) presentó un efecto negativo (Figura 25b), lo que determinó que la

interacción entre ambas influye negativamente de manera significativa sobre la actividad β -1,3-glucanasa (Figura 25a).

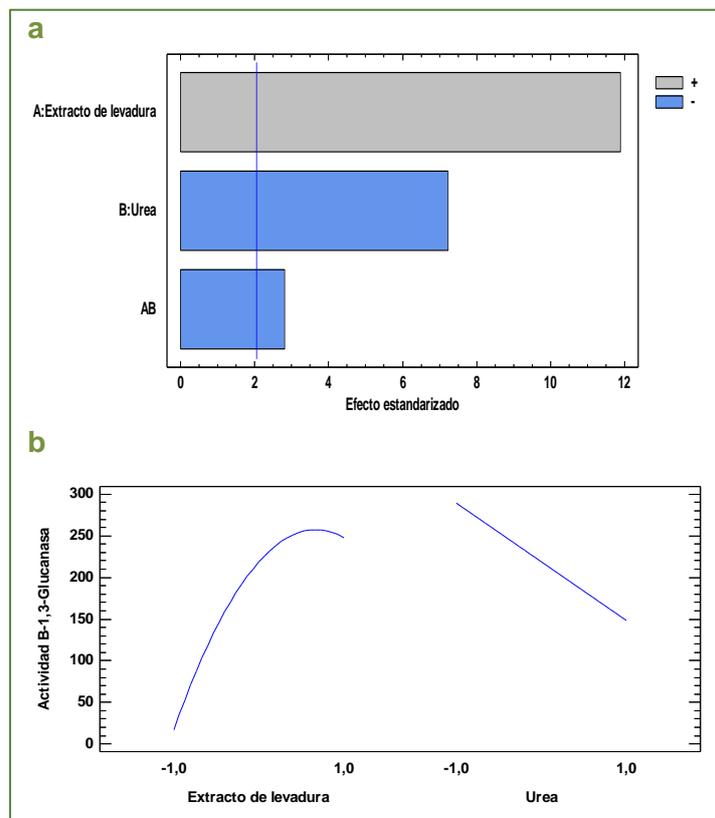


Figura 25. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b), con los factores significativos, para la actividad β -1,3-glucanasa de *E. primorosea* HMP9. El largo de las barras es proporcional al efecto estandarizado de cada fuente de nitrógeno sobre la actividad enzimática, con el 95,0% de confianza.

Con respecto a la actividad quitinasa, se obtuvo un R^2 de 78,57% y la prueba de falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$) con un nivel de confianza de 95,0%. Se observó un efecto estadísticamente significativo por parte de las fuentes de nitrógeno, extracto de levadura y urea, así como la interacción en las mismas ($p < 0,05$) (Tabla 10).

Tabla 10. ANOVA de RSM de las fuentes de nitrógeno, para la actividad quitinasa en *E. primorosea* HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Extracto de levadura	19,0991	1	19,0991	10,40	0,0035
B: Urea	116,602	1	116,602	63,51	0,0000
AB	36,1718	1	36,1718	19,70	0,0002
Falta de ajuste	14,0059	3	4,66862	2,54	0,0790
Error puro	45,8983	25	1,83593		
Total (corr.)	279,629	33			

Mediante los gráficos de Pareto y efectos principales se pudo observar una influencia significativa negativa en la actividad enzimática, por parte de los niveles altos de urea (Figura

26). Por su parte los niveles altos de extracto de levadura presentaron un efecto positivo, por tanto, la interacción entre ambos factores fue significativamente negativa (Figura 26a).

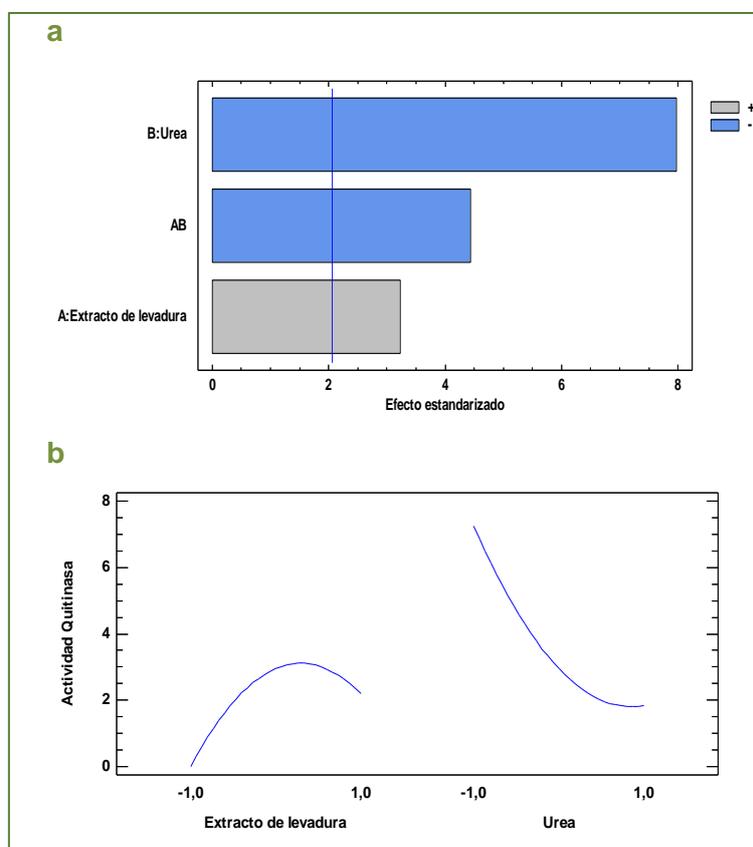


Figura 26. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b), con los factores significativos, para la actividad quitinasa de *E. primorosea* HMP9. El largo de las barras es proporcional al efecto estandarizado de cada fuente de nitrógeno sobre la actividad enzimática, con el 95,0% de confianza.

A partir del ANOVA de RSM para los efectos de los niveles de cada factor, sobre la actividad de las enzimas micolíticas, se realizó un análisis de optimización de múltiples respuestas. Se obtuvieron gráficos de RSM tridimensional y de contorno estimados, con los puntos óptimos dentro de la región experimental (Figura 27).

Con respecto a la variable no significativa sulfato de amonio, el óptimo se encontró cercano al nivel más bajo (-1). Para el extracto de levadura, se ubicó cercano al nivel más alto (+1) y para urea se encontró en el nivel bajo (-1).

A partir de estos resultados se pudieron predecir las concentraciones de cada componente nitrogenado que maximizan la función "deseabilidad", la cual busca optimizar de manera conjunta las actividades proteasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa.

Las condiciones óptimas predichas por el diseño fueron, urea (0,2 g/L), extracto de levadura (1,86 g/L) y sulfato de amonio (0,21 g/L).

Con respecto al factor urea, el óptimo predicho se ubicó en un extremo del diseño, por tanto, se agregaron dos concentraciones más en el siguiente ensayo de optimización.

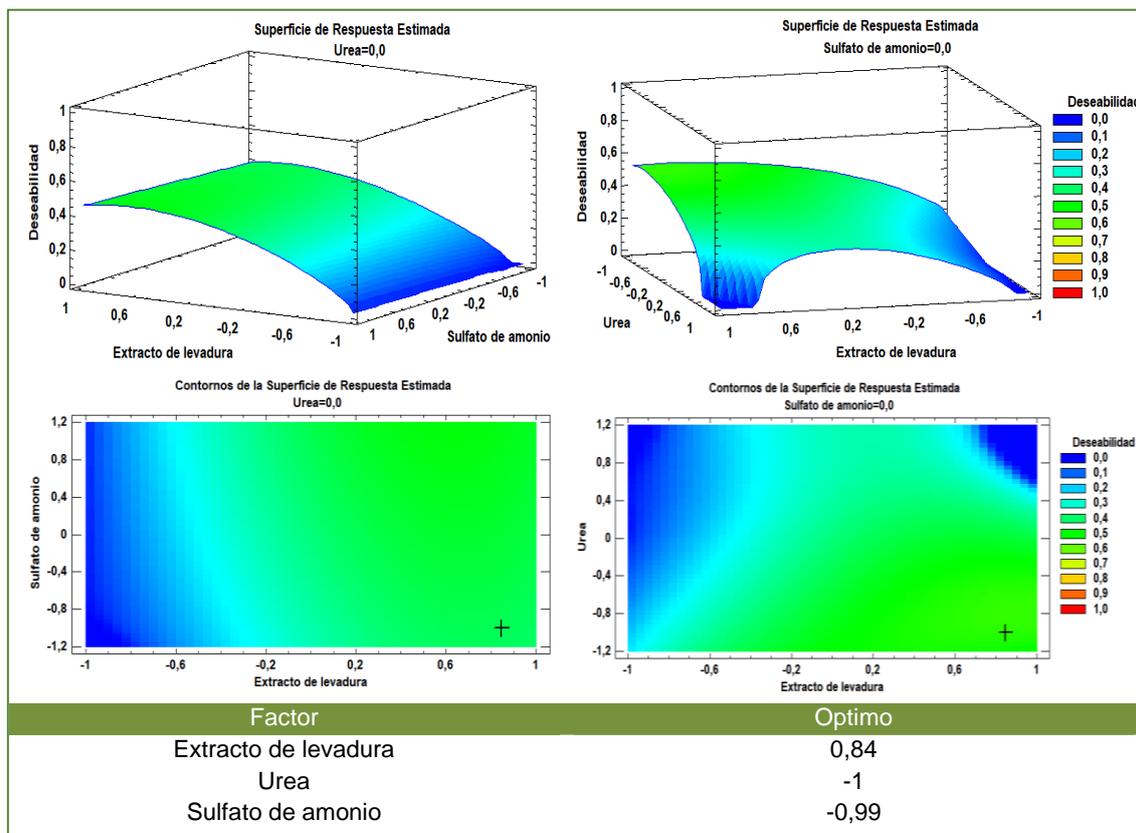


Figura 27. RSM tridimensional estimada y contorno de respuesta para las concentraciones de nitrógeno, con los puntos óptimos (+) dentro del diseño experimental, para maximizar la deseabilidad en *E. primorosea* HMP9.

4.4.4 Optimización de variables físico-químicas que promuevan la secreción de enzimas micolíticas: concentración de inóculo, pH inicial del medio y concentración de urea

Con el fin de seguir incrementando la actividad de las enzimas micolíticas del aislamiento *E. primorosea* HMP9, se optimizaron las variables físico-químicas, concentración de urea, pH inicial del medio y concentración del inóculo. Se utilizó un diseño experimental RSM Box-Behnken en 17 ensayos en fermentación líquida, en los cuales se emplearon las condiciones optimizadas previamente.

Con respecto a la actividad proteasa, se obtuvo un valor R^2 que explicó el 91,58% de la variabilidad en los resultados obtenidos. Asimismo, la prueba de falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$) (Tabla 11), por tanto, el modelo seleccionado se consideró adecuado para describir los datos observados, con un nivel de confianza de 95,0%.

Tabla 11. ANOVA de RSM de factores físico-químicos, para la actividad proteasa en *E. primorosea* HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
C: Inóculo	33369,7	1	33369,7	140,45	0,0000
Falta de ajuste	97,6067	1	97,6067	0,41	0,5276
Error puro	5702,11	24	237,588		
Total (corr.)	68872,0	29			

Por otra parte, se observó que la variable concentración de inóculo presentó un efecto significativo sobre la actividad enzimática ($p < 0,05$) (Tabla 11). Los gráficos de Pareto y efectos principales (Figura 28) muestran la influencia negativa por parte de este factor en sus mayores niveles (+1).

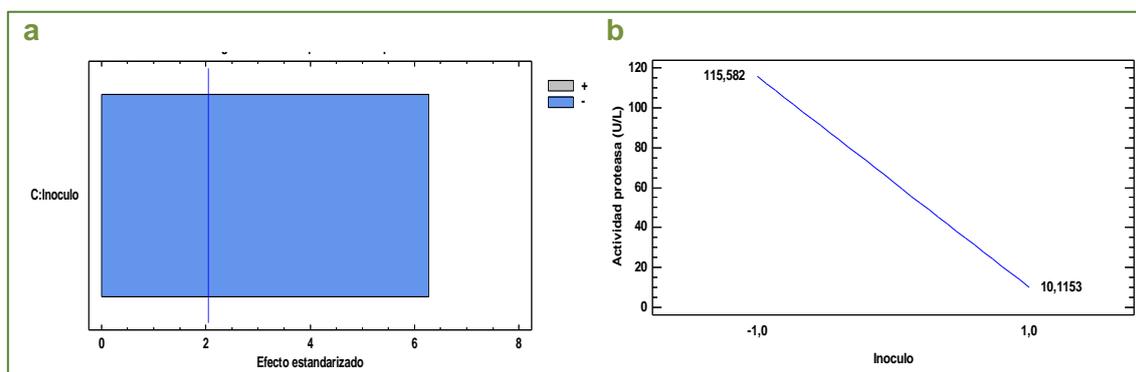


Figura 28. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b), con el factor significativo, para la actividad proteasa de *E. primorosea* HMP9, con el 95,0% de confianza.

Con respecto a la actividad quitinasa, el valor R^2 explicó el 84,93% de la variabilidad obtenida y la prueba de falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$) (Tabla 12), por lo cual el modelo es adecuado para los datos observados.

Asimismo, se observó que las variables pH y concentración de inóculo, presentaron un efecto significativo sobre la actividad enzimática ($p < 0,05$) con un nivel de confianza de 95,0% (Tabla 12).

Tabla 12. ANOVA de RSM de factores físico-químicos, para la actividad β -1,3-glucanasa en *E. primorosea* HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
B: pH	1,39192E6	1	1,39192E6	194,84	0,0000
C: Inóculo	80246,1	1	80246,1	11,23	0,0017
Falta de ajuste	59331,5	3	19777,2	2,77	0,0534
Error puro	300039,	42	7143,79		
Total (corr.)	2,38436E6	50			

En los gráficos de Pareto y efectos principales (Figura 29), se observó que la variable pH presentó un efecto negativo sobre la actividad enzimática en sus niveles más altos (+1), mientras que la concentración de inóculo tuvo un efecto significativo positivo.

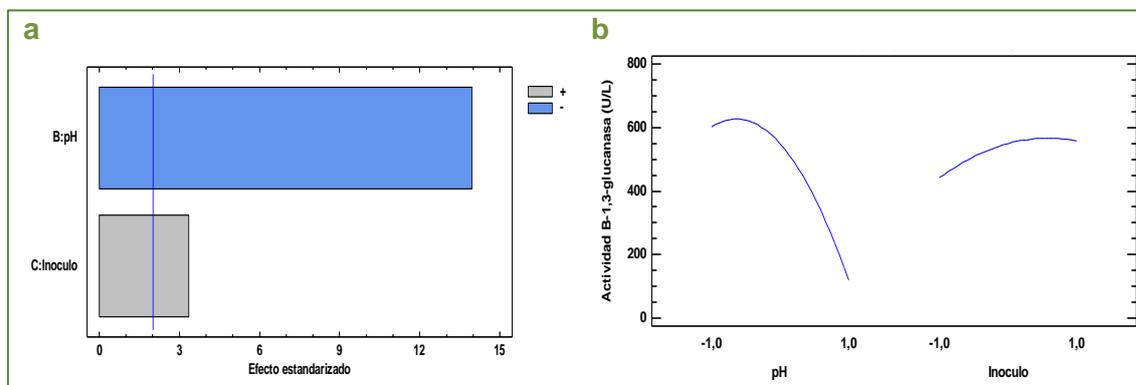


Figura 29. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b), con los factores significativos, para la actividad β -1,3-glucanasa de *E. primorosea* HMP9, con el 95,0% de confianza.

Con respecto a la actividad quitinasa, el valor R^2 fue de 87,78% y la prueba de falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$), por tanto, el análisis es adecuado para explicar los datos observados. Por otra parte, las variables pH y concentración de inóculo presentaron un efecto significativo sobre la actividad enzimática ($p < 0,05$) con un nivel de confianza de 95,0% (Tabla 13).

Tabla 13. ANOVA de RSM de factores físico-químicos, para la actividad quitinasa en *E. primorosea* HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
B: pH	6417,05	1	6417,05	264,34	0,0000
C: Inoculo	134,237	1	134,237	5,53	0,0235
Falta de ajuste	183,122	4	45,7806	1,89	0,1308
Error puro	1019,57	42	24,2755		
Total (corr.)	9841,07	50			

En los gráficos de Pareto y efectos principales (Figura 30) se pudo observar un efecto negativo por parte de la variable pH en sus niveles más altos (+1) y positivo para concentración de inóculo.

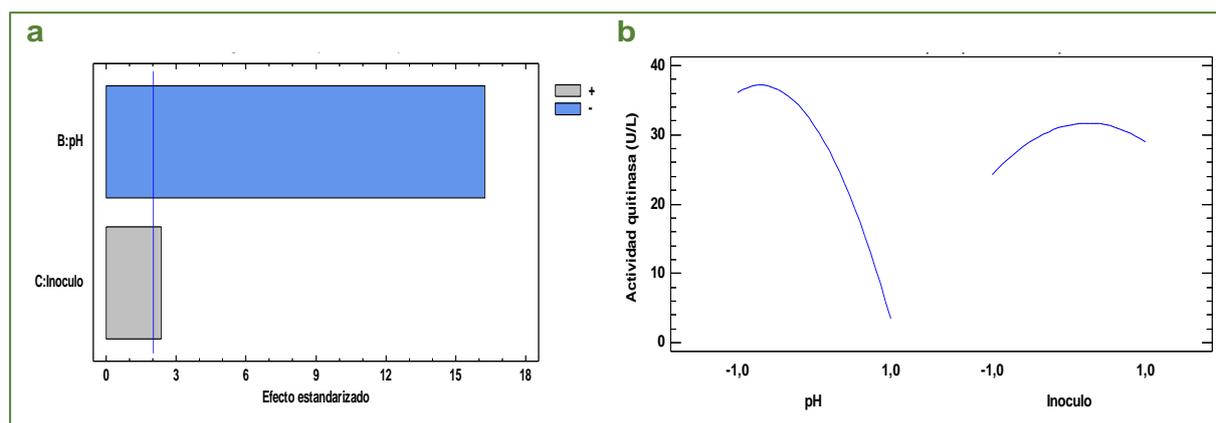


Figura 30. Diagrama de Pareto (a) y gráfico de efectos principales (b), con los factores significativos, para la actividad quitinasa de *E. primorosea* HMP9, con el 95,0% de confianza.

A partir de los ANOVA de RSM para las tres enzimas, se realizó un análisis de optimización de múltiples respuestas y se obtuvieron los gráficos de RSM tridimensional y de contorno estimados, con los puntos óptimos dentro de la región experimental (Figura 31).

Para la variable no significativa, concentración de urea, el óptimo se ubicó en el nivel medio (0). Para la variable significativa pH inicial, el óptimo se encontró entre el nivel medio y nivel inferior, y para la variable significativa concentración del inóculo el óptimo se ubicó cercano al nivel bajo.

A partir de estos resultados, se pudieron predecir las condiciones físico-químicas que permiten maximizar la deseabilidad dentro de la región experimental, para optimizar de manera conjunta las actividades proteasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa.

Las condiciones óptimas predichas por el diseño fueron, concentración de urea (0,1 g/L), pH (4,63) y concentración del inóculo (4×10^6 esporas/mL).

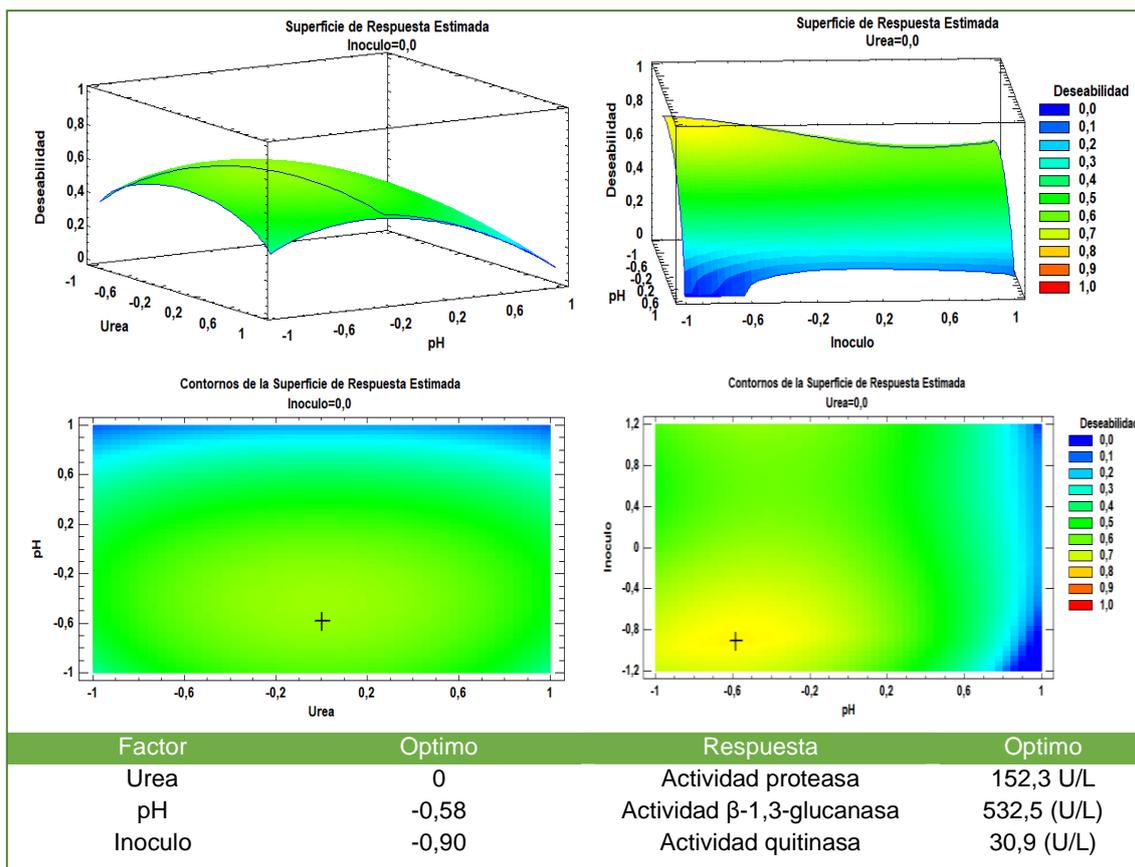


Figura 31. RSM tridimensional estimada y contorno de respuesta para las variables físico-químicas, con los puntos óptimos (+) dentro del diseño experimental, para maximizar la deseabilidad en *E. primorosea* HMP9.

