



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN NEMATICIDA *in vitro* DE  
FILTRADOS OBTENIDOS A PARTIR DE HONGOS  
NEMATÓFAGOS CULTIVADOS EN MEDIOS  
ELICITADOS CON EXTRACTO LARVAL DEL  
PARÁSITO *Haemonchus contortus***

Tesis que presenta

Marilem Rodríguez Labastida

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2019



*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Marilem Rodríguez Labastida**, titulado “**Evaluación nematocida *in vitro* de filtrados obtenidos a partir de hongos nematófagos cultivados en medios elicitados con extracto larval del parásito *Haemonchus contortus***”, fue realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del INIFAP, en la línea de Biotecnología de Productos Naturales, bajo la dirección de la Dra. María Marcela Gamboa Angulo y del Dr. Pedro Mendoza de Gives, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 8 de Noviembre de 2019.



## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: \_\_\_\_\_

Rodríguez Labastida Marilem



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, en el Laboratorio de Productos Naturales, y en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del INIFAP y forma parte del proyecto titulado “Evaluación *in vitro* de filtrados obtenidos a partir de hongos nematófagos contra larvas infectantes de *Haemonchus contortus*” bajo la dirección de la Dra. María Marcela Gamboa Angulo y el Dr. Pedro Mendoza de Gives, del CENID-SAI, INIFAP. Número de proyecto 1-1.6-1365733019-P-M.2-1.





## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero a través de la beca mensual con número 462934.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), número de proyecto 1-1.6-1365733019-P-M.2-1, por el apoyo económico durante las estancias realizadas en su centro.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por las facilidades para la realización de este proyecto, en especial a la Unidad de Biotecnología y al personal de la Dirección de Docencia por su siempre amable atención.

Al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI), así como al personal del Laboratorio de Helmintología de dicha institución, por las instalaciones y facilidades para llevar a cabo los ensayos biológicos de este proyecto.

A mis directores de tesis, Dra. María Marcela Gamboa Angulo y Dr. Pedro Mendoza de Gives, con gran respeto y cariño, por todo el aprendizaje, por haberme aceptado como su estudiante y por sus palabras de ánimo y críticas constructivas, que hicieron posible mi formación. Siempre recibí el apoyo de su equipo de trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. María Manuela de Jesús Reyes Estebanez y Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, por sus valiosas aportaciones al desarrollo de este trabajo y el tiempo que dedicaron a mi formación académica.

A los miembros de mi comité revisor: Dra. María Manuela de Jesús Reyes Estebanez, Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela y Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, por enriquecer este trabajo con sus valiosas observaciones durante su desarrollo.

A la I.Q. Irma Leticia Medina Baizabal, por su amable apoyo técnico en el laboratorio en la fase experimental del trabajo de tesis, en particular, en el análisis cromatográfico, y porque además se convirtió en una gran amiga.

A la Dra. María Eugenia López Arellano y la Mtra. Jocelyn Maza López, por su apoyo técnico en la fase experimental del trabajo y por brindarme y compartir conmigo su conocimiento en la realización de las pruebas de laboratorio.

Al Dr. Agustín Olmedo Juárez, por su apoyo en el análisis estadístico de los resultados del proyecto y, sobre todo, por sus consejos y por su valiosa amistad.

A mis amigos y compañeros del CICY, Tania, Aida, Leticia, Mónica, Mari Toña, Horacio, Syndel, Dayvi, Andrés, Demetrio, Jesús y Diana, por su apoyo, su amistad, por hacer amena mi estancia al estar lejos de casa y por formar parte de mi vida.

A mis amigos del Laboratorio de Helmintología del CENID-SAI, Jocelyn, Silvina, David, Sarahi, Gabriel, Sarai, Josué y Antonio, por sus consejos, por su amistad y por su gran apoyo siempre.

A la Dra. Liliana Marcelino Aguilar y la Dra. Sarahi Castañeda Ramirez, gracias por haberme apoyado siempre, y por sus consejos, gracias infinitas.



## DEDICATORIAS

**Dedico esta tesis a:**

A Dios

*A todas las personas que más quiero, las que me curan el alma con un abrazo. Las que me hacen reír y sus sonrisas llenan mi corazón.*

*¡Gracias por existir!*

A mi padre Néstor Rodríguez R.  
A mi madre Alejandrina Labastida M.

Porque siempre me han apoyado, en mi formación académica y como persona. Por todos sus consejos y palabras de amor. Gracias por todo, los amo con toda mi alma.

*Tener en nuestro corazón, el amor del hogar, lo mantiene siempre sano, siempre en paz.*

A mi hermosa familia, Yazmín, Santiago, Citlali, Azucena, Jonathan y sobrinos, Zeltzin, Alan, Isaac, Atziry, Yaretzi, Arturo, Fernando, Regina, Eduardo y Matías.

Marilem



---

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1. IMPORTANCIA DE LOS OVINOS	5
1.1. GENERALIDADES DE LA INDUSTRIA OVINA EN MÉXICO	5
1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA INDUSTRIA OVINA EN MÉXICO	5
1.3 PARASITOSIS EN OVINOS	6
1.4 NEMÁTODOS GASTROINTESTINALES EN PEQUEÑOS RUMIANTES	7
1.5 <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	8
1.5.1 CICLO BIOLÓGICO DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	9
1.5.2 IMPACTO ECONÓMICO CAUSADO POR <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	11
1.6 MÉTODOS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE NEMÁTODOS GASTROINTESTINALES	11
1.6.1 ANTIHELMÍNTICOS	11
1.7 RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA	15
1.8 MÉTODOS DE CONTROL ALTERNATIVO DE NEMÁTODOS GASTROINTESTINALES	15
1.9 MÉTODOS DE CONTROL ALTERNATIVO UTILIZADOS PARA REDUCIR EL CONTACTO DE LOS NEMÁTODOS GASTROINTESTINALES CON SU HOSPEDANTE	16
1.10 HONGOS NEMATÓFAGOS	17
1.10.1 MEDIOS DE CULTIVO DE LOS HONGOS	18

---

<b>NEMATÓFAGOS</b>	
<b>1.10.2 MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDO PARA HONGOS NEMATOFÁGOS</b>	<b>19</b>
<b>1.11 INTERACCIÓN HONGO-NEMÁTODO</b>	<b>19</b>
<b>1.12 CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS</b>	<b>20</b>
<b>1.13 FACTORES ESTIMULANTES EN LA PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS ANTAGÓNICAS Y ÓRGANOS DE CAPTURA EN LOS HONGOS NEMATÓFAGOS</b>	<b>23</b>
<b>1.14 ELICITACIÓN</b>	<b>24</b>
<b>1.15 PRODUCTOS DE EXCRECIÓN Y SECRECIÓN DE NEMÁTODOS GASTROINTESTINALES</b>	<b>25</b>
<b>1.16 INDUCTORES DE LA MORFOGÉNESIS EN HONGOS NEMATÓFAGOS</b>	<b>25</b>
<b>1.17 HONGOS NEMATÓFAGOS EN MÉXICO</b>	<b>28</b>
<b>1.17.1 GÉNERO <i>ARTHROBOTRYS</i></b>	<b>29</b>
<b>1.17.2 <i>ARTHROBOTRYS MUSIFORMIS</i></b>	<b>29</b>
<b>1.17.3 <i>ARTHROBOTRYS OLIGOSPORA</i></b>	<b>30</b>
<b>1.17.4 <i>CLONOSTACHYS ROSEA</i></b>	<b>32</b>
<b>1.17.5 <i>DUDDINGTONIA FLAGRANS</i></b>	<b>33</b>
<b>1.18 PRUEBAS <i>IN VITRO</i></b>	<b>34</b>
<b>1.19 ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS</b>	<b>34</b>
<b>1.20 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>35</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>36</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>37</b>

---

<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>37</b>
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>39</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>2.1 LOCALIZACIÓN</b>	<b>39</b>
<b>2.2 OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>39</b>
<b>2.2.1 LARVAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i></b>	<b>39</b>
<b>2.3 HONGOS NEMATÓFAGOS</b>	<b>42</b>
<b>2.3.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS</b>	<b>43</b>
<b>2.4 EXPERIMENTOS PRELIMINARES EXPLORATORIOS DE CULTIVO DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS</b>	<b>43</b>
<b>2.4.1 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS</b>	<b>43</b>
<b>2.4.2 METILACIÓN</b>	<b>46</b>
<b>2.4.3 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS</b>	<b>46</b>
<b>2.5 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO PROTEICO DE LARVAS INFECTANTES DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> (ECL)</b>	<b>46</b>
<b>2.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES</b>	<b>47</b>
<b>2.7 CULTIVOS LÍQUIDOS DE HONGOS NEMATÓFAGOS</b>	<b>48</b>
<b>2.7.1 PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE LOS CULTIVOS LÍQUIDOS</b>	<b>48</b>
<b>2.7.2 PROCEDIMIENTO PARA OBTENER LOS FILTRADOS DE HONGOS NEMATÓFAGOS</b>	<b>48</b>



---

<b>2.8 DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>48</b>
<b>2.9 MORTALIDAD DE LARVAS INFECTANTES DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i></b>	<b>49</b>
<b>2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>51</b>
<b>2.10.1 DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR</b>	<b>51</b>
<b>2.11 MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	<b>51</b>
<b>2.12 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE LOS FILTRADOS</b>	<b>51</b>
<b>2.13 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>51</b>
<b>2.14 RESULTADOS</b>	<b>53</b>
<b>2.14 RENDIMIENTO DEL MATERIAL FUNGAL</b>	<b>53</b>
<b>2.14.1 RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS PRE-LIMINARES</b>	<b>54</b>
<b>2.14.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE LARVAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> PARA SER UTILIZADOS COMO INDUCTOR DE LA MORFOGÉNESIS Y COMO POSIBLE ELICITOR DE COMPUESTOS NEMATICIDAS</b>	<b>56</b>
<b>2.14.3 RESULTADOS DEL EFECTO NEMATICIDA <i>IN VITRO</i> DE FILTRADOS DE CUATRO HONGOS NEMATÓFAGOS</b>	<b>57</b>
<b>2.14.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>59</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>69</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>69</b>
<b>3.1 CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>3.2 PERSPECTIVAS</b>	<b>70</b>

---

**REFERENCIAS**

**71**

**ANEXOS**

**93**

---

## LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.** Signos clínicos observados en ovinos parasitados con nemátodos gastrointestinales
- Figura 2.** Larva infectante de *Haemonchus contortus*
- Figura 3.** Ciclo de vida de *Haemonchus contortus*
- Figura 4.** Estructura química del bencimidazol y estructura química del albendazol
- Figura 5.** Estructura química del pirantel, levamisol y morantel
- Figura 6.** Estructura química de las lactonas macrocíclicas
- Figura 7.** *Arthrobotrys musiformis* en PDA (AM-CENID-1)
- Figura 8.** *Arthrobotrys oligospora* en PDA (AO-CENID-1)
- Figura 9.** *Clonostachys rosea* en PDA (TZH-27)
- Figura 10.** *Duddingtonia flagrans* en PDA (FTHO-8)
- Figura 11.** Diagrama de la estrategia experimental
- Figura 12.** Ubicación de Centros de Investigación
- Figura 13.** Proceso de obtención de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*
- Figura 14.** Hongos nematófagos re-activados en agar papa dextrosa
- Figura 15.** Placa de Elisa de 96 pozos
- Figura 16.** Perfil proteico de la larva infectante de *Haemonchus contortus*
- Figura 17.** Cromatogramas de líquidos de las fracciones de los filtrados de hongos nematófagos
- Figura 18.** Estructura de flagranonas A, B y C de *Duddingtonia flagrans*

---

---

## LISTADO DE CUADROS

- Cuadro 1.** Principales estados productores de carne de ovino por entidad
- Cuadro 2.** Principales grupos de antihelmínticos
- Cuadro 3.** Algunos inductores de hongos y sus objetivos blancos
- Cuadro 4.** Hongos nematófagos en estudio y del cepario de origen
- Cuadro 5.** Diseño experimental de los tratamientos en estudio de cultivo de hongos nematófagos
- Cuadro 6.** Diseño experimental de la confrontación de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* con filtrados de hongos nematófagos
- Cuadro 7.** Rendimiento de los extractos etanólicos obtenidos de la fermentación en arroz
- Cuadro 8.** Fracciones orgánicas de acetonitrilo de los filtrados fungales producidos en Czapek Dox con y sin el inductor
- Cuadro 9.** Resultados de la confrontación *in vitro* de los extractos de hongos nematófagos con larvas infectantes de *Haemonchus contortus* expresados en porcentaje de mortalidad en dos tiempos de incubación
- Cuadro 10.** Resultados de la confrontación *in vitro* de los extractos del hongo *Arthrobotrys musiformis* con larvas de *Haemonchus contortus* expresados en porcentaje de mortalidad en tres tiempos de incubación.
- Cuadro 11.** Proporción de larvas muertas de *Haemonchus contortus* (L3) recuperadas de las placas de microtitulación
- Cuadro 12.** Componentes nutricionales de los medios de cultivo
- Cuadro 13.** Compuestos con actividades biológicas importantes que han sido identificados a partir de cepas de hongos nematófagos

---

## ABREVIATURAS

<b>AO-CENID-1</b>	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
<b>AM-CENID-1</b>	<i>Arthrobotrys musiformis</i>
<b>FTHO-8</b>	<i>Duddingtonia flagrans</i>
<b>TZH-27</b>	<i>Clonostachys rosea</i>
<b>CPD</b>	Caldo papa dextrosa
<b>Cz-Dox</b>	Czapek dox
<b>L3</b>	Larvas infectantes
<b>ECL</b>	Extracto crudo de larvas infectantes de <i>H. contortus</i>
<b>NGI</b>	Nemátodos Gastrointestinales
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>HN</b>	Hongos nematófagos
<b>mm</b>	Milímetros
<b>μ</b>	Micras
<b>AH</b>	Antihelmínticos (a)
<b>RA</b>	Resistencia antihelmíntica
<b>CB</b>	Control biológico
<b>APD</b>	Agar papa dextrosa
<b>AHM</b>	Agar harina de maíz
<b>MS</b>	Metabolitos secundarios
<b>Da</b>	Dalton
<b>FL</b>	Filtrado liofilizado

---

## RESUMEN

Las nematodiasis gastrointestinales en ovinos causan enormes pérdidas. Estas parasitosis se tratan con drogas sintéticas, las cuales provocan resistencia en los parásitos, pueden dejar residuos en carne y leche y dañar el ambiente, pues se eliminan en heces y orina al suelo, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas que reemplacen a los antihelmínticos. Este estudio inició con el monitoreo de la actividad nematocida de extractos etanólicos de cuatro hongos nematófagos (HN) cultivados en arroz fermentado sobre larvas infectantes del nemátodo *Haemonchus contortus*. En una segunda etapa, se evaluó la actividad antihelmíntica *in vitro* de filtrados de cultivos líquidos Caldo papa dextrosa y Czapek dox (CPD y Cz-Dox, respectivamente) de las cuatro cepas contra este nemátodo. Los HN evaluados fueron *Arthrobotrys oligospora* (AO-CENID-1), *Arthrobotrys musiformis* (AM-CENID-1), *Duddingtonia flagrans* (FTHO-8) y *Clonostachys rosea* (TZH-27). Adicionalmente, los hongos fueron sembrados en los mismos medios enriquecidos con el extracto crudo de larvas infectantes (ECL) de *H. contortus*, con la finalidad de determinar si estos extractos ejercen en los hongos un posible efecto elicitor de metabolitos con actividad nematocida.

Los bioensayos con los filtrados de cultivo se llevaron a cabo en placas de cultivo de células de 96 pozos. Los datos de motilidad larval se registraron a las 24 y 48 h y se reportan como porcentajes de mortalidad larval. Los resultados con los extractos orgánicos no mostraron actividades nematocidas importantes. La mortalidad en los medios Cz-dox y CPD en ausencia de ECL, estuvo en un rango entre 0-27%. En contraste, los filtrados que contenían el inductor causaron una mortalidad larval variable de 15.3-42.4% en *D. flagrans* (CPD) y *C. rosea* (CPD), mientras que los valores más elevados de mortalidad correspondieron a *D. flagrans* con 80.5% (Cz-Dox), *A. oligospora* con 69.9% (Cz-Dox) y *A. musiformis* con 66.8% (Cz-Dox). Los resultados del presente estudio nos llevan a concluir que los hongos evaluados producen compuestos nematocidas y un extracto de larvas de *H. contortus* adicionado a los medios de cultivo actúa como un potente agente estimulante de compuestos nematocidas.

---

---

---



---

## ABSTRACT

Gastrointestinal nematodiasis cause enormous economic losses in sheep flock farms. These parasitoses are treated with synthetic drugs, which cause resistance in the parasites, can leave residues in meat and milk and damage the environment, since they are eliminated in feces and urine to the ground, so it is necessary to look for new alternatives that replace these synthetic anthelmintics. Initially, this study was focused on screening the nematicidal activity of ethanolic extracts obtained from nematophagous fungi (NF) cultured on fermented rice against infective larvae of *Haemonchus contortus*. In a second stage, the *in vitro* anthelmintic activity of liquid culture filtrates produced in papa dextrose broth (PDB) and Czapek dox (Cz-Dox) of the four strains against this nematode was assessed. These NF were *Arthrobotrys oligospora* (AO-CENID-1), *Arthrobotrys musiformis* (AM-CENID-1), *Duddingtonia flagrans* (FTHO-8) and *Clonostachys rosea* (TZH-27). The culture filtrates were obtained by culturing them in two media: PDB and Cz-Dox. Additionally, both fungi were cultured in the same media enriched with a crude extract of infective larvae of *H. contortus* (LCE), in order to determine which extract act as an elicitor of metabolites with nematocidal activity.

The bioassays with the culture filtrates were performed in 96-well cell culture plates. Larval motility data were recorded at 24 and 48 hours and reported as larval mortality. The results with the organic extracts did not show important nematicidal activities. Mortality in the media of Cz-Dox and PDB in absence of LCE were in a range of 0-27%. In contrast, the filtrates containing the elicitor caused variable larval mortality values of 15.3-42.4% in *D. flagrans* (PDB) and *C. rosea* (PDB), while the highest mortality values corresponded to *D. flagrans* with 80.5% (Cz-Dox), *A. oligospora* with 69.9% (in Cz-Dox) and *A. musiformis* with 66.8% (in Cz-Dox). The results of the present study led us to conclude that the NF evaluated produce nematicidal compounds and an extract of *H. contortus* larvae added to the culture media acts as a potent elicitor of nematicidal compounds.

---

---

---

## INTRODUCCIÓN

Los parásitos gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud animal que afectan severamente a la ganadería en México y en el mundo, dando origen a la reducción en la producción y a importantes pérdidas económicas (Esteban *et al.*, 2013; FAO, 2012; Hoste *et al.*, 2011). Dentro de los principales parásitos que afectan a los ruminantes y particularmente al ganado ovino y caprino se encuentran los nemátodos gastrointestinales (NGI) (Guilleard, 2012). Estas enfermedades provocan un cuadro de anemia, anorexia, debilidad y una alta susceptibilidad para contraer otras enfermedades, pudiendo llegar a morir en caso de infecciones masivas y, particularmente, cuando se presenta en animales jóvenes (NADIS, 2015).

Las nematodiasis gastrointestinales han sido controladas de manera tradicional mediante el uso de productos antihelmínticos sintéticos o semisintéticos, siendo hasta ahora el método de control más efectivo establecido en todo el mundo. Estos se administran en los animales con la finalidad de reducir las parasitosis y mejorar el estado de salud del ganado (Braga y Araujo, 2014; Jackson y Miller 2006), los más comunes son: lactonas macrocíclicas, bencimidazoles y febendazoles (Anziani *et al.*, 2015). No obstante, este método de control trae algunas consecuencias negativas en su uso, como la presencia de resistencia en los parásitos hacia los medicamentos antiparasitarios (Irum *et al.*, 2015). Otro problema con el uso de los antiparasitarios es el riesgo a la salud pública, debido a los residuos tóxicos que pueden permanecer en los productos y subproductos de los animales para consumo humano (Floate, 1998).

Otros problemas que desencadena el uso inadecuado de los antiparasitarios contra nemátodos de ovinos y caprinos incluye el posible deterioro al medio ambiente, ya que algunas moléculas de compuestos químicos antiparasitarios administrados en los animales son eliminados al ambiente junto con las heces, sin haber sufrido degradación y afectan a organismos benéficos en el suelo, además de llegar a contaminar el subsuelo (Sprat, 1997).

Ante esta situación, se buscan estrategias integrales del control de los NGI, desde una perspectiva sustentable que considere la conservación y respeto al medio ambiente. Algunas estrategias de control diferentes del uso de antihelmínticos convencionales son el

uso de control biológico basado en la utilización de enemigos naturales de los nemátodos, tales como los hongos nematófagos (Barron, 1977). Estos microorganismos viven en el suelo y en presencia de nemátodos son estimulados por el forcejeo de los nemátodos (Cruz *et al.*, 2009). Forman trampas a partir de sus micelios y capturan, matan y se alimentan de los nemátodos de vida libre, huevos y estadios larvarios de los parásitos del ganado (Braga y Araujo, 2014; Yang *et al.*, 2007a). Entre los microorganismos que regulan las densidades de nemátodos en el suelo, se encuentran los hongos nematófagos (HN). Estos poseen comportamientos parasitarios, antagónicos o predatorios, algunas especies tienen potencial para biocontrolar a través de actividades antagonistas, incluyendo la producción de compuestos nematotóxicos (Bogús *et al.*, 2005; Kerry 2000). Estos microorganismos pueden afectar la viabilidad de una o más etapas del parásito (López-Llorca y Jansson, 2006).

Durante los últimos años se ha descubierto que el mecanismo de acción de los HN es una combinación de la liberación de enzimas hidrolíticas extracelulares como proteasas séricas, quitinasas y colagenasas, las cuales digieren la cutícula del nemátodo, además de la fuerza mecánica que ejercen los órganos de captura (Paz-Silva *et al.*, 2011). A estos metabolitos nematotóxicos se les ha encontrado diversidad de actividades biológicas importantes que incluyen antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, antiparasitarios, entre otras actividades (Torres-Acosta *et al.*, 2012a).

Existen varios medios de cultivo que son utilizados para la incubación y aislamiento de los HN y el crecimiento de estos hongos dependerá en gran medida de la cantidad y calidad del contenido de los nutrientes (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006). En la búsqueda de compuestos nematotóxicos o antagónicos de nemátodos, el uso de filtrados obtenidos a partir de procesos fermentativos en medios de cultivo líquido se ha intensificado en los últimos años, debido a la forma fácil, rápida y eficiente de obtención de toxinas, enzimas o compuestos derivables de sus metabolitos (Liu *et al.*, 2008; López-Llorca *et al.*, 2008). También son utilizados por su facilidad de controlar variables importantes como la temperatura, la relación carbono/nitrógeno del sustrato, el contenido de oxígeno, la velocidad de agitación y el pH, entre otras (Gregori *et al.*, 2007). La manipulación y control que se tiene sobre estos factores puede incrementar o disminuir significativamente la producción de determinados metabolitos secundarios, aunque son múltiples los factores

que afectan un cultivo. La adición de nemátodos como cebos en medios de cultivo, pueden estimular de manera efectiva el crecimiento de órganos de captura y, en su defecto, la producción de metabolitos secundarios (Wyborn *et al.*, 1969).

En el grupo de trabajo del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del INIFAP de Jiutepec, Morelos se han identificado y seleccionado hongos nematófagos que han sido evaluados al ser administrados por vía oral en ovinos. En las heces de los animales tratados con los hongos se ha observado una sustancial reducción en el número de larvas infectantes de nemátodos gastrointestinales (Arroyo-Balán *et al.*, 2008; Mendoza de Gives *et al.*, 2000; Mendoza de Gives, 1998). Esta metodología sirve como una estrategia de control biológico indirecto, ya que rompe el ciclo biológico de los parásitos a nivel de heces e impide la diseminación de la infección al resto del pastizal (Casillas-Aguilar *et al.*, 2008).

Los HN producen sustancias bioactivas, con un número importante de usos medicinales; sin embargo, poco se conoce sobre su actividad antiparasitaria en contra de nemátodos de importancia económica en la industria ovina (Braga y Araujo, 2014). Por lo tanto, este estudio fue diseñado para evaluar el efecto nematicida *in vitro* de filtrados obtenidos a partir de cultivos de hongos nematófagos, en presencia o ausencia de un extracto de larvas infectantes del nemátodo *H. contortus*, como un posible agente elicitor de compuestos nematicidas.



## CAPÍTULO I ANTECEDENTES

### 1. IMPORTANCIA DE LOS OVINOS

#### 1.1. Generalidades de la Industria ovina en México

La ovinocultura en nuestro país está dirigida hacia la producción de carne, considerada el ingrediente principal para la elaboración de barbacoa, platillo de gran demanda en la mayoría de los estados del país (Partida, 2013). Los animales que conforman el ganado ovino son buenos productores de leche y carne, pero también lo son como proveedores de lana que se emplea en la industria textil para la confección de diversos tipos de tela, entre ellos, las prendas de lana. En México, el ganado ovino es de tipo criollo y un porcentaje bajo son de razas puras como Suffolk, Hampshire, Rambouillet y Corriedale. También se crían para la producción de lana las razas: Debouillet, Merino Australiano y Lincoln. Las razas criadas para doble propósito, es decir aprovechamiento de carne y lana son Marsh y Rommey (SADER, 2019).

#### 1.2. Situación actual de la industria ovina en México

México ocupa el 40° lugar mundial en la producción de ganado en pie ovino, aportando el 0.72%, con 8'575,908 cabezas. En 2017 la producción de carne ovina sobrepasó las 62 mil toneladas (SADER, 2019). En la mayoría de los estados del país se produce carne de ovino, siendo los estados de México, Hidalgo y Veracruz los principales productores (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Principales estados productores de carne de ovino por entidad.

Posición	Estado	Vol. Producción (Ton)	Producción Nacional (%)
1	México	17,711	14.77
2	Hidalgo	13,969	11.65
3	Veracruz	9,913	8.27
4	Zacatecas	8,893	7.42
5	Jalisco	8,129	6.78
6	Puebla	8,008	6.68
7	Tlaxcala	5,134	4.29

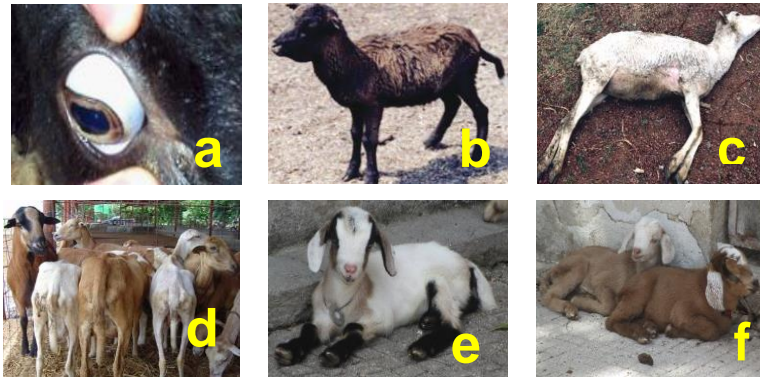
El Estado de México es el más importante productor de ovinos, pues concentra el 30% del inventario nacional, le siguen Hidalgo con el 25% y Veracruz con 15%. También el ganado ovino se presenta como una excelente opción para su desarrollo en zonas áridas. Los déficits de proteínas animales se acentúan en el mundo y el ovino posee muchas ventajas en la producción de este nutrimento. La cría de ovinos proporciona múltiples productos a la familia, como la lana, la leche, la piel y estiércol. La carne contiene proteínas de alta calidad y puede cubrir los requerimientos proteicos y de hierro en los niños (Mejía, 2014).

### **1.3. Parasitosis en ovinos**

Los parásitos son todos aquellos organismos patógenos que viven a expensas de otros, causándoles daños diversos y se clasifican en tres grandes grupos: 1) protozoarios, que se encuentran en la sangre; 2) helmintos o gusanos, quienes parasitan desde el tracto digestivo hasta el recto e inclusive hay otros que afectan a los pulmones de distintas especies y 3) los artrópodos, que son parásitos generalmente externos afectando la piel de los animales. Todos estos parásitos son considerados de gran importancia en la salud animal y generan un gran impacto económico en las distintas especies productoras de carne como son bovino, ovino, caprino, cerdos y aves (Quiroz-Romero, 2017; Quiroz-Romero 2014).

Una de las principales enfermedades parasitarias que afectan a los rumiantes y particularmente al ganado ovino y caprino son los NGI (Guilleard, 2012). Estos parásitos son uno de los problemas sanitarios más frecuentes en las explotaciones ovinas de tipo extensivo, principalmente en las que el pastoreo constituye la base de la alimentación y los efectos negativos que causan en la salud del ganado pueden llegar a provocar la muerte de los animales susceptibles (Esteban-Andrés *et al.*, 2013). Estas enfermedades provocan un cuadro clínico que incluye: anemia, anorexia, debilidad, pudiendo llegar a morir en caso de infecciones masivas y particularmente en animales jóvenes (Figura 1, NADIS, 2015).





**Figura 1.** Signos clínicos observados en ovinos parasitados con nemátodos gastrointestinales. a) Mucosas oculares pálidas, b) Cordero mostrando un retraso en el crecimiento y edema submandibular. c) Muerte de ovino, d) Disminución considerable en su condición corporal como consecuencia de una nematodiasis gastroentérica severa y e-f) Corderos pequeños tienen mayor probabilidad de infección por parásitos.

La gran adaptabilidad y resistencia de los parásitos hacia diversas condiciones climáticas ocasionan que éstos tengan una amplia distribución geográfica y una prevalencia muy alta, tanto en las regiones templadas como las tropicales. Las nematodiasis afectan de forma continua a los ovinos, por lo que es necesario buscar una estrategia adecuada para controlar estas parasitosis y lograr maximizar el potencial productivo de los animales (Mendoza de Gíves y Torres-Acosta, 2012a). Las parasitosis causadas por nemátodos particularmente en los pequeños rumiantes como ovinos y caprinos, ocasionan un considerable deterioro en la salud de los animales, lo que se refleja en pérdidas importantes en la producción (Roeber *et al.*, 2013a).

#### 1.4 Nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes

Los nemátodos en rumiantes son gusanos con cuerpo cilíndrico alargado, generalmente anillado y bilateralmente simétrico. Los ejemplares más pequeños pueden llegar a medir tan sólo algunas micras, lo que hace imposible observarlos a simple vista, y únicamente pueden ser estudiados a través de microscopio. Las infestaciones por NGI provocan principalmente alteraciones en el tracto digestivo de los animales afectados. Dentro de los nemátodos gastrointestinales que afectan a los rumiantes, los géneros más importantes son: *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, en el abomaso de ovinos y caprinos y *Mecistocirrus digitatus* y *H. placei*, en el caso de bovinos. Con respecto a los nemátodos que se alojan en el intestino delgado se encuentran *Cooperia*, *Trichostrongylus*,

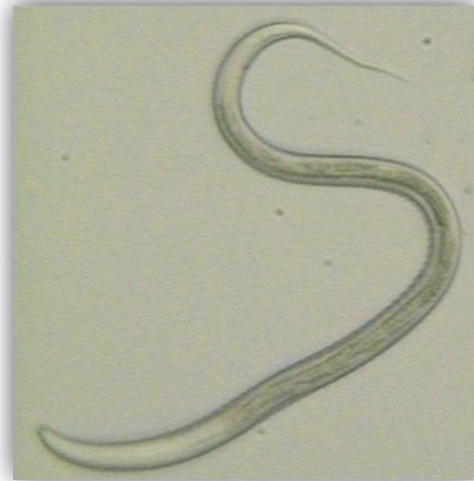
*Nematodirus*, *Strongyloides* y *Bunostomum*, mientras que en intestino grueso se encuentran *Oesophagostomum*, *Chabertia ovina* y *Trichuris* y *Agriostomon* (López *et al.*, 2013).

### **1.5 *Haemonchus contortus***

*Haemonchus contortus* es un nemátodo que parasita el abomaso de ovejas y cabras, en ocasiones en bovinos y excepcionalmente en rumiantes silvestres y domésticos. *H. contortus* se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, causando mayores problemas en regiones con climas tropicales y subtropicales (Figura 2). Este NGI es considerado altamente patógeno, ya que ocasiona graves daños al hospedero; posee una lanceta para erosionar la mucosa del abomaso del huésped alimentándose de sangre (Dibarrat y Montes de Oca, 2012). Debido a sus hábitos alimenticios, es fácilmente detectable a simple vista en su estadio adulto a la necropsia, ya que presenta una coloración rojiza en el intestino y en el caso de las hembras, esta coloración se alterna con el color blanco de los cordones sexuales enrollados alrededor del tubo digestivo, lo que le confiere al parásito un color peculiar, dando un aspecto del cuerpo en espiral, conocido como “palo de barbería” (Millares, 2010). Los machos adultos son largos y pueden llegar a medir entre 10 y 20 mm de largo y de 0.1 a 15 mm de ancho y la hembra de 18 a 30 de largo y 0.4-0.5 mm de ancho. El macho presenta la bolsa copuladora en dos lóbulos laterales simétricos largos y un lóbulo dorsal pequeño asimétrico en forma de “Y” invertida, posee un par de espículas de 450-500  $\mu\text{m}$  de longitud, presentando cada uno un pequeño gancho en su extremidad dorsal. En las hembras se presenta una vulva cubierta por una lengüeta supravulvar prominente y larga; pueden poner de 5,000 a 10,000 huevos al día dentro del hospedero (Romero *et al.*, 2001).

**Clasificación taxonómica**

<b>Reino:</b>	Metazoa
<b>Filo:</b>	Nematoda
<b>Clase:</b>	Chromadorea
<b>Orden:</b>	Rhabditida
<b>Suborden:</b>	Strongylida
<b>Superfamilia:</b>	Trichostrongyloidea
<b>Familia:</b>	Haemonchidae
<b>Subfamilia:</b>	Haemonchinae
<b>Género:</b>	<i>Haemonchus</i>
<b>Especie:</b>	<i>Haemonchus contortus</i> (Hoberg <i>et al.</i> , 2004)



(Uniprot Consortium, 2016)

**Figura 2.** Larva infectante *Haemonchus contortus*.

### 1.5.1 Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*

El desarrollo parasitario de *H. contortus* es directo como la mayoría de los NGI. Se divide en dos fases parasitarias: una fase endógena y la segunda fase exógena (Figura 3). La primera fase se lleva a cabo en el abomaso; existe la presencia de dimorfismo sexual en el que las hembras son más grandes que los machos y son muy fértiles. Durante el ciclo de vida, los nemátodos poseen por lo regular cinco estadios de larvas juveniles (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> y L<sub>5</sub>) entre el huevo y el adulto. Los parásitos adultos (machos y hembras) copulan en el abomaso. Las hembras grávidas producen una gran cantidad de huevos que son expulsados junto con las heces del hospedador cayendo en el pasto (medio ambiente), donde eclosionan a larva L<sub>1</sub> entre 24 y 30 h, esto depende de las condiciones de temperatura de 20 °C, y una humedad relativa (80%). La larva L<sub>1</sub> evoluciona a larva L<sub>2</sub> en aproximadamente 2-3 días; y este estadio sufre una segunda muda ente el 4<sup>o</sup> y 7<sup>o</sup> día, para transformarse en larva L<sub>3</sub> que es el estadio infectante, según las condiciones ambientales.

La L<sub>3</sub> es muy activa y se encuentra en un movimiento rápido y constante, que le permite subir a los tallos y hojas de los pastos. Estos pastos sirven como alimento de los animales y al mismo tiempo un vehículo para las larvas para entrar al tracto digestivo de los

animales e infectarlos. Las larvas son capaces de infectar a los animales entre los 10 y 20 min después de haber sido ingeridas. Ya en el rumen, se lleva a cabo el desvainado de las larvas por la acción del ácido clorhídrico del tubo digestivo del hospedero y de algunas enzimas como lipasas, pseudocolagenasas y leucina aminopeptidasa, que son enzimas que han sido implicadas en la eclosión del huevo (Rogers, 1982).

Las larvas llegan al abomaso, penetrando la mucosa, en donde se transforman en larva L<sub>4</sub>. Estas larvas se alojan en la mucosa del abomaso en donde se transforman en larva L<sub>5</sub> y posteriormente en parásitos adultos, repitiendo el mismo ciclo desde que son ingeridas con el pasto, hasta que son eliminados en su fase de huevo al ambiente junto con las heces en aproximadamente 21 días. Cabe mencionar que las L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> se alimentan de microorganismos existentes en su entorno, mientras que las L<sub>3</sub> se alimentan de sus propias reservas nutritivas (Roeber *et al.*, 2013b).



Figura 3. Ciclo de vida de *Haemonchus contortus*.

### **1.5.2 Impacto económico causado por *Haemonchus contortus***

A pesar que la carne de ovino no es precisamente de las más baratas, existen varios factores que hacen que el consumo de esta carne vaya en aumento cada año. Su valor nutricional, sabor, nuevos consumidores, diversidad de presentación y platillos, son sólo algunos de los factores que han propiciado el desarrollo de la ovinocultura en México.

Sin embargo, la calidad de la carne de los pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) disminuye debido a la presencia de *H. contortus*. Este nemátodo origina una importante reducción en la productividad, no sólo en pequeños rumiantes, sino también en bovinos, causando mortalidad y grandes pérdidas al productor (Jabbar *et al.*, 2006).

En un estudio sobre el impacto económico en México en bovinos se estimaron pérdidas por más de \$445 millones de dólares por año (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). En México, aún no se cuenta con un estudio de impacto económico por causa de nemátodos gastrointestinales en ovinos; sin embargo, en otros países como en Argentina, se han estimado pérdidas de entre 15 y 20% atribuidas a este tipo de parásitos (Bulman, 2012). Con las infecciones subclínicas ocurren reducciones en la ganancia de peso, la producción de leche y en la producción de pelo y lana (González-Garduño *et al.*, 2012).

## **1.6 Métodos de prevención y control de nemátodos gastrointestinales**

### **1.6.1 Antihelmínticos**

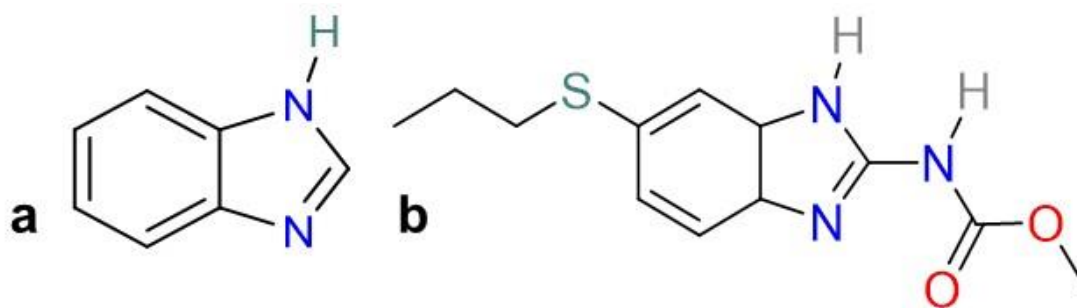
Los antihelmínticos son compuestos químicos desarrollados de manera sintética para el control de parásitos del ganado. Estos pueden estar disponibles comercialmente en farmacias veterinarias y son fáciles de adquirir y de administrar en los animales. En la actualidad, los antihelmínticos se agrupan de acuerdo con su naturaleza química y sus efectos sobre los parásitos. Los bencimidazoles, lactonas macrocíclicas e imidazotiazoles son los grupos de fármacos químicos antihelmínticos (AH) más utilizados para el tratamiento de los NGI (Wolstenholme *et al.*, 2012). Muchos productores y veterinarios han aprendido que la manera correcta de controlar los NGI en los rebaños ovinos es la desparasitación regular de todos los animales (Molento *et al.*, 2009). Los AH disponibles comercialmente para ovinos se dividen en tres clases de acuerdo a su modo de acción y estructura química (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Principales grupos de antihelmínticos.

Grupo I	Grupo II	Grupo III
<b>Bencimidazoles y Probencimidazoles</b>	<b>Imidazotiazoles</b>	<b>Lactonas Macrocíclicas</b>
<b>Mebendazol</b>	Tetramisol	Ivermectina
<b>Oxibendazol</b>	Levamisol	Moxidectin
<b>Fenbendazol</b>	Morantel	Abamectin
<b>Aldendazol</b>		Doramectin
<b>Oxfendazol</b>		
<b>Tiofanato</b>		
<b>Febantel</b>		
<b>Netobimin</b>		

#### a) Bencimidazoles

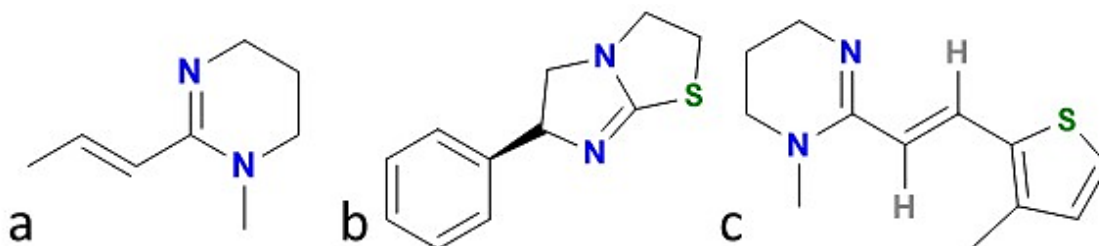
Los bencimidazoles (Figura 4a) son una familia grande de compuestos con gran variedad de actividades biológicas de interés terapéutico, porque pueden interactuar con varios receptores que participan en diversas actividades en el organismo, por ejemplo, contra la inflamación, así como en contra de un grupo de patógenos incluyendo a virus y bacterias, así como a diversos parásitos, *ie.*, en contra de parásitos protozoarios y helmintos. Los bencimidazoles se acoplan a la tubulina, una proteína estructural de los microtúbulos celulares que son organelos celulares esenciales en todo tipo de organismos (Scarcella *et al.*, 2007). Los microtúbulos actúan en la secreción de la mayoría de las enzimas digestivas y los bencimidazoles impiden su funcionamiento normal. Este tipo de compuestos inhiben la enzima fumarato reductasa, lo que ocasiona el bloqueo del metabolismo y la parálisis en los nemátodos y como consecuencia se perturba el proceso digestivo de los gusanos, que acaban muriendo (Solana *et al.*, 2009). El tiabendazol fue de los primeros bencimidazoles en ser sintetizados en 1961 y posteriormente otros productos de amplio espectro fueron introducidos al mercado (Holden-Dye y Walker, 2014). Algunos de los bencimidazoles incluyen al albendazol, tiabendazol, mebendazol, flubendazol, febendazol, oxfendazol, oxibendazol, febantel, netobimin y triclabendazol. El albendazol (Figura 4b) ha sido probado en ovinos y su principal modo de acción es la unión selectiva de alta afinidad con la subunidad  $\beta$  de la proteína que constituye los microtúbulos, inhibiendo la formación de los mismos (Köhler, 2001).



**Figura 4.** a) Estructura química del bencimidazol y b) Estructura química del albendazol.

### b) Imidazotiazoles

Este tipo de compuestos actúan y tienen alta eficacia actuando como agonistas nicotínicos del sistema nervioso de los nemátodos, provocando parálisis muscular, desprendimiento y expulsión de los nemátodos. Los receptores nicotínicos se encuentran sobre las células somáticas del músculo, estos receptores poseen canales que se abren ante el efecto neurotransmisor de la acetilcolina de los imidazotiazoles, lo que provoca una despolarización continua de la membrana muscular, lo que causa una parálisis muscular y desprendimiento de los nemátodos. Este grupo de antihelmínticos (Figura 5) incluye el pirantel, levamisol y el morantel (Holden-Dye y Walker, 2014). El levamisol actúa como un estimulante de los ganglios nerviosos de los helmintos que provoca contracciones musculares persistentes. Los gusanos afectados quedan paralizados y mueren o son expulsados del hospedador.

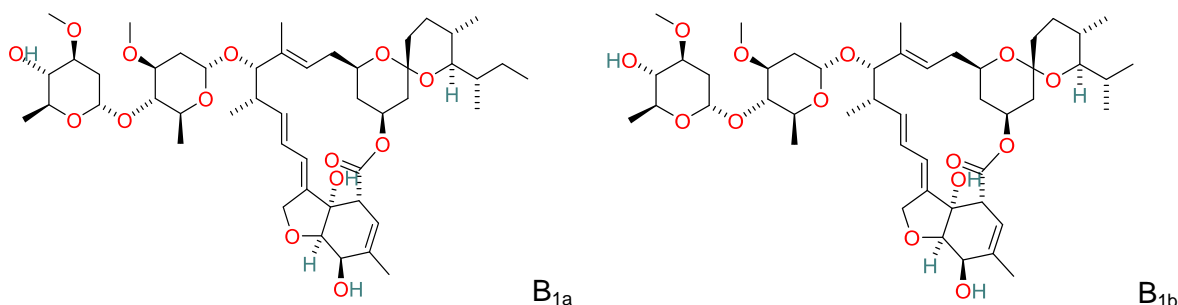


**Figura 5.** Estructuras químicas de a) pirantel, b) levamisol y c) morantel.

### c) Lactonas macrocíclicas

Las lactonas macrocíclicas son antihelmínticos naturales. Su actividad nematicida está asociada a su interacción sobre los receptores del canal de glutamato de cloro de las células nerviosas de los invertebrados, lo que estimula la polimerización en la membrana y bloquea la re-polarización de ésta, disminuyendo el bombeo del esófago y causando parálisis del tejido muscular de los órganos motores (López-Arellano *et al.*, 2010).

Las lactonas macrocíclicas, a bajas concentraciones, potencian el efecto del glutamato y a concentraciones elevadas producen, por sí mismas, la apertura del canal, originando una hiperpolarización y un aumento irreversible de la conductancia de entrada al ion cloro. La ivermectina consiste en una mezcla de dos avermectinas (Figura 6). La aplicación constante incontrolada puede inducir la generación de resistencia en los parásitos hacia estos medicamentos antiparasitarios (Jabbar *et al.*, 2006). Otro problema es la contaminación de la carne, la leche y la piel del animal, además, al excretar el animal sus desechos, se contamina el subsuelo y lo vuelve infértil y tóxico para bacterias, hongos e insectos encargados de degradar los residuos del desecho del animal.



**Figura 6.** Estructuras químicas de las lactonas macrocíclicas: mezcla de avermectina B<sub>1a</sub> y B<sub>1b</sub>, que son lactonas macrocíclicas producidas por la actinobacteria *Streptomyces avermitilis*.

Entre los riesgos de comer carne contaminada con avermectina, se encuentran que ocasiona intoxicaciones, alergias y afección al sistema inmunológico, así como afectaciones al hígado y páncreas, principalmente. Lo grave del caso es que no existe un control en el consumo de carne procedente de animales contaminados con exceso de desparasitantes, pues regularmente si el animal está infestado, el ganadero, que no recibe asesoría, suele sacrificarlo y vender la carne para el consumo humano (Caicedo, 2019).



### **1.7 Resistencia antihelmíntica**

Con el uso inadecuado de químicos, los nemátodos, después de haber sido expuestos de manera constante y continua a estos antihelmínticos, han desarrollado mecanismos genéticos (mutaciones) para lograr sobrevivir ante el efecto de los fármacos, lo que se ha denominado resistencia antihelmíntica (RA), definiéndose esta resistencia como la capacidad que tiene una fracción de una población de nemátodos para tolerar dosis tóxicas de sustancias químicas que son letales para otras poblaciones de las mismas especies. Este problema ha ido creciendo y es una amenaza para el control de parásitos (Torres-Acosta *et al.*, 2012b). La resistencia a los antihelmínticos es un mecanismo de adaptación de los parásitos en situaciones adversas, ocasionando el fenómeno de selección genética donde el o los genes que le confieren resistencia a los nemátodos se presentan en una población parasitaria para sobrevivir. La resistencia surge como el resultado de una mutación a través de la repetición de exposición a la presencia de AH, confiriéndole la resistencia de carácter genético y heredable de la sensibilidad de una población de parásitos a la acción del antihelmíntico (López-Arellano *et al.*, 2010). Debido a la RA que tanto amenaza a la industria pecuaria mundial, se ha tenido que investigar y utilizar otras alternativas para el control de los NGI, como las que se presentan a continuación:

### **1.8 Métodos de control alternativo de nemátodos gastrointestinales**

Los métodos de control alternativos al uso de los productos que han creado resistencia se basan en tres principios: a) aquellos enfocados a reducir el contacto de los huéspedes con las larvas en etapa infectiva a través de técnicas de pastoreo, b) mejorando la respuesta del huésped contra las infecciones ocasionadas por NGI, mediante un enfoque genético o nutricional, y c) los que buscan controlar la población de parásitos utilizando materiales nematicidas no convencionales, como es el uso de minerales o productos vegetales (Hoste *et al.*, 2011), que también incluyen el uso del control biológico basado en la utilización de enemigos naturales de los nemátodos, tales como los HN (Barron, 1977). Estos microorganismos ejercen un efecto perjudicial en las poblaciones de nemátodos en sus fases pre-infectantes e infectantes en las heces, en el suelo y pasto, en donde los animales se encuentran pastoreando de manera continua (Chauhan *et al.*, 2005).

## 1.9 Métodos de control alternativo utilizados para reducir el contacto de los nemátodos gastrointestinales con su hospedante

### a) Manejo del pastoreo

El diseño de sistemas de pastoreo en el control parasitario deriva del hecho de que cuando los animales infectados se introducen en un potrero “limpio”, estos animales contaminarán el pastizal con los huevos de los parásitos, que salen al exterior conjuntamente con las heces, lo cual conlleva a la presencia de larvas infectantes L<sub>3</sub> en el pasto, al cabo de 8 días en promedio, con picos entre los 9 y los 13 días, pero cuyos niveles son apenas detectables en un lapso de 4 a 6 semanas. Este sistema se desarrolló para la maximización del forraje y para aprovechar el insumo.

Este método de control se basa en división de la superficie de pastoreo en un tiempo determinado, el ganado introducido por períodos no superiores a los cuatro días, permitiendo un descanso a la pradera para la recuperación del pasto, se regresa el ganado al primer pastizal después de un periodo de 30 días y al dar un periodo de tiempo al descanso de la pradera, los parásitos van perdiendo actividad fisiológica y son afectados por las condiciones climáticas como el sol, al no ser ingeridos por el ganado se evita así que continúen con su ciclo los NGI (Morales y Pino, 1999), ya que las larvas L<sub>3</sub> pierden energía y con el paso del tiempo mueren. Este sistema es difícil de adoptar si no se cuenta con grandes extensiones de terreno.

### b) Agujas de cobre

Son alambres delgados de óxido de cobre con una longitud aproximada de 2 mm que se administran en cápsulas de gelatina. Estas llegan al abomaso y se oxidan con el medio ácido, liberando iones de cobre que son letales sobre *H. contortus* y su persistencia de eficacia puede superar los 35 días (Galindo-Barboza *et al.*, 2011).

### c) Vacunación

Se han utilizado vacunas con antígenos derivados de las células intestinales de parásitos adultos, como son las proteínas H11 y H-gal-GP del nemátodo *H. contortus* que han sido

perfectamente caracterizados (Morales y Pino, 1999), aunque desafortunadamente aún no se encuentran comercialmente disponibles.

d) Control biológico

El control biológico (CB) se puede definir como un método o mecanismo donde el hombre hace uso de organismos antagonistas de otro organismo para el control de la población. En el caso de los parásitos se utilizan antagonistas naturales para disminuir las poblaciones parasitarias a niveles no perjudiciales para el huésped con lo que se evita sus efectos nocivos (Larsen, 1999).

Es fundamental entender en qué consiste el CB, ya que es una medida reguladora cuyo objetivo no es acabar con el organismo blanco, sino controlar su población para reducir efectos nocivos (Larsen, 2000). Entre los antagonistas naturales de los nemátodos se encuentran: bacterias, hongos nematófagos, nemátodos depredadores de otros nemátodos, ácaros, entre otros (Gaugler, 2004). Las características que debe de cumplir un organismo de CB son: virulencia hacia el nemátodo, especificidad, capacidad de crecer, facilidad de producción, bajo costo y conservar la inocuidad de animales, humanos y hacia el ambiente (Verdejo, 2005).

### **1.10 HONGOS NEMATÓFAGOS**

Los HN viven en el suelo y en las heces de los animales. Son organismos saprobios y en presencia de nemátodos forman trampas a partir de sus micelios con las que capturan, matan y se alimentan de los nemátodos del suelo, incluyendo a parásitos de plantas y animales. En el caso de las fases libres de nemátodos parásitos del ganado, estos hongos disminuyen considerablemente sus poblaciones en los potreros (Ketzis *et al.*, 2006). De esta manera el uso de HN actúa como un método indirecto de control biológico (González-Garduño *et al.*, 2005). Hay más de 300 especies de HN descritos, encontrados por todo el mundo, incluidas las regiones polares. Los hongos son habitantes del suelo, generalmente más frecuentes en suelos con elevado contenido de materia orgánica.

### 1.10.1 Medios de cultivo de los hongos nematófagos

Los protocolos para estudiar los HN difieren de los utilizados para estudiar la mayoría de los hongos, debido a que las estructuras del micelio no son visibles a simple vista. Las técnicas relacionadas al aislamiento, recuperación y mantenimiento de los HN implican técnicas exclusivas de este grupo. Existen varios medios de cultivo que se utilizan para la incubación y aislamiento de los hongos nematófagos. No obstante, como regla general, los medios con bajo contenido de nutrientes deben usarse para el aislamiento y los medios con alto contenido de nutrientes deben usarse para la incubación. Los medios de cultivo pueden ser sólidos o líquidos (Jong y Birminham, 2001).

Los medios líquidos se utilizan para estudios fisiológicos y químicos, para la producción de metabolitos secundarios. Los medios de cultivo sólidos son utilizados para el aislamiento, mantenimiento, conservación y estudios de confrontación o esporulación. Una vez aislados, los medios que más se utilizan para la incubación de los HN son agar papa dextrosa (APD) y agar harina de maíz (AHM). Para permitir el crecimiento de los hongos en el laboratorio, es necesario aportarles un medio con nutrientes y las condiciones fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo. Teniendo en cuenta que, para los HN, si hay más nutrientes presentes, generalmente producirán menos conidióforos (Araújo *et al.*, 2004; Dhingra y Sinclair, 1995).

Los componentes de un medio de cultivo de forma general son naturales, semisintéticos y sintéticos y se constituyen de: una fuente de carbono, generalmente contienen altas concentraciones de azúcares sencillos como, por ejemplo, glucosa, lactosa, sacarosa, dextrosa, etc. Como fuente de nitrógeno, se suelen usar proteínas parcialmente hidrolizadas como las peptonas. Otros componentes, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , vitaminas, etc., así como amortiguadores de pH (soluciones tampón o buffer), son sustancias que ayudan a mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango adecuado para el crecimiento de los hongos. También se utilizan ingredientes naturales, como: papa, zanahoria, jugo de vegetales, entre otros y compuestos definidos como las sales.

Parte de los problemas que se encuentran al trabajar con hongos nematófagos es la contaminación por bacterias. Estos problemas son solucionados por lo general utilizando antibióticos, como penicilina, cloranfenicol, amikacina, etc.

### **1.10.2 Medios de cultivo líquido para hongos nematófagos**

En la búsqueda de compuestos nematotóxicos o antagonicos, se ha puesto gran interés por el uso de filtrados obtenidos a partir de procesos fermentativos a partir de medios en cultivo líquido, lo que se ha intensificado en los últimos años. Esta es la forma más fácil, rápida y eficiente para la obtención de toxinas, enzimas o compuestos derivables de su metabolismo (Liu *et al.*, 2008; López-Llorca *et al.*, 2008). También son utilizados por su facilidad de controlar variables importantes como la temperatura, la relación carbono/nitrógeno del sustrato, el contenido de oxígeno, la velocidad de agitación y el pH, entre otras (Gamboa-Angulo *et al.*, 2012; Reyes-Estebanez *et al.*, 2011).

La manipulación y control que se tiene sobre estos factores puede incrementar o disminuir significativamente la producción de determinados metabolitos secundarios (MS). Son múltiples los factores que afectan un cultivo de hongos y su estimulación para la producción de MS bioactivos diferentes.

### **1.11 Interacción hongo-nemátodo**

Los hongos nematófagos disponen de la habilidad única de atrapar e infectar nemátodos. Los estudios para conocer el proceso de captura han permitido descubrir que la infección involucra una serie de procesos que incluyen el reconocimiento, la adhesión, la penetración y la inmovilización de nemátodos (Yang *et al.*, 2007a; Nordbring-Hertz, 2004). Durante el proceso de infección, la cutícula del nemátodo es penetrada, inmovilizándolo hasta ser completamente invadido y digerido por el hongo, siendo este un proceso de secreción de enzimas hidrolíticas y fuerzas mecánicas. Una de las proteínas que ha sido reconocida como la precursora del reconocimiento inicial del nemátodo es la lectina, que se encuentra en las hifas de los hongos y se une a los carbohidratos que constituyen la cutícula del nemátodo (Yang *et al.*, 2007b). Esta interacción se da entre el enlace carbohidrato-proteína (lectina) y el carbohidrato receptor presente en el nemátodo (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006).

La sustancia considerada como la más relevante durante el proceso de infección es la colagenasa, enzima que cataliza la hidrólisis del colágeno, que es el componente más importante de la estructura cuticular de los nemátodos (Blaxter y Robertson, 1998). La

enzima debilita la cutícula de los nemátodos, facilitando la entrada del hongo. En las especies de *Arthrobotrys*, la colagenasa es una enzima constitutiva. Otras enzimas secretadas que intervienen en la etapa de infección hongo-nemátodo son las quitinasas, que tienen acción sobre la quitina, que es un polímero estructural de las paredes celulares de algunos organismos y de la cubierta de los huevos de los nemátodos. Los hongos parásitos de huevos producen las quitinasas para llevar a cabo la infección.

### **1.12 Clasificación de los hongos nematófagos**

Los HN son microorganismos del suelo que desarrollan órganos especializados para capturar y destruir a los nemátodos como: anillos, ramas, conidias y esporas adhesivas (Mendoza de Gives y Alatorre-Rosas, 2011), también pueden ser hongos endoparásitos, ya que afectan a los nemátodos con conidios adhesivos o conidios modificados, que germinan dentro del huésped después de la alimentación. El resultado de la infección es siempre el mismo, un nemátodo completamente digerido. Los nutrientes provenientes de los nemátodos son utilizados para formar nuevas estructuras fúngicas (hifas, esporas, etc.).

Durante los últimos años se ha descubierto que los HN, además de su actividad depredadora de nemátodos, también son capaces de producir compuestos químicos, también conocidos como metabolitos secundarios. Estos se producen en respuesta a estímulos externos y en general presentan pesos moleculares menores a 3,000 Da. Estos poseen una diversidad de actividades biológicas importantes que incluyen antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, antiparasitarios, entre otras (Torres-Acosta *et al.*, 2012a).

Tienen un efecto letal o paralizante sobre nemátodos que actúan como mecanismos de depredación (Mendoza de Gives y Alatorre-Rosas, 2011). Los HN pueden vivir en forma saprófita, pero puede cambiar su morfología a una fase depredadora en la que utiliza como alimento a los nemátodos para aumentar sus oportunidades de sobrevivencia. Entre los cambios morfológicos que presentan los HN podemos mencionar la formación de estructuras capaces de atrapar nemátodos (Mendoza de Gives y Valero-Coss, 2009). En general, los HN se dividen en cuatro grupos dependiendo de su modo de infectar nemátodos:

## 1) Hongos atrapadores de nemátodos

Estos hongos forman varios tipos de órganos atrapadores a partir de sus hifas. Son buenos saprótrofos y en muchos casos la formación de las trampas debe ser inducida por los propios nemátodos. Los HN atrapadores son parásitos facultativos, a excepción de los Zygomycetes. Hay dos mecanismos diferentes en la función de las trampas, adhesivos y mecánicos. Sea cual sea el mecanismo, el hongo penetra la cutícula del nemátodo por la trampa formando un bulbo de infección que penetran al nemátodo, a partir del cual las hifas tróficas crecen dentro del cuerpo y digieren sus contenidos.

Los Deuteromycetes poseen trampas adhesivas tipo redes como el hongo *A. oligospora* y *Monacrosporium haptotylum* que poseen pedúnculos y *Monacrosporium gephyropagum* que tiene ramas adhesivas. La especie *Arthrobotrys dactyloides* posee anillos constrictores que funcionan como trampas mecánicas.

Algunos de los hongos son capaces de atacar las hifas de otros hongos para poder alimentarse de ellos, otros tantos son descomponedores de maderas y estos hongos se cree que al metabolizar la madera obtienen carbono y energía y que el nitrógeno lo adquiere a partir de ingerir nemátodos (Tabarant *et al.*, 2011). Otra de las especies de HN que depreda a su presa mediante la producción de clamidosporas, las cuales germinan y dan lugar a estructuras tridimensionales capaces de atrapar es *D. flagrans*.

## 2) Hongos endoparásitos

Los endoparásitos utilizan sus esporas para infectar nemátodos. Estos hongos son a menudo parásitos obligados de nemátodos y fuera del cuerpo infectado del nemátodo aparecen sólo como estructuras de diseminación.

Las esporas de estos hongos pueden ser zoosporas móviles como por ejemplo *Myzocytiium anomalum* y *Catenaria anguillulae* que se enquistan sobre el nemátodo adhiriéndose a él y penetra la cutícula, conidios adhesivos o conidios que son ingeridos por los nemátodos (Barron, 1977). Los hongos endoparásitos tienen un número más restringido de huéspedes comparado con los hongos atrapadores.

### 3) Hongos parásitos de huevos y hembras

Estos hongos infectan estadios no móviles (huevos) de nemátodos. Producen apresorios, que son estructuras de infección en los extremos de las hifas que se adhieren a la cubierta del huevo. La cubierta del huevo es penetrada por el hongo y el contenido es digerido, por mencionar algunas especies de hongos ovicidas incluyen a algunos hongos zoospóricos como *Catenaria auxiliaris*, *Lagenidium* spp., los cuales infectan a hembras de nemátodos fitoparásitos agalladores, incluso siendo inmaduras cuando no poseen huevos. *Pochonia chlamydosporia* (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard), *Paecilomyces lilacinus* y *Dactyella ovoparasitica* que son algunos de los principales representantes de hongos con actividad ovicida significativa (Mendoza de Gives y Ribeiro-Braga, 2017).

### 4) Hongos productores de toxinas

Los compuestos tóxicos y/o enzimáticos que derivan de estos HN son un recurso potencial para el manejo de nemátodos parásitos de plantas (Regaieg *et al.*, 2010). Uno de los hongos del cual se tienen estudios más recientes es *Pleurotus ostreatus* que produce la nematoxina NRRL 3526. *Pleurotus subareolatus* y *Pleurotus cornucopiae*, son hongos que secretan toxinas en pequeños exudados, las cuales al entrar en contacto con los nemátodos producen una reducción de la parte anterior del nemátodo y lo inmovilizan sin causar muerte, posteriormente las hifas se dirigen hacia el nemátodo inmóvil, penetran en los orificios naturales, colonizan al hospedero y finalmente lo digieren.

Otros organismos en contra de nemátodos fitoparásitos que se reportan con actividad tóxica son *P. lilacinus*, *Omphalotus olearius*, con mecanismos de acción sobre receptores neurotrópicos de los nemátodos y algunos poseen actividad proteolítica y quitinolítica responsables del daño a la cutícula de los huevos de los nemátodos, así como cambios en la permeabilidad y perforaciones de los mismos (Kerry, 2000; Mayer *et al.*, 1999; Cayrol *et al.*, 1989).

La información que se tiene sobre la gran diversidad de los hongos es en general muy escasa, siendo éste uno de los principales motivos del desconocimiento del potencial biotecnológico que tiene cada una de las cepas. Por ejemplo, algunos presentan actividad



antibacteriana, como el extracto del hongo *Menisporopsis theobomae* (Trigos *et al.*, 2005). Otras cepas han sido aisladas y evaluadas, encontrando actividad en sus extractos, siendo potenciales productores de metabolitos con propiedades antimicrobianas o antioxidantes (Gamboa-Angulo y De la Rosa, 2008).

De la información que se tiene sobre algunas cepas de hongos microscópicos, se puede destacar el estudio de la expresión de genes de *Aspergillus terreus* involucrados en la biosíntesis de lovastatina, sobre la manipulación de factores abióticos para obtener una mayor concentración de metabolitos que tienen gran importancia comercial, como, la cefalosporina C y la penicilina (Barrios-González *et al.*, 2008; Cuadra *et al.*, 2008).

Los hongos de manera general se reconocen como importantes productores de MS, los cuales mantienen una gran diversidad en sus estructuras, lo que les confiere propiedades biológicas de gran importancia para la humanidad en el sector de salud pública (Adrio y Demain, 2003) y en el área agropecuaria.

La actividad que mantienen los hongos microscópicos, sugiere que la producción de los MS se realiza en la idiofase, fase donde el desarrollo activo del hongo ha cesado (Calvo *et al.*, 2002). Asimismo, la producción de los hongos se refleja en la cantidad y variedad de los mismos, en respuesta a los factores abióticos (pH, disponibilidad de nutrientes, etc.), así como factores bióticos (bacterias, hongos, nemátodos, etc.) (Strohl, 2000; Frisvad *et al.*, 1998).

### **1.13 Factores estimulantes en la producción de sustancias antagónicas y órganos de captura en los hongos nematófagos**

Otra estrategia para hacer crecer a los hongos es utilizando inductores que permiten una eficiente producción de enzimas en cultivos líquidos o sólidos, permaneciendo la actividad de los HN. La producción de sustancias nematicidas con el uso de inductores que permitan la producción de enzimas y metabolitos secundarios en cultivos líquidos y sólidos que mantengan la actividad de los HN. La adición de nemátodos como cebos en los medios de cultivo, puede estimular de manera efectiva el crecimiento de los órganos de captura y la producción de metabolitos secundarios (Wyborn *et al.*, 1969).

Los factores que afectan un cultivo y la producción de MS son múltiples, la manipulación y control sobre estos factores pueden incrementar o disminuir significativamente la producción. El estímulo o elicitación, se refiere a la activación o incremento del metabolismo secundario, provocada por determinado factor, la cual conlleva a la producción de MS.

### **1.14 Elicitación**

La elicitación consiste en inducir o estimular la biosíntesis de metabolitos por exposición de los microorganismos a moléculas capaces de causar una situación de estrés. Su presencia determina la expresión de genes asociados con las enzimas catalizadoras de diferentes vías metabólicas (Roberts y Shuler, 1997). Los elicitores se agrupan en dos clases: bióticos y abióticos. La inducción biótica está asociada a otros microorganismos, micelios y componentes de la pared celular de hongos, polisacáridos, glucanos glicoproteínas, ácidos orgánicos de bajo peso molecular o insectos que estimulan a los microorganismos a producir metabolitos secundarios (Ertola *et al.*, 1994). Los elicitores abióticos se asocia a factores como luz UV, temperatura, concentración de sustancias inorgánicas, pH, agua, espacio, sales de metales pesados, los herbicidas y el estrés osmótico (Mitchell *et al.*, 2016).

Un espacio de oportunidad en investigación poco desarrollado aún corresponde a las enzimas y metabolitos producidos por los hongos nematófagos. Las enzimas extracelulares juegan un papel importante en la infección de los nemátodos por hongos, ayudando a romper la integridad física del nemátodo y promoviendo la penetración fúngica y colonización de los nemátodos (Yang *et al.*, 2007a; Huang *et al.*, 2004).

Los hongos nematófagos forman parte de un grupo heterogéneo de gran propagación, viviendo normalmente en forma saprofítica y ocupando preferiblemente el suelo, alimentándose ya sea como recurso principal o secundario en gran parte de los nemátodos de vida libre (Soto-Barrientos *et al.*, 2011). A través de mecanismos como la producción de un material adhesivo sobre las hifas y la formación de complejos anillos constrictores, los hongos son capaces de atrapar y consumir los estadios larvarios de los nemátodos presentes en las heces y en el suelo (Arias *et al.*, 2013).

Algunos estudios hacen referencia a la actividad producida por los metabolitos secundarios de algunos hongos y que podrían ser utilizados para el control de las parasitosis gastrointestinales en rumiantes (Xalxo *et al.*, 2013). Dentro de las enzimas que producen los hongos nematófagos podemos encontrar quitinasas, glucanasas, peroxidases, viridinas y metabolitos secundarios como las glicotoxinas y tricoderminas, entre otros (Szabó *et al.*, 2013).

### **1.15 Productos de excreción y secreción de nemátodos gastrointestinales**

La mayoría de los nemátodos gastrointestinales liberan dentro de su ambiente productos de excreción y secreción. La naturaleza bioquímica de estos productos está provista de propiedades enzimáticas como: proteasas, acetil-colinoesterasas (Yan *et al.*, 2010; Rogers, 1982). También contienen glicoproteínas, monosacáridos, lípidos y prostanoides (Yatsuda *et al.*, 2003). La actividad de estos productos no está del todo clara, una de las hipótesis es la participación en la instalación de las L<sub>3</sub>, en su nutrición y reproducción de los parásitos adultos en el hospedero (Huby *et al.*, 1999; Hoste *et al.*, 1995). Algunas de las moléculas al ser liberadas afectan las mucosas del hospedero, en las perturbaciones patológicas, y también contribuyen a mantener el equilibrio parásito-hospedero (Huby *et al.*, 1999).

### **1.16 Inductores de la morfogénesis en hongos nematófagos**

A partir de estudios preliminares, surgió la hipótesis de que algunas sustancias producidas por los nemátodos activaban la fase depredadora de los hongos nematófagos. Pramer y Stoll (1959) reportaron que *Arthrobotrys conoides* formaba trampas en cultivo puro donde se agregaba el nemátodo *Neoplectana glaseri*, o el extracto del nemátodo. Estas investigaciones lograron identificar una sustancia desconocida que fue la responsable de inducir el desarrollo de órganos de captura en el hongo *A. conoides* y a la que se denominó "nemina" (Pramer y Stoll, 1959).

La identidad de la nemina aún no está establecida. En el caso del hongo *Aspergillus niger* (PD42), se utilizó el ácido cítrico, ácido oxálico y moléculas mayores a 8,000 KDa como inductores de compuestos nematicidas y los filtrados de este hongo en presencia de los inductores mostraron una importante actividad nematicida del 93% en contra del

nemátodo fitopatógeno *Rotylenchulus reniformis* tanto en pruebas *in vitro* como a nivel de invernadero (Zuckerman *et al.*, 1994).

Arias *et al.* (2013), como resultado de su investigación, comprobaron que al colocar los nemátodos *Oesophagostomun* spp., *Parascaris equorum* y tremátodos (gusanos platelmintos parásitos de los vertebrados, de cuerpo no segmentado, con ventosas o ganchos para fijarse al cuerpo de su hospedador), adultos muertos de *Fasciola hepática* y *Calicophoron daubneyi*, así como sus productos de secreción, éstos actuaron como estimuladores en el desarrollo de trampas y clamidosporas del hongo *A. flagrans* en el medio de cultivo sólido AHM. Los datos obtenidos fueron reportados en la formación de trampas y cantidad de clamidosporas por cm<sup>2</sup>/día; la producción de trampas más elevada se obtuvo en cultivos suplementados con *F. hepática* y *C. daubneyi*, comparada con los productos de secreción de los mismos tremátodos. El nemátodo *Rhabditis terricola* también es utilizado ampliamente como organismo objetivo para la estimulación y formación de trampas de hongos que atrapan nemátodos (Barron, 1977).

Un organismo modelo de gran utilidad en la investigación de aspectos biológicos de los hongos nematófagos ha sido el nemátodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*, debido a que se han encontrado diversas cepas mutantes con defectos en algunas partes de la cabeza. Al utilizar *C. elegans* de tipo salvaje y sus mutantes, se pueden conocer los patrones de infección de *Drechmeria coniospora*, su modo de adhesión y su posterior penetración. Este nemátodo también es usado como modelo de infección de invertebrados para detectar factores de virulencia que involucran a los HN (Jansson, 1994). También se ha encontrado que alguna mutación en la superficie cuticular de este nemátodo es capaz de modificar su captura por hongos nematófagos (Mendoza de Gives *et al.*, 1999).

Por otro lado, se reportó que polillas parasitadas con nemátodos se utilizaron para determinar la producción de hongos nematófagos. Se utilizaron larvas de la polilla para que éstas fueran parasitadas y así obtener mayor número de nemátodos. Los nemátodos utilizados fueron *Steinernema glaseri* y *Heterorhabditis marelatus*, éstos originaron el aumento de la densidad poblacional de *Arthrobotrys oligospora* (redes adhesivas) y otros hongos atrapadores endémicos del suelo como *Myzocyttium glutinosporum*, *Drechlerella*

*brochopaga* y *Gamsylella gephyropaga* que producen esporas adhesivas, anillos de constricción y ramas adhesivas, respectivamente (Jaffee y Fuerte, 2005).

Cabe destacar que en el trabajo de Jaffee y Fuerte (2005) no se determinó si *A. oligospora* y los otros hongos evaluados fueron estimulados por los nemátodos entomopatógenos, el insecto muerto o una combinación de ellos, ya que, como se sabe, *A. oligospora* en particular se cree que es un cazador “facultativo” de nemátodos, pero también utiliza la descomposición de materia orgánica como fuente de carbono y energía (Barron, 1992).

El ácido abscísico y el óxido nítrico han sido evaluados en la inducción de la formación de trampas y en la captura de nemátodos (*C. elegans*), por el hongo *Drechslerella stenobrocha* (AS6.1). Como resultado, se detectó que el ácido abscísico indujo una mayor formación de trampas y, por ende, la capacidad de atrapamiento comparado con los resultados al utilizar el óxido nítrico y ácido abscísico (Xu *et al.*, 2011).

El uso de nemátodos y tremátodos mejoran el desarrollo y producción de los hongos. La formación de las trampas como las de las clamidiosporas no sólo está relacionada con los estímulos específicos de los nemátodos. La adición de productos secretores del tremátodo *Calicophoron daubneyi* en el medio de cultivo tiene potencial para su uso en la producción a gran escala de las clamidiosporas. Las larvas vivas no son necesarias para que se desarrollen los hongos (Arias *et al.*, 2013). La serina proteasa Ds1 secretada por *Dactylella shizishanna* degrada la cutícula de los nemátodos (Wang *et al.*, 2006). Ésta comparte varias propiedades bioquímicas similares con PII y AozI, dos serinas proteasas del HN *A. oligospora* (Zhao *et al.*, 2004).

Otros inductores utilizados como estrategia para hacer crecer hongos en medios de cultivo líquido o sólido son el extracto del nemátodo inductor, péptidos, aminoácidos, fracciones de la sangre, hormonas animales y antibióticos peptídicos (Pramer, 1964; Wootton y Pramer, 1966). La nutrición limitada es esencial para la inducción de trampas (Nordbring-Hertz, 1977) y algunos hongos forman trampas cuando se transfieren de un medio rico en nutrientes a un medio pobre en nutrientes (Balan y Lechevalier, 1972). En el Cuadro 3 se mencionan algunos de los inductores que se han empleado con algunos hongos.

**Cuadro 3.** Algunos inductores de hongos y sus objetivos blancos.

Hongo	Inductor	Organismo blanco	Producto	Autor
<i>Arthrobotrys conoides</i>	<i>Neoplectana glaseri</i>		Estimulación de trampas	Pramer y Stoll, 1959
	Extracto del nemátodo		Diferenciación de trampas	
<i>Drechmeria coniospora</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>		Adhesión de conidios	Jasson, 1994
<i>Aspergillus niger</i> (PD42)	Filtrados con ácido cítrico –ácido oxálico	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Actividad nematocida	Zuckerman <i>et al.</i> , 1994
	<i>Panagrellus redivivus</i>			Gray, 1983
	<i>Rhabditis terricola</i>	Organismos modelo	Estimulación y formación de trampas de hongos	Barron, 1977
	<i>Caenorhabditis elegans</i>		Infección de invertebrados para detectar factores de virulencia	Jasson, 1994
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	<i>Steinernema glaseri</i>			Jaffee y Fuerte, 2005
<i>Myzocytyium glutinosporum</i> - <i>Drechslerella brochopaga</i> – <i>Gamsylella gephyropaga</i>	<i>Heterorhabditis marelatus</i>		Esporas adhesivas – anillos de constricción – ramas adhesivas	
<i>Verticillium leptobactum</i>	Aislado (HR <sub>43</sub> )	<i>Meloidoayne incognita</i>	Inactivación de los juveniles producción de enzimas	Regaieg, 2010
<i>Dactylella shizishanna</i>	Sproteasa Ds1		Degradación de la cutícula	Wang, 2006
	Extracto de nemátodos – Péptidos – Aminoácidos – Sueros – Hormonas animales – antibióticos peptídicos Valina			Pramer, 1964
	Nutrición limitada		Inducción de trampas	Wootton y Pramer, 1966
			Inducción de trampa	Nordbring-Hertz, 1977
<i>Colletotricum coccodes</i>	Óxido nítrico	Germinación de los conidios	Aceleración de la germinación	Wang, 2005
<i>Arthrobotrys</i> sp. <i>Duddingtonia flagrans</i>	Nemátodos y tremátodos		Mayor producción de trampas y clamidiosporas	Arias <i>et al.</i> , 2013

### 1.17 Hongos nematófagos en México

En México un grupo de investigadores del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del INIFAP, ha trabajado desde hace varias décadas con HN con prometedores resultados en su uso como agentes potenciales de control biológico de las nematodiasis de ovinos y bovinos (Ortiz-Pérez *et al.*, 2017; Aguilar-Marcelino *et al.*,

2016). Estos hongos al ser administrados por vía oral pasan a través del tracto digestivo y finalmente llegan a las heces donde ejercen su actividad depredadora de larvas infectantes de los nemátodos, reduciendo la población de larvas en las heces (Mendoza de Gives *et al.*, 2018). Este sistema sirve como un método de control biológico indirecto, ya que rompe el ciclo biológico de los parásitos a nivel de heces e impide la diseminación de la infección al resto del pastizal (Casillas *et al.*, 2008). Cuatro HN prometedores seleccionados en el presente estudio corresponden a *A. musiformis*, *A. oligospora*, *C. rosea* y *D. flagrans*.

### **1.17.1 Género *Arthrobotrys***

Este género de hongo se encuentra ubicado en la clasificación taxonómica como perteneciente a la familia Orbiliaceae. El género es considerado como nematófago facultativo. La habilidad depredadora que tiene el género *Arthrobotrys* fue descrita por Zopf (1888), en donde detalla el proceso de captura de los nemátodos. Dentro de las especies más conocidas se encuentran *A. musiformis*, *A. oligospora*, *A. robusta*, *A. superba*, *A. oviformis*, entre otras. