

ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA *IN VITRO* DE MACROHONGOS
CONTRA DIFERENTES HONGOS FITOPATÓGENOS*In vitro* biocontrol activity of macrofungi against
different plant pathogenic fungiManuel PATIÑO¹, Ivonne Jeannette NIETO-RAMIREZ², Carolina CHEGWIN-ANGARITA², Esperanza TORRES-ROJAS^{1*}¹Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 No. 45-03, Bogotá, Colombia²Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 No. 45-03, Bogotá, Colombia ***For correspondence:** etorres@unal.edu.coReceived: 12th October 2018, Returned for revision: 22nd February 2019, Accepted: 22nd March 2019.

Associate Editor: Juan F. González.

Citation/Citar este artículo como: Patiño M, Nieto-Ramírez IJ, Chegwin-Angarita C, Torres-Rojas E. Actividad biocontroladora *in vitro* de macrohongos contra diferentes hongos fitopatógenos. Acta biol. Colomb. 2020;25(2):265-279. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n2.75303>

RESUMEN

Las enfermedades causadas por hongos en las plantas son una gran preocupación en la producción agrícola. Los macromicetos son una fuente potencial de compuestos antifúngicos que podrían usarse para controlar estas enfermedades. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad biocontroladora *in vitro* de cuatro macromicetos de los géneros *Xylaria*, *Agrocybe*, *Psilocybe* y *Stereum* sobre diferentes hongos fitopatógenos. Para ello, se determinó la curva de crecimiento de los macrohongos en dos medios: papa dextrosa (PDA) y salvado de trigo (ST) y se caracterizaron las interacciones y la inhibición *in vitro* de hongos fitopatógenos. Se realizó la extracción y caracterización de metabolitos secundarios de la biomasa, el medio extracelular y del homogeneizado del micelio y caldo en los hongos con mayor porcentaje de inhibición. Finalmente, se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de estos extractos. Las curvas de crecimiento cambiaron con la fuente de carbono, tres de cuatro macrohongos mostraron una mayor acumulación de biomasa en PDA que en ST. Las interacciones de *Xylaria* se clasificaron principalmente como reemplazo, obteniendo el mayor nivel de antagonismo en PDA. Dos de los tres extractos evaluados mostraron actividad antifúngica contra los tres patógenos aislados en concentraciones de 18 µg/ml para extractos metanólicos de biomasa y 2,5 % para el filtrado del homogeneizado del micelio, con inhibiciones de 10 a 80 %. La caracterización de los metabolitos de *Xylaria* mostró a los ácidos grasos como posibles compuestos responsables de la actividad antifúngica. Este trabajo resalta el potencial de estos hongos para el control de enfermedades fúngicas.

Palabras clave: Antagonismo, cinética del crecimiento, cultivo dual, metabolitos secundarios, parasitismo.

ABSTRACT

Fungal diseases in plants are a significant concern in agricultural production. Macrofungi are a potential source of antifungal compounds that could be used to control these diseases. This study aimed to evaluate the *in vitro* biocontrol activity of four macrofungi of the genus *Xylaria*, *Agrocybe*, *Psilocybe* and *Stereum* on different plant pathogenic fungi. For this purpose, the growth curve of macrofungi was determined on two carbon sources: potato dextrose and wheat bran. Interactions and the *in vitro* inhibition on phytopathogenic fungi were also characterized. Subsequently, extraction and characterization of secondary metabolites of the intracellular, extracellular and filtrate of homogenized of mycelia and broth culture were performed only on the fungi that showed higher inhibition percentage. Finally, the *in vitro* antifungal activity of these extracts was evaluated. Growth curves changes with the carbon source and three of four isolates show more considerable accumulation of biomass in potato dextrose than wheat bran, reaching the stationary growth phase in a long time. *Xylaria* interactions were classified mostly as a replacement, obtaining the highest level of antagonism on potato dextrose. Two of the three extracts assessed showed antifungal activity in all three pathogens isolated at concentrations of 18 µg/ml for biomass methanol extracts and 2.5 % for filtrate of homogenized of mycelia with inhibitions from 10 to 80 %. Characterization of the metabolites of *Xylaria* showed fatty acids as possible compounds responsible for the antifungal activity. This work showed the potential of these fungi for the control of fungal diseases.

Keywords: Antagonism, dual culture, growth kinetics, parasitism, secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por hongos en plantas son una de las preocupaciones de mayor consideración en la producción agrícola. Los fungicidas empleados actualmente para el control de estas enfermedades son responsables de un gran número de efectos tóxicos para el ser humano, pueden generar consecuencias negativas en el medio ambiente (Orlandini *et al.*, 2015; Regueiro *et al.*, 2015) y afectan la comercialización de los productos agrícolas. La resistencia asociada a un uso erróneo y excesivo de los mismos ha motivado la búsqueda de opciones ambiental y económicamente racionales, que permitan reemplazar o combinar el uso de productos químicos sintéticos en la agricultura (Hoyos, 2012). Algunas de estas alternativas están enmarcadas en el término “regulación biológica” y se refieren al uso de microorganismos vivos, nativos o introducidos, naturales o modificados genéticamente, para el control de patógenos de plantas (Hoyos, 2012). Estos organismos, denominados biocontroladores, ejercen su acción por mecanismos como depredación, parasitismo, hipovirulencia, inhibición, competencia o favorecimiento de la planta (Ghorbanpour *et al.*, 2017).

Entre los organismos que han sido reportados como biocontroladores se encuentran bacterias, levaduras, cepas no patogénicas, cepas hipovirulentas y hongos micro y macromicetos (Ghorbanpour *et al.*, 2017). Estos últimos pueden ser una fuente potencial de compuestos bioactivos, generalmente metabolitos secundarios con actividad antifúngica, los cuales podrían ser empleados a escala comercial (Morath *et al.*, 2012). Dichos metabolitos secundarios presentan una distribución taxonómica restringida y su biosíntesis está condicionada por factores físicos, químicos y ambientales (Ramadan *et al.*, 2015). En principio, estos compuestos no son esenciales para la vida del hongo pero contribuyen a su supervivencia y se producen con frecuencia durante la fase estacionaria de crecimiento (Ali *et al.*, 2013 ; Hwang *et al.*, 2014). Otros compuestos como péptidos, enzimas líticas (quitinasas, lacasas, celulasas, hemicelulasas, proteasas, peroxidasas, entre otras) y polisacáridos con actividad antifúngica, antibacteriana y nematocida, han sido reportados en macrohongos de los géneros *Xylaria* (Pongcharoen *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014), *Agrocybe* (Ngai *et al.*, 2005), *Psilocybe* (Keay Brown, 1989) y *Stereum* (Cateni *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014; Aqueveque *et al.*, 2016; Aqueveque *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2017).

Colombia posee una gran diversidad de ecosistemas que presentan nichos únicos para el crecimiento de hongos, lo que lo posiciona como un sitio promisorio para la búsqueda de estas especies y de sus componentes bioactivos (Castiblanco *et al.*, 2015). Sin embargo, son muy pocos los estudios sobre diversidad fúngica y sus posibles aplicaciones. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad biocontroladora *in vitro* de cuatro

macromicetos nativos pertenecientes a los géneros *Xylaria*, *Agrocybe*, *Psilocybe* y *Stereum* sobre siete aislamientos de hongos fitopatógenos de interés agrícola correspondientes a *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Monilinia* sp., *Moniliophthora roreri*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp., y *Colletotrichum* sp. Para ello, i) se determinó la curva de crecimiento de los hongos macromicetos en dos fuentes de carbono; ii) se caracterizaron las interacciones y la capacidad de inhibición *in vitro* de los macromicetos sobre los hongos fitopatógenos; iii) se realizó la extracción y caracterización preliminar de los metabolitos secundarios a partir de la biomasa y el medio de cultivo de los hongos que presentaron mayor capacidad de inhibición y iv) se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos seleccionados sobre aislados de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum* sp. y *Moniliophthora roreri*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material fúngico

Se seleccionaron cuatro hongos macromicetos de los géneros *Xylaria* sp. CH3, *Psilocybe* sp. UPB6, *Agrocybe* sp. UPB1 y *Stereum* sp. CH84 colectados a partir de madera en descomposición, en el bosque alto andino ubicado en el Parque Natural Chicaque (Cundinamarca) y en plantaciones de palma de aceite de la empresa UNIPALMA S.A. en los llanos orientales de Colombia (Crespo *et al.*, 2014; Castaño *et al.*, 2019). Los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Monilinia* sp., *Moniliophthora roreri*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp. se obtuvieron de la clínica de plantas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia y de la Federación Nacional de Cacaoteros, Fedecacao. Las cepas se conservaron en cajas de Petri en agar papa dextrosa a 4 °C y se repicaron cada tres meses en el mismo medio.

Medios de cultivo

Se empleó caldo papa dextrosa (PDB) con la siguiente formulación (g.L⁻¹): papa (200) y glucosa (18); el salvado de trigo (ST) con solución Mandels modificado (Moya y Torres, 2012) tuvo la siguiente formulación (g.L⁻¹): salvado de trigo (50), KNO₃ (1,4), KH₂PO₄ (2), CaCl₂.2H₂O (0,4), MgSO₄.7H₂O (0,3), FeSO₄.7H₂O (0,005), MnSO₄.H₂O (0,00118), ZnSO₄.7H₂O (0,0014), CoCl₂.6H₂O (0,0026), CuSO₄ (0,01) y agar nutritivo (28) para agar salvado de trigo y PDA (agar papa dextrosa).

Cinética de crecimiento

Se determinó la curva de crecimiento de los hongos macromicetos en dos fuentes de carbono (FC), una convencional en Papa Dextrosa (PDB) y otra no convencional en Salvado de trigo (ST). Esta se realizó mediante una fermentación en estado líquido (FEL) en Erlenmeyer de 100 ml con 30 ml de medio PDB o ST. Estos medios de cultivo se

inocularon con tres discos de 0,5 cm de diámetro tomados de la periferia del hongo crecido en cajas con PDA de nueve días de incubación (Castaño y Torres, 2015) y se incubaron a 27 ± 2 °C con agitación orbital de 150 rpm (MaxQ™ 4000 Benchtop Orbital Shaker) por 15 - 18 días en oscuridad. La cuantificación de biomasa seca (48 h - 40 °C) se realizó por triplicado con muestras tomadas cada tres días.

Clasificación y caracterización de las interacciones *in vitro*

Las interacciones se determinaron mediante cultivo dual en los medios PDA y ST. Se tomaron discos de 8 mm del micelio de cada uno de los hongos y se sembraron en los extremos opuestos de una caja Petri, con incubación a 27 ± 2 °C en oscuridad durante 18 a 21 días posteriores a la inoculación del hongo fitopatógeno. Las interacciones se clasificaron en cinco categorías: entremezcla mutua (MI), entremezcla parcial (PMI), inhibición al punto de contacto (TPI), inhibición a la distancia (DI) y reemplazo (RPL) (Molla *et al.*, 2001). Para cada uno de los aislamientos se calculó además el índice de antagonismo (IA) (Badalyan *et al.*, 2004). Para ello, se asignó a cada tipo de interacción un puntaje: MI = 0, TPI = 1, DI = 2, PMI = 3, $RPL_{TPI} = 4$, $RPL_{DI} = 5$ y se calculó según la fórmula: $IA = MI (0 \times n) + TPI (1 \times n) + DI (2 \times n) + PMI (3 \times n) + RPL_{TPI} (4 \times n) + RPL_{DI} (5 \times n)$, donde n es la frecuencia de cada tipo de interacción. Adicionalmente, se clasificó la actividad antagonista como fuertemente activo (IA > 30), activo (IA 20 - 30), moderadamente activo (IA 11 - 20) y débilmente activo (IA 1 - 10) (Pandey, 2012). La inhibición *in vitro* se determinó solamente en las interacciones clasificadas como DI y RPL. Se realizó una medición manual de los diámetros de ambas colonias cada tres días, durante 15 días. El porcentaje de inhibición se determinó como la reducción de la colonia del fitopatógeno en comparación con la colonia control multiplicado por 100 según la fórmula $PI = 100 \times (C1 - C2) / C1$, donde C1 es el diámetro de la colonia en ausencia del macromiceto y C2 en presencia del mismo (Abdel-Motaal *et al.*, 2010).

Obtención de extractos

La extracción de los metabolitos secundarios de baja y mediana polaridad se realizó sobre la biomasa (BM), el medio de cultivo agotado (MC) y el homogenizado (EC) en la fase estacionaria de crecimiento de los hongos macromicetos que evidenciaron mayor índice de antagonismo y mayor capacidad de inhibición *in vitro* sobre los hongos fitopatógenos. El producto de la FEL obtenido en la fase estacionaria de crecimiento se filtró separando el micelio del medio agotado. El medio de cultivo liofilizado fue solubilizado en metanol mientras que la biomasa seca (40 °C - 48 h) fue sometida a extracciones discontinuas con MeOH asistidas por ultrasonido hasta obtener un peso constante. Los extractos se desecaron con Na_2SO_4 anhidro y se llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio a 120 rpm y 35 °C. Para la obtención del EC, el producto obtenido

de la FEL durante la fase estacionaria de crecimiento fue homogenizado en vórtex y centrifugado a 5000 rpm por 20 min; posteriormente el sobrenadante se filtró empleando una membrana de 0,22 µm MILLEX®GV, Millipore.

Caracterización preliminar de los extractos

La caracterización preliminar de la clase de metabolitos presentes en los extractos se efectuó mediante la realización de ensayos cualitativos de coloración en Cromatografía en Capa Delgada CCD (MeOH:EtOAc 98:2 y MeOH:EtOAc 50:50), utilizando el cromatograma que evidenció el mayor número de componentes y empleando los siguientes reveladores específicos: tricloruro férrico para compuestos fenólicos, Lieberman-Burchard para esteroides y/o terpenoides, Molisch para azúcares, Benedict para cumarinas y Fluoresceína para lípidos (Merck, 1980). Para la detección de los esteroides se empleó además como reveladores específicos solución de vainillina-ácido sulfúrico 10 % en etanol y $ZnCl_2$ al 25 % en metanol y como universal, luz ultravioleta (254 nm y 366 nm). En cuanto a la caracterización de los compuestos de la fracción grasa se realizó por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) en un cromatógrafo GC-17A Shimadzu, con las siguientes características: columna capilar HP-5MS 30 m, 0,250 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor; gas de arrastre Helio 4,5 a 1 ml.min⁻¹; modo Split 1:10; temperatura desde 90 °C hasta 300 °C a 5 °C.min⁻¹; temperatura de inyector y de interfase de 250 °C. Este cromatógrafo está acoplado a un espectrómetro de masas CGMS QP5050A. Se inyectaron 1 µL de soluciones de 3 mg.ml⁻¹ del extracto a analizar disueltos en CH_2Cl_2 .

Ensayos antifúngicos cuantitativos

Se empleó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (PICM). Los extractos filtrados BM y MC se adicionaron por separado a medio PDA en concentraciones de 9, 18, 90 y 180 µg.ml⁻¹ y en concentraciones de 1; 2,5; 5; 10 y 50 % para el EC. Se tomaron discos de 3 mm del micelio de tres hongos fitopatógenos de ocho días de cultivo y se inocularon en el centro de las cajas de Petri de 5 cm con el medio PDA que contenía las concentraciones de los extractos por separado. Como control se inocularon discos de micelio en medio PDA. Todos los hongos se incubaron a 28 °C por 6 - 11 días y se tomaron lecturas diarias de los diámetros de las colonias. La actividad inhibitoria se determinó midiendo el diámetro radial de las colonias en presencia del extracto (R2) y el diámetro radial de la colonia control (R1). Estas dos medidas se utilizaron para calcular el PICM (Skidmore AM, Dickinson CH. Interactions between germinating spores of *Septoria nodorum* and phyloplane fungi. Trans. Brit. Mycol. Soci. 1976;66, 45-56.) según la fórmula:

$$PICM = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100 \quad (1)$$

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar y todos los experimentos se realizaron por triplicado. Una vez comprobados los supuestos del análisis de varianza, los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA y prueba de comparación de medias (Test de Tukey) a una $p \leq 0,05$ para determinar la presencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Los datos se analizaron en el programa estadístico SAS 9.1.3®.

RESULTADOS

Caracterización de las cinéticas de crecimiento

La cantidad de biomasa seca en función del tiempo varió con respecto a los aislamientos y a la fuente de carbono (Anexo 1). Para los aislamientos *Xylaria* sp. CH3, *Agrocybe* sp. UPB1 y *Psilocybe* sp. UPB6 el rendimiento de biomasa fue mayor en medio PDB que en medio ST y se evidenciaron las diferentes fases de crecimiento de cada uno de estos aislamientos (Anexo 1A). *Xylaria* sp. CH3 presentó la mayor producción de biomasa de todos los aislamientos en medio PDB con $9,91 \pm 0,70 \text{ g.L}^{-1}$ en el día 15, mientras que *Stereum* sp. CH84 evidenció la menor en medio PDB con $3,73 \pm 0,28 \text{ g.L}^{-1}$ en el mismo periodo de tiempo (Anexo 1A). Sin embargo, en medio ST la producción de biomasa de *Stereum* sp. CH84 aumentó en 1,5 veces ($5,71 \pm 0,57 \text{ g.L}^{-1}$) y se lograron distinguir las diferentes fases de crecimiento. En general para el medio ST, el rango de mayor producción de biomasa se encontró entre 4,5 y $5,54 \text{ g.L}^{-1}$ y fue menor a lo encontrado en medio PDB ($6,9 - 10,9 \text{ g.L}^{-1}$) para todos los aislamientos, con excepción de *Stereum* sp. CH84. El aislamiento *Agrocybe* sp. UPB1 fue el único que presentó un crecimiento diaúxico en el tiempo evaluado.

Existen reportes que demuestran que la biosíntesis de los metabolitos secundarios inicia durante la fase estacionaria del crecimiento del hongo, cuando este entra en estado de estrés debido a la disminución de nutrientes. Se considera que estos compuestos no son esenciales para la vida del hongo pero contribuyen a su supervivencia (Shaikh *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2014). Con base en los resultados obtenidos, para la extracción de los metabolitos secundarios presentes en la biomasa, en el sobrenadante y en el homogenizado total de los aislamientos seleccionados, se empleó la biomasa obtenida en el medio de cultivo en PDB, utilizando la muestra correspondiente a la fase estacionaria del cultivo.

Clasificación y caracterización de las interacciones *in vitro*

Se clasificaron un total de 56 interacciones fúngicas. El tipo de interacción varió con los aislamientos y la fuente de carbono empleada (Tabla 1, Fig. 1). En medio PDA la mayoría de las interacciones de *Xylaria* sp. CH3 se clasificaron como RPL. *Agrocybe* sp. UPB1 presentó la mayor diversidad

de interacciones fúngicas, lo cual pone en evidencia su capacidad de respuesta a diferentes patógenos. Para los aislamientos *Psilocybe* sp. UPB6 y *Stereum* sp. CH84 se presentaron con mayor frecuencia interacciones del tipo DI.

En este estudio se calculó un total de 22 índices de antagonismo para cada uno de los aislamientos en los dos medios de cultivo (Tabla 1), con valores mayores o iguales en medio PDA que en ST, con excepción del aislamiento CH84. Con base en esta clasificación, *Xylaria* sp. CH3 y *Agrocybe* sp. UPB1 presentaron un antagonismo activo, y *Psilocybe* sp. UPB6 junto con *Stereum* sp. CH84 un antagonismo moderadamente activo en medio PDA. En medio ST, *Xylaria* sp. CH3 fue el único aislamiento con antagonismo activo, *Psilocybe* sp. UPB6 y *Stereum* sp. CH84 presentan un antagonismo moderadamente activo y *Agrocybe* sp. UPB1 un antagonismo débil. Con base en estos resultados se determinó la capacidad de inhibición *in vitro* (PICM) únicamente en las interacciones clasificadas como RPL o DI las cuales están relacionadas principalmente con la producción de compuestos antifúngicos.

Determinación de la capacidad de inhibición *in vitro* (PICM)

Los resultados muestran que los PICM dependen tanto del medio de cultivo como de las cepas utilizadas en la interacción (Fig. 2). En general se alcanzaron los mayores PICM en medio PDA con todos los macromicetos evaluados, en donde se destaca el aislamiento *Xylaria* sp. CH3 para la mayoría de los hongos fitopatógenos con valores de PICM entre 52 y 68 %, y *Agrocybe* sp. UPB1 para *F. oxysporum* que alcanzó un valor de 72 % (Fig. 2a). En medio ST los PICM variaron con respecto a PDA (Fig. 2b). *Xylaria* sp. CH3 presentó un mayor PICM para *Colletotrichum* sp. y *Rhizoctonia* sp. con valores de 73 % y 62 %, respectivamente. Aunque *Stereum* sp. CH84 mostró PICM en cuatro de los siete fitopatógenos, los valores de inhibición oscilaron entre el 1 y el 33 %. Con base en estos resultados se realizó la extracción de los metabolitos secundarios presentes en los aislamientos con mayor actividad antagonista correspondientes a *Xylaria* sp. CH3, *Agrocybe* sp. UPB1 y *Stereum* sp. CH84 en medio PDB.

Caracterización preliminar de metabolitos secundarios por CCD, ensayos colorimétricos y CG-EM

Caracterización por CCD

La visualización de los cromatogramas con el revelador universal estableció que los extractos metanólicos estuvieron constituidos por compuestos de baja y mediana polaridad. En los correspondientes a la biomasa de *Xylaria* sp. CH3 se detectaron compuestos con valores R_f de 0,34, 0,89 y 0,98; para *Agrocybe* sp. UPB1 de 0,83, 0,88 y 0,92; y para *Stereum* sp. CH84 de 0,88 y 0,95, lo que permitió ver la similitud de composición de los extractos (Anexo 4). Solamente para el aislamiento *Xylaria* sp. CH3, y como resultado del empleo en CCD de los reveladores específicos para los diferentes tipos

Tabla 1. Interacciones entre macromicetos y hongos fitopatógenos.

Cepa	Tipo de interacción ^a							Índice de antagonismo
	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>F. oxysporum</i>	<i>M. roreri</i>	<i>Monilinia</i> sp.	<i>Sclerotinia</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>F. solani</i>	
PDA								
<i>Xylaria</i> sp. CH3	RPL _{DI}	RPL _{TPI}	RPL _{DI}	RPL _{DI}	RPL _{TPI}	RPL _{TPI}	PMI	30
<i>Agrocybe</i> sp. UPB1	RPL _{DI}	DI	RPL _{TPI}	PMI	PMI	PMI	PMI	23
<i>Psilocybesp.</i> UPB6	DI	DI	TPI	DI	TPI	TPI	DI	11
<i>Stereum</i> sp. CH84	DI	DI	DI	DI	TPI	DI	DI	13
Índice de antagonismo	14	10	12	12	9	10	10	
ST								
<i>Xylaria</i> sp. CH3	RPL _{DI}	PMI	RPL _{TPI}	PMI	PMI	RPL _{TPI}	TPI	23
<i>Agrocybesp.</i> UPB1	DI	PMI*	DI	DI	TPI	RPL _{DI} *	DI	9
<i>Psilocybesp.</i> UPB6	TPI	DI	TPI	DI	DI	DI	TPI	11
<i>Stereum</i> sp. CH84	DI	PMI	DI	DI	PMI*	DI	TPI	15
Índice de antagonismo	10	8	9	9	9	8	5	

^aPMI, Entremezcla parcial mutua; DI, Inhibición a la distancia; TPI, Inhibición al punto de contacto; RPL_{DI}, Reemplazo después de inhibición a la distancia; RPL_{TPI}, Reemplazo después de inhibición al punto de contacto.

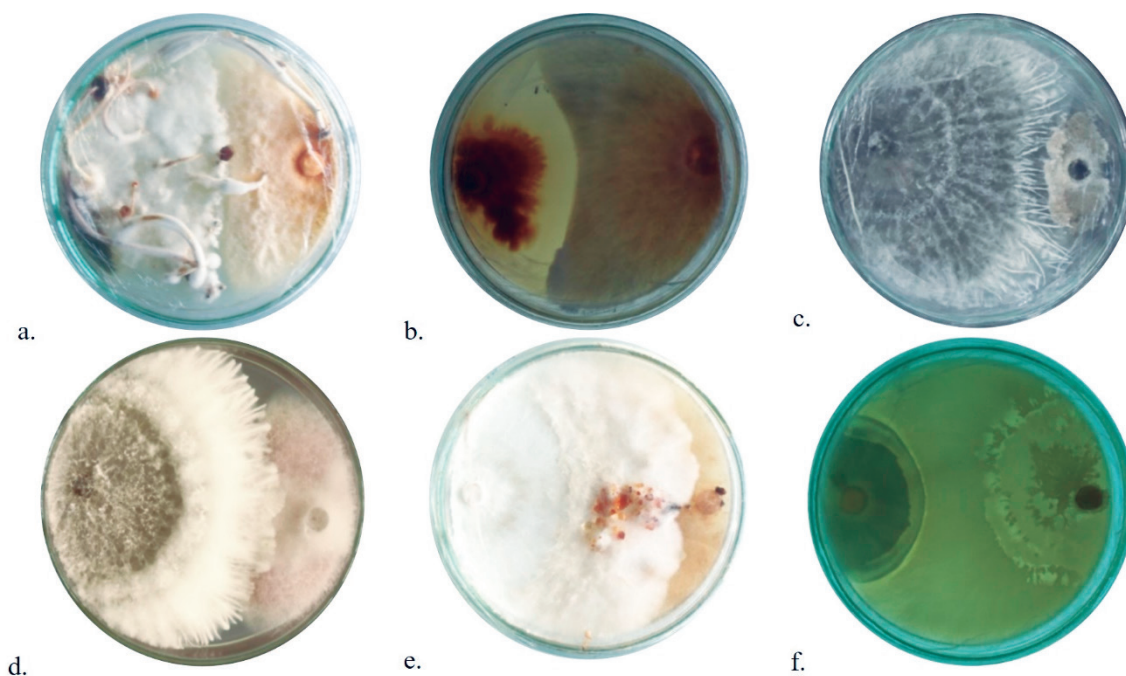


Fig 1. Interacciones entre macromicetos (izquierda) y hongos fitopatógenos (derecha). **a.** Inhibición al punto de contacto (TPI) entre *Psilocybe* sp. UPB6 y *Moniliophthora roreri* en PDA; **b.** Inhibición a la distancia (DI) entre *Stereum* sp. y *Moniliophthora roreri* CH84 en ST; **c.** Reemplazo después de inhibición a la distancia (RPL_{DI}) entre *Xylaria* sp. CH3 and *Monilinia* sp. en PDA; **d.** Reemplazo después de inhibición al punto de contacto (RPL_{TPI}) entre *Xylaria* sp. CH3 y *Fusarium oxysporum* en PDA; **e.** Entremezcla parcial mutua (PMI) entre *Agrocybe* sp. UPB1 y *Rhizoctonia* sp. en PDA; **f.** Reemplazo después de inhibición a la distancia (RPL_{DI}) entre *Agrocybe* sp. UPB1 y *Rhizoctonia* sp. en ST donde el hongo fitopatógeno crece sobre el macromiceto. Las figuras son representativas de todas las repeticiones del experimento.

de metabolitos que conforman cada uno de los extractos analizados (BM, MC y EC), se determinó la presencia de compuestos fenólicos, ácidos grasos, azúcares y compuestos triterpenoidales (Tabla 2).

Análisis por CG-EM

Con base en el hecho de que los ácidos grasos exhiben actividad antifúngica y dado que *Xylaria* sp. exhibió el mayor índice de antagonismo, se determinó la composición química de la fracción grasa, correspondiente al extracto en Diclorometano (DCM) de la biomasa de *Xylaria* sp. mediante CG-EM. Los compuestos fueron identificados por la librería del equipo y el análisis de sus espectros de masas (Anexo 2), dando como resultado la presencia de los ácidos palmítico, linoléico y oleico. Todos ellos presentan en sus espectros de masa los picos correspondientes a $[M\text{-agua}]^+$, $[M\text{-OH}]^+$, $[M\text{-CO}_2\text{H}]^+$ y los iones en $m.z^{-1}$ 60, correspondientes al rearrreglo de McLafferty, así como las pérdidas sucesivas de 14 unidades de masa, debidas a la fragmentación de la cadena hidrocarbonada.

Ensayos antifúngicos cuantitativos

Se evaluó la actividad antifúngica de dos extractos metanólicos obtenidos a partir de la BM y el MC de *Xylaria* sp. a concentraciones de 0, 9, 18, 90 y 180 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sobre el crecimiento radial de tres hongos fitopatógenos: *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp. y *M. royeri*. (Fig. 3a). Los extractos de BM evidenciaron actividad antifúngica en los tres fitopatógenos evaluados desde 90 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. El extracto del MC no evidenció actividad antifúngica en *F. oxysporum* ni en *Colletotrichum* sp., pero si una leve inhibición en *M. royeri* a una concentración de 180 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Con respecto a la actividad antifúngica del

EC, ésta se evidenció para los tres fitopatógenos, siendo mayor para *Colletotrichum* sp. y *M. royeri* desde el 1 % (Fig. 3b).

Se calcularon en total 45 PICM de los tres extractos evaluados para los tres hongos fitopatógenos en el día 15. Para todos los casos EC-50 % (homogeneizado de la biomasa y el medio de cultivo en concentración del 50 %) evidenció los mayores PICM con valores de $59,2 \pm 5 \%$, $82,4 \pm 1 \%$ y $73,3 \pm 1,7 \%$ para *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp. Y *M. royeri* respectivamente (Anexo 3).

DISCUSIÓN

La biomasa y las diferentes fases de crecimiento que presenta un hongo dependen tanto de la composición del medio de cultivo como del hongo utilizado. En este estudio se encontraron mayores producciones de biomasa en medio PDB y en un tiempo menor de lo reportado para *Xylaria* sp. ($1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en 40 días) por Ramesh *et al.* (2014) y para *Agrocybe cylindracea* ($6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) por Kim *et al.* (2005). Así mismo, se ha reportado que el medio PDB, al estar suplementado con glucosa, facilita el inicio de la fase exponencial del hongo alcanzando mayores rendimientos (Ramesh *et al.*, 2014); en la fase estacionaria y de declive, cuando se disminuye la disponibilidad de glucosa, se producen las enzimas necesarias para la degradación de moléculas más complejas (Aziza y Amrane, 2012). En contraste, en un medio ST, en el que la fuente de carbono es compleja desde el inicio, los aislamientos deberán contar con enzimas específicas para degradar el salvado de trigo, que es un sustrato compuesto de diferentes polisacáridos, e iniciar su crecimiento (Kim *et al.*, 2005). La diferencia en las cinéticas de crecimiento para cada uno de los aislamientos estudiados en medio

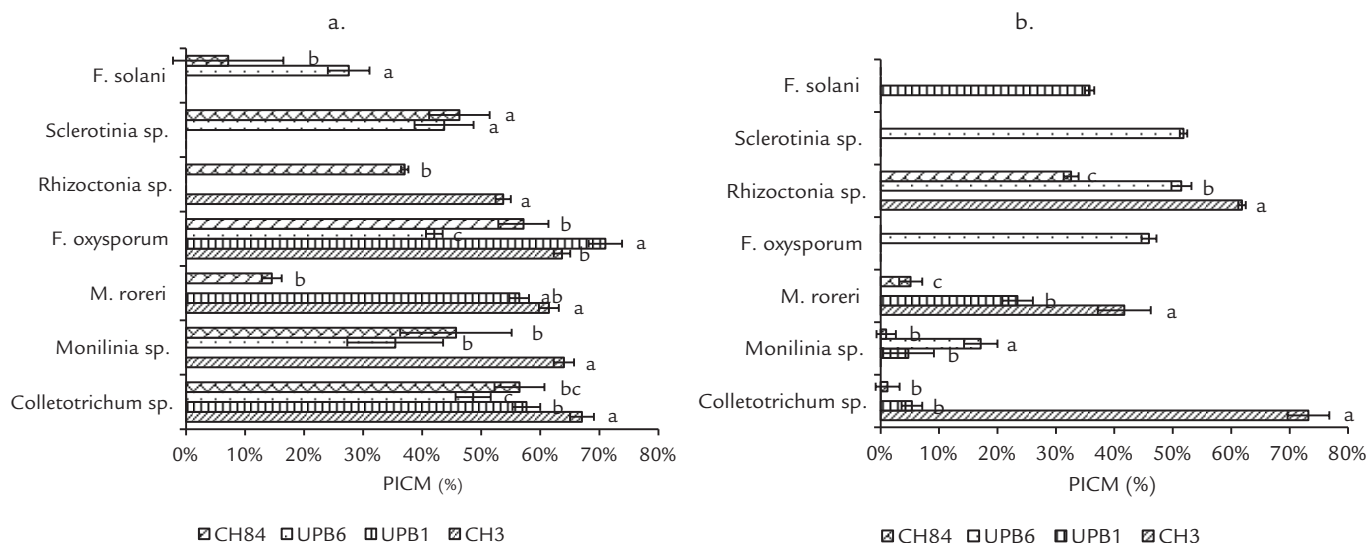


Fig 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) de hongo fitopatógenos 15 días después de inoculación en presencia de *Xylaria* sp. CH3, *Agrocybe* sp. UPB1, *Psilocybe* sp. UPB6 y *Stereum* sp. CH84 en dos fuentes de carbono diferentes. **a.** PICM en PDA. **b.** PICM en ST. Las columnas de cada fitopatógeno con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Las barras en las columnas representan la desviación estándar de la media ($n = 3$).

ST puede deberse a la actividad enzimática propia de cada aislamiento empleada para degradar este sustrato; de esta forma *Stereum* sp. CH84 y *Agrocybe* sp. UPB1 cuentan con las enzimas específicas que le permiten degradar más eficientemente este sustrato que los otros aislamientos.

En las interacciones de *Stereum* sp. CH84 con *Rhizoctonia* sp., *F. solani*, *Sclerotinia* sp. y *Monilinia* sp. fue posible apreciar la producción de pigmentos en la interface (Fig 1b); Peiris *et al.* (2008) indica que estos compuestos pueden tratarse de fenoles y quinonas asociados a enzimas extracelulares, como lacasas. Estas enzimas están implicadas en múltiples funciones presentes en las interacciones miceliales, como cambios en la hidrofobicidad de las paredes celulares de las hifas como medida de protección ante las enzimas hidrolíticas de otros organismos (Larena *et al.*, 2005), y en la producción de algunos compuestos como las quinonas que están involucradas en la formación de melanina, la cual actúa como barrera física contra enzimas degradadoras de la pared celular (Larena *et al.*, 2005).

En medio ST solo se encontraron tres interacciones del tipo RPL, todas pertenecientes a *Xylaria* sp. CH3 (Tabla 1). En general, estos tipos de interacciones se relacionan con los mecanismos de regulación biológica de patógenos (Ghorbanpour *et al.*, 2017); de esta forma, las interacciones clasificadas como RPL indican que se trata de parasitismo, en el que el patógeno es atacado usualmente mediante la producción de enzimas líticas; las interacciones DI involucran un antagonismo indirecto mediante la producción de compuestos que inhiben el organismo patógeno; las interacciones TPI y PMI están relacionadas con la competencia, ya sea por nutrientes o por espacio, en la cual uno de los organismos reduce la disponibilidad de recursos para el otro. Las interacciones RPL_{DI} involucran antibiosis inicial y posterior parasitismo (Badalyan *et al.*, 2004). Boddy (2000) reporta interacciones de reemplazo completo en *Armillaria gallica* por parte de *Xylaria hypoxylon*; Pandey (2012) reporta interacciones de *Xylaria* del tipo RPL_{TPI} sobre *Rhizoctonia solani* y *F. oxysporum*, reemplazo completo en *Alternaria brassicae* y PMI en *F. solani*, *Colletotrichum capsici*, *Phytophthora nicotianae* y *Phoma medicaginis*. Se han reportado interacciones del tipo TPI y

posterior PMI para *Stereum hirsutum* en presencia de *Coprinus micaceus* y *C. disseminatus* (Peiris *et al.*, 2008). También se han documentado interacciones del tipo TPI entre *Psilocybe fasciata* y *Acremonium strictum*, en las que el punto de contacto corresponde a una zona micelial escasa (He *et al.*, 2006).

El mayor IA lo obtuvo el aislamiento *Xylaria* sp. CH3 en medio PDA (IA-30); este resultado es concordante con lo presentado por Pandey (2012), que reporta índices de antagonismo entre 20 y 30 para *Xylaria* sp. En comparación con los IA reportados para especies con alta actividad biocontroladora como *Trichoderma harzianum* (IA 44.5), *T. pseudokoningii* (IA 26) y *T. viride* (IA 26) en presencia de 17 especies diferentes de hongos xilófilos (Badalyan *et al.*, 2004), el aislamiento *Xylaria* sp. utilizado en este estudio se posiciona como un excelente candidato para controlar hongos fitopatógenos.

Se ha demostrado que la producción de diferentes compuestos antifúngicos como proteínas, aminoácidos, compuestos esteroidales, compuestos fenólicos, lípidos y polisacáridos tipo β -glucano entre otros, puede ser elicitada por la fuente de carbono y nitrógeno utilizada en el medio de cultivo, así como por el tipo de cepas enfrentadas en el cultivo dual (Ramadan *et al.*, 2015). Ruiz *et al.* (2010) indican que existe una fuerte influencia de la fuente de carbono en la formación de muchos metabolitos.

Los extractos EC y BM presentaron una mayor riqueza de compuestos con respecto a MC; además, solo en el extracto BM se detectó la presencia de lípidos (Tabla 2). Esta diferencia en la composición de los extractos radica en los niveles de concentración de estos compuestos, dados por la intensidad de coloración obtenida con los reveladores específicos. En este sentido, para el extracto BM se presentaron mayores o iguales niveles en la mayoría de los compuestos con excepción del reportado para azúcares en el extracto EC (Tabla 2). Estos resultados ponen en evidencia la variabilidad estructural de los compuestos sintetizados por este aislamiento de *Xylaria*, lo cual concuerda con lo reportado en diferentes estudios químicos realizados para el género *Xylaria*, en los que se han aislado metabolitos de diversas estructuras como citocalasinas, ácidos grasos, diterpenos glicosidados, sesquiterpenoides,

Tabla 2. Caracterización preliminar de metabolitos secundarios por ensayos colorimétricos en CCD presentes en *Xylaria* sp. CH3. BM, extracto metanólico de biomasa; MC, extracto metanólico del medio de cultivo; EC, homogeneizado de la biomasa y el medio de cultivo.

Muestra	Tipo de metabolito					
	Flavonoides y cumarinas con grupos o-dihidroxi	Fenoles y ácidos hidroxámicos	Lípidos	Azúcares	Esteroles, esteroides y triterpenos glicosidados	Universal
BM	+++	+++	++	++	+++	+++
MC	+	+	-	++	++	+++
EC	++	++	-	+++	+++	+++

+++ Positivo; ++ Intermedio, + No concluyente, - Negativo

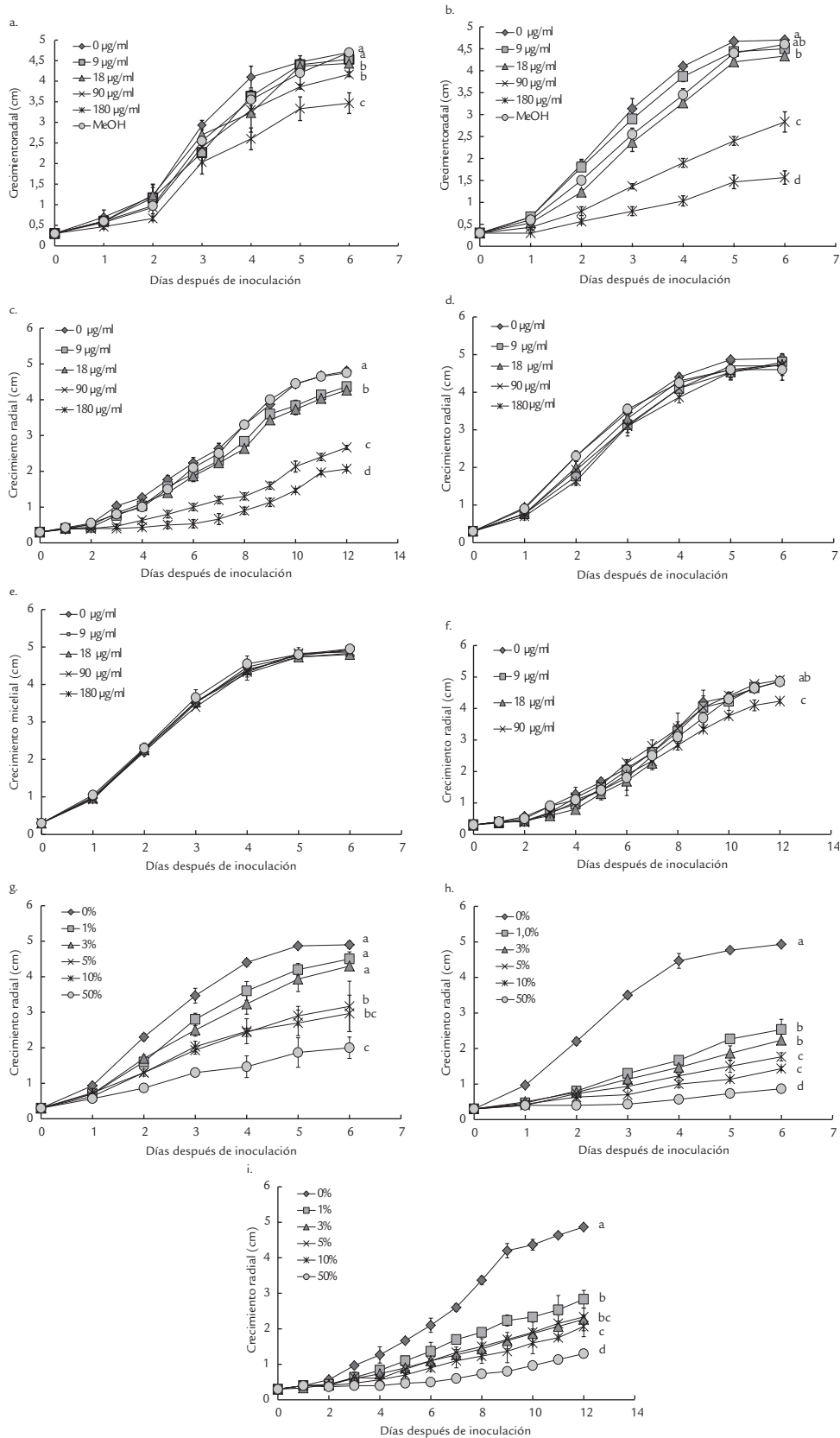


Fig. 3. Crecimiento radial de hongos fitopatógenos en presencia de extractos de *Xylaria* sp. CH3. a. *Fusarium oxysporum* - BM; b. *Colletotrichum* sp. - BM; c. *Moniliophthora roreri* - BM; d. *Fusarium oxysporum* - MC; e. *Colletotrichum* sp.- MC; f. *Moniliophthora roreri* - MC; g. *F. oxysporum* - EC; h. *Colletotrichum* sp.- EC; i. *Moniliophthora roreri* - EC. Las diferencias significativas entre tratamientos se indican con letras diferentes en cada variable de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

esteroides y lactonas a partir de cuerpos fructíferos o medios de cultivo (Wang *et al.*, 2014). También se detectó que estos compuestos permanecen principalmente en la biomasa del hongo y se secretan en menor cantidad al medio de cultivo. Adicionalmente, los resultados arrojados en la presente investigación, en lo referente a ácidos grasos, son similares con lo reportado por Wang *et al.* (2014), quienes determinaron, en extractos de cloroformo/metanol de cuerpos fructíferos de *Xylaria euglosa*, la presencia de compuestos de baja polaridad, como ácidos grasos de cadena larga.

Con base en el análisis anterior y la similitud del perfil cromatográfico en CCD de los extractos de los diferentes aislamientos, se puede inferir que la elevada actividad antagonista que presentó el aislamiento *Xylaria* sp. CH03 puede ser debida a la presencia de los ácidos grasos, ya que los ácidos palmítico, linoleico y esteárico se han reportado con actividad antimicrobiana y antifúngica (Paterson, 2006; Wang *et al.*, 2014). Esta última, en el caso del palmítico, específicamente contra *Fusarium oxysporum* (Liu *et al.*, 2008), de los ácidos linoléico y linolénico contra *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pyrenophora avenae* y *Crinipellis pernicioso* (Walters *et al.*, 2004) y del ácido oléico contra *Colletotrichum fulcatum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Abubacker y Devi, 2014). Sin embargo, cabe anotar que los resultados aquí presentados corresponden a una caracterización preliminar del perfil metabolómico de los aislamientos estudiados y, por lo tanto, es indispensable continuar con el estudio y la identificación inequívoca de los compuestos encontrados, así como evaluar sus diferentes actividades biológicas.

Tarman *et al.* (2011) indican que extractos en EtOAc de medio de cultivo de *Xylaria* sp. exhiben actividades citotóxicas y antibacteriales considerables, pero actividades antifúngicas bajas en concentraciones de 100 a 400 µg por punto de aplicación. Sin embargo, en el presente estudio se utilizó un extracto metanólico que presenta mayor polaridad que el acetato de etilo y por lo tanto extrae compuestos con polaridades distintas, que pueden ser estructuralmente diferentes y que, como en este caso, exhiben propiedades antifúngicas mayores. Por otro lado, Pandey (2012) reporta un PICM de 0 % para los hongos *F. oxysporum* y *Colletotrichum capsici* en presencia de medio de cultivo filtrado de *Xylaria* sp. a concentraciones de 50 %, lo cual no corresponde a lo reportado en el presente estudio, en el que se encontró inhibición desde el 1%, inhibición que dependió del hongo fitopatógeno evaluado. Abdel-Motaal *et al.* (2010) reportan mayor actividad antifúngica de los compuestos secretados al medio de hongos endófitos contra algunos fitopatógenos; sin embargo, esto es contrario a los resultados aquí presentados, donde los compuestos con actividad antifúngica se encuentran presentes principalmente en la biomasa y posiblemente corresponden a ácidos grasos. Se ha reportado que la secreción al medio de cultivo de los

compuestos con actividad antifúngica es inducida por la presencia del hongo fitopatógeno (Ramadan *et al.*, 2015) y por tanto, en ausencia del mismo, estos se mantienen en mayor proporción en la fase intracelular del organismo, como se evidenció en el presente estudio.

CONCLUSIONES

De la investigación realizada sobre hongos macromicetos nativos pertenecientes a los géneros *Xylaria*, *Agrocybe*, *Psilocybe* y *Stereum* se determinó que el crecimiento de estos hongos y su interacción con los hongos fitopatógenos depende del medio de cultivo y de las cepas utilizadas, lo que indica una variabilidad metabólica y un modo de regulación biológica propia de cada organismo. El hongo *Xylaria* sp. CH3 cultivado en PDB mostró tanto la mayor producción de biomasa como la mayor actividad antagonista para los fitopatógenos *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp. y *M. roseri*, acción que podría ser atribuida a la presencia, dentro de los metabolitos biosintetizados por este hongo, de los ácidos grasos, compuestos ya reportados con actividad antifúngica, posicionándolo como un potencial biocontrolador de enfermedades de cultivos de interés agrícola. Sin embargo, es necesario separar y purificar cada uno de estos compuestos y evaluar su potencial antifúngico mediante pruebas *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la clínica de plantas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia y a la Federación Nacional de Cacaoteros, Fedecacao por el suministro de los aislamientos fitopatógenos utilizados en esta investigación. Adicionalmente, a la Dirección de Investigación de la Sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación parcial de esta investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses

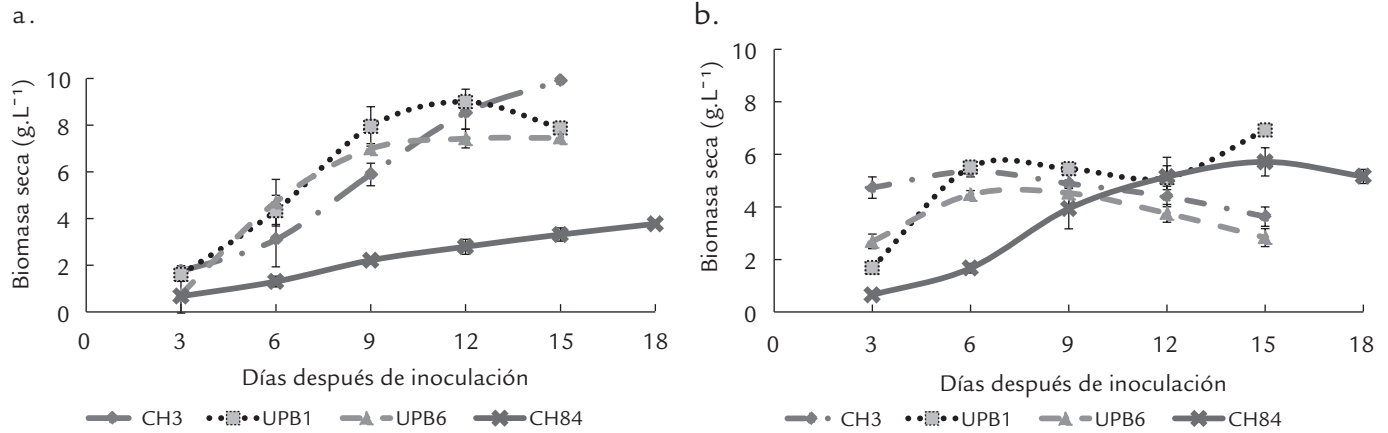
REFERENCIAS

- Abdel-Motaal FF, Nassar MSM, El-Zayat S, El-Sayed M, Shin-Ichi I. Antifungal activity of endophytic fungi isolated from Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Pakistan J Bot.* 2010;42(4):2883-2894.
- Aqueveque P, Céspedes CL, Alarcón J, Schmeda-Hirschmann G, Cañumir J, Becerra J, *et al.* Antifungal activities of extracts produced by liquid fermentations of Chilean *Stereum* species against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). *Crop Prot.* 2016;89:95-100. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.014>
- Aqueveque P, Céspedes CL, Becerra J, Aranda M, Sterner O. Antifungal activities of secondary metabolites isolated from liquid fermentations of *Stereum hirsutum* (Sh134-11) against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). *Food Chem Toxicol.* 2017;109(Part 2):1048-1054. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.036>

- Alia M, Haider BA, Ihsan-ul-haq. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of. *Ind Crops Prod.* 2013;49:400–406. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.033>
- Abubacker MN, Devi KP. *In vitro* antifungal potentials of bioactive compound oleic acid, 3-(octadecyloxy) propyl ester isolated from *Lepidagathis cristata* Willd. (Acanthaceae) inflorescence. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7(Suppl 1):S190-S193. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60230-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60230-3)
- Aziza M, Amrane A. Diauxic growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on amino acids and glucose. *Braz J Chem Eng.* 2012;29(2):203–210. Doi: <http://doi.org/10.1590/S0104-66322012000200001>
- Badalyan S, Innocenti G, Grogory N. Interactions between xylotrophic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. *Phytopathol. Mediterr.* 2004;43:44–48.
- Boddy L. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiol Ecol.* 2000;31(3):185–194. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00683.x>
- Castañó J, Cruz C, Torres-Rojas E. Optimization of the production, purification and characterization of laccase from the native fungus *Xylaria* sp. *Biocatal Agri Biotechnol.* 2015;4(1):710-716. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.012>
- Cataño JD, Crespo CC, Torres E. Evaluation of chemical and biological treatments to degrade oil palm empty fruit bunches (*Elais guineensis* Jacq.) and their potential use. *J Oil Palm Res.* 2019;31(2):271-280. Doi: <https://doi.org/10.21894/jopr.2019.0016>
- Castiblanco C, Etter A, Ramirez A. Impacts of oil palm expansion in Colombia: What do socioeconomic indicators show? *Land Use Policy.* 2015;44:31–43. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2014.10.007>
- Cateni F, Doljak B, Zacchign M, Anderluh M, Piltaver A, Scialino G, et al. New biologically active epidioxysterols from *Stereum hirsutum*. *Bioorg Med Chem.* 2007;17(22):6330–6334. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.08.072>
- Crespo CC, Aime M, Torres E. Exploration for fungi with novel lignocellulolytic enzymes in the High Andes Colombian Forest. En: Muñoz F, editor. *Memorias del VIII Congreso Latinoamericano de Micología.* 4-7 de Noviembre. Medellín: Sayonara Plata Arboleda; 2014.
- Ghorbanpour M, Omidvari M, Abbaszadeh-Dahaji P, Omidvar R, Kariman K. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biol Control.* 2007; 117:147-157. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.006>
- He P, He X, Zhang C. Interactions between *Psilocybe fasciata* and its companion fungus *Acremonium strictum*. *Ecol Res.* 2006;21(3):387–395. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11284-005-0123-0>
- Hoyos L. 1. Conceptos generales en manejo biológico de fitopatógenos. En: Hoyos L, editor. *Enfermedades de plantas: control biológico.* Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia; 2012. p. 1-10.
- Hwang KS, Kim HU, Charusanti P, Palsson B Ø, Lee YS. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotech Adv.* 2014;32(2):255–268. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.008>
- Keay SM, Brown AE. Interactions between *Psilocybe semilanceata* and fungi of its habitat. *Mycol Res.* 1989;93(4):554–556. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80054-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80054-1)
- Kim HO, Lim JM, Joo JH, Kim SW, Hwang HJ, Choi JW, et al. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresour Technol.* 2005;96(10):1175–1182. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.021>
- Larena I, Torres R, De Cal A, Liñán M, Melgarejo P, Domenichini P, et al. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by *Weld* applications of *Epicoccum nigrum*. *Biol Control.* 2005;32(2):305–310. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.10.010>
- Li JF, Qin YK, Tian MQ, Zhang KQ, Li GH. Two new sesquiterpenes from the fungus *Stereum* sp. NN048997. *Phytochem Lett.* 2014;10(2):32–34. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.07.004>
- Liu X, Dong M, Chen X, Jiang M, Lv X, Zhou J. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;78:241–247. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1305-1>
- Merck E. *Dyeing Reagents for Thin-Layer and Paper Chromatography.* Darmstadt, Germany: Merck; 1980. 118 p.
- Molla AH, Fakhru'l-Razi A, Abd-Aziz S, Hanafi MM, Alam MZ. *In-vitro* compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *World J Microbiol Biotechnol.* 2001;(17):849–856. Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1013844306960>
- Morath SU, Hung R, Bennett JW. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol Rev.* 2012;26(2–3):73–83. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>
- Moya LA, Torres E. Hydrolysis of cellulose and oil palm empty fruit bunches by using consortia of fungi isolated from the soil of Colombian high Andean forest. *Agron Colomb.* 2012;30(3):411–418. Doi: <https://doi.org/10.15446/agron.colomb>
- Ngai PHK, Zhao Z, Ng TB. Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides.* 2005;26(2):191–196. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.09.011>
- Orlandini Costa N, LeivasVieira M, Sgarionia V, Pereira MRF, Garcia Montagnini B, Paccola Mesquita SF, et al. Evaluation of the reproductive toxicity of fungicide propiconazole in male rats. *J Toxicol.* 2015;335:55–61. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.06.011>

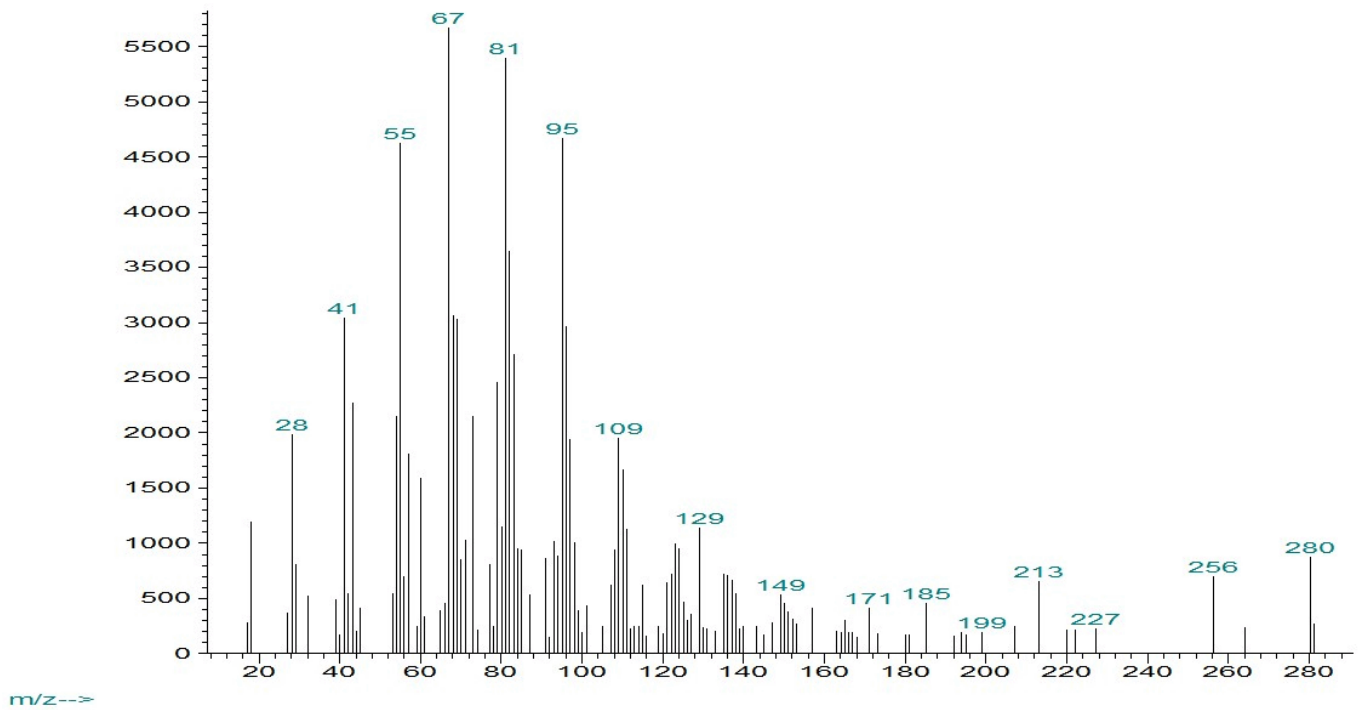
- Pal KK, Gardener BM. Biological Control of Plant Pathogens. *Plant Health Instr.* 2006;1–25. Doi: <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>.
- Pandey VK. Anti plant pathogenic properties of higher fungi especially wild mushrooms. India: Chaudhary Sarwan Kumar Himachal Pradesh Krishi Vishvavidyalaya; 2012. 155 p.
- Paterson RRM. *Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry.* 2006;67(18): 1985–2001. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.004>
- Peiris D, Dunn WB, Brown M, Kell DB, Roy I, Hedger JN. Metabolite profiles of interacting mycelial fronts differ for pairings of the wood decay basidiomycete fungus, *Stereum hirsutum* with its competitors *Coprinus micaceus* and *Coprinus disseminatus*. *Metabolomics.* 2008;4(1):52–62. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0100-4>
- Pongcharoen W, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S, Kühn T, Pelzing M, Sakayaroj J, Taylor WC. Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. *Phytochemistry.* 2008;69(9):1900–1902. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.003>
- Ramadan U, Grkovic T, Balasubramanian S, Salah M, Quinn RJ, Hentschel U. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnol Adv.* 2015;33(6-Part-1):798–811. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.06.003>
- Ramesh V, Karunakaran C, Rajendran A. Optimization of submerged culture conditions for mycelial biomass production with enhanced antibacterial activity of the medicinal macro fungus *Xylaria* sp. Strain R006 against drug resistant bacterial pathogens. *Curr Res Environ Appl Mycol.* 2014;4(1):88–98. Doi: <https://doi.org/10.5943/ream/4/1/7>
- Regueiro J, Olgún N, Simal-gándara J, Suñol C. Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultured cortical neurons. *Environ Res.* 2015;140:37–44. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.03.013>
- Richardson SN, Walker AK, Nsiama TK, McFarlane J, Sumarah MW, Ibrahim A, *et al.* Griseofulvin-producing *Xylaria* endophytes of *Pinus strobus* and *Vaccinium angustifolium*: evidence for a conifer-understorey species endophyte ecology. *Fungal Ecol.* 2014;11(2011):107–113. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.05.004>
- Ruiz B, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, *et al.* Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit Rev Microbiol.* 2010;36(2):146–167. Doi: <https://doi.org/10.3109/10408410903489576>
- Shaikh AS, Tang YJ, Mukhopadhyay A, García Martín H, Gin J, Benke PI, *et al.* Study of stationary phase metabolism via isotopomer analysis of amino acids from an isolated protein. *Biotechnol Prog.* 2009;26(1):52–56. Doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.325>
- Silva GH, de Oliveira CM, Teles HL, Pauletti PM, Castro-Gamboa I, Silva DHS, *et al.* Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). *Phytochem Lett.* 2010;3(3):164–167. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2010.07.001>
- Dickinson CH, Skidmore AM. Interactions between germinating spores of *Septoria nodorum* and phyloplane fungi. *Trans Brit Mycol Soci.* 1976;66(1):45–56. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80091-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80091-5)
- Tarman K, Lindequist U, Wende K, Porzel A, Arnold N, Wessjohann LA. Isolation of a New Natural Product and Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Extracts from Fungi of Indonesian. *Mar Drugs.* 2011;9(3):294–306. Doi: <https://doi.org/10.3390/md9030294>
- Walters D, Raynor L, Mitchell A, Walker R, Walker K. Antifungal activities of four fatty acids against Plant Pathogenic fungi. *Mycopathologia.* 2004;157(1), 87–90. Doi: <https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000012222.68156.2c>
- Wang XN, Huang WY, Du JC, Li CY. Chemical constituents from the fruiting bodies of *Xylaria euglossa* Fr. and its chemotaxonomic study. *Biochem Systemat and Ecol.* 2014;54:157–159. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.12.018>
- Wu SH, He J, Li XN, Huang R, Song F, Chen YW, *et al.* Guaiane sesquiterpenes and isopimarane diterpenes from an endophytic fungus *Xylaria* sp. *Phytochemistry.* 2014;105:197–204. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.04.016>
- Yao JN, Chen L, Chen HP, Zhao ZZ, Zhang SB, Huang Y, *et al.* Miscellaneous lanostane triterpenoids with cytotoxicities from fruiting bodies of the basidiomycete *Stereum* sp. *Fitoterapia.* 2017;12:227–234. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.11.020>

ANEXOS



Anexo 1. Cinéticas de crecimiento de *Xylaria* sp. CH3, *Agrocybe* sp. UPB1, *Psilocybe* sp. UPB6 y *Stereum* sp. CH84 en dos fuentes de carbono **a.** Papa dextrosa PDB **b.** Salvado de trigo ST.

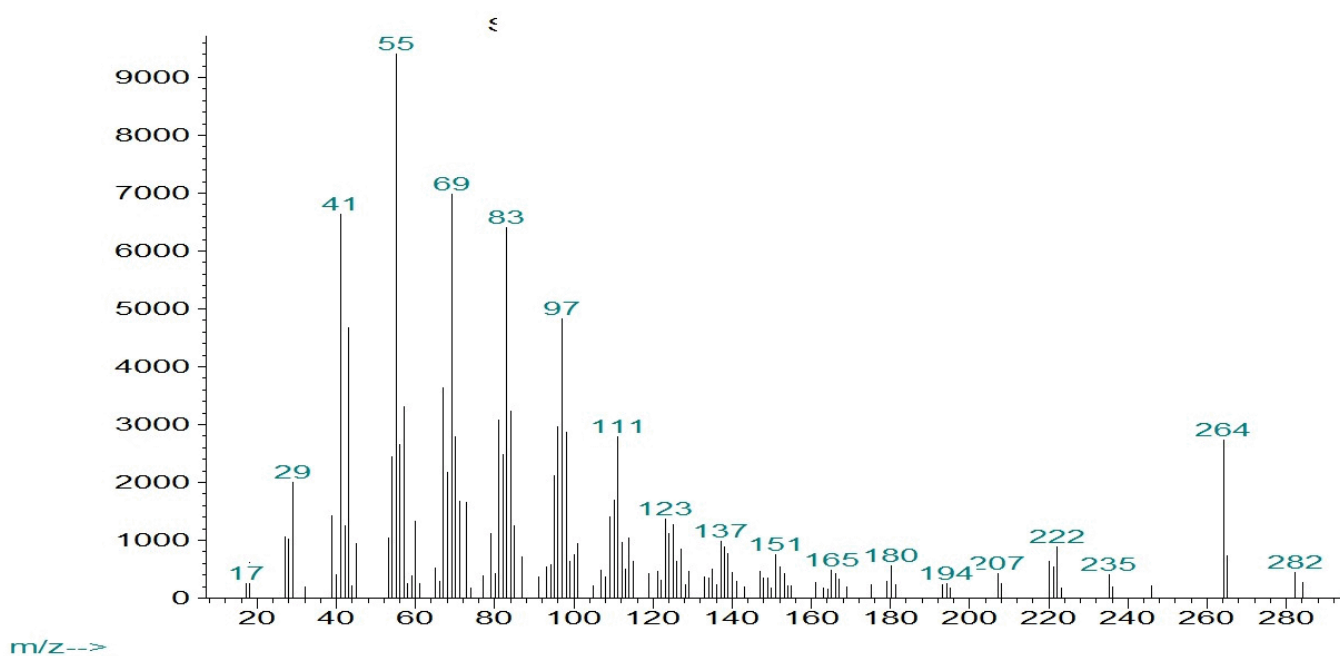
Abundance



a. Ácido Linoléico

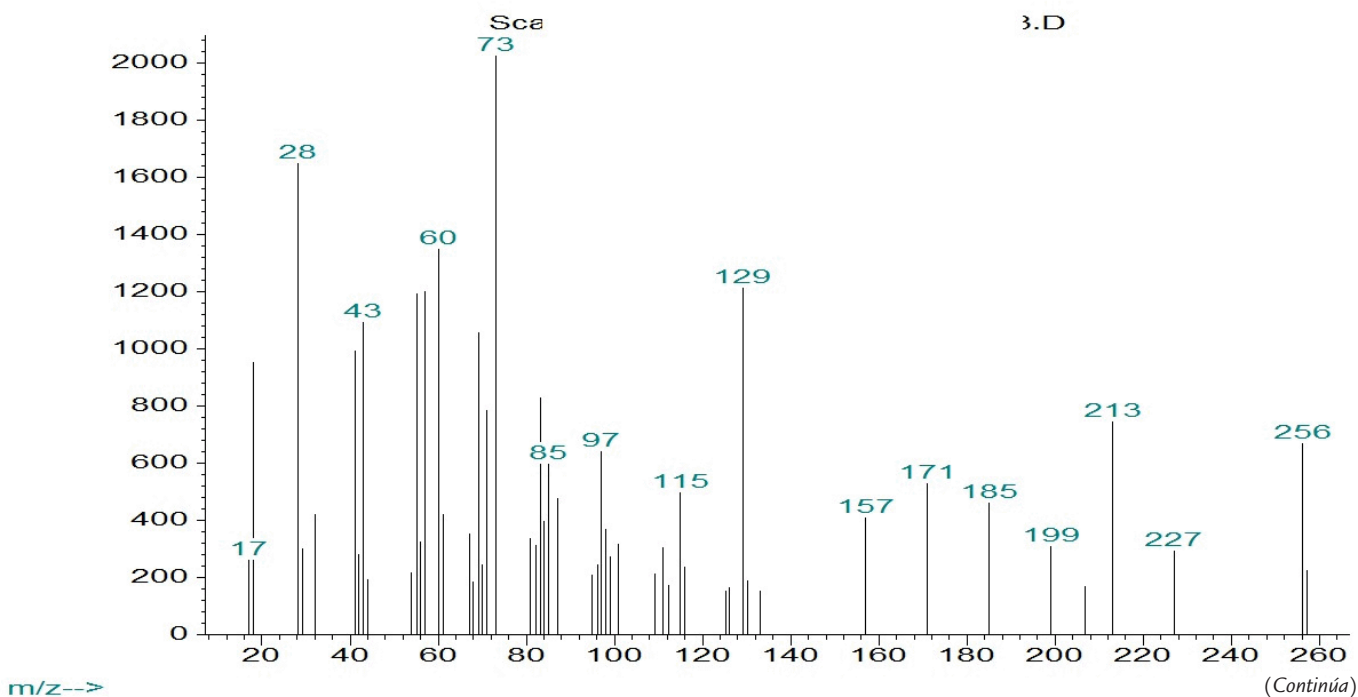
Anexo 2. Espectros de masas de los ácidos grasos del extracto en Diclorometano (DCM) de la biomasa de *Xylaria* sp. a. Ácido Linoléico b. Ácido Oléico c. Ácido Palmítico

Abundance



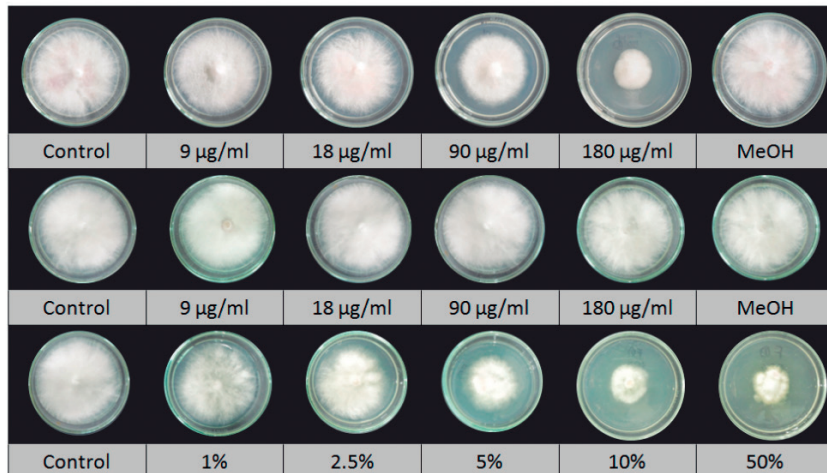
b. Ácido Oléico

Abundance

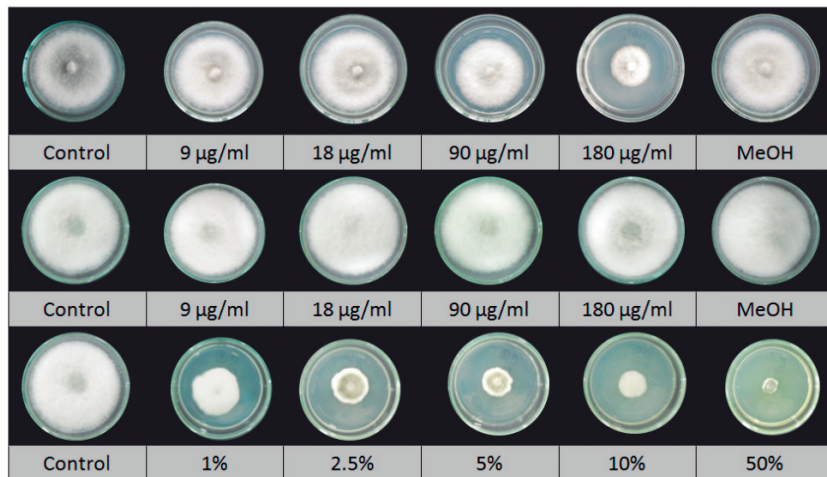


c. Ácido Palmítico

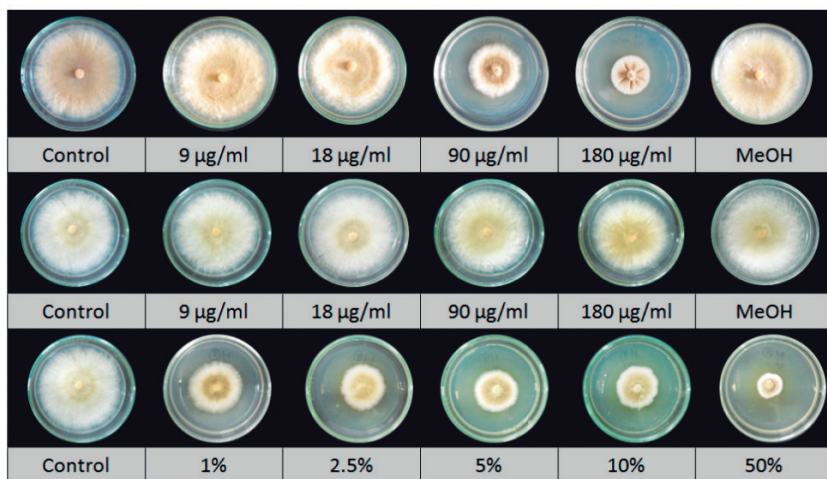
Anexo 2. Espectros de masas de los ácidos grasos del extracto en Diclorometano (DCM) de la biomasa de *Xylaria* sp. a. Ácido Linoléico b. Ácido Oléico c. Ácido Palmítico



a. *Fusarium oxysporum*

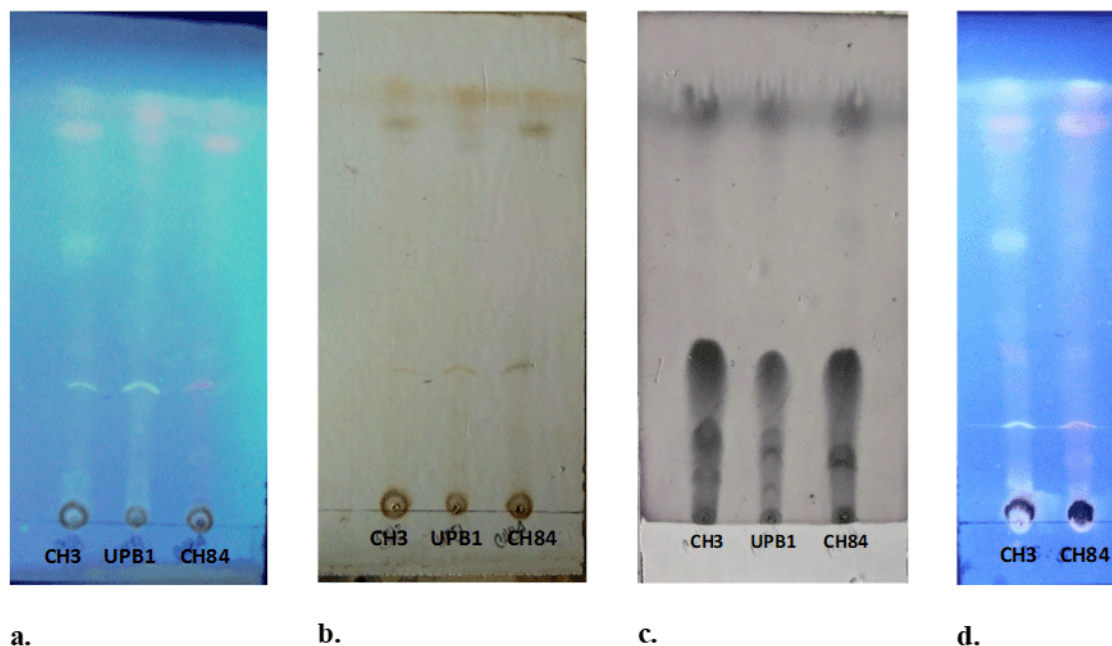


b. *Colletotrichum* sp.



c. *Moniliophthora roreri*

Anexo 3. Actividad antifúngica de extractos de *Xylaria* sp.CH3. BM en concentraciones de 9 µg.ml⁻¹, 18 µg.ml⁻¹, 90 µg.ml⁻¹ y 180 µg.ml⁻¹; MC en concentraciones de 9 µg.ml⁻¹, 18 µg.ml⁻¹, 90 µg.ml⁻¹ y 180 µg.ml⁻¹. EC en concentraciones de 1 %, 3 %, 5 %, 10 % y 50 % (v/v). MeOH, Testigo (-) con metanol a. *Fusarium oxysporum*; b. *Colletotrichum* sp. y c. *Moniliophthora roreri*.



Anexo 4. CCD de extractos metanólicos de la biomasa de *Xylaria* sp. CH3, *Agrocybe* sp. UPB1, *Stereum* sp. CH84 con diferentes reveladores a. UV 366 nm MeOH: EtOAc (98: 2) b. Cloruro de Zinc 25 % MeOH: EtOAc (95: 5) c. Revelador universal MeOH: EtOAc (50:50) d. UV 366 nm MeOH: EtOAc (95: 5).