4.4.5 Validación de las variables experimentales optimizadas

Las condiciones óptimas predichas se validaron, mediante 5 corridas experimentales, y se realizó una comparación entre los valores predichos y reales (Tabla 14).

Con respecto a la actividad proteasa se obtuvo un valor experimental notablemente inferior a la actividad predicha, por lo cual no hubo concordancia. Sin embargo, la actividad enzimática se incrementó en un 71,4% (3,5 veces) en comparación al medio de cultivo sin optimizar (Figura 32).

Con respecto a la actividad β -1,3-glucanasa, se obtuvo un valor experimental concordante con el predicho (Tabla 14), y la actividad enzimática se optimizó un 85,1% (6,7 veces) (Figura 32).

Con respecto a la actividad quitinasa, se obtuvo un valor concordante con el predicho, incrementando la actividad en un 85,2% (6,8 veces) en comparación con el medio sin optimizar (Figura 32).

Por tanto, fue posible optimizar la actividad de las tres enzimas micolíticas, empleando como fuente de carbono paredes celulares de *L. gongylophorus* (0,36 g/L), y como fuente de nitrógeno el complejo Mandels cuya concentración de los componentes nitrogenados fueron, urea (0,1 g/L), extracto de levadura (1,86 g/L) y sulfato de amonio (0,21 g/L). El pH inicial del medio de cultivo fue de 4,63 y la concentración de inóculo 4×10^6 esporas/mL.

Tabla 14. Validación experimental de las condiciones óptimas predichas para la actividad de las enzimas micolíticas de *E. primorosea* HMP9, en fermentación líquida.

Variables	Valores óptimos	Actividad enzimática micolítica (U/L)	
Fuente de Carbono			
Paredes celulares de <i>L. gongylophorus</i>	0,36 g/L	Actividad proteasa	Valor predicho 152,3
Fuente de nitrógeno (Mandels)	Sulfato de amonio		Valor real 83,8
	Extracto de levadura	Actividad β-1,3-glucanasa	Valor predicho 532,5
	Urea		Valor real 497,8
pH inicial	4,63	Actividad quitinasa	Valor predicho 30,9
Concentración de inóculo	4×10^6 esporas/mL		Valor real 34,9

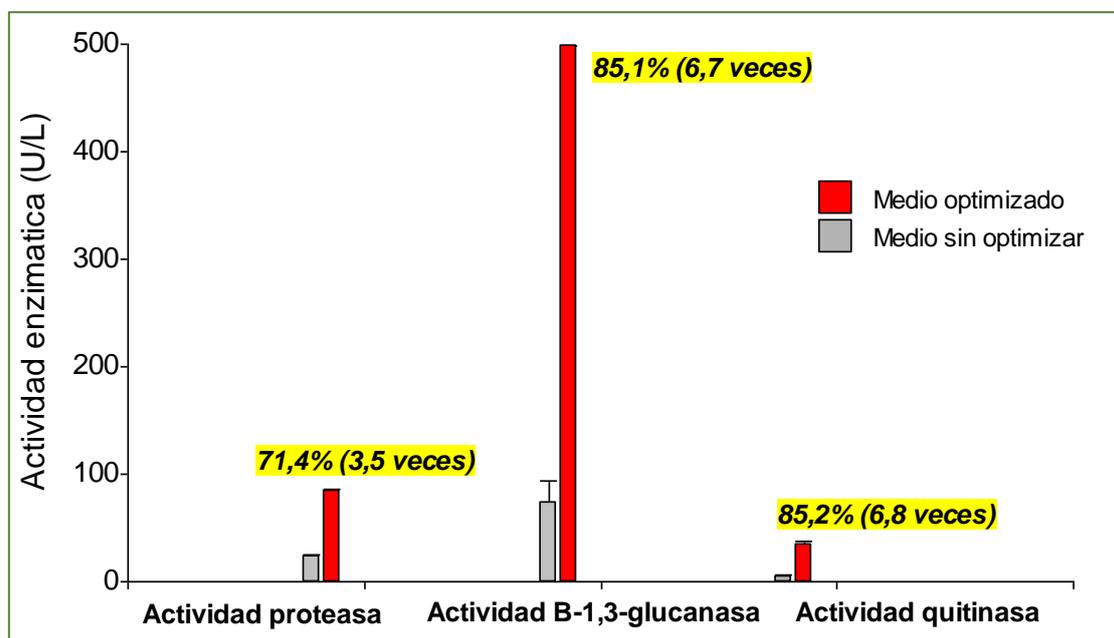


Figura 32. Optimización total de la actividad enzimática, obtenida para proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas en *E. primorosea* HMP9.

4.5 Caracterización bioquímica de las enzimas micolíticas presentes en los sobrenadantes optimizados.

Una vez obtenidos los sobrenadantes optimizados, se procedió a la caracterización bioquímica de sus enzimas micolíticas. Se estudió la influencia de la temperatura y pH en su actividad y estabilidad ya que estos factores se consideran primordiales a la hora de aplicar enzimas fúngicas en procesos biotecnológicos.

4.5.1 Temperatura y pH de reacción óptimos

En primer lugar, se ensayaron las condiciones de temperatura y pH de reacción óptimos para las tres enzimas micolíticas (proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas). El efecto de ambos factores sobre la actividad enzimática, se evaluó incubando las mezclas de reacción a diferentes temperaturas y pHs (Sección 3.5.1).

Con respecto a la actividad proteasa, se observó la máxima actividad al incubar los sobrenadantes a una temperatura de 85°C ($393,15 \pm 8,35$ U/L) (Figura 33a) y pH 7,4 ($368,36 \pm 31,72$ U/L) (Figura 33b), con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto a las demás condiciones ensayadas. Para la actividad β -1,3-glucanasa se obtuvo la máxima actividad a 60°C ($547,035 \pm 6,69$ U/L) (Figura 33c) y pH 5 ($550,36 \pm 8,58$ U/L) (Figura 33d), con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a las demás condiciones de reacción.

Para la actividad quitinasa no se observaron diferencias significativas en el rango de temperatura de 37 a 55°C, y entre los pHs 4 a 5, obteniéndose una mayor actividad a 45°C ($41,074 \pm 1,45$ U/L) (Figura 33e) y pH 4 ($51,9 \pm 2,54$ U/L) (Figura 33f).

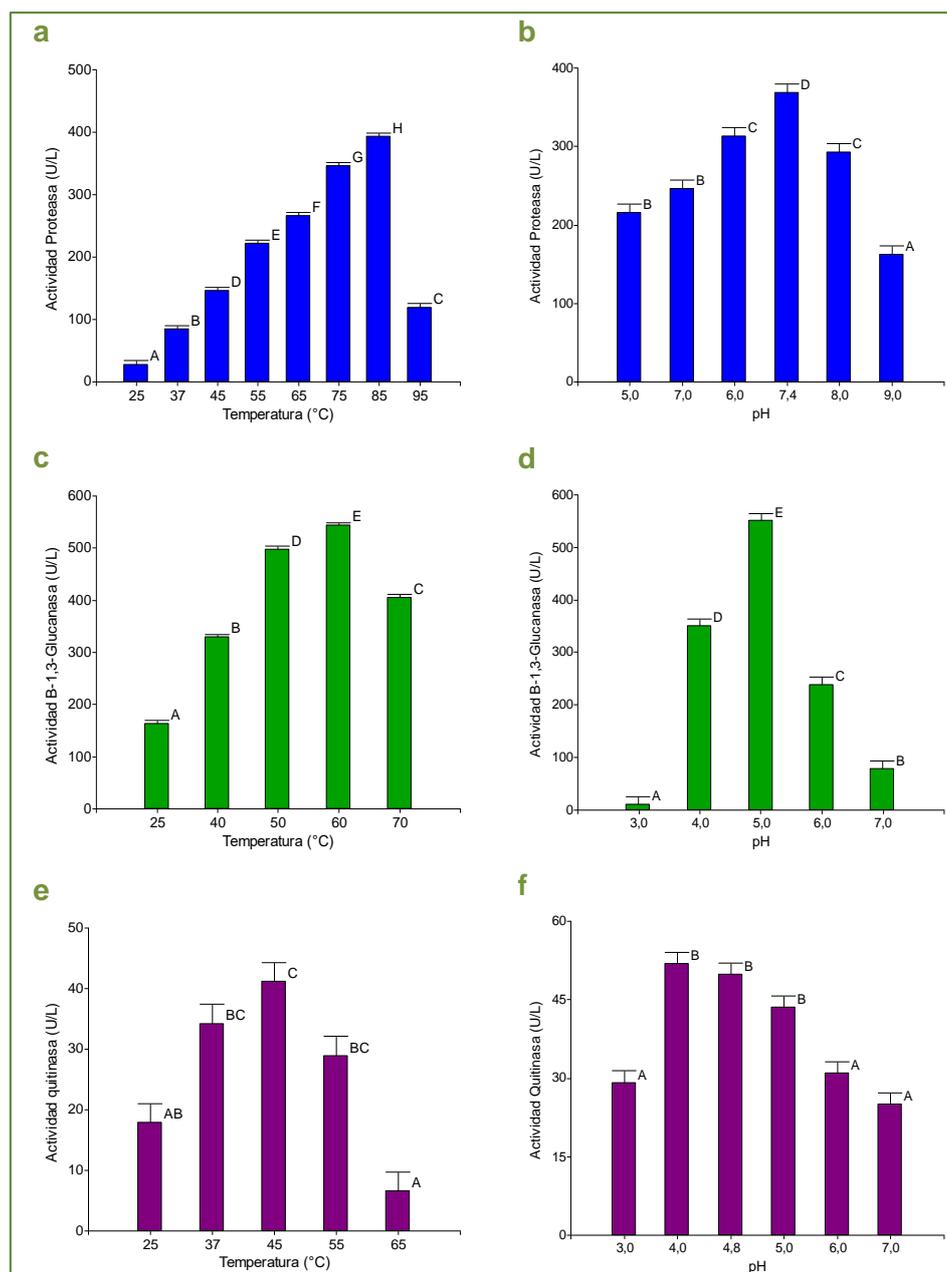


Figura 33. Prueba de diferencia entre medias para las actividades enzimáticas: proteasa (a y b), β -1,3-glucanasa (c y d) y quitinasa (e y f) a diferentes temperaturas y pHs de reacción. Test de Tukey con un nivel de confianza del 95,0%. Las medias con una letra diferente son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

4.5.2 Termoestabilidad y pH estabilidad

Se ensayó la estabilidad de las enzimas micolíticas proteasas, quitinasas y β -1,3-glucanasas, en los sobrenadantes optimizados, incubándolos post-fermentación a diferentes temperaturas y pHs, durante distintos intervalos de tiempo. La actividad residual se definió como el porcentaje de actividad enzimática medida luego de un período de tiempo con respecto a la actividad en el tiempo inicial (100%).

Con respecto a la termoestabilidad en el tiempo, la actividad proteasa residual en heladera

no presentó diferencias significativas durante los 30 días de incubación ($p>0,05$), manteniéndose superior a 90% (Figura 34a). A temperatura ambiente disminuyó significativamente a los 10 días de incubación ($p<0,05$); sin embargo, se mantuvo mayor a 70% durante 25 días (Figura 34b). Para β -1,3-glucanasas, la actividad residual en heladera y a temperatura ambiente, no presentó diferencias significativas durante los 30 días de incubación ($p>0,05$), manteniéndose por encima de 80 y 90% respectivamente (Figuras 34d y 34e). Para la actividad quitinasa residual, no hubo diferencias significativas durante 25 días en heladera (Figura 34g), y durante 15 días a temperatura ambiente ($p>0,05$) superando el 70% (Figura 34h).

Finalmente, para las temperaturas de reacción óptimas, la actividad residual de las tres enzimas disminuyó significativamente a los 5 min de incubación ($p<0,05$), por debajo de 25% (Figuras 34c, 34f, 34i).

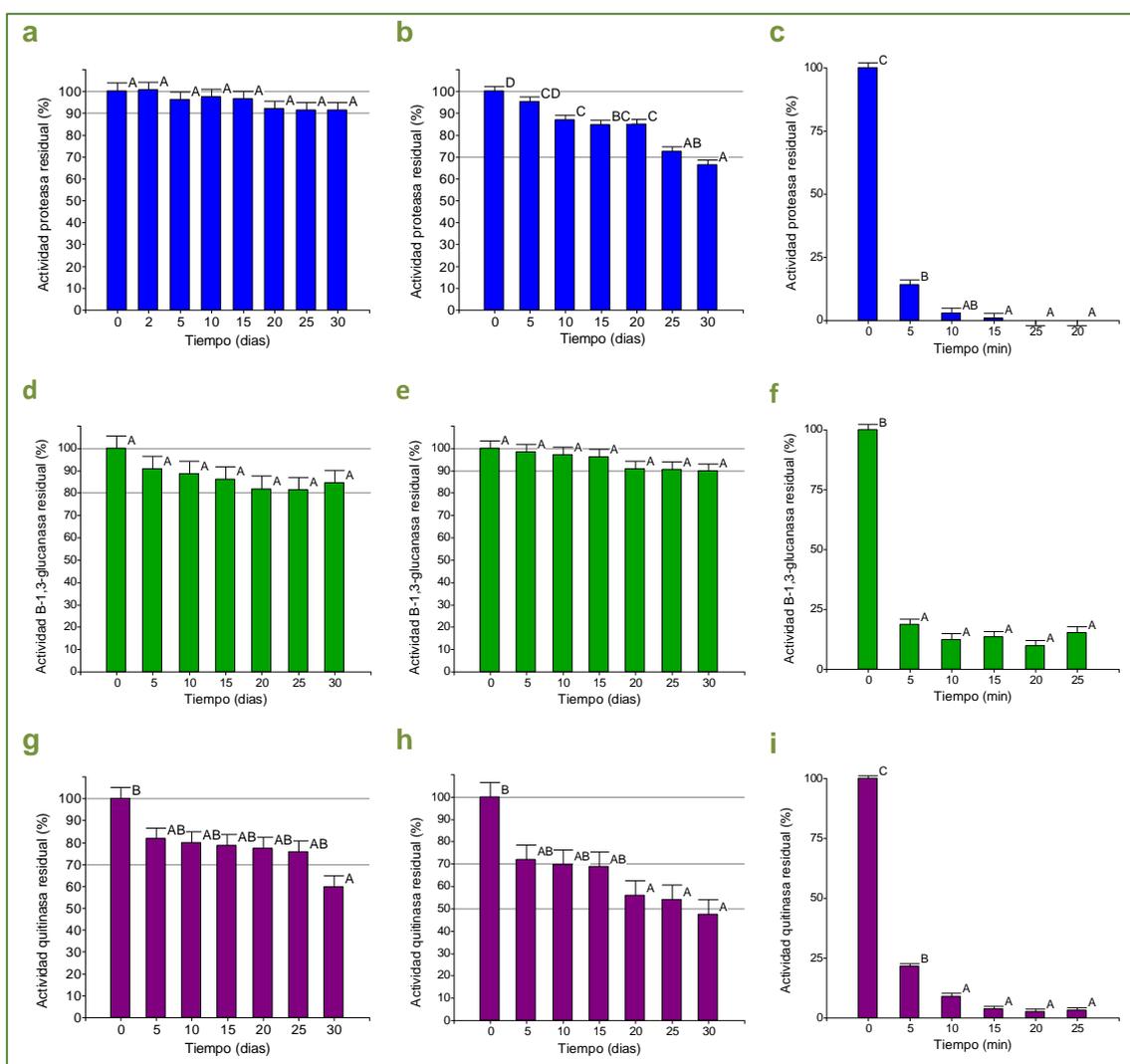


Figura 34. Termoestabilidad de las actividades enzimáticas proteasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa de *E. primorosea* HMP9. Estabilidad enzimática residual en el tiempo, cuando los sobrenadantes optimizados se incubaron refrigerados a 5°C (a, d, g); a temperatura ambiente (b, e, h) y a la temperatura de reacción óptima de

cada enzima (c, f, i). Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95%. Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Con respecto a la estabilidad del pH en el tiempo, los sobrenadantes optimizados se incubaron durante 30 días a temperatura ambiente. Para la actividad residual proteasa, no se observaron diferencias significativas durante 30 días a pH 6 (Figura 35a); y los pHs 7,4 y 8, presentaron diferencias significativas al día 10 de incubación, con una actividad residual mayor a 50% (Figuras 35b y 35c).

Para β -1,3-glucanasas, a pH 4 la actividad residual no mostró diferencias significativas durante los 30 días de incubación (Figura 35d). Los pHs 5 y 6 presentaron diferencias significativas al día 10 de incubación, con una actividad residual mayor a 70% durante el resto de los días (Figura 35e, 35f).

Finalmente, la actividad quitinasa mostró diferencias significativas al día 10 de incubación, para pH 3, con una actividad residual menor al 50% (Figura 35g). Para pH 4, se observó diferencia significativa al día 10, con una actividad residual mayor a 50% durante los 30 días (Figura 35h). Para pH 5 no hubo diferencias significativas durante 20 días, con una actividad residual mayor a 70% (Figura 35i).

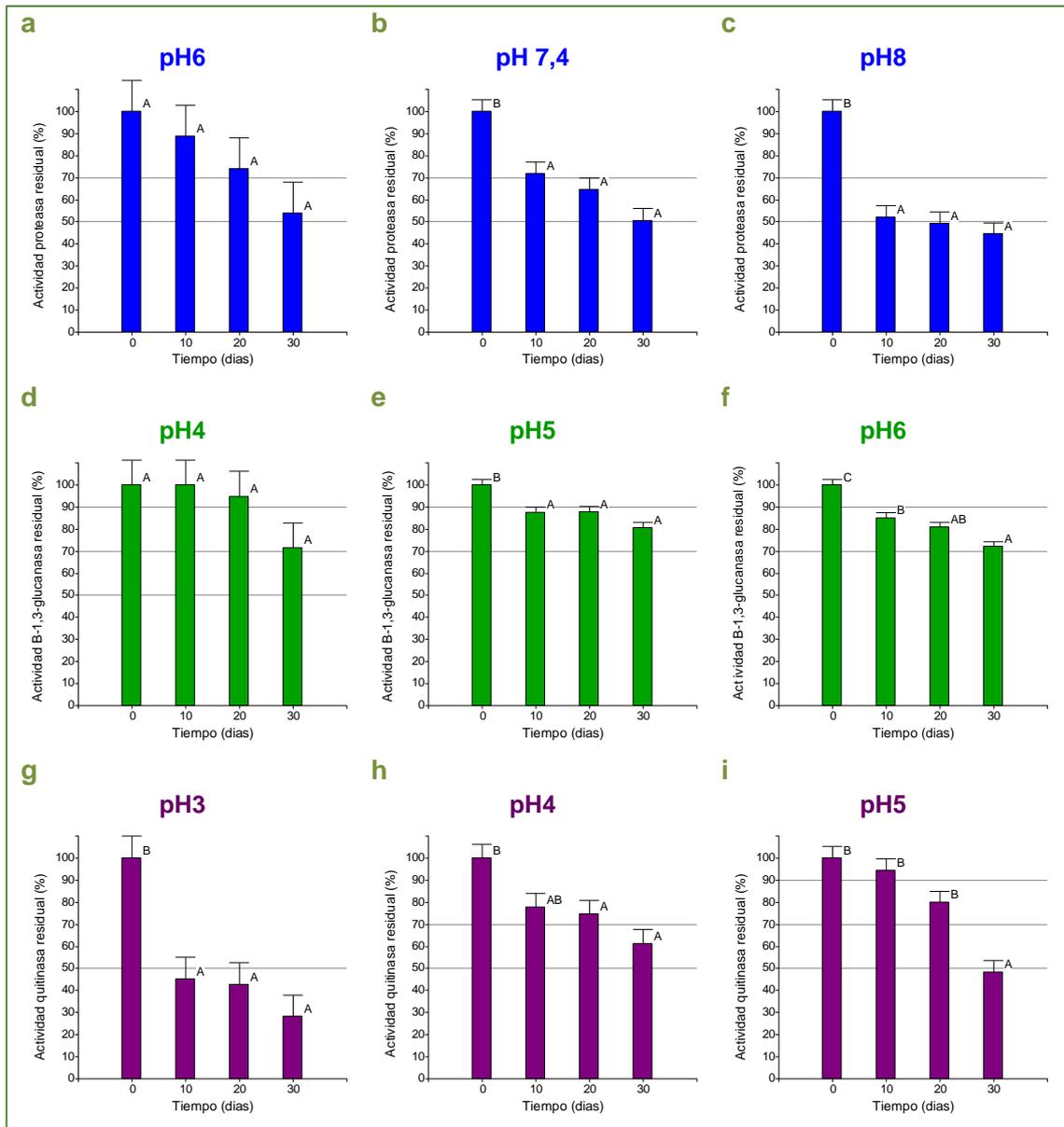


Figura 35. pH estabilidad de la actividad micolítica de *E. primorosea* HMP9. Actividad residual en el tiempo para proteasas: pHs 3, 4 y 5 (a, b, c); β -1,3-glucanasas: pH 4, 5 y 6 (d, e, f); y quitinasas: pH 3, 4 y 5 (g, h, i). Test de Tukey, con un nivel de confianza de 95%. Las medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.6 Detección de isoenzimas con actividad micolítica en ND-PAGE: Zimogramas

Se realizó un gel ND-PAGE para determinar la presencia de isoenzimas para cada de las enzimas micolíticas a partir de los sobrenadantes optimizados de *E. primorosea* HMP9. Se emplearon distintos sustratos, y fue posible realizar el perfil isoenzimático tanto para proteasas (Figura 36a), como β -1,3-glucanasas (Figura 36b) y quitinasas. Particularmente para quitinasas se detectó la presencia de 2 isoenzimas (Figura 36c).

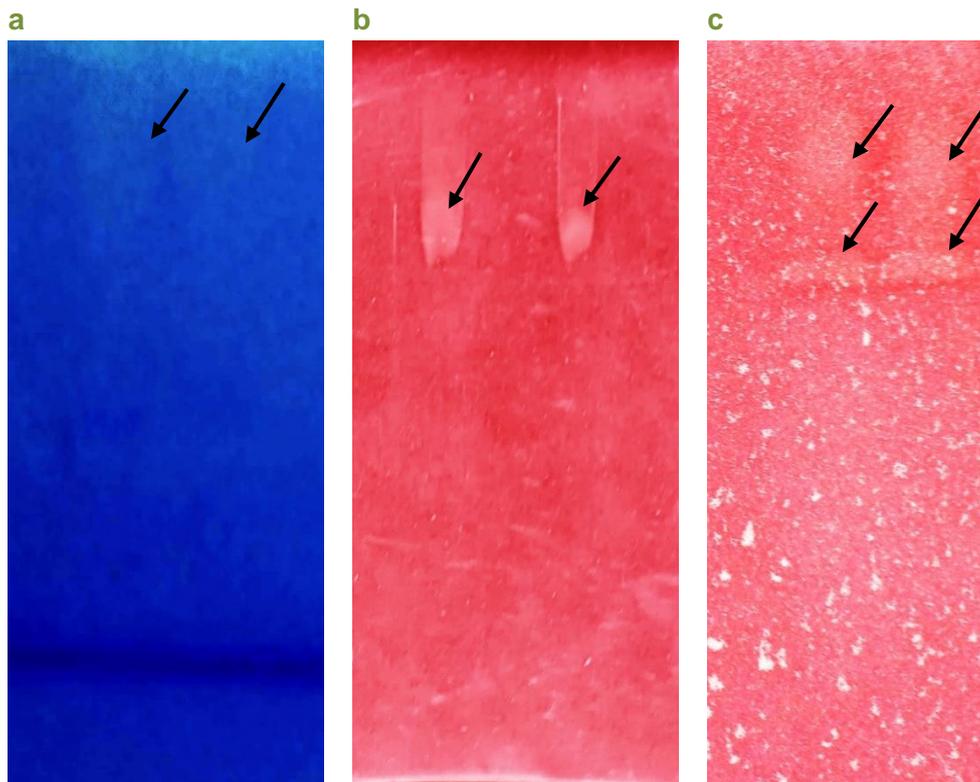


Figura 36. Detección de enzimas micolíticas de *E. primorosea* HMP9. ND-PAGE de los sobrenadantes optimizados, sembrados por duplicado, donde se visualiza la presencia de isoenzimas para (a) proteasas, utilizando tinción con azul de coomasie, (b) β -1,3-glucanasas y (c) quitinasas, utilizando tinción con Rojo Congo. Las flechas indican las regiones donde se detectó actividad enzimática.

DISCUSSION



5 DISCUSION

La evolución natural de los sistemas de producción agraria han derivado en la necesidad de contar con métodos de control biológico de plagas, racionales y respetuosos con el medio ambiente [189,190]. En consecuencia, constantemente se requiere el desarrollo de nuevos bioinsumos que mejoren la calidad y productividad dentro de la industria agrícola y forestal.

Los estudios realizados en una gran variedad de especies fúngicas y sus metabolitos, están orientados a sus posibles aplicaciones biotecnológicas, como agentes microbianos de control biológico, ya que son antagonistas naturales capaces de reducir los daños causados por organismos perjudiciales [110]. Por tanto, la identificación de aislamientos fúngicos con actividad biocontroladora y su optimización, son fundamentales en el desarrollo de formulados a base de estos microorganismos benéficos y/o sus metabolitos bioactivos, como enzimas, entre otros.

En la provincia de Misiones, las hormigas cortadoras de hojas están categorizadas como una de las plagas que mayor daño ocasionan a la industria forestal [13,35,191]. En este contexto el hongo *Escovopsis*, representa un potencial biocontrolador, comprometiendo de manera indirecta la salud y supervivencia de las colonias de hormigas, ya que es un micoparásito especialista de *L. gongylophorus*, un hongo mutualista obligado, utilizado como alimento por las hormigas cortadoras de hojas [70].

5.1 Obtención de aislamientos fúngicos de *Escovopsis* y *Leucoagaricus*, asociados a nidos de hormigas cortadoras de hojas en Misiones.

En el presente trabajo, se recolectaron muestras de hongueras de nidos de hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex*, con el fin de obtener cepas pertenecientes a *Escovopsis* y a *L. gongylophorus*. Las colonias muestreadas estaban ubicadas en sitios ecológicamente distintos: plazoletas de la zona urbana de Posadas, con una fuerte intervención humana; pastizales y monte de la zona interurbana que comprende al campus universitario de la Universidad Nacional de Misiones, con intervención humana moderada; y áreas linderas al Parque Provincial Cañadón de Profundidad, con baja perturbación humana.

Sólo, en esta zona natural protegida de un fragmento de la selva misionera, no se consiguió ningún aislamiento de *Escovopsis*. Sin embargo, en este trabajo, no se podría definir que la infección por *Escovopsis* esté asociada a la intervención humana debido a que el número de muestras recolectadas fue muy variable en cada sitio y que la técnica de muestreo se fue poniendo a punto. Por tanto, la incidencia de *Escovopsis* también aumentó con el trascurso de los muestreos, lográndose obtener 11 aislamientos distintos. Además, se tuvieron en

cuenta factores ecológicos externos que incrementen la susceptibilidad de los nidos, los cuales no fueron los mismos entre los distintos sitios de muestreo. Estos factores, implican una disminución en la eficacia del sistema de defensa de las colonias, que es aprovechado por *Escovopsis* para infectar con éxito los nidos de hormigas más susceptibles [56,85,192].

Por otra parte, es sabido que la honguera constituye una comunidad interactiva de diversos microorganismos, como bacterias y levaduras que contribuyen a la protección de la colonia inhibiendo la infección por *Escovopsis* [193]. Por tanto, la susceptibilidad de la colonia también puede estar relacionada con la capacidad de su microbiota asociada para inhibir a *Escovopsis*. Gerardo *et al.* y Rodrigues *et al.* [194,195] demostraron que las comunidades de microorganismos asociados a la honguera pueden variar de un ambiente a otro, en virtud de la fauna edáfica y epífita de los sitios adyacentes a los nidos.

Si bien, Currie [84] sugirió que la incidencia de *Escovopsis* está relacionada con el sitio de muestreo, aún no está claro a que se deben los niveles de infección por *Escovopsis*.

5.2 Identificación polifásica de los aislamientos fúngicos obtenidos

Una vez obtenidos los aislamientos puros de *Escovopsis* y *L. gongylophorus*, se procedió a su caracterización e identificación. Con respecto a los aislamientos de *L. gongylophorus*, se observaron colonias con agrupaciones visibles de gongilidios. La presencia de estas estructuras especializadas es una característica determinante para identificar tanto a este hongo simbiote como a las hormigas que lo cultivan. Esto se debe a que los gongilidios se producen exclusivamente en las hongueras cultivadas por las Attini más especializadas, es decir, los géneros *Atta* y *Acromyrmex* [65], y se atribuyen específicamente a la especie teleomorfa *L. gongylophorus* [76].

Con respecto a los aislamientos de *Escovopsis*, se obtuvieron colonias blancas algodonosas que se tornaron marrones pulverulentas. Microscópicamente, se observó la presencia de conidióforos ramificados con la presencia de vesículas evanescentes, células conidiógenas fialídicas ampuliformes y conidios hialinos que se tornaron pigmentados y ornamentados. Estas características macro micromorfológicas, concuerdan con la descripción formal del género [63]. Asimismo, a partir del reporte de nuevas especies, se fueron teniendo en cuenta otras características para identificar taxonómicamente aislamientos de *Escovopsis* [74,75,81,172].

En este trabajo, la identificación hasta el nivel de especie se realizó mediante un estudio polifásico basado en la combinación de características morfológicas y moleculares. La importancia de este tipo de análisis radica en integrar los datos fenotípicos, genotípicos y filogenéticos para clasificar a aquellas especies con un mínimo de contradicciones [196],

[197]. Por un lado, se realizó la identificación macro y microscópica, donde las características de mayor relevancia diagnóstica fueron el color de las colonias, la morfología de las vesículas y la morfología y tamaño de los conidios. Por otro lado, se realizó la identificación molecular mediante el empleo de los cebadores ITS1 e ITS4. La región ITS1-5,8S-ITS2, es considerada como la más eficiente y frecuente en el análisis de la biodiversidad fúngica a nivel de género y especie [198], y es utilizada como un código de barras estandarizado para el reino Fungi [199,200]. Durante el análisis molecular y filogenético, HMP1 se agrupó junto con las secuencias correspondientes a *E. microspora* y *E. weberi*. Sin embargo, la caracterización morfológica determinó que corresponde a la especie *E. microspora*, ya que presentó vesículas de $5,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de diámetro, característicos de esta especie [75]. Por otra parte, las secuencias pertenecientes a los aislamientos HMP5 y HMP6 presentaron mayores porcentajes de identidad y similitud con *E. weberi*, lo cual se correspondió con los resultados del análisis morfológico. Sin embargo, al igual que HMP1, el árbol filogenético las agrupó junto a *E. weberi* y *E. microspora*. Con respecto a este punto, la estrecha relación que existe entre las secuencias ITS de ambas especies se ha reportado por varios autores [74,79,81,172]. Marfetán *et al.* [75] amplificaron la región 28S del ADNr para poder distinguir ambas especies. No obstante, en este trabajo se logró identificar satisfactoriamente estas cepas hasta el nivel de especie, gracias a su análisis polifásico. Con respecto a los aislamientos HMP2, HMP3, HMP4, HMP7, HMP8, HMP9, HMP10 y HMP11, morfológicamente mostraron características microscópicas particulares, como la presencia de vesículas catenuladas, lo cual se correspondió con la descripción de dos especies de *Escovopsis*: *E. catenulata* y *E. primorosea* [75]. Los autores diferenciaron morfológicamente estas dos especies por la coloración de sus conidios cuando crecieron en medio mCYA. HMP2, HMP3, HMP4, HMP7, HMP9, HMP10 y HMP11 mostraron conidios rosa pálidos al cuarto día de incubación, que luego se tornaron marrones, y fueron identificados como *E. primorosea*. Por su parte, HMP8 presentó conidios marrones durante todo el período de incubación, por tanto, se identificó como *E. catenulata*. Estas especies caracterizadas recientemente no disponen de secuencias ITS publicadas en las bases de datos, por tanto, no se pudo considerar el análisis de identidad y similitud para identificarlas. Sin embargo, en el análisis filogenético, estas secuencias no se agruparon con ninguna secuencia de referencia. Los árboles agruparon juntos a HMP2, HMP3, HMP4, HMP7, HMP9, HMP10 y HMP11; y HMP8 se ubicó en una rama aparte, lo cual es concordante con el análisis macromorfológico realizado cuando crecieron en medio mCYA.

Finalmente, como se mencionó anteriormente, hasta el momento no hay secuencias ITS reportadas por otros autores para las especies *E. catenulata* y *E. primorosea*. Por lo tanto, las secuencias nucleotídicas depositadas en la base de datos GenBank en el transcurso del

presente trabajo, representan una gran contribución para futuras evaluaciones en el marco del análisis molecular de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 de este género a nivel mundial.

5.3 Selección de una cepa fúngica promisorio mediante pruebas de patogenicidad

Establecer los mecanismos de acción involucrados en el micoparasitismo es un factor relevante en el desarrollo y la aplicación de agentes de biocontrol [94]. Por tanto, una vez identificados los aislamientos de *Escovopsis*, se evaluó su capacidad antagónica en contra del hongo *L. gongylophorus*, lo cual permitió seleccionar una cepa promisorio con características implicadas en el nivel de patogenicidad y especificidad. Además, se realizaron enfrentamientos en microcultivos, para observar la interacción y los mecanismos estructurales existentes entre *Escovopsis* y *L. gongylophorus*.

En primer lugar, las pruebas de patogenicidad mostraron mayor crecimiento y conidiación por parte de todos los aislamientos de *Escovopsis* contra *L. gongylophorus*. Hay trabajos que reportan que la producción de metabolitos secundarios en hongos, es generada ya sea para su defensa o ataque, como para que sean aprovechados por otros organismos para su beneficio [201,202]. Por tanto, el aumento en la conidiación de *Escovopsis* puede deberse a compuestos difusibles producidos por el hongo simbiote. Este mecanismo de retroalimentación positiva en la producción de conidios de *Escovopsis*, también fue reportado por otros grupos de investigación [88,170,179,203–205].

Por su parte, el mayor crecimiento micelial de *Escovopsis* hacia *L. gongylophorus* también se atribuye a un reconocimiento químico. En este proceso, el huésped libera señales volátiles que son captadas por el micoparásito, creciendo rápidamente de manera dirigida por quimiotaxis, que es un mecanismo observado en la naturaleza [207–210].

De manera general, hay reportes sobre la liberación de compuestos difusibles que serían responsables de acelerar el ciclo de vida de *Escovopsis*; estimulando su crecimiento, la formación de conidióforos y la germinación y maduración de sus conidios [211–213].

Por otra parte, la patogenicidad de *Escovopsis* sobre *L. gongylophorus* presentó diferentes niveles de virulencia; destacándose los aislamientos HMP1, HMP3, HMP7, HMP8 y HMP9, que alcanzaron el grado 4 de virulencia al sexto día de enfrentamiento. Sin embargo, considerando la duración total del ensayo, todos los aislamientos alcanzaron el máximo de virulencia, presentando una capacidad antagónica satisfactoria. Esto significó un deterioro y posterior colapso total de *L. gongylophorus*, lo cual denotó un importante aprovechamiento de nutrientes por parte de *Escovopsis* durante el ataque.

En varios trabajos se reportó que *Escovopsis* es un micoparásito eficaz contra el hongo simbiote [194,206,214,215]. Con respecto a los mecanismos involucrados en el nivel de patogenicidad, se propuso que la infección se debe a respuestas específicas directamente relacionadas con la especialización huésped-parasito [89,212,216–218]. Se han sugerido mecanismos fisiológicos, por los cuales *Escovopsis* detecta al hongo mutualista y responde en consecuencia, mediante la secreción de toxinas y enzimas líticas [70,88].

Por otra parte, hay trabajos donde se observaron mecanismos estructurales, mediante el contacto físico entre las hifas de ambos hongos [55,92]. También se propuso que la virulencia de *Escovopsis* no está determinada por su infectividad, sino por la susceptibilidad del hospedador [62,89,215].

Con respecto a la inhibición de *L. gongylophorus* por parte de *Escovopsis*, en la mayoría de los enfrentamientos se observaron grados de inhibición con un efecto significativo. Varios autores reportaron una inhibición del crecimiento del hongo simbiote por parte de diferentes cepas de *Escovopsis* [92,169,206,212]. Asimismo, los porcentajes de inhibición obtenidos en este trabajo, a excepción de uno, fueron promisorios (mayores a 50%) y tres de ellos obtuvieron más de 75%, destacándose *Escovopsis* HMP9 con un porcentaje de inhibición mayor a 90%. Para los mecanismos involucrados en la inhibición del crecimiento del hongo simbiote, se reportó la producción de compuestos químicos y metabolitos secundarios con acción antifúngica, que inhibieron su desarrollo [218–220].

Para investigar más detalladamente los mecanismos involucrados en esta interacción huésped-parasito, se seleccionó el aislamiento promisorio *E. primorosa* HMP9. Los ensayos de microcultivos evidenciaron la interacción entre ambos hongos en el proceso micoparasítico.

En primer lugar, la ausencia de gongilidios en *L. gongylophorus* denotó que el ataque del micoparásito *E. primorosa* HMP9 impidió la formación de estas estructuras, características del hongo simbiote. Es probable que esto se deba al elevado grado de inhibición (mayor a 90%) observado en los ensayos de patogenicidad.

Por otra parte, se observó un enrollamiento de las hifas de *L. gongylophorus* sobre las hifas de *E. primorosa* HMP9. Este comportamiento poco frecuente, también fue observado en una cepa de *L. gongylophorus* frente a *Escovopsis* sp. por Haifig [55], quien propuso que podría tratarse de un mecanismo de defensa por parte del hongo simbiote. Por el contrario, la acción típica reportada para otros géneros de hongos micoparásitos es el enrollamiento de sus hifas alrededor del hospedador, como un mecanismo físico de ataque [212,221,222].

En este trabajo también se observaron grupos de hifas de *E. primorosea* HMP9 entrelazadas, como formando una gran hifa. Este comportamiento no es típico en micoparásitos, por lo cual se propone que podría tratarse de un mecanismo de respuesta al enrollamiento de las hifas de *L. gongylophorus*.

Con respecto al ataque del micoparásito, por un lado, se establecieron zonas de contacto estrecho entre las hifas de ambos hongos, donde fue notable la degradación del micelio del huésped para la transferencia de nutrientes. Los principales reportes sobre mecanismos de ataque estructurales implican cambios morfológicos por parte del micoparásito [90–92]. Sin embargo, en los microcultivos no se observó la formación de estructuras especializadas ni enrollamientos hifales por parte de *E. primorosea* HMP9.

Por otra parte, se observaron zonas de degradación del micelio del huésped antes de que se establezca el contacto físico entre las hifas, lo cual indicaría la secreción de enzimas y toxinas volátiles por parte de *E. primorosea* HMP9. Este comportamiento fue reportado por varios autores [88,169,206,212,213]. Asimismo, de Man *et al.* [171], secuenciaron el genoma de *E. weberi*, y reportaron la presencia de numerosos genes que codifican micotoxinas y enzimas degradantes de la pared celular fúngica. Por su parte, Inglis y Kawchuk [162], observaron la secreción de quitinasas en un aislamiento de *Escovopsis*. Asimismo, nuestro equipo de trabajo reportó por primera vez la secreción de proteasas en un aislamiento de *Escovopsis*, utilizando un medio de cultivo que contenía paredes celulares de *L. gongylophorus* como fuente de carbono [223].

A partir de los resultados observados, en esta interacción micoparasítica actuaron de manera conjunta mecanismos físicos y químicos de *E. primorosea* HMP9 para la destrucción de las hifas de *L. gongylophorus*. Durante la infección, se estimuló primero la secreción de compuestos químicos por parte de los aislamientos de *Escovopsis* que inhibieron el crecimiento de *L. gongylophorus*, y posteriormente degradaron los componentes de la pared celular de las hifas del hospedador, incluso antes de entrar en contacto.

Por otra parte, los microcultivos indicaron que el aislamiento promisorio *E. primorosea* HMP9 actuó como un micoparásito necrotrófico de contacto. Según Jeffries [90], estos liberan principalmente toxinas y enzimas líticas destructivas al medio ambiente, y se distinguen porque no hay penetración del micelio del huésped, sino que se establece un contacto estrecho entre las hifas para la transferencia de nutrientes; y carecen de estructuras de infección especializadas.

5.4 Optimización de la secreción de enzimas micolíticas en un aislamiento de *Escovopsis promisorio*

Como se discutió previamente, durante el proceso micoparasitario, antes del contacto físico, son determinantes los mecanismos químicos de atracción, inhibición y ataque del hongo micoparásito sobre su hospedador. Los hongos secretan enzimas hidrolíticas extracelulares, principalmente proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas, que participan en la degradación del micelio del huésped durante la infección patogénica de los mismos [224]. La digestión de la pared celular, compuesta principalmente de quitina, β -1,3-glucanos y proteínas, facilita la penetración de antibióticos secretados por el micoparásito e inhibe la capacidad del huésped para reparar su pared, amplificando el efecto de las enzimas micolíticas [225,226]. Por esto, los esfuerzos en investigación se han dirigido principalmente a la evaluación del efecto de nutrientes inductores en el medio de fermentación, como fuentes de carbono y nitrógeno rentables en el rendimiento de las enzimas y la optimización de los parámetros como el pH inicial del medio y la concentración de inóculo [227]. Sin embargo, no hay establecido un medio de cultivo definido para la mejor producción de enzimas micolíticas microbianas. Cada microorganismo y/o cepa presenta una necesidad específica para su multiplicación y secreción eficiente de enzimas extracelulares [228]. Por tanto, en este trabajo, se profundizó el estudio de estos mecanismos por parte de *E. primorosea* HMP9, seleccionando y optimizando los parámetros de fermentación relevantes para inducir la actividad de las enzimas micolíticas en este micoparásito promisorio.

Se utilizaron diferentes herramientas estadísticas, las cuales son muy productivas para estudiar la correlación entre los componentes de un medio de cultivo y la secreción de enzimas de interés biotecnológico, utilizando sustratos complejos [229]. Los ensayos de este trabajo, se realizaron mediante fermentación líquida, teniendo en cuenta que en los procesos biotecnológicos más del 75% de las enzimas microbianas son producidas por esta tecnología, en comparación con la fermentación en estado sólido [144,230,231].

5.4.1 Selección de fuentes de carbono y nitrógeno que promuevan la secreción de enzimas micolíticas

En primer lugar, mediante un diseño experimental factorial, se realizó la selección de fuentes de carbono y nitrógeno que tuvieron un efecto significativo sobre la actividad de las enzimas micolíticas (proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas).

En aquellos ensayos donde se detectó actividad micolítica, se pudo observar la formación de pellets micelares por parte de *E. primorosea* HMP9. Esta forma de desarrollo del micelio

resulta efectiva ya que facilita el empleo del sobrenadante de cultivo para la obtención de metabolitos de interés, como la purificación de enzimas secretadas al medio [232].

Con respecto a las fuentes de carbono, entre las estrategias sugeridas para lograr la mayor expresión de las enzimas micolíticas, se encuentra el cultivo de los hongos en presencia de inductores. Estos pueden favorecer una eficiente secreción enzimática, la cual está estrechamente regulada por su producto de degradación [95,127,233,234].

Si bien se han probado diversas fuentes de carbono con efectos variables sobre la actividad enzimática [164–166], muchos estudios reportaron la mayor secreción de proteasas, quitinasas y β -1,3-glucanasas, cuando el micoparásito creció en medios de cultivo que contenían paredes celulares fúngicas [235–238]. Para este comportamiento, varios investigadores plantearon una interacción sinérgica entre las enzimas micolíticas, inducidas por estos sustratos complejos hasta su degradación en componentes más simples, que son asimilados por el microorganismo para su crecimiento y secreción enzimática [162,225,239].

Por tanto, en este trabajo se ensayó el efecto de las paredes celulares extraídas de dos hongos diferentes, *Fusarium* sp. y *L. gongylophorus*, sobre el complejo enzimático micolítico de *E. primorosea* HMP9, pudiéndose detectar actividad para las tres enzimas de estudio. Cabe destacar que en este trabajo se reporta por primera vez la determinación enzimática cuantitativa de β -1,3-glucanasas secretadas por un aislamiento del género *Escovopsis*. Inglis y Kawchuk [162], compararon la degradación de las paredes celulares de tres hongos (*Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*) por parte de *Escovopsis* sp. y reportaron por primera vez la presencia de actividad quitinasa en uno de sus aislamientos. Por otra parte, nuestro equipo de trabajo estableció las condiciones de reacción de un método colorimétrico para cuantificar la actividad proteasa en sobrenadantes enzimáticos de *Escovopsis*, reportando por primera vez actividad proteasa en un aislamiento de este género [158].

Para las tres enzimas micolíticas ensayadas en este trabajo, se observó un efecto significativo por parte de los medios de cultivo que contenían paredes celulares de *L. gongylophorus*, en comparación con *Fusarium* sp. En parte esta diferencia puede deberse a que, si bien los componentes principales de toda pared celular fúngica son los polisacáridos (quitinas, y β -glucanos) y proteínas, la sensibilidad a las enzimas degradantes de la pared celular varía entre los hongos filamentosos debido a que presentan diferencias en la composición de la pared celular [240,241]. Michel-Aceves *et al.* [242], emplearon paredes celulares de *Fusarium oxysporum*, un género fitopatógeno muy estudiado, para inducir la actividad micolítica en aislamientos de *Trichoderma* [243,244], el cual es un micoparásito necrotrófico estrechamente relacionado con *Escovopsis* [18,171,245]. Los autores plantearon que la pared de *F.*

oxysporum fue menos susceptible a la actividad de quitinasas y glucanasas por parte de *Trichoderma*, debido a que presenta una capa externa de glicoproteínas que cubre a la quitina y los glucanos [246], de tal manera que se necesitó una mayor secreción de enzimas para degradarla.

Con respecto al efecto significativo de las paredes de *L. gongylophorus* sobre la actividad enzimática de su parásito especialista *E. primorosea* HMP9, de Man *et al.* [171], detectaron que algunos genes y grupos de genes específicos asociados, estaban regulados cuando crecían con *L. gongylophorus*. Es probable que durante la degradación de las paredes celulares se activen genes que codifican para las enzimas micolíticas y además se activen mecanismos característicos, estructurales, fisiológicos y enzimáticos, que fueron evolucionando en función de su huésped específico. Los autores proponen que la dependencia de *L. gongylophorus* dio forma al genoma de *Escovopsis* [171].

Con respecto a las fuentes de nitrógeno, se ensayaron medios de cultivo suplementados con extracto de levadura, urea, sulfato de amonio y el complejo nitrogenado Mandels. En primer lugar, se detectó que los medios de cultivo que contenían individualmente urea y sulfato de amonio, además de un escaso crecimiento micelial, no presentaron actividad detectable para las tres enzimas micolíticas ensayadas. Con respecto a este punto, hay trabajos que reportaron efectos represivos por parte de estas fuentes de nitrógeno en la actividad enzimática de hongos micoparásitos, concretamente cuando se emplearon como única fuente de nitrógeno [132,247,248].

Para las demás fuentes de nitrógeno, se observó una mayor actividad micolítica en los medios de cultivo que contenían Mandels, con respecto a extracto de levadura, con diferencias significativas para β -1,3-glucanasas y quitinasas.

En relación al efecto favorable del medio Mandels, hay muchos trabajos que indican su influencia significativa en la secreción enzimática, debido a la combinación de los compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos que posee este medio [155,249]. Además, este medio contiene otros nutrientes, como microelementos y sales que colaboran en el crecimiento y secreción enzimática [250]. Hay reportes donde la suplementación del medio de cultivo con una solución de trazas metálicas mejoró sustancialmente el crecimiento y la producción de enzimas, lo que indica que puede ser un requisito la presencia de algunos iones metálicos para la secreción enzimática de los microorganismos [251,252].

Por otra parte, hay trabajos donde la secreción enzimática mejoró cuando el medio de cultivo se complementó con CaCl_2 , MgSO_4 y KH_2PO_4 , que también son componentes del medio Mandels. El aumento en la producción de enzimas fue pequeño cuando estas sales se usaron

individualmente, y mucho más baja en su ausencia, lo cual denota su importancia en los medios de cultivo [251,253].

5.4.2 Optimización de las fuentes de carbono y nitrógeno seleccionadas que promueven la secreción de enzimas micolíticas

A partir de la selección de paredes celulares de *L. gongylophorus* y del complejo Mandels, se procedió a la optimización de dichas fuentes de carbono y nitrógeno con efecto significativo en la actividad micolítica por parte de *E. primorosea* HMP9.

La concentración de sustrato es un factor primo en la fermentación de microorganismos [254]. En este trabajo se ensayaron 4 concentraciones de paredes celulares extraídas del micelio de *L. gongylophorus* (0,13 g/L; 0,36 g/L; 0,81 g/L y 1,25 g/L). Para las tres enzimas micolíticas, se observó una mayor actividad a 0,36 g/L, es decir una concentración de la región inferior del diseño.

Con respecto a la actividad proteasa, hay estudios en hongos filamentosos donde se reportó que su producción es regulada por el estrés de carbono y nitrógeno [148,255,256]. También se observó en aislamientos del micoparásito *Trichoderma* sp., la secreción de β -1,3-glucanasas y quitinasas en medios de cultivo sin fuente carbono, es decir, se secretaban constitutivamente en condiciones no inductivas. Aunque su secreción aumentó tras la inducción mediante paredes celulares del huésped en concentraciones limitantes [257].

Hay estudios que asocian el aumento de la actividad enzimática en condiciones limitantes de carbono, con la autólisis del micelio o la degradación de los componentes de la pared celular que van a ser excretados al medio de cultivo y son empleados como fuentes de carbono cuando otras fácilmente metabolizables no están disponibles [95].

Si bien no hay muchos reportes sobre el efecto de distintas concentraciones de paredes celulares fúngicas como fuente de carbono, estos resultados indicaron que las mayores actividades se obtuvieron en la concentración cercana al nivel más bajo para las tres enzimas.

Por otra parte, una vez seleccionado el medio Mandels como fuente de nitrógeno, se procedió a optimizar la combinación de las concentraciones de sus tres componentes nitrogenados (urea, extracto de levadura y sulfato de amonio), los cuales juegan un rol importante en la regulación de efectos metabólicos, entre ellos la secreción enzimática [258]. Se realizó un diseño de RSM Box-Behnken mediante el cual se evaluó el efecto de tres concentraciones de cada componente (0,2 g/L; 1,1 g/L y 2 g/L), considerando una región experimental, que posiblemente abarque los puntos óptimos, para cada uno de los componentes nitrogenados.

Con respecto a la actividad proteasa, se observó una influencia significativa positiva ($p < 0,05$) por parte de los tres componentes nitrogenados de Mandels. Para esta enzima, se ha reportado que las fuentes de nitrógeno orgánicas como urea y extracto de levadura, son mejores para el crecimiento y producción de proteasas en algunos organismos [259,260]. Malathi y Chakraborty [261], reportaron que el extracto de levadura, puede servir como un inductor específico de proteasas, ejerciendo así una influencia positiva acumulativa en la enzima. Otros autores también informaron actividades significativas en medios que contenían extracto de levadura, para la secreción de proteasas [253,260,262]. Sin embargo, también hay trabajos donde se observó un mejor rendimiento de proteasas cuando se emplearon fuentes de nitrógeno inorgánicas como el sulfato de amonio [252,263].

Con respecto a las actividades de β -1,3-glucanasas y quitinasas, se observó una influencia significativa negativa por parte de urea ($p < 0,05$) y positiva por parte de extracto de levadura ($p < 0,05$), con una consecuente interacción significativa negativa entre ambos componentes nitrogenados.

Se ha sugerido que la limitación nutricional, particularmente la privación de nitrógeno, puede estar fuertemente vinculada con la patogénesis en sistemas fúngicos [264–266]. Esto concuerda con el efecto negativo de la urea sobre las actividades de β -1,3-glucanasas y quitinasas, es decir, que a menores concentraciones de urea aumentó la actividad enzimática. Esta observación respalda lo reportado por numerosos autores [247,267]. Sandhya *et al.* [127] detectaron que la adición de urea al medio redujo el rendimiento de quitinasas en un 39,7%.

En contraste, se reportó que la adición de extracto de levadura al medio estimuló la secreción de β -1,3-glucanasas y quitinasas [268–271].

Hay múltiples informes sobre la influencia favorable del extracto de levadura, donde la actividad enzimática micolítica mostró un aumento relacionado con la concentración de esta fuente de nitrógeno [272,273]. Šimkovič *et al.* [274] mencionaron que el extracto de levadura funciona como una fuente de vitaminas para hongos, y es importante para el crecimiento microbiano y la productividad enzimática.

En el análisis individual de cada enzima micolítica se observaron discrepancias para proteasas con respecto a β -1,3-glucanasas y quitinasas. Entonces, los valores óptimos predichos para una enzima diferían de los valores óptimos para otra enzima. Por tanto, la mejor combinación para las variables estudiadas, se pudo estimar mediante la optimización de múltiples respuestas, y las concentraciones obtenidas fueron: urea en su nivel bajo (0,2 g/L), extracto de levadura cercano al nivel alto (1,86 g/L) y sulfato de amonio cercano al nivel bajo (0,21 g/L), para maximizar la secreción enzimática micolítica.

5.4.3 Optimización de variables físico-químicas que promuevan la secreción de enzimas micolíticas: concentración de inóculo, pH inicial del medio y concentración de urea

Una vez seleccionadas y optimizadas las variables fuente de carbono y nitrógeno, se continuó optimizando otras variables físico-químicas que promuevan la secreción enzimática de proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas.

Para el factor concentración de urea, durante la optimización de las fuentes de nitrógeno, el óptimo predicho estaba en un extremo del diseño. Por tanto, se extendió la región experimental (0 g/L, 0,1 g/L, 0,2 g/L), en la cual no se observó un efecto significativo para la secreción de ninguna de las tres enzimas, encontrándose el óptimo en el nivel medio, es decir, entre la ausencia de urea y el nivel inferior predicho anteriormente. Esto corrobora el hecho de que el componente urea, en mayores concentraciones puede tener un efecto significativo negativo sobre la actividad enzimática. Sin embargo, la ausencia del mismo, también genera una disminución en la secreción enzimática [275].

Con respecto al pH inicial del medio (4; 5,5; 7), se observó una influencia significativa negativa para las actividades de β -1,3-glucanasas y quitinasas, es decir, que la secreción enzimática fue favorecida por valores de pH ácidos. En numerosos trabajos se informó que el pH ácido denota un parámetro de crecimiento y actividad importante en la secreción de β -1,3-glucanasas y quitinasas [276–278]. Por otra parte, al igual que en los ensayos de optimización previos, estas dos enzimas se comportaron de manera similar, lo cual fue reportado por Rao *et al.* [267] quienes plantearon que la secreción de β -1,3-glucanasas y quitinasas puede estar regulada de manera coordinada, ya que ambas enzimas fueron influenciadas de la misma manera por niveles similares de los parámetros ensayados.

Los aislamientos fúngicos se destacan para su mejor rendimiento en el rango de 3 a 6, y en general las enzimas se producen con mayor rendimiento a un valor cercano a su pH óptimo de reacción [279].

Hay reportes donde se obtuvieron valores de pH muy similares al punto óptimo predicho en este trabajo. Nampoothiri *et al.* [273] reportaron la producción máxima de quitinasas por *T. harzianum* a un pH de 4,5. Por su parte Moreno-Mateos *et al.* [280] informaron un intervalo de pH óptimo de 4,5 a 5,5 para la misma especie.

Por tanto, se comprobó el efecto significativo del pH en la secreción enzimática, al igual que en otros micoparásitos [279,281,282], y se puede afirmar el carácter moderadamente acidofílico del aislamiento *E. primorosea* HMP9.

Con respecto a la actividad proteasa, en este trabajo el pH del medio no presentó efecto significativo. Sin embargo, se reportó que muchos organismos fermentadores exhiben un crecimiento y actividad proteasa satisfactorios en una amplia gama de pH [283,284].

Por otra parte, para el factor concentración de inóculo (1×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 esporas/mL), se detectó un efecto significativo negativo para las tres enzimas micolíticas. Este comportamiento puede deberse a que un aumento en el número de esporas en el inóculo asegura una rápida proliferación y síntesis de biomasa. Sin embargo, después de un cierto límite, la competencia por los nutrientes da como resultado la disminución de la actividad metabólica del microorganismo [273]. Por tanto, el tamaño óptimo de inóculo para la producción de enzimas se encontró cercano al nivel inferior, donde existe un equilibrio entre la proliferación de biomasa y la disponibilidad de nutrientes que respalden la producción de enzimas.

A partir del análisis de optimización de múltiples respuestas se obtuvieron los valores óptimos que maximizan la deseabilidad dentro de la región experimental: concentración de urea en su nivel medio (0,1 g/L), pH inicial del medio cercano al nivel inferior (4,63) y concentración del inóculo cercana al nivel inferior (4×10^6 esporas/mL), para optimizar de manera conjunta las actividades de proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas.

Las condiciones óptimas predichas se validaron experimentalmente, obteniéndose resultados satisfactorios y prometedores para la secreción micolítica de *E. primorosea* HMP9. Con respecto a proteasas, la actividad se incrementó en un 71,4%, es decir, 3,5 veces en relación al medio de cultivo inicial, sin optimizar. Con respecto a la actividad β -1,3-glucanasa, se incrementó en un 85,1%, es decir, 6,7 veces del valor inicial en el medio sin optimizar. Finalmente, la actividad quitinasa, se incrementó en un 85,2%, es decir, 6,8 veces en comparación con el medio sin optimizar.

Para las actividades de β -1,3-glucanasas y quitinasas, los valores experimentales fueron concordantes con los predichos. Por tanto, se comprobó que, durante los ensayos, tanto ambas enzimas fueron reguladas de manera coordinada e influenciadas de la misma manera por lo niveles de los factores ensayados.

Para la actividad proteasa el valor experimental no fue concordante con la actividad predicha. Esto puede deberse a que, en el transcurso de los ensayos de optimización esta enzima se comportó de manera distintiva con respecto a las demás, entonces los factores y niveles ensayados no presentaron los mismos efectos significativos. Por tanto, cuando se aplicaron los análisis de optimización de múltiples respuestas, los valores óptimos presentaban una concordancia ajustada con respecto a las enzimas β -1,3-glucanasas y quitinasas.

A partir de estos ensayos, fue posible optimizar la actividad de las tres enzimas micolíticas, empleando como fuente de carbono paredes celulares de *L. gongylophorus* (0,36 g/L), y como fuente de nitrógeno el complejo Mandels cuya concentración de componentes nitrogenados fueron, urea (0,1 g/L), extracto de levadura (1,86 g/L) y sulfato de amonio (0,21 g/L). El pH inicial del medio de cultivo fue de 4,63 y la concentración de inóculo 4×10^6 esporas/mL.

5.5 Caracterización bioquímica de las enzimas micolíticas presentes en los sobrenadantes optimizados.

5.5.1 Temperatura y pH de reacción óptimos

La caracterización bioquímica de las enzimas micolíticas de los sobrenadantes optimizados presenta una importancia tanto biológica como comercial [285].

En primer lugar, se ensayaron las condiciones de reacción óptimas para las tres enzimas micolíticas (proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas), incubando las mezclas de reacción a diferentes temperaturas y pH. Con respecto a la actividad proteasa, la enzima se mantuvo activa en todo el rango de temperaturas ensayadas (25-95°C), sin embargo, la actividad se incrementó significativamente hasta 85°C.

Esta temperatura de reacción óptima fue notablemente superior a las reportadas frecuentemente para proteasas alcalinas fúngicas (entre 35°C y 60°C) [255,286,287].

No obstante, hay reportes en bacterias que son concordantes con los resultados de este trabajo. Particularmente, para una proteasa alcalina de *Bacillus* sp. se observó una temperatura óptima de 85°C [288]. Por su parte, Sookkheo *et al.* [289] estudiaron tres proteasas secretadas por *Bacillus stearothermophilus* que mostraron actividades máximas a 70, 85 y 90 °C, clasificadas como proteasas altamente termoestables.

Por otra parte, la proteasa mantuvo su actividad entre los pH 5 y 9, con un máximo significativo a pH 7,4. Valores equiparables se obtuvieron para una proteasa de *T. harzianum*, la cual se mantuvo activa entre los pH 5 y 10, con un óptimo a pH 7 [290]. La actividad proteasa óptima también fue comparable con la de otras proteasas secretadas por cepas de *Trichoderma* sp. [291–293].

Cabe destacar que la proteasa de *E. primorosea* HMP9 presentó un valor de pH óptimo de reacción, dentro del rango reportado para proteasas alcalinas fúngicas (entre 7 y 9). Este tipo de proteasas están representadas principalmente por las serinproteasas [267,294], las cuales están mayormente relacionadas con los procesos de biocontrol en *Trichoderma* spp. [295–298].

Con respecto a las β -1,3-glucanasas, la enzima se mantuvo activa durante el rango de temperaturas estudiado (25 – 70°C) con un óptimo significativo a 60°C. Estos resultados fueron comparables a los obtenidos en varios trabajos en lo que respecta a las temperaturas óptimas reportadas para hongos [299–301]. Noronha y Ulhoa [302] reportaron una temperatura óptima de 50 °C, para β -1,3-glucanasas en *T. harzianum*. Fontaine *et al.* [303] obtuvieron un rango de temperatura óptima para *Aspergillus fumigatus* entre 55 y 65 °C. Para las especies fúngicas *Acremonium persicinum* [304] y *Rasamsonia emersonii* [305], también se reportó un óptimo de 65°C. Por su parte El-Katatny [306], observaron para un aislamiento de *T. harzianum*, un valor óptimo a 60 °C, coincidente con el valor óptimo reportado en este trabajo.

En lo que respecta al efecto de pH sobre la actividad enzimática, se observó que la enzima fue funcional en el rango de pH de 4 a 7, con un valor óptimo significativo de 5. La actividad óptima de las β -1,3-glucanasas fúngicas generalmente se encuentra en un rango de pH de 4 a 6. [301,307]. Thrane *et al.* [308] obtuvieron un pH óptimo en el rango 5 a 5,5, para la actividad β -1,3-glucanasa de *Trichoderma longibrachiatum*. Marco y Félix [300] reportaron para *T. harzianum* una actividad óptima a pH 5, al igual que en este trabajo.

Con respecto a las quitinasas, se detectó actividad en todas las temperaturas estudiadas (25 – 65°C). Se observó un rango óptimo entre 37 y 55°C, con el máximo de actividad a 45°C.

Chung *et al.* [309] reportaron que en general, las quitinasas fúngicas tienen rangos óptimos de temperatura de 23 a 50 °C [310–312]. Para las quitinasas de *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. viride*, se han reportado actividades máximas entre 50 y 55 °C [313–315], y para *T. asperellum* un rango de temperatura óptimo de 30°–40°C [316,317]. Estos valores son comparables con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que no se observaron diferencias significativas entre 37–55°C.

Por otra parte, la enzima se mantuvo activa en todos los pH ensayados (3-7), con un rango óptimo entre 4 y 5. Estos valores fueron congruentes con los óptimos de 4 y 4,5 reportados para las quitinasas de dos cepas de *T. harzianum* [318,319]. Asimismo, otros autores reportaron rangos de pH de 3,5 a 4,5 para distintas especies de *Trichoderma* [313–315].

Si bien la actividad quitinasa varía según las especies fúngicas, los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de los rangos observados en diversos estudios previos por otros autores con hongos micoparásitos.

5.5.2 Termoestabilidad y pH estabilidad

La estabilidad de las enzimas micolíticas, es decir, su capacidad para retener actividad a lo largo del tiempo, es sin duda un factor limitante en la mayoría de los bioprocesos [320]. La estabilidad enzimática es fundamental en los procesos biotecnológicos, tanto en la aplicación enzimática para biotratamientos como en la etapa de producción y recuperación/purificación de las enzimas [321,322]. Por tanto, es una característica muy importante a la hora de producir y aplicar las enzimas micolíticas, considerando que su estabilidad debe ser suficiente para dicha aplicación; en este caso mediante la acción lítica de estas enzimas sobre las hongueras de las hormigas cortadoras de hojas.

Con respecto a la termoestabilidad en el tiempo, la actividad proteasa residual en heladera fue mayor a 90%, por tanto, demostró tener una elevada estabilidad refrigerada a 5°C, durante los 30 días de incubación. A temperatura ambiente (entre 24 y 28°C) se mantuvo mayor a 70% durante 25 días. Banerjee [253] también reportó para una proteasa de *Bacillus brevis*, una estabilidad mayor a 70% a 25 °C durante 12 días. Shankar *et al.* [286] por su parte detectaron para una proteasa de *Beauveria* sp. que la enzima retuvo el 100% de actividad durante una hora a temperatura ambiente. En ambos casos con tiempos considerablemente menores al de este trabajo.

Por otra parte, la termoestabilidad a temperatura óptima (85°C) presentó una disminución significativa por debajo de 25% a partir de los 5 min de incubación, perdiendo por completo la actividad a los 25 min. De manera similar a lo observado en el presente trabajo, Nascimento y Martins [252] midieron la termoestabilidad de una proteasa durante 2 h y el perfil indicó que la enzima a 80°C mantuvo sólo un 16% de su actividad. Asimismo, una proteasa de *Bacillus* sp. retuvo 25% de la actividad original después del tratamiento térmico de 1 h a 80°C [323].

Por otra parte, Sookkheo *et al.* [289], ensayaron la termoestabilidad de tres proteasas de *Bacillus* durante 30 min, las cuales retuvieron aproximadamente el 50% de la actividad inicial a 72, 78 y 90 °C, respectivamente.

Para β -1,3-glucanasas, la actividad residual en heladera y a temperatura ambiente, al igual que para proteasas fue notable, manteniéndose por encima de 80 y 90% respectivamente durante los 30 días de incubación. El-Katatny [306] reportó para una cepa de *T. harzianum*, una actividad residual β -1,3-glucanasas de 50% después de 60 días de incubación, a temperaturas entre 20 y 30°C.

Por otra parte, en este trabajo la actividad residual a temperatura óptima (60°C), disminuyó

de manera significativa a los 5 min de incubación, por debajo de 25% pero estable durante 25 min.

Se reportaron resultados comparables por varios autores. La estabilidad térmica para una β -1,3-glucanasa de *Thielavia terrestris* presentó una vida media de 37 min a 60 °C [324]. Por otra parte, una β -1,3-glucanasa de *T. reesei* perdió toda su actividad al incubarse durante 15 min a 60°C [325], y la β -1,3-glucanasa de *Chaetomium* sp. se volvió inactiva por encima de 60°C durante 30 min [326]. Por su parte El-Katatny [306] reportó para *T. harzianum* una actividad enzimática residual del 30% en 30 min de incubación a 60°C.

Con respecto a la actividad quitinasa residual, esta se mantuvo mayor a 70% durante 25 días en heladera y durante 15 días a temperatura ambiente. Chung *et al.* [309] reportaron una actividad residual entre el 93 y 99% cuando el sobrenadante enzimático se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 1 a 2 h, lo que demuestra que si bien presentan estabilidad alta, los tiempos son mucho menores a los ensayados en este trabajo.

A temperatura de reacción óptima (45°C) la actividad quitinasa residual, también disminuyó significativamente por debajo del 25%, a los 5 min de incubación, con una vida media de 25 min. De manera similar, El-Katatny [306] reportó una actividad quitinasa media de 18 min a 40°C, y 42 min a 50°C, para *T. harzianum*. Por su parte, Loc *et al.* [316] informaron una estabilidad térmica quitinasa de una cepa de *T. asperellum*, entre 25 y 50°C por 30 min. Por otra parte, Chung *et al.* [309] investigaron la estabilidad térmica quitinasa a 40 y 50°C durante 1 a 2 h, y la enzima mantuvo una actividad residual de 93-99% y 50-70% respectivamente.

La disminución significativa de actividad, para las tres enzimas micolíticas a sus temperaturas óptimas, puede ser el resultado de la desnaturalización por calor y la autodigestión de las enzimas en el sobrenadante enzimático crudo [306].

Sin embargo, fue notable la estabilidad de las tres enzimas micolíticas, refrigeradas en heladera y a temperatura ambiente. Estas características resultan primordiales, ya que además de facilitar la conservación de un bioinsumo a base de las enzimas micolíticas de *E. primorosea* HMP9, se favorece su aplicación ya que las hongueras de los nidos de hormigas cortadoras de hojas presentan una temperatura cercana a la ambiental, la cual se mantiene estable debido al metabolismo de *L. gongylophorus* [327]. Entonces los sobrenadantes enzimáticos además de presentar actividad micolítica a temperatura ambiente, mantienen una estabilidad elevada durante al menos 30 días, lo que podría reflejar una mayor durabilidad del efecto biocontrolador.

Con respecto a la estabilidad del pH en el tiempo, la actividad residual proteasa, fue mayor a 70% durante 20 días a pH 6; y los pHs 7,4 y 8, presentaron actividades residuales mayores a 50% durante los 30 días de incubación. Si bien, no se encontraron reportes de pH estabilidad durante el periodo de 30 días, se discutió sobre trabajos realizados con tiempos más reducidos. Nascimento y Martins [252] incubaron los sobrenadantes enzimáticos a temperatura ambiente durante 24 h a valores de pH de 5,5, 8 y 9, y observaron una disminución de aproximadamente 51%, 18% y 66% de su actividad original, respectivamente. Por su parte Aissaoui *et al.* [290] detectaron que la actividad proteasa fue estable en el rango de pH de 5 a 9, con una actividad residual de más del 80% durante 1 h.

Shankar *et al.* [286] informaron que un aislamiento de *Beauveria* fue altamente estable en el rango de pH 3-11 a temperatura ambiente durante 1 h con máxima estabilidad a pH 7. Hajji *et al.* [328] informaron una serinproteasa de *Aspergillus clavatus* que retuvo aproximadamente el 68% de su actividad inicial a pH 7.

Para β -1,3-glucanasas, a pH 4 la actividad residual se mantuvo por encima de 90% durante 20 días de incubación, y para los pH 5 y 6 se mantuvo por encima de 70% durante los 30 días de incubación.

Los ensayos de estabilidad de pH para la actividad β -1,3-glucanasa de *T. terrestris* indicaron que permaneció estable dentro del rango de pH de 4,5 a 7, después de una incubación a temperatura ambiente (25 °C) durante 2,5 h. Mientras que otras β -1,3-glucanasas fúngicas permanecieron estables durante pocos minutos, dentro del rango de pH de 4 a 7 [329].

La actividad quitinasa, presentó una disminución significativa en su actividad al día 10 de incubación para pH 3, con una actividad residual menor al 50%. Por otra parte, para los pH 4 y 5, la actividad residual fue mayor a 70% durante 20 días.

La estabilidad de pH para una quitinasa de *T. harzianum* se mantuvo en un rango de 4,5 a 7, lo cual fue concordante con los datos reportados para otras quitinasas, que eran estables entre los pH 4 y 8 [330]. Otra quitinasa de *T. harzianum* fue estable a pH de 5,5, manteniendo más del 50% de su actividad [313].

Zhang *et al.* [331] reportó un rango de estabilidad de pH bastante amplio (4 a 13) para *Paenibacillus xylanexedens*, que retuvo alrededor del 90% de su actividad inicial después de una incubación de 12 h.

En base a lo expuesto en este punto, los sobrenadantes enzimáticos de *E. primorosea* HMP9 presentaron una estabilidad de pH prometedora para su potencial aplicación como un bioproducto en los nidos de hormigas cortadoras de hojas.

Los reportes sobre el efecto de las hormigas en las propiedades del suelo son variados. Los nidos suelen presentar valores de pH en un rango ligeramente ácidos a ligeramente alcalinos, q tienden a la neutralidad, en comparación con los suelos circundantes [332,333].

Sin embargo, es bien conocido que los hongos en general tienden a acidificar el medio y a mantenerlo estable según sus necesidades fisiológicas [334]. Entonces, es probable que dentro de la honguera se tienda a un pH ligeramente ácido, y en el presente trabajo, se obtuvieron sobrenadantes estables en un rango amplio de pH, con mayor estabilidad para las 3 enzimas, en el rango de 4 a 6.

Por tanto, además de una termoestabilidad promisoría, las enzimas micolíticas de *E. primorosea* HMP9 presentan una estabilidad de pH propicia para su aplicación.

5.5.3 Detección de isoenzimas con actividad micolítica en ND-PAGE: Zimogramas

La presencia de distintas isoenzimas en los sistemas de degradación de polisacáridos es un fenómeno frecuente encontrado en numerosos microorganismos [335] y es consecuencia de la existencia de diferentes genes [336] o modificaciones postraduccionales del producto de un mismo gen, como proteólisis o diferentes estados de glicosilación [337,338]. Esta diversidad de enzimas para una misma actividad se ha interpretado como una optimización molecular para la degradación más efectiva de los sustratos atacados [335,339].

En este trabajo, se empleó zimografía realizando un gel ND-PAGE para perfilar las enzimas extracelulares secretadas por *E. primorosea* HMP9 en condiciones específicas, y determinar la presencia de isoenzimas para cada una de las enzimas micolíticas en los sobrenadantes optimizados.

Para proteasas, se empleó leche descremada como sustrato y se obtuvo una única banda tenue. La observación de bandas poco claras puede deberse a que, el sustrato no digerido por la proteasa y coloreado de azul genera un bajo contraste entre el área digerida y no digerida [340]. La banda observada representaría a la proteasa alcalina caracterizada en los sobrenadantes optimizados de *E. primorosea* HMP9, concordante con una única isoforma proteolítica revelada sobre geles de poliacrilamida.

Al respecto, cabe destacar que no hay reportes sobre la caracterización de proteasas secretadas por especies de *Escovopsis* sp. De Man *et al.* [171] en su trabajo sobre la

secuenciación de *E. weberi* no informaron genes que codifiquen para proteasas, sin embargo, reportaron la existencia de muchos genes de función desconocida.

Flores *et al.* [295] detectaron altos niveles de expresión de una proteasa alcalina codificada por el gen *prb1*, por parte de *T. harzianum*, durante la interacción *in vitro* con las paredes celulares de *Rhizoctonia solani*. Estos autores demostraron que el gen era activo sólo cuando el hongo se cultivó en medios que contenían las paredes celulares de *R. solani* como la única fuente de carbono.

Con respecto a la actividad β -1,3-glucanasa, se utilizó como sustrato laminarina, detectándose una sola banda. A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, Bara *et al.* [341] obtuvieron dos bandas de β -1,3-glucanasas extracelulares para *T. asperellum*, en presencia de paredes celulares de *R. solani*. Otros autores reportaron la presencia de tres isoenzimas de β -1,3-glucanasas por parte de *T. harzianum* cuando creció utilizando paredes celulares fúngicas como fuente de carbono [168,342]. Por otra parte, Vázquez-Garcidueñas *et al.* [343] obtuvieron zimogramas para *T. harzianum*, con cinco bandas de β -1,3-glucanasas en condiciones inductivas. Por lo cual, podría inferirse que la cantidad de isoenzimas además de estar influenciadas por los inductores empleados, está relacionada con las diferentes cepas y/o especies, y en el caso de β -1,3-glucanasas es muy variable. Con respecto a *Escovopsis*, este trabajo es el primer reporte para esta enzima.

Finalmente, para quitinasas, se empleó quitina coloidal como sustrato y se obtuvieron dos bandas. Esto concuerda con el único reporte de actividad quitinasa para *Escovopsis* sp. Inglis y Kawchuk [162] también detectaron la presencia de dos quitinasas en los zimogramas, cuando se emplearon paredes celulares de *R. solani* como fuente de carbono.

Curiosamente, al contrario de lo observado en este trabajo, Grinyer *et al.* [296] identificaron dos β -1,3-glucanasas y una quitinasa en un sobrenadante de cultivo de *T. atroviride*, en un medio que contenía paredes celulares de *R. solani* como la única fuente de carbono.

Con respecto a estas enzimas, De Man *et al.* [171] reportaron que *E. weberi* tiene un número similar de quitinasas (GH18, GH20) y de β -1,3-glucanasas (GH16) en comparación con *T. reesei*, lo que indica que las enzimas micolíticas que secretan y su potencial para atacar la pared celular de huésped son comparables entre ambos géneros fúngicos.

Todo lo expuesto indica que, *E. primorosea* HMP9, actúa como un micoparásito necrotrófico de contacto, y que, en condiciones de fermentación inductivas, produce un sistema micolítico que consiste en al menos una enzima proteasa, una β -1,3-glucanasa y dos quitinasas. Esta

inducción se debe a la incorporación de paredes celulares fúngicas de *L. gongylophorus* como fuente de carbono y el complejo nitrogenado Mandels como fuente de nitrógeno.

El coctel enzimático generado, presentó una estabilidad elevada en el rango de pHs para su potencial aplicación, y a temperaturas tanto de conservación (en condiciones de refrigeración) como también de aplicación (temperatura ambiente).

Este trabajo presenta una contribución novedosa e importante al conocimiento sobre el papel fisiológico de las enzimas micolíticas secretadas por este género fúngico micoparásito. Queda por profundizar en la investigación sobre los mecanismos de aplicación de este coctel enzimático, con propiedades micoparasitarias óptimas y estables, para su empleo eficiente sobre las hongueras de los nidos de hormigas cortadoras de hojas.

CONCLUSIONES



6 CONCLUSIONES

El muestreo de 53 nidos de hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex*, permitió aislar 11 cepas fúngicas pertenecientes al género *Escovopsis*, y dos cepas pertenecientes a *L. gongylophorus* nativas de la provincia de Misiones, enriqueciendo el cepario del BIOTECMOL.

El estudio polifásico, basado en la caracterización tanto morfológica (macro y microscópica) como molecular, permitió identificar las cepas de *Escovopsis* hasta el nivel de especie. La cepa HMP1 se identificó como *E. microspora*, las cepas HMP2, HMP3, HMP4, HMP7, HMP9, HMP10 y HMP11 se identificaron como *E. primorosea*, las cepas HMP5 y HMP6 se identificaron como *E. weberi*; y la cepa HMP8 se identificó como *E. catenulata*.

Cabe destacar que, a partir de este trabajo, se reportaron por primera vez secuencias ITS para las especies *E. catenulata* y *E. primorosea*. Además, debido a la baja disponibilidad de secuencias para las distintas especies de *Escovopsis* en las bases de datos GenBank, las secuencias obtenidas y reportadas en este trabajo representan una gran contribución para futuras evaluaciones en el marco del análisis molecular de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 de este género a nivel mundial.

Durante la realización de pruebas de patogenicidad, se observó que todos los aislamientos de *Escovopsis* alcanzaron el máximo de virulencia (grado 4), presentando una capacidad antagónica satisfactoria frente a *L. gongylophorus*. Particularmente, *E. primorosea* HMP9 además de presentar una capacidad antagónica satisfactoria, obtuvo el mayor grado de inhibición (mayor a 90%) y redujo de manera significativa el crecimiento de *L. gongylophorus*, por tanto, fue seleccionada como una cepa promisoría. Por otra parte, los microcultivos demostraron que *E. primorosea* HMP9 actuó como un micoparásito necrotrófico de contacto, liberando toxinas y enzimas que degradaron los componentes de la pared celular de su hospedador *L. gongylophorus*.

Empleando una serie de diseños experimentales factoriales y RSM Box-Behnken, en fermentación sumergida, fue posible la optimización de múltiples respuestas en el micoparásito *E. primorosea* HMP9. Para inducir el máximo rendimiento de las enzimas micolíticas, proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas, las condiciones de fermentación óptimas fueron: paredes celulares extraídas de *L. gongylophorus* (0,36 g/L) como fuente de carbono, y el complejo Mandels como fuente de nitrógeno, cuyos componentes nitrogenados fueron, urea (0,1 g/L), extracto de levadura (1,86 g/L) y sulfato de amonio (0,21 g/L). El pH inicial óptimo del medio de cultivo fue de 4,63 y la concentración de inóculo 4×10^6 esporas/mL.

Con respecto a las proteasas la actividad enzimática se incrementó en un 71,4%, es decir, 3,5 veces su actividad; la actividad β -1,3-glucanasa se optimizó un 85,1%, es decir 6,7 veces, y la actividad quitinasa se optimizó un 85,2%, 6,8 veces su actividad en comparación al medio de cultivo sin optimizar.

A partir de la caracterización bioquímica del sobrenadante optimizado, se obtuvieron las condiciones de temperatura y pH de reacción óptimos para las enzimas micolíticas. Para la actividad proteasa, se observó la máxima actividad a 85°C y pH 7,4; para β -1,3-glucanasas se obtuvo la máxima actividad a 60°C y pH 5 y para la actividad quitinasa a 45°C y pH 4.

Con respecto a la estabilidad del sobrenadante optimizado, las enzimas micolíticas presentaron una notable estabilidad refrigeradas en heladera y a temperatura ambiente, durante al menos 30 días. Además, permanecieron estables en un rango amplio de pH, con mayor estabilidad para las tres enzimas, en el rango de 4 a 6. Esta estabilidad prometedora es propicia para su potencial aplicación como un bioproducto, ya que las hongueras de los nidos de hormigas cortadoras de hojas presentan una temperatura cercana a la ambiental, y es probable que se encuentren a un pH ligeramente ácido.

Con respecto al perfil isoenzimático micolítico, se detectó que *E. primorosea* HMP9, produce un sistema micolítico que consiste en al menos una enzima proteasa, una β -1,3-glucanasa y dos quitinasas en condiciones inductivas con paredes celulares fúngicas de *L. gongylophorus* como fuente de carbono y el complejo nitrogenado Mandels como fuente de nitrógeno.

Cabe destacar que en este trabajo se presentan los primeros reportes de actividad enzimática β -1,3-glucanasa, así como la caracterización bioquímica de proteasas y β -1,3-glucanasas en aislamientos del género *Escovopsis*.

Finalmente, el sobrenadante optimizado de *E. primorosea* HMP9 demostró su acción óptima, tanto antifúngica como micoparasitaria sobre el hongo mutualista obligado, *L. gongylophorus*. Los resultados obtenidos, denotan y estimulan su potencial como alternativa no química prometedora en el control indirecto de hormigas cortadoras de hojas, una de las principales plagas de Misiones.

Recomendaciones para futuros trabajos y
Producción científica



7 RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

Escovopsis demostró ser un buen microorganismo de fermentación, y secretó eficientemente las enzimas del complejo micolítico. No obstante, para su aplicación como un agente biocontrolador, tanto la cepa como la formulación enzimática, están influenciadas por factores ambientales, como pH, temperaturas extremas, variaciones de humedad y radiación ultravioleta. Debido a esto, la inmovilización de células microbianas y enzimas se puede utilizar con el fin de aumentar su persistencia bioactiva y eficiencia. Por tanto, como continuación de este trabajo doctoral, se propone microencapsular las enzimas micolíticas (proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas), presentes en los sobrenadantes enzimáticos de *E. primorosea* LBM277, para su liberación gradual y eficiente, con efecto en la degradación de las paredes celulares de *L. gongylophorus*, en el contexto del biocontrol indirecto de hormigas cortadoras de hojas en la provincia de Misiones

8 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

8.1 Publicaciones en Revistas

- I. Barengo MP, Amerio NS, Bich GA, Castrillo ML, Zapata PD. Estandarización del método cuantitativo de azocaseína para determinar la actividad proteolítica en sobrenadantes fúngicos de *Escovopsis* y *Trichoderma*. *Biotecnol Apl.* 2020;37(2):2201-6.
- II. Barengo MP, Bich GA, Zapata PD, Castrillo ML. Micoparasitismo de *Escovopsis* frente a *Leucoagaricus gongylophorus*, asociados a nidos de hormigas cortadoras de hojas. *Gayana Botanica* (**Aceptado, en prensa**).

8.2 Presentaciones a Congresos

- I. Barengo MP, Bich GA, Castrillo ML, Villalba LL, Zapata PD. Aislamiento y caracterización morfológica de *Leucoagaricus gongylophorus* a partir de un nido de hormigas cortadoras de hojas. Jornadas Científico-Tecnológicas "45° Aniversario de la UNaM". 2018.
- II. Barengo MP, Bich GA, Alzaga EE, Villalba LL, Castrillo ML, Zapata PD. Bioprospección de cepas nativas de *Escovopsis* (Ascomycota: Hipocreales), potenciales biocontroladores de hormigas cortadoras de hojas. I Reunión sobre el manejo de plagas y agentes de control biológico del nordeste argentino y II Taller de manejo de malezas y plantas invasoras: el control biológico como alternativa. 2018.
- III. Barengo MP, Alzaga EE, Bich GA, Castrillo ML, Villalba LL, Zapata PD. Identificación molecular de aislamientos pertenecientes a *Escovopsis* y *Leucoagaricus*, géneros de

- interés para el biocontrol de hormigas cortadoras de hojas. XV Congreso Argentino de Microbiología, 25 a 27 Septiembre de 2019.
- IV. Barengo MP, Alzaga EE, Bich GA, Amerio NS, Castrillo ML, Zapata PD. Patogenicidad de *Escovopsis* frente a *Leucoagaricus*, asociados a nidos de hormigas cortadoras de hojas. XII Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos, 25 a 27 de Noviembre de 2019.
 - V. Barengo MP, Alzaga EE, Bich GA, Amerio NS, Castrillo ML, Zapata PD. Phylogenetic analysis of its sequences from isolates of *Escovopsis*, natives of the province of Misiones. 1st Latin American Congress of Women in Bioinformatics and Data Science, 21 a 24 de septiembre de 2020.
 - VI. Barengo MP, Amerio NS, Bich GA, Zapata PD, Castrillo ML. Selection of carbon and nitrogen sources for enhancing the secretion of mycolytic enzymes of *Escovopsis* in submerged fermentation. 1° Simpósio de Microbiologia de Rondônia: Saúde, Ambiente e Inovação SIMICRON, 23 a 25 de marzo de 2021.
 - VII. Barengo MP, Amerio NS, Bich GA, Zapata PD, Castrillo ML. Optimización de la secreción de enzimas micolíticas en *Escovopsis* primorosea HMP9. 6° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos SAPROBIO, 4 a 6 de agosto de 2021.
 - VIII. Barengo MP, Amerio NS, Bich GA, Zapata PD, Castrillo ML. Biochemical characterization of the optimal reaction temperature and pH of the main mycolytic enzymes with biocontrol capacity of the *Escovopsis* primorosea HMP9 strain. Tercer Encuentro & Primer Workshop de la Red Argentina de Tecnología Enzimática (Red TEz), 8 a 10 de Septiembre de 2021.
 - IX. Barengo MP, Alzaga EE, Bich GA, Amerio NS, Zapata PD, Castrillo ML. Micoparasitismo de *Escovopsis* HMP9, promisorio para biocontrol de hormigas cortadoras de hojas. Primeras Jornadas Institucionales de InBioMis, 23 y 24 de junio de 2022.
 - X. Barengo MP, Amerio NS, Bich GA, Zapata PD, Castrillo ML. Termoestabilidad de enzimas micolíticas con capacidad biocontroladora, en sobrenadantes de *Escovopsis* primorosea de Misiones, Argentina. V Simposio Chileno de Control Biológico, 30 de agosto a 1 de septiembre de 2022.
 - XI. Barengo M. P., Alzaga E. E., Bich G. A., Amerio N.S, Zapata P. D., Castrillo M. L. Phylogenetic analysis of ITS sequences in *Escovopsis* isolates from Misiones, in the framework of a polyphasic identification. 3rd Women in Bioinformatics & Data Science LA Conference, 20 a 23 de septiembre de 2022.

9 PROYECTO/S DE INVESTIGACIÓN DENTRO DEL/LOS CUAL/ES SE DESARROLLÓ LA TESIS

Esta investigación estuvo enmarcada dentro de los siguientes proyectos:

- ✓ PICT 2016-3349. Control biológico de hongos fitopatógenos: Optimización de la producción de enzimas micolíticas a partir de la predicción *in silico* de genes y potenciales inductores. Directora: Castrillo, ML. Fecha ejecución: 09-2017 al 05-2021. Monto subsidiado: 220.000,00\$

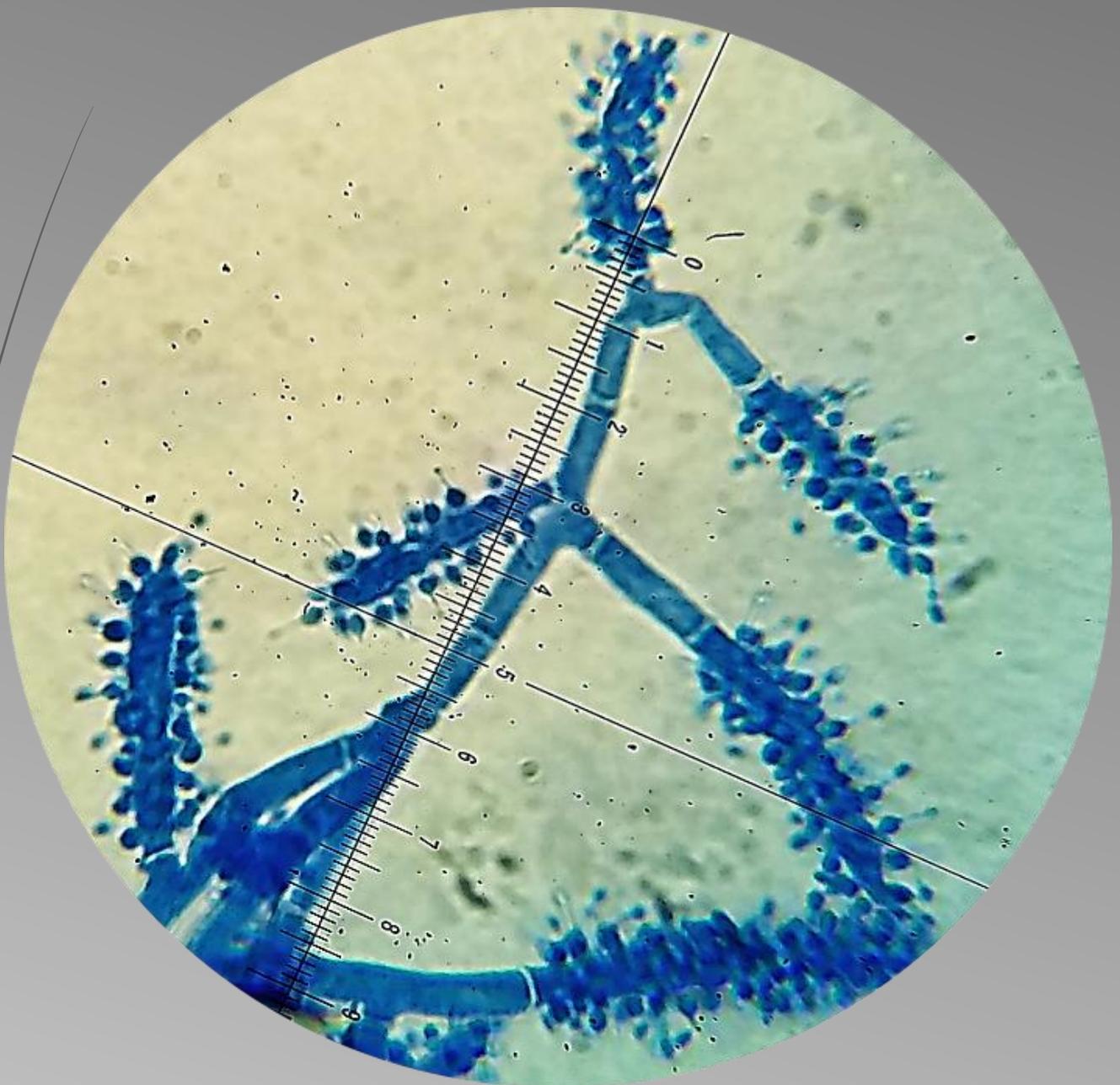
- ✓ PICT-2018-04348. Biocontrol de hormigas cortadoras de hojas: Genómica y secretómica del hongo biocontrolador *Escovopsis* infectando al hongo simbiote de las hormigas cortadoras de hojas para el desarrollo de mejoras de productos biocontroladores. Director: Bich GA. Fecha ejecución: 10-2019 al 05-2023. Monto subsidiado: 410.000,00\$

10 BECA/S Y SUBSIDIO/S CON LOS QUE SE FINANCIÓ LA TESIS

Barengo, MP obtuvo una beca doctoral interna temas estratégicos desde 04/2017 hasta 07/2023 para la realización del presente doctorado.

Los proyectos anteriormente mencionados fueron los principales subsidios que llevaron a cabo el presente plan de doctorado.

ANEXOS



11 ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo.

Para llevar a cabo los distintos ensayos de la presente tesis, se emplearon los medios de cultivo detallados a continuación. Todos ellos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atm de presión superior a la normal, durante 15 min.

- **Agar Dextrosa Papa (PDA)**

Medio de cultivo sólido compuesto por PDA (39 g/L) con el agregado de cloranfenicol 0,02% p/v. Se esterilizó en autoclave y se distribuyó en placas de Petri de 60 y 90 mm de diámetro. Este medio se utilizó para el aislamiento, reactivación y conservación de los aislamientos, como así también para realizar las pruebas de patogenicidad.

- **Agar Czapek Levadura modificado (mCYA)**

Méδιο de cultivo sólido compuesto por KNO_3 (0,03M), K_2HPO_4 ($5,74 \times 10^{-3}$ M), KCl ($6,7 \times 10^{-3}$ M), $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ ($2,02 \times 10^{-3}$ M), $\text{FeSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,7 \times 10^{-4}$ M), $\text{ZnSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ ($8,7 \times 10^{-6}$ M), $\text{CuSO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}$ (2×10^{-5} M), extracto de levadura (5 g/L), dextrosa (30 g/L), y agar (20 g/L). Se esterilizó en autoclave y se distribuyó en placas de Petri de 90 mm de diámetro. Este medio se utilizó en la identificación polifásica, para diferenciar dos especies de *Escovopsis*, en función de la coloración de los conidios, según lo establecido por [75], [172]. Asimismo, se empleó en la reactivación del aislamiento de *Escovopsis* seleccionado para los ensayos de optimización.

- **Agar Agua (AA)**

Medio de cultivo sólido compuesto por agar agua (10 g/L). Se esterilizó en autoclave y se colocó sobre portaobjetos que fueron utilizados para los ensayos de microcultivos.

- **Extracto de Malta (ME)**

Medio de cultivo líquido compuesto por extracto de malta (20 g/L). Fue utilizado para el crecimiento de los aislamientos empleados en la extracción de ADN a partir de micelio fúngico. Se distribuyeron 10 mL de medio en tubos de 50 mL y se esterilizaron en autoclave. Este medio también fue empleado para la obtención de paredes celulares fúngicas, utilizadas como fuente de carbono en los ensayos de optimización de la actividad micolítica. Se distribuyeron 50 mL de medio en frascos erlenmeyers de 250 mL y se esterilizaron en autoclave.

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN a partir de micelio fúngico [175].

1. Filtrar el micelio y lavar con 1 ml de solución de lavado conteniendo, TRIS-HCl 0.1M, EDTA 0.02 M en frío.
2. Centrifugar a 12000 rpm por 3 min, descartar el sobrenadante. Repetir este paso dos veces.
3. Triturar y macerar el tejido con una varilla de plástico en presencia de 1 ml de buffer de extracción compuesto por Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1,5 M, EDTA 50 mM pH 8, Proteinasa K, 0,1mg/ml, β -mercaptoetanol 10 mM, SDS 2%.
4. Incubar a 60 °C por una hora. Luego, agitar con vórtex cada 10 min.
5. Posteriormente centrifugar por 5 min a 12000 rpm y recuperar el sobrenadante. Registrar el volumen recuperado.
6. Adicionar igual volumen de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1). Mezclar mediante vórtex 15 segundos.
7. Centrifugar a 12000 rpm por 3 min. Recuperar el sobrenadante. Repetir una vez más este paso.
8. Adicionar 200 μ l de acetato de potasio 3 M, mezclar por inversión.
9. Centrifugar a 12000 rpm por 3 min. Recuperar el sobrenadante.
10. Precipitar el ADN con 1 ml de isopropanol 100 % durante 24 h.
11. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min. Eliminar el isopropanol.
12. Lavar el precipitado con 1 ml de Etanol 70 %, y centrifugar a 12000 rpm por 5 min.
13. Eliminar el etanol y dejar secar a temperatura ambiente.
14. Finalmente, resuspender en agua destilada libre de nucleasas y almacenar a -20°C.

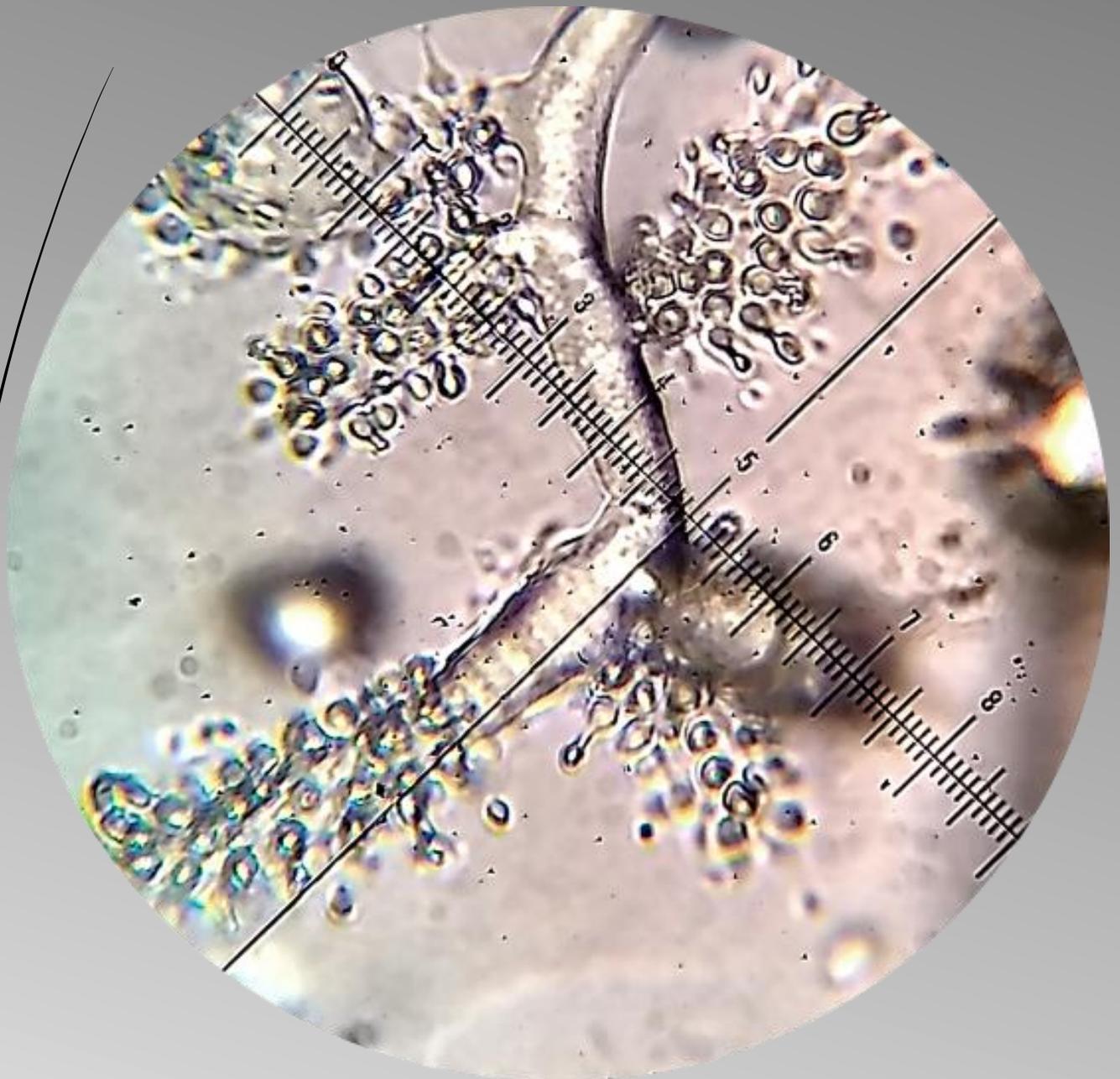
Anexo 3. Lista de aislamientos de *Escovopsis* y *L. gongylophorus* con sus respectivos códigos de cepario del BIOTECMOL.

Aislamientos	Código de cepario
HMP1	LBM269
HMP2	LBM270
HMP3	LBM272
HMP4	LBM271
HMP5	LBM274
HMP6	LBM275
HMP7	LBM273
HMP8	LBM276
HMP9	LBM277
HMP10	LBM278
HMP11	LBM279
173COR	LBM265
136MIG	LBM282

Anexo 4. ANOVA de las fuentes de carbono y nitrógeno, para las actividades proteasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa, en *Escovopsis primorosea* HMP9, con un nivel de 95,0% de confianza.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
Actividad proteasa					
Modelo	719,77	3	239,92	12,19	0,0176
A:Fuente de carbono	648,34	1	648,34	32,93	0,0046
B:Fuente de nitrógeno	62,89	1	62,89	3,19	0,1484
AB	8,54	1	8,54	0,43	0,5462
Error	78,75	4	19,69		
Total	<u>798,53</u>	7			
Actividad β-1,3-glucanasa					
Modelo	12735,24	3	4245,08	17,50	0,0001
A:Fuente de carbono	2186,43	1	2186,43	9,01	0,0110
B:Fuente de nitrógeno	10131,58	1	10131,58	41,76	<0,0001
AB	417,23	1	417,23	1,72	0,2143
Error	2911,17	12	242,60		
Total	15646,41	15			
Actividad quitinasa					
Modelo	53,13	3	17,71	26,31	<0,0001
A:Fuente de carbono	11,58	1	11,58	17,20	0,0014
B:Fuente de nitrógeno	32,64	1	32,64	48,48	<0,0001
AB	8,91	1	8,91	13,24	0,0034
Error	8,08	12	0,67		
Total	61,2	15			

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS



12 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] J. R. Boyle, Planted forests: views and viewpoints, en *Planted Forests: views and viewpoints*, New Forests, 1999, pp. 5-9.
- [2] W. R. Sutton, The need for planted forests and the example of radiata pine, *Planted Forests: Contributions to the Quest for Sustainable Societies*, Springer, 1999. 95-109. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2689-4_8.
- [3] C. A. Izurieta, Estrategia forestal de la provincia de Misiones instrumentos para el diseño de políticas, Ministerio de Economía y Producción, República Argentina, <http://www.lanic.utexas.edu/project/etext/llilas/cpa/spring04/argbrazil/izurieta.pdf>, 2000.
- [4] E. Weber, Densidad básica de madera de *Pinus taeda* L. Marion de diferentes edades, Misiones, Argentina, *Floresta*, 35 (2005). <https://doi.org/10.5380/ef.v35i3.5199>.
- [5] F. Montagnini, B. I. Eibl, y R. Fernández, Adaptabilidad y crecimiento de especies forestales nativas de bosque húmedo subtropical en sitios degradados de Misiones, Argentina, (2005).
- [6] F. Montagnini, B. Eibl, y R. Fernández, Réhabilitation de sols dégradés à Misiones, Argentine, *BOIS & FORETS DES TROPIQUES*, 288 (2006) 51-65.
- [7] S. Cavallaro y C. Fratolocchi, La planificación ecológica del territorio a través del análisis multitemporal en San Ignacio, Misiones, República Argentina, *Ciencias Espaciales*, 8 (2015) 212-230.
- [8] V. G. Teza et al., Estandarización de marcadores moleculares microsatélites para su uso en la industria forestal de Misiones, Argentina, *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14 (2012) 216-223.
- [9] A. Uasuf y J. Hilbert, El uso de la biomasa de Origen Forestal con destino a bioenergía en la Argentina, *Informes Técnicos Bioenergía*, 1 (2012).
- [10] V. H. Dale et al., Climate change and forest disturbances: climate change can affect forests by altering the frequency, intensity, duration, and timing of fire, drought, introduced species, insect and pathogen outbreaks, hurricanes, windstorms, ice storms, or landslides, *BioScience*, 51 (2001) 723-734.
- [11] A. Brechelt, El manejo ecológico de plagas y enfermedades, Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL). Fundación Agricultura y Medio Ambiente (FAMA). RD, (2004).
- [12] Pedrosa Macedo J. E., Monitoreo y detección precoz de las plagas forestales en la República Argentina, 2010. https://nanopdf.com/download/resumen-ejecutivo-ati-226-jose-enrique-pedrosa-macedo_pdf (accedido 28 de septiembre de 2022).
- [13] B. Hölldobler y E. O. Wilson, *The ants*. Harvard University Press, 1990.
- [14] T. R. Schultz y R. Meier, A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae, *Systematic Entomology*, 20 (1995) 337-370. doi: 10.1111/j.1365-3113.1995.tb00100.x.
- [15] N. A. Weber, *Gardening ants the attines*, 1972.
- [16] S. P. Perez, Riesgo potencial de la hormiga cortadora de hojas *Acromyrmex lobicornis* para las plantaciones forestales de la Patagonia, Manejo Integrado de Plagas Forestales, Laboratorio de Ecología de Insectos EEA, INTA, Bariloche, Cuadernillo 6 (2009).
- [17] F. Fernández, A. V. Castro Huertas, y F. J. Serna-Cardona, Hormigas cortadoras de hojas de Colombia: *Acromyrmex* & *Atta* (Hymenoptera: Formicidae), Primera edición, en *Fauna de Colombia*, monografía no. 5. Bogotá, Colombia, 2015.

- [18] T. R. Schultz y S. G. Brady, Major evolutionary transitions in ant agriculture, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (2008) 5435-5440.
- [19] N. A. Weber, Fungus ants, *Social insects*, 4 (1982) 255-363.
- [20] J. Cherrett, The economic importance and control of leaf-cutting ants, *Economic impact and control of social insects*. New York: Praeger, (1986) 165-192.
- [21] N. Vaccaro y J. Mousques, Hormigas cortadoras (géneros *Atta* y *Acromyrmex*) y taurúes en Entre Ríos, *Actas XII Jornadas Forestales de Entre Ríos*. Concordia, Entre Ríos, Argentina, 1997.
- [22] C. Marinho, M. Oliveira, M. Araújo, M. Ribeiro, y T. Della Lucia, Voo nupcial ou revoada de formigas-cortadeiras, *DELLA LUCIA*, (2011) 165-172.
- [23] M. A. Bowers y S. D. Porter, Effect of foraging distance on water content of substrates harvested by *Atta columbica* (Guerin), *Ecology*, 62 (1981) 273-275.
- [24] J. C. Schultz, Tannin-insect Interactions, *Chemistry and significance of condensed tannins* (1989) 417-433.
- [25] A. A. Moreira et al., External and internal structure of *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae) nests, *Journal of Applied Entomology*, 128 (2004) 204-211.
- [26] A. Moreira et al., Nest architecture of *Atta laevigata* (F. Smith, 1858)(Hymenoptera: formicidae), *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 39 (2004) 109-116.
- [27] T. Belt, *The naturalist in Nicaragua; with observations on animals and plants in reference to the theory of the evolution of living things*, London, Murray, 1874, 403p.
- [28] S. Rønvede, J. J. Boomsma, y S. Rosendahl, Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens, *Mycological research*, 108 (2004) 101-106.
- [29] E. A. Diniz y O. C. Bueno, Substrate preparation behaviors for the cultivation of the symbiotic fungus in leaf-cutting ants of the genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae), *Sociobiology*, 53 (2009) 651-666.
- [30] T. M. C. Della Lucia, Hormigas de importancia económica en la región Neotropical, en F. Fernandez (Ed), *Introducción a las Hormigas de la región Neotropical*, Instituto Alexander von Humboldt, Bogota, Colombia, 2003.
- [31] M. Anglada et al., Hormigas podadoras: Estudios bioecológicos y alternativas de manejo en sistemas agrícolas y vegetación de monte en Entre Ríos, *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 3 (2013) 1-19.
- [32] E. Amante, Prejuízos causados pela formiga saúva em plantações de *Eucalyptus* e *Pinus* no Estado de São Paulo, *Silvicultura em São Paulo*, 6 (1967) 355-363.
- [33] R. Zanetti et al., An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations, *Forests*, 5 (2014) 439-454.
- [34] L. Forti y M. A. C. Boaretto, *Formigas cortadeiras: biologia, ecologia, danos e controle*, Botucatu: Departamento de Defesa Fitossanitária, Universidade Estadual Paulista, (1997) 61p.
- [35] J. Montoya-Lerma et al., Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control, *International Journal of Pest Management*, 58 (2012) 225-247.
- [36] C. E. Bisognin et al., Plano de amostragem de *Acromyrmex* spp. (Hymenoptera: Formicidae) em áreas de pré-plantio de *Pinus* spp, *Ciência Rural*, 36 (2006).
- [37] J. F. Barrera, Manejo holístico de plagas: Más allá del MIP, presentado en XXX Congreso Nacional de Control Biológico/Simposio del IOBC, noviembre. Mérida, Yucatán, México, 2007, 18p.
- [38] J. S. de Britto et al., Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*, *International Journal of Research in Environmental Studies*, (2016) 11-92. doi.org/10.33500/ijres.2016.3.002.

- [39] M. Ricci et al., Hormigas argentinas: comportamiento, distribución y control, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2005.
- [40] R. S. Camargo, L. C. Forti, J. F. Lopes, y N. S. Nagamoto, Studies on leaf-cutting ants, *Acromyrmex* spp. (Formicidae, Attini): behavior, reproduction and control, Recent research developments in entomology, 5 (2006) 1-21.
- [41] N. S. Nagamoto, L. C. Forti, y C. G. Raetano, Evaluation of the adequacy of diflubenzuron and dechlorane in toxic baits for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) based on formicidal activity, Journal of Pest Science, 80 (2007) 9-13.
- [42] D. Torres y T. Capote, Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental, Ecosistemas, 13 (2004).
- [43] A. M. del Puerto Rodríguez, S. Suárez Tamayo, y D. E. Palacio Estrada, Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud, Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 52 (2014) 372-387.
- [44] R. Alatorre et al., Manejo integrado de plagas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Subsecretaría de Desarrollo Rural, Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural, (2000) 12p.
- [45] M. Blanco, Las Feromonas y sus usos en el manejo integrado de plagas, Manejo integrado de plagas y agroecología, 71 (2004) 112-118.
- [46] R. F. Smith, Principles, definitions and scope of integrated pest control, en Proc. FAO Symp. Integrated Pest Control, 1 (1966) 11-17.
- [47] C. Guédez et al., Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible, Academia, 7 (2008) 50-74.
- [48] C. I. Nicholls, Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Universidad de Antioquia, 2008, pp. 58-59.
- [49] D. Fischbein, Introducción a la teoría del control biológico de plagas, Villacide, J. & J. Corley (Eds.), Serie técnica: "Manejo Integrado de Plagas Forestales", 15 (2012) 1-21.
- [50] P. Shah y J. Pell, Entomopathogenic fungi as biological control agents, Applied microbiology and biotechnology, 61 (2003) 413-423.
- [51] E. López et al., Primer registro de *Metarhizium anisopliae* infectando reinas de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) en Colombia, Revista Colombiana de Entomología, 25 (1999) 49-56.
- [52] M. Verma et al., Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control, Biochemical Engineering Journal, 37 (2007) 1-20.
- [53] M. Soler, Capítulo 12: Coevolución, Evolución: La base de la biología. Coord. Manuel Soler. Ed. Proyecto Sur, España, 2002.
- [54] C. R. Currie et al., Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis, Science, 299 (2003) 386-388.
- [55] S. S. V. Haifig, Natureza do parasitismo de *Escovopsis* e *Escovopsioides* sobre *Leucoagaricus gongylophorus*, fungos associados aos jardins de formigas cortadeiras, Maestría en Ciencias Biológicas, Universidade Estadual Paulista, 2014. Disponible en: <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/110413>.
- [56] A. V. Santos et al., Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* rubropilosa, FEMS microbiology letters, 239 (2004) 319-323.
- [57] I. E. Moller et al., The dynamics of plant cell-wall polysaccharide decomposition in leaf-cutting ant fungus gardens, PLoS One, 6 (2011) e17506.
- [58] F. O. Aylward et al., Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens, The ISME journal, 6 (2012) p.1688.

- [59] R. J. Quinlan y J. M. Cherrett, The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.), *Ecological Entomology*, 4 (1979) 151-160.
- [60] A. Silva et al., Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources, *Journal of Insect Physiology*, 49 (2003) 307-313.
- [61] F. C. Pagnocca, A. Rodrigues, y M. Bacci Jr, Microrganismos associados às formigas-cortadeiras, DELLA LUCIA, TMC Formigas cortadeiras: da biologia ao manejo. Viçosa-MG: UFV, (2011) 263-283.
- [62] I. Jiménez Gómez, Interação patógeno-hospedeiro na fungicultura das formigas atíneas derivadas, Tesis de Maestría, Universidade Estadual Paulista, 2017. Disponible en: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150676>
- [63] J. Muchovej y T. Della Lucia, *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum, *Mycotaxon*, 37 (1990) 191-195.
- [64] K. A. Seifert, R. A. Samson, y I. H. Chapela, *Escovopsis aspergilloides*, a Rediscovered Hyphomycete from Leaf-Cutting Ant Nests, *Mycologia*, 87 (1995) 407. doi: 10.2307/3760838.
- [65] U. G. Mueller, Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis, *the american naturalist*, 160 (2002) S67-S98.
- [66] S. A. Van Bael, C. Estrada, y W. T. Wcislo, Fungal-fungal interactions in leaf-cutting ant agriculture, *Psyche: A Journal of Entomology*, 2011 (2011).
- [67] A. L. Marsaro Junior et al., Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens* rubropilosa Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* Pers. Fr., *Neotropical Entomology*, 30 (2001) 403-406.
- [68] H. Fernández-Marín et al., Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273 (2006) 1689-1695.
- [69] A. Rodrigues et al., Microfungal "Weeds" in the Leafcutter Ant Symbiosis, *Microbial Ecology*, 56 (2008) 604-614. doi: 10.1007/s00248-008-9380-0.
- [70] C. R. Currie, U. G. Mueller, y D. Malloch, The agricultural pathology of ant fungus gardens, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (1999) 7998-8002.
- [71] C. Currie, A. Bot, y J. J. Boomsma, Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites, *Oikos*, 101 (2003) 91-102.
- [72] F. C. Pagnocca, V. E. Masiulionis, y A. Rodrigues, Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants, *Psyche*, 2012 (2012) 1-9.
- [73] C. R. Currie y A. E. Stuart, Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268 (2001) 1033-1039.
- [74] J. O. Augustin et al., Yet More "Weeds" in the Garden: Fungal Novelties from Nests of Leaf-Cutting Ants, *PLoS ONE*, 8 (2013) e82265. doi: 10.1371/journal.pone.0082265.
- [75] J. A. Marfetan et al., Five new *Escovopsis* species from Argentina, *Mycotaxon*, 133 (2019) 569-589. doi: 10.5248/133.569.
- [76] A. Möller, Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. G. Fischer, Jena, Germany, 1893.
- [77] H. Kreisel, Pilze aus Pilzgärten von *Atta insularis* in Kuba, *Journal of Basic Microbiology*, 12 (1972) 643-654.

- [78] N. Weber, Fungus-growing ants and soil nutrition, E. H. Rapoport (Ed.) Actas 1st Coloquio Latinoamericano Biología del Suelo, Bahia Blanca, Argentina, 1966, pp.222-256.
- [79] V. E. Masiulionis et al., *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*, Antonie van Leeuwenhoek, 107 (2015) 731-740. doi: 10.1007/s10482-014-0367-1.
- [80] L. A. Meirelles et al., New Light on the Systematics of Fungi Associated with Attine Ant Gardens and the Description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov., PloS one, 10 (2015) e0112067.
- [81] Q. V. Montoya, M. J. S. Martiarena, y D. A. Polezel, More pieces to a huge puzzle: Two new *Escovopsis* species from fungus gardens of attine ants, MycoKeys, (2019) 97.
- [82] A. Araújo et al., Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98 (2003) 5-11.
- [83] J. E. Patterson y K. E. Ruckstuhl, Parasite infection and host group size: a meta-analytical review, Parasitology, 140 (2013) 803-813.
- [84] C. R. Currie, Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism., Oecologia, 128 (2001).
- [85] U. G. Mueller et al., The evolution of agriculture in insects, Annual review of ecology, evolution, and systematics, (2005) 563-595.
- [86] A. Bot, C. Currie, A. Hart, y J. J. Boomsma, Waste management in leaf-cutting ants, Ethology Ecology & Evolution, 13 (2001) 225-237.
- [87] A. E. F. Little et al., Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens, Biology Letters, 2 (2006) 12-16, doi: 10.1098/rsbl.2005.0371.
- [88] H. T. Reynolds y C. R. Currie, Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The Parasite of the Attine Ant-Microbe Symbiosis Directly Consumes the Ant-Cultivated Fungus, Mycologia, 96 (2004) 955. doi: 10.2307/3762079.
- [89] S. J. Taerum et al., Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis, Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 274 (2007) 1971-1978. doi: 10.1098/rspb.2007.0431.
- [90] P. Jeffries, Biology and ecology of mycoparasitism, Canadian journal of botany, 73 (1995) 1284-1290.
- [91] H. Barnett y F. Binder, The fungal host-parasite relationship, Annual review of phytopathology, 11 (1973) 273-292.
- [92] J. A. Marfetán, A. I. Romero, y P. J. Folgarait, Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved and virulence levels, Fungal Ecology, 17 (2015) 52-61, doi: 10.1016/j.funeco.2015.04.002.
- [93] M. Ezziyani, et al., Control biológico por microorganismos antagonistas, Revista Horticultura, 191 (2006) 8-15.
- [94] M. Karlsson et al., Necrotrophic Mycoparasites and Their Genomes., Microbiol Spectr, 5 (2017). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0016-2016.
- [95] J. de la Cruz Díaz, Purificación y caracterización de hidrolasas implicadas en el microparasitismo de *Trichoderma harzianum*, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, España, 1994. Disponible en <https://idus.us.es/handle/11441/15805>.
- [96] S. M. Bowman y S. J. Free, The structure and synthesis of the fungal cell wall, BioEssays, 28 (2006) 799-808. doi: 10.1002/bies.20441.
- [97] P. J. Kuhn et al., Biochemistry of cell walls and membranes in fungi. Springer Science & Business Media, 2012.

- [98] I. Chet et al., Biological control of soil-borne plant pathogens by *Trichoderma harzianum*, In: Gams W (ed.) Academic Press, Soil-borne plant pathogens. Schippers B, London, (1979) 585–592.
- [99] I. Chet, y R. Baker, Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*, *Phytopathology*, 71 (1981) 286-290.
- [100] J. C. Kapteyn, H. Van Den Ende, y F. M. Klis, The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1426 (1999) 373-383.
- [101] T. H. Nguyen, G. H. Fleet, y P. L. Rogers, Composition of the cell walls of several yeast species, *Applied microbiology and biotechnology*, 50 (1998) 206-212.
- [102] S. Bartnicki-Garcia, Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi, *Annual Reviews in Microbiology*, 22 (1968) 87-108.
- [103] H. de Nobel, H. van den Ende, y F. M. Klis, Cell wall maintenance in fungi, *Trends in microbiology*, 8 (2000) 344-345.
- [104] B. Bago et al., Effect of Nikkomycin Z, a chitin-synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two arbuscular-mycorrhizal fungi, *Protoplasma*, 192 (1996) 80-92.
- [105] C. A. Specht et al., The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis, *Fungal Genetics and Biology*, 20 (1996) 153-168.
- [106] A. F. Estrella y I. Chet, Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi, in: A Altman (Ed) *Agricultural biotechnology*. Marcel Dekker, New York, 1998, pp.263-282.
- [107] M. Lorito et al., Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase, *Phytopathology*, 83 (1993) 302-307.
- [108] M. Lorito et al., Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1, 3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*, *Phytopathology*, 84 (1994) 398-405.
- [109] L. F. Fleuri, 'Beta'-1,3 glucanases, proteases e quitinasas: produção, purificação e aplicação, Doctoral dissertation, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2006. Disponible en: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254343>
- [110] A. Schuster y M. Schmoll, Biology and biotechnology of *Trichoderma*, *Applied microbiology and biotechnology*, 87 (2010) 787-799.
- [111] R. M. Ram et al., Biocontrol technology: eco-friendly approaches for sustainable agriculture, en *Omics technologies and bio-engineering*, Elsevier, 2018, pp.177-190.
- [112] M. V. Deshpande, Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges, *Critical Reviews in Microbiology*, 25 (1999) 229-243. doi: 10.1080/10408419991299220.
- [113] C. A. Nunes, Biological control of postharvest diseases of fruit, *European Journal of Plant Pathology*, 133 (2012) 181-196.
- [114] S. Droby et al., Possible modes of action of yeast antagonists of postharvest diseases, *Bulletin OILB SROP (France)*, 16 (1993) 186-189.
- [115] S. M. Arevalo Chávez, Optimización de la producción del agente de biocontrol *Candida sake* (CPA-1), Tesis Doctoral, Universitat de Lleida, 1998.
- [116] B. Martínez, D. Infante, y B. Peteira, Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*, *Revista de Protección Vegetal*, 30 (2015).
- [117] R. R. Colwell, Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species, *Journal of Bacteriology*, 104 (1970) 410-433.
- [118] Á. Valverde Portal, Taxonomía Polifásica de Poblaciones de microorganismos que establecen simbiosis con *Phaseolus vulgaris*, Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, 2003.

- [119] M. S. Tigano-Milani et al., DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*, *Microbiology*, 141 (1995) 239-245.
- [120] N. Pérez y L. L. Vázquez, Manejo ecológico de plagas, Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural - CEDAR, La Habana, Cuba, 2004, p.296.
- [121] A. N. Hernández-Lauzardo et al., Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos, *Revista mexicana de fitopatología*, 25 (2007) 66-74.
- [122] F. Sucaticona, Actividad antagónica in vitro de los hongos *Trichoderma* spp y *Lecanicillium* spp. frente al hongo de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*) en condiciones de laboratorio, PhD Thesis, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú. (2018) p.87.
- [123] A. R. Robles Carrión, Uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades de cultivos, Centro de biotecnología, (2012), 34-43.
- [124] M. Petruccioli et al., Effect of stirrer speed and buffering agents on the production of glucose oxidase and catalase by *Penicillium variable* (P16) in benchtop bioreactor, *Enzyme and Microbial Technology*, 17 (1995) 336-339. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00030-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00030-1).
- [125] Y. Park et al., Effect of culture temperature and dissolved oxygen concentration on expression of α -amylase gene in batch culture of spore-forming host, *Bacillus subtilis* 1A289, *Journal of fermentation and bioengineering*, 84 (1997) 53-58.
- [126] R. L. Tate III, *Handbook of Applied Mycology. Soil and Plants. Soil Science*, 152 (1991) 487.
- [127] C. Sandhya et al., Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation, *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 44 (2994) 49-58.
- [128] K. Todar, *Nutrition and growth of bacteria*, University of Wisconsin-Madison, 2013.
- [129] F. Persello-Cartieaux, L. Nussaume, y C. Robaglia, Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions, *Plant, Cell & Environment*, 26 (2003) 189-199.
- [130] R. Núñez, Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos, Tesis Doctoral, Universidad de La Habana, Cuba, 2003.
- [131] V. Cheyner et al., Application of response surface methodology to evaluation of bioconversion experimental conditions, *Applied and environmental microbiology*, 45 (1983) 634-639.
- [132] A. S. Wasli et al., Medium optimization for chitinase production from *Trichoderma virens* using central composite design, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14 (2009) 781-787.
- [133] C. D. Hendrix, Through the response-surface with test tube and pipe wrench, *Chemtech*, 10 (1980) 488-497.
- [134] M. A. Teruel, Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-carrageenan immobilized *Streptomyces aureofaciens*, *Enzyme and microbial technology*, 21 (1997) 314-320.
- [135] S.-L. Lee y W.-C. Chen, Optimization of medium composition for the production of glucosyltransferase by *Aspergillus niger* with response surface methodology, *Enzyme and Microbial Technology*, 21 (1997) 436-440.

- [136] C. J. Silva y I. C. Roberto, Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology, *Process Biochemistry*, 36 (2001) 1119-1124.
- [137] G. Dey et al., Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology, *Biochemical Engineering Journal*, 7 (2001) 227-231.
- [138] P. L. Wejse, K. Ingvorsen, y K. K. Mortensen, Xylanase production by a novel halophilic bacterium increased 20-fold by response surface methodology, *Enzyme and Microbial Technology*, 32 (2003) 721-727.
- [139] E. Kristo, C. G. Biliaderis, y N. Tzanetakis, Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology, *Food chemistry*, 83 (2003) 437-446.
- [140] C. Liyana-Pathirana y F. Shahidi, Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology, *Food chemistry*, 93 (2005) 47-56.
- [141] F. Chen et al., Optimizing conditions for the purification of crude octacosanol extract from rice bran wax by molecular distillation analyzed using response surface methodology, *Journal of food engineering*, 70 (2005) 47-53.
- [142] M. Elibol, Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) with response surface methodology, *Process Biochemistry*, 39 (2004) 1057-1062.
- [143] M. Kuddus, Statistical optimization of cold-active chitinase production by mutagenized cells of multi-enzyme producing *Bacillus cereus* GA6, *Rendiconti Lincei*, 26 (2015) 271-280.
- [144] G. Dukariya y A. Kumar, Distribution and biotechnological applications of chitinase: A review, *Int. J. Biochem. Biophys*, 8 (2020) 17-29.
- [145] K. Sanjeev, T. Manibhushan, y R. Archana, *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases, *African journal of agricultural research*, 9 (2014) 3838-3852.
- [146] M. Huaraca Espinoza, Evaluación de tres Sistemas de Fermentación para producir Celulasa a partir de Suero de Leche y *Aspergillus niger*, UNAMBA, Abancay, Perú, 2019.
- [147] D. J. Hernández-Melchor et al., *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial, *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35 (2019) 98-112. doi: 10.4067/S0719-38902019005000205.
- [148] K. Gupta et al., Solid state fermentation with recovery of Amyloglucosidase from extract by direct immobilization in cross linked enzyme aggregate for starch hydrolysis, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4 (2015) 486-492.
- [149] C. N. García-Espejo et al., Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador, *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7 (2016) 20-32.
- [150] M. A. Jackson, Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19 (1997) 180-187.
- [151] T. Benítez et al., Características de levaduras y hongos filamentosos de interés en agroalimentación ¿Adaptación al ambiente?, *Actualidad*, 41 (2006) 17-27.
- [152] M. Azin, R. Moravej, y D. Zareh, Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method, *Enzyme and microbial technology*, 40 (2007) 801-805.

- [153] A. M. Vásquez Vanegas, Producción de xilanasas por *Aspergillus* sp.: en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido, Tesis de maestría, Universidad Iberoamericana Ciudad de México, 2013.
- [154] V. Olmedo-Monfil et al., Multiple environmental signals determine the transcriptional activation of the mycoparasitism related gene *prb1* in *Trichoderma atroviride*, *Molecular Genetics and Genomics*, 267 (2002) 703-712.
- [155] M. Mandels y E. T. Reese, Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals, *Journal of Bacteriology*, 73 (1957) 269.
- [156] M. Mandels, Microbial sources of cellulase, en *Biotechnology and bioengineering symposium*, (1975) 81-105.
- [157] N. D. Daranagama et al., Proteolytic analysis of *Trichoderma reesei* in cellulase-inducing condition reveals a role for trichoderma pepsin (TrAsP) in cellulase production, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 46 (2019) 831-842.
- [158] M. P. Barenco et al., Standardization of the azocasein quantitative method to determine the proteolytic activity in fungal supernatants of *Escovopsis* and *Trichoderma*, *Bioteconología Aplicada*, 37 (2020) 2201-2206.
- [159] Y. Elad, I. Chet, y Y. Henis, Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*, *Canadian Journal of Microbiology*, 28 (1982) 719-725.
- [160] Y. Elad, R. Barak, y I. Chet, Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*, *Soil Biology and Biochemistry*, 16 (1984) 381-386.
- [161] R. A. Geremia et al., Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*, (1993) 12.
- [162] G. D. Inglis y L. M. Kawchuk, Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi, *Canadian Journal of Microbiology*, 48 (2002) 60-70. doi: 10.1139/w01-130.
- [163] Ó. Goñi Ramos, M. I. Escribano Garaizabal, y C. Merodio Moreno, Aislamiento, caracterización y funcionalidad de quitinasas y 1,3- β -glucanasas inducidas diferencialmente en frutos de *Annona cherimola* Mill por bajas temperaturas y elevadas concentraciones de CO₂. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2011. Disponible en: <http://site.ebrary.com/id/10515181>
- [164] A. Sivan y I. Chet, Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*, *Microbiology*, 135 (1989) 675-682.
- [165] B.-W. Zhu et al., Purification and partial characterization of a novel β -1,3-glucanase from the gut of sea cucumber *Stichopus japonicus*, *Process Biochemistry*, 43 (2008) 1102-1106.
- [166] T. Larsen et al., Characterization of a novel *Salmonella typhimurium* chitinase which hydrolyzes chitin, chitooligosaccharides and an N-acetyllactosamine conjugate, *Glycobiology*, 21 (2011) 426-436. doi: 10.1093/glycob/cwq174.
- [167] C. Carsolio et al., Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (1994) 10903-10907.
- [168] J. De La Cruz et al., Carbon source control on β -glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*, *Archives of Microbiology*, 159 (1993) 316-322.
- [169] S. S. Varanda-Haifig et al., Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants, *Antonie van Leeuwenhoek*, 110 (2017) 593-605, doi: 10.1007/s10482-016-0826-y.
- [170] A. Silva et al., Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi, *Mycopathologia*, 162 (2006) 115-119.

- [171] T. J. B. de Man et al., Small genome of the fungus *Escovopsis weberi*, a specialized disease agent of ant agriculture, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (2016) 3567-3572, doi: 10.1073/pnas.1518501113.
- [172] L. A. Meirelles, Sistemática e filogenia do fungo parasita *Escovopsis* associado às formigas Attini, Maestría en Ciencias Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2015. Disponible en: <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/134060>
- [173] D. S. Hibbett et al., A higher-level phylogenetic classification of the Fungi, *Mycological Research*, 111 (2007) 509-547. doi: 10.1016/j.mycres.2007.03.004.
- [174] C. L. Schoch et al., Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (2012) 6241-6246.
- [175] M. I. Fonseca, Utilización de hongos de pudrición blanca de Misiones en procesos de biopulpado: Aspectos bioquímicos y moleculares de sistemas ligninolíticos involucrados y prospección biotecnológica, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Tucuman, Tucuman, 2012.
- [176] T. J. White, T. Bruns, S. Lee, y J. Taylor, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18 (1990) 315-322.
- [177] R. Acevedo, Control biológico de la pudrición blanca del ajo (*Sclerotium cepivorum* Berk) utilizando el micoparasitismo *Trichoderma* spp, Trabajo de ascenso, Universidad Nacional Experimental de Táchira. San Cristóbal, Venezuela, 1995.
- [178] M. Castrillo et al., Capacidad biocontroladora de aislamientos nativos de *Trichoderma* sp. contra el hongo fitopatógeno *Alternaria alternata*, aislado de yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hil.), *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 37 (2021) 244-256.
- [179] D. E. E. Wallace, J. G. V. Asensio, y A. A. P. Tomás, Correlation between virulence and genetic structure of *Escovopsis* strains from leaf-cutting ant colonies in Costa Rica, *Microbiology*, 160 (2014) 1727-1736.
- [180] J. G. Aquino-Martínez, L. M. Vázquez-García, y B. G. Reyes-Reyes, Biocontrol in vitro e in vivo de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. dianthi (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. Con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México, *Revista mexicana de fitopatología*, 26 (2008) 127-137.
- [181] A. Clavijo y A. M. Cotes, Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici en tomate, mediante fitoinvigorización de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*, *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1 (1998) 58-66.
- [182] J. Charney y R. M. Tomarelli, A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice, *Journal of Biological Chemistry*, 171 (1947) 501-505.
- [183] E. I. Masih y B. Paul, Secretion of β -1, 3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine, *Current microbiology*, 44 (2002) 391-395.
- [184] C.-M. Wen et al., Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35 (2002) 213-219.
- [185] J. L. De Marco et al., A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa, *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (2000) 383-386.

- [186] K.-J. Kim, Y.-J. Yang, y J.-G. Kim, Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20, *BMB Reports*, 36 (2003) 185-189.
- [187] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *nature*, 227 (1970) 680-685.
- [188] K. Murugesan et al., Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture, *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (2007) 1662-1672.
- [189] M. H. Badii et al., Formas de evaluar los enemigos naturales en control biológico, *CULCyT: Cultura Científica y Tecnológica*, 1 (2004) 1.
- [190] M. H. Badii y J. L. Abreu, Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control), *Daena: international journal of good conscience*, 1 (2006) 82-89.
- [191] J. S. Pereira et al., Comparative analysis of fungal communities in colonies of two leaf-cutting ant species with different substratum preferences, *Fungal Ecology*, 21 (2016) 68-75. doi: 10.1016/j.funeco.2016.03.004.
- [192] M. Bacci et al., Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*, *Brazilian journal of medical and biological research*, 28 (1995) 79-82.
- [193] A. Rodrigues et al., Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungi garden pathogens of leaf-cutting ants, *Antonie van Leeuwenhoek*, 96 (2009) 331-342.
- [194] N. M. Gerardo et al., Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271 (2004) 1791-1798. doi: 10.1098/rspb.2004.2792.
- [195] A. Rodrigues et al., Ecology of microfungi communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas, *FEMS Microbiology Ecology*, 78 (2011) 244-255.
- [196] P. Vandamme et al., Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, *Microbiological reviews*, 60 (1996) 407-438.
- [197] T. Coenye et al., Towards a prokaryotic genomic taxonomy, *FEMS microbiology reviews*, 29 (2005) 147-167.
- [198] X. Lai et al., Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea, *The ISME Journal*, 1 (2007) 756-762.
- [199] D. Begerow et al., Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures, *Applied microbiology and biotechnology*, 87 (2010) 99-108.
- [200] E. Bellemain et al., ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases, *BMC microbiology*, 10 (2010) 1-9.
- [201] J. Sonnenbichler, J. Dietrich, y H. Peipp, Secondary ungal metabolites and their biological activities, V. Investigations concerning the induction of the biosynthesis of toxic secondary metabolites in Basidiomycetes, 375 (1994) 71-80. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1994.375.1.71>.
- [202] R. H. Baltz, A. L. Demain, y J. E. Davies (Eds), *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, 3rd ed., American Society for Microbiology Press, Washington DC, 2010.
- [203] S. Tsujiyama y M. Minami, Production of phenol-oxidizing enzymes in the interaction between white-rot fungi, *Mycoscience*, 46 (2005) 268-271.
- [204] N. M. Gerardo et al., Ancient Host–Pathogen Associations Maintained by Specificity of Chemotaxis and Antibiosis, *PLoS Biology*, 4 (2016) e235. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040235>.

- [205] P. J. Folgarait, J. A. Marfetan, y M. J. Cafaro, Growth and Conidiation Response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) Against the Fungal Cultivar of *Acromyrmex lundii*; (Hymenoptera: Formicidae), *Environmental Entomology*, 40 (2011) 342-349. <https://doi.org/10.1603/EN10111>.
- [206] P. Folgarait et al., Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents, *Current microbiology*, 63 (2011) 250.
- [207] G. A. Zentmyer, Chemotaxis of zoospores for root exudates, *Science*, 133 (1961) 1595-1596.
- [208] B. M. Zuckerman y H.-B. Jansson, Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition, *Annual review of phytopathology*, 22 (1984) 95-113.
- [209] I. Chet y J. Inbar, Biological control of fungal pathogens, *Applied biochemistry and biotechnology*, 48 (1994) 37-43.
- [210] V. Gadkar et al., Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition, *Plant physiology*, 127 (2001) 1493-1499.
- [211] F. A. Ditengou et al., Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture, *Nature communications*, 6 (2015) 1-9.
- [212] B. C. Custodio y A. Rodrigues, *Escovopsis kreiselii* specialization to its native hosts in the fungiculture of the lower attine ant *Mycetophylax morschi*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 112 (2019) 305-317. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1158-x>.
- [213] V. E. Masiulionis y F. C. Pagnocca, In vitro study of volatile organic compounds produced by the mutualistic fungus of leaf-cutter ants and the antagonist *Escovopsis*, *Fungal Ecology*, 48 (2020) 100986.
- [214] N. M. Gerardo y E. J. Caldera, Labile associations between fungus-growing ant cultivars and their garden pathogens, *The ISME journal*, 1 (2007) 373.
- [215] M. Poulsen et al., Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: Parasite-defence interactions in leaf-cutting ants, *Environmental Microbiology Reports*, 2 (2019) 534-540. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00098.x>.
- [216] M. J. Cafaro et al., Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278 (2011) 1814-1822. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2118>.
- [217] S. S. Birnbaum y N. M. Gerardo, Patterns of specificity of the pathogen *Escovopsis* across the fungus-growing ant symbiosis, *The American Naturalist*, 188 (2016) 52-65.
- [218] R. Bizarria Jr, N. S. Nagamoto, y A. Rodrigues, Lack of fungal cultivar fidelity and low virulence of *Escovopsis trichodermoides*, *Fungal Ecology*, 45 (2020) 100944.
- [219] B. Dhodary et al., Secondary Metabolites from *Escovopsis weberi* and Their Role in Attacking the Garden Fungus of Leaf-Cutting Ants, *Chemistry – A European Journal*, 24 (2018) 4445-4452. <https://doi.org/10.1002/chem.201706071>.
- [220] D. Heine et al., Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen, *Nature Communications*, 9 (2018) 1-11.
- [221] H. Barnett, Mycoparasitism, *Mycologia*, 56 (1964) 1-19.
- [222] F. B. dos R. Almeida et al., Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production, *Biotechnology letters*, 29 (2007) 1189-1193.
- [223] M. P. Barengo et al., Estandarización del método cuantitativo de azocaseína para determinar la actividad proteolítica en sobrenadantes fúngicos de *Escovopsis* y *Trichoderma*, *Biotecnología Aplicada*, 37 (2020) 2201-2206..

- [224] M. J. North, Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms., *Microbiological Reviews*, 46 (1982) 308.
- [225] M. Lorito et al., Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination, *Microbiology*, 140 (1994) 623-629.
- [226] M. Schirmböck et al., Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi, *Applied and environmental microbiology*, 60 (1994) 4364-4370.
- [227] N. J. Velloorvalappil et al., Versatility of microbial proteases, *Advances in enzyme research*, 1 (2013) 39-51.
- [228] S. C. Ferreira et al., Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Analytica chimica acta*, 597 (2007) 179-186.
- [229] P. da Silva Delabona et al., Experimental mixture design as a tool to enhance glycosyl hydrolases production by a new *Trichoderma harzianum* P49P11 strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation, *Bioresource technology*, 132 (2013) 401-405.
- [230] R. Subramaniam y R. Vimala, Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study, *International Journal of Science and Nature*, 3 (2012) 480-486.
- [231] C. R. Soccol et al., Recent developments and innovations in solid state fermentation, *Biotechnology Research and Innovation*, 1 (2017) 52-71.
- [232] S. R. Pérez et al., Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos, *Afinidad*, 74 (2017).
- [233] G. Bhanu Prakash et al., Expression of chitinase genes of *Metarhizium anisopliae* isolates in lepidopteran pests and on synthetic media, *Journal of Basic Microbiology*, 52 (2012) 628-635.
- [234] K. G. F. Chávez et al., Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas, *Sociedades rurales, producción y medio ambiente*, (2014) 143-160.
- [235] M. El-Katatny, Characterization of a chitinase and an endo- β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (2001) 137-143.
- [236] N. Markovich y G. Kononova, Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39 (2003) 341-351.
- [237] V. Seidl, Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions, *Fungal Biology Reviews*, 22 (2008), <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.03.002>.
- [238] J. E. Paredes Escalante et al., Enzimas Líticas Producidas por *Trichoderma* spp. y su Correlación con la Inhibición in vitro de Patógenos Causantes de la Pudrición de la Raíz del Garbanzo, *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29 (2011) 73-75.
- [239] A. Viterbo et al., Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203), *Current Genetics*, 42 (2002) 114-122.
- [240] Y. Daguerre et al., Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review, *Fungal biology reviews*, 28 (2014) 97-125.

- [241] H. Banani et al., Biocontrol activity of an alkaline serine protease from *Aureobasidium pullulans* expressed in *Pichia pastoris* against four postharvest pathogens on apple, International Journal of Food Microbiology, 182 (2014) 1-8.
- [242] A. C. Michel-Aceves et al., Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp, en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* in vitro, Revista Chapingo Serie Horticultura, 11 (2005).
- [243] A. Tronsmo y G. E. Harman, Coproduction of chitinolytic enzymes and biomass for biological control by *Trichoderma harzianum* on media containing chitin, Biological Control, 2 (1992) 272-277.
- [244] A. Kapat, S. Rakshit, y T. Panda, Optimization of carbon and nitrogen sources and the environmental conditions for the production of chitinase using *Trichoderma harzianum*, Bioproc Eng, 15 (1996) 13-20.
- [245] A. S. Mikheyev, U. G. Mueller, y P. Abbot, Comparative dating of attine ant and *Lepiotaceous* cultivar phylogenies reveals coevolutionary synchrony and discord, The American Naturalist, 175 (2010) E126-E133.
- [246] E. A. Schoffemeer et al., The cell wall of *Fusarium oxysporum*, Fungal Genetics and Biology, 27, (1999) 275-282.
- [247] N. Rattanakit et al., Utilization of shrimp shellfish waste as a substrate for solid-state cultivation of *Aspergillus* sp. S1-13: evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin-assimilation, Journal of bioscience and bioengineering, 93 (2002) 550-556.
- [248] D. Dienes et al., Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414, Enzyme and Microbial Technology, 40 (2007) 1087-1094.
- [249] V. Vijay Kalaskar et al., Optimization of extracellular acid protease production from *Aspergillus niger* by factorial design, Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 04 (2014) 132-136. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2014.4.2.132-136>.
- [250] C. Larroche, Microbial growth and sporulation behaviour in solid state fermentation, Journal of scientific & industrial research, 55 (1996) 408-423.
- [251] P. Jenssen, K. Peek, y H. Morgan, Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A, Applied Microbiology and Biotechnology, 41(1994) 400-406.
- [252] W. C. A. do Nascimento y M. L. L. Martins, Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp, Brazilian journal of microbiology, 35 (2004) 91-96.
- [253] R. Banerjee (Ed), Chemistry and Biochemistry of B12. John Wiley & Sons, 1999.
- [254] R. K. Singh et al., Optimization of media components for chitinase production by chickpea rhizosphere associated *Lysinibacillus fusiformis* B-CM18, Journal of basic microbiology, 53 (2013) 451-460.
- [255] F. Abidi, F. Limam, y M. N. Marzouki, Purification and characterization of an alkaline protease prot 1 *Frombotrytis cinerea*, Applied biochemistry and biotechnology, 141(2007) 361-376.
- [256] W. Ebeling et al., Proteinase K from *Tritirachium album* limber, European Journal of Biochemistry, 47 (1974) 91-97.
- [257] S. Haran et al., Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism, Phytopathology, 86 (1996) 980-985.
- [258] H. S. Oberoi, R. Rawat, y B. S. Chadha, Response surface optimization for enhanced production of cellulases with improved functional characteristics by newly isolated *Aspergillus niger* HN-2, Antonie van Leeuwenhoek, 105 (2014) 119-134.

- [259] P. Aleksieva et al., Submerged cultivation of a strain of *Humicola lutea* 72 producing acid protease, *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 13 (1981) 165-169.
- [260] S. U. Phadatare, V. V. Deshpande, y M. C. Srinivasan, High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8. 20): enzyme production and compatibility with commercial detergents, *Enzyme and microbial technology*, 15 (1993) 72-76.
- [261] S. Malathi y R. Chakraborty, Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent, *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (1991) 712-716.
- [262] B. Johnvesly y G. Naik, Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium, *Process biochemistry*, 37 (2001) 139-144.
- [263] N. Sinha y T. Satyanarayana, Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*, *Indian journal of microbiology*. New Delhi, 31 (1991) 425-430.
- [264] R. St. Leger et al., Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, *Archives of Microbiology*, 150 (1988) 413-416.
- [265] J. Åhman et al., Sequence analysis and regulation of a gene encoding a cuticle-degrading serine protease from the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*, *Microbiology*, 142 (1996) 1605-1616.
- [266] M. Hensel et al., The role of the *Aspergillus fumigatus* *areA* gene in invasive pulmonary aspergillosis, *Molecular and General Genetics MGG*, 258 (1998) 553-557.
- [267] K. L. N. Rao, K. S. Raju, y H. Ravisankar, Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere, *Brazilian journal of microbiology*, 47 (2016) 25-32.
- [268] R. Vaidya, P. Vyas, y H. Chhatpar, Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*, *Enzyme and Microbial Technology*, 33 (2003) 92-96.
- [269] Y. S. Lee y K. Y. Kim, Statistical optimization of medium components for chitinase production by *Pseudomonas fluorescens* strain HN1205: role of chitinase on egg hatching inhibition of root-knot nematode, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29 (2015) 470-478.
- [270] S. Alamri et al., Enhancing the biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* JF419706 through cell wall degrading enzyme production, *International Journal of Agriculture and Biology*, 18 (2016) 765-772.
- [271] E. T. Mezadri et al., Evaluation of ultrasound waves for the production of chitinase and β -1, 3 glucanase by *Trichoderma harzianum* through SSF, *3 Biotechnology*, 12 (2022) 122.
- [272] P. Suresh y M. Chandrasekaran, Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation, *Process Biochemistry*, 34 (1999) 257-267.
- [273] K. M. Nampoothiri et al., Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*, *Process Biochemistry*, 39 (2004) 1583-1590.
- [274] M. Šimkovič et al., Induction of secretion of extracellular proteases from *Trichoderma viride*, *Acta Chimica Slovaca*, 1 (2008) 250-264.
- [275] R. Hernández Regalado, Modelación neuronal de la etapa de fermentación en la Ronera de San José, Tesis para optar por el título de ingeniero químico, La Habana, Cuba, 2018. doi: 10.13140/RG.2.2.30475.92961.

- [276] C. J. Ulhoa y J. F. Peberdy, Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*, *Microbiology*, 137 (1991) 2163-2169.
- [277] M. H. Jijakli y P. Lepoivre, Characterization of an exo- β -1, 3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples, *Phytopathology*, 88 (1998) 335-343.
- [278] S. Bhagat y S. Pan, Variability in Production of Extracellular Hydrolytic Enzymes by *Trichoderma* spp. and Induction of Resistance in Gram (cicer arietinum), *Journal of Biological Control*, (2008) 57-66.
- [279] A. Pandey et al., *Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications*, Asiatech Publishers, New Delhi, 2001.
- [280] M. A. Moreno-Mateos et al., pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*, *Fungal Genetics and Biology*, 44 (2007) 1355-1367.
- [281] E. Kubicek-Pranz, Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*, *Trichoderma and Gliocladium Volume*, (1998) 95.
- [282] L. Kredics et al., Extracellular proteases of *Trichoderma* species, *Acta microbiologica et immunologica hungarica*, 52 (2005) 169-184.
- [283] M. H. Zwietering et al., Modeling of the bacterial growth curve, *Applied and environmental microbiology*, 56 (1990) 1875-1881.
- [284] R. S. Laxman et al., Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*, *Process Biochemistry*, 40 (2005) 3152-3158.
- [285] N. F. Haard y B. K. Simpson, *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality*. CRC Press, 2000.
- [286] S. Shankar, M. Rao, y R. S. Laxman, Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp, *Process biochemistry*, 46 (2011) 579-585.
- [287] S. Savitha et al., Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42 (2011) 298-304.
- [288] S. S. Nilegaonkar et al., Novel protease for industrial applications, U.S. Patent Application No 11/931,537, 2008.
- [289] B. Sookkheo et al., Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33, *Protein expression and purification*, 20 (2000) 142-151.
- [290] N. Aissaoui et al., Purification and biochemical characterization of a neutral serine protease from *Trichoderma harzianum*. Use in antibacterial peptide production from a fish by-product hydrolysate, *Applied biochemistry and biotechnology*, 182 (2017) 831-845.
- [291] T. Uchikoba et al., Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*, *Biological chemistry*, 382 (2001) 1509-1513.
- [292] J. L. De Marco y C. R. Felix, Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease, *BMC Biochemistry*, 3 (2002) 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-3-3>.
- [293] S. Jayalakshmi et al., *Trichoderma harzianum* L¹ as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri, *Australian Journal of Crop Science*, 3 (2009) 44.
- [294] R. Gupta, Q. Beg, y P. Lorenz, Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *Applied microbiology and biotechnology*, 59 (2002) 15-32.

- [295] A. Flores, I. Chet, y A. Herrera-Estrella, Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*, *Current genetics*, 31 (1997) 30-37.
- [296] J. Grinyer et al., Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell wall material of *Rhizoctonia solani*, *Currents Genetics*, 47 (2005) 381-388.
- [297] L. Hanson y C. Howell, Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma viren*, *Phytopathology*, 94 (2004) 171-176.
- [298] M. J. Pozo et al., Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*, *Fungal Genetics and Biology*, 41 (2004) 336-348.
- [299] S. Kasahara et al., Characterization and mode of action of *exo-1*, 3- β -D-glucanase from *Aspergillus saitoi*, *Journal of fermentation and bioengineering*, 74 (1992) 238-240.
- [300] J. L. de Marco y C. R. Felix, Purification and characterization of a beta-Glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50 (2007) 21-29.
- [301] K. Periyasamy et al., Production, partial purification and characterization of enzyme cocktail from *Trichoderma citrinoviride* AUKAR04 through solid-state fermentation, *Arabian Journal for Science and Engineering*, 42 (2017) 53-63.
- [302] E. F. Noronha y C. Ulhoa, Characterization of a 29-kDa β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum*, *FEMS microbiology letters*, 183 (2000) 119-123.
- [303] T. Fontaine et al., Differential patterns of activity displayed by two *exo-beta-1*, 3-glucanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall, *Journal of Bacteriology*, 179 (1997) 3154-3163.
- [304] S. M. Pitson et al., Purification and characterization of three extracellular (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan glucohydrolases from the filamentous fungus *Acremonium persicinum*, *Biochemical Journal*, 308 (1995) 733-741.
- [305] E. O'Connell, C. Piggott, y M. Tuohy, Purification of *exo-1*, 3-beta-glucanase, a new extracellular glucanolytic enzyme from *Talaromyces emersonii*, *Applied microbiology and biotechnology*, 89 (2011) 685-696.
- [306] M. El-Katatny, The activity of β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* in native form and after immobilization on calcium alginate, *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 41 (2008) 175-186. <https://doi.org/10.1080/03235400600679818>.
- [307] S. Pitson, R. Seviour, y B. McDougall, Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation, *Enzyme and microbial technology*, 15 (1993) 178-192.
- [308] C. Thrane, A. Tronsmo, y D. Jensen, Endo- β -1, 3 glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: Biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp, *European Journal of Plant Pathology*, 103 (1997) 331-344.
- [309] D. Chung et al., Characterization of Chitinolytic and Antifungal Activities in Marine-Derived *Trichoderma bissettii* Strains, *Mycobiology*, 50 (2022) 244-253.
- [310] R. Guo et al., Purification and characterization of a novel thermostable chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SY2 and cloning of its encoding gene, *Agricultural Sciences in China*, 7, (2008) 1458-1465.
- [311] G. Yu et al., Isolation, partial characterization, and cloning of an extracellular chitinase from the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*, *Genetics and Molecular Research*, 14 (2015) 2275-2289.
- [312] D. Chung et al., Identification and characterization of a marine-derived chitinolytic fungus, *Acremonium* sp. YS2-2, *Journal of Microbiology*, 57 (2019) 372-380.

- [313] E. E. Deane et al., The purification and characterization of a *Trichoderma harzianum* exochitinase, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1383 (1998) 101-110.
- [314] C. A. Omumasaba, N. Yoshida, y K. Ogawa, Purification and characterization of a chitinase from *Trichoderma viride*, *The Journal of general and applied microbiology*, 47 (2001) 53-61.
- [315] K. Kovacs et al., Production of chitinolytic enzymes with *Trichoderma longibrachiatum* IMI 92027 in solid substrate fermentation, *Applied biochemistry and biotechnology*, 118 (2004) 189-204.
- [316] N. H. Loc et al., Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34, *Mycology*, 11 (2020) 38-48.
- [317] D. P. Kumar et al., Studies on exo-chitinase production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and its characterization, *Indian journal of microbiology*, 52 (2012) 388-395.
- [318] C. J. Ulhoa y J. F. Peberdy, Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*, *Enzyme and Microbial Technology*, 14 (1992) 236-240.
- [319] G. Harman et al., Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase, *Phytopathology*, 83 (1993) 313-318.
- [320] A. Illanes, Stability of biocatalysts, *Electronic Journal of Biotechnology*, 2 (1999).
- [321] A. Illanes, *Biología de enzimas*, Serie de Monografías Científicas del Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Organización de los Estados Americanos, Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 1994.
- [322] J. Carrera, Producción y aplicación de enzimas industriales, *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 1 (2003) 9-15.
- [323] C. Kumar, M. Tiwari, y K. Jany, Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties, *Process Biochemistry*, 34 (1999) 441-449.
- [324] J. Rodríguez-Mendoza et al., Purification and biochemical characterization of a novel thermophilic exo- β -1, 3-glucanase from the thermophile biomass-degrading fungus *Thielavia terrestris* Co3Bag1, *Electronic Journal of Biotechnology*, 41 (2019) 60-71.
- [325] C. W. Bamforth, The adaptability, purification and properties of exo-beta 1, 3-glucanase from the fungus *Trichoderma reesei*., *Biochemical journal*, 191 (1980) 863.
- [326] H. Sun et al., Purification and properties of a β -1, 3-glucanase from *Chaetomium* sp. that is involved in mycoparasitism, *Biotechnology Letters*, 28 (2006) 131-135.
- [327] E. Quirán y A. Pilati, Estructura de los hormigueros de *Acromyrmex lobicornis* (Hymenoptera: Formicidae) en un sitio natural semiárido de La Pampa, Argentina., *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 57 (1998) 1-4.
- [328] M. Hajji et al., Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1, *Process Biochemistry*, 42, (2007) 791-797.
- [329] H. Li et al., Purification and partial characterization of β -1, 3-glucanase from *Chaetomium thermophilum*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (2007) 1297-1303.
- [330] E. Cabib, The synthesis and degradation of chitin, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 59 (1987) 59-101.
- [331] W. Zhang et al., Biochemical characterization of a novel acidic chitinase with antifungal activity from *Paenibacillus xylanexedens* Z2-4, *International Journal of Biological Macromolecules*, 182 (2021) 1528-1536.
- [332] J. Frouz y V. Jilková, The effect of ants on soil properties and processes (Hymenoptera: Formicidae), *Myrmecological News*, 11 (2008) 191-199.

- [333] R. A. Sabattini et al., Evaluación de la actividad forrajera de hormigas cortadoras en un bosque nativo del centro norte de Entre Ríos, Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento, 10 (2020).
- [334] C. A. Cruz Ramírez, Caracterización parcial de una proteasa alcalina a partir de hongos filamentosos implicados en el deterioro de documentos históricos, Tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia, 2011.
- [335] M. Deshpande, Enzymatic degradation of chitin and its biological applications, Journal of Scientific and Industrial Research, 45 (1986) 273-281.
- [336] T. Watanabe et al., Structure of the gene encoding chitinase D of *Bacillus circulans* WL-12 and possible homology of the enzyme to other prokaryotic chitinases and class III plant chitinases, Journal of bacteriology, 174 (1992) 408-414.
- [337] A. R. Nebreda et al., Heterogeneous glycosylation of the EXG1 gene product accounts for the two extracellular exo- β -glucanases of *Saccharomyces cerevisiae*, FEBS letters, 220 (1987) 27-30.
- [338] T. Watanabe et al., Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type III homology units of fibronectin., Journal of Biological Chemistry, 265 (1990) 15659-15665.
- [339] C. Ridout, J. Coley-Smith, y J. Lynch, Fractionation of extracellular enzymes from a mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*, Enzyme and Microbial Technology, 10 (1988) 180-187.
- [340] H. Yasumitsu, Serine protease zymography: low-cost, rapid, and highly sensitive RAMA casein zymography, Zymography: Methods and Protocols, (2017) 13-24.
- [341] M. T. F. Bara, A. L. Lima, y C. J. Ulhoa, Purification and characterization of an exo- β -1, 3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*, FEMS Microbiology Letters, 219 (2003) 81-85.
- [342] E. F. Noronha et al., Regulation of 36-kDa β -1, 3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*, FEMS microbiology letters, 188 (2000) 19-22.
- [343] S. Vázquez-Garcidueñas, C. A. Leal-Morales, y A. Herrera-Estrella, Analysis of the β -1,3-Glucanolytic System of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*, Applied Environmental Microbiology, 64 (1998) 1442-1446. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.4.1442-1446.1998>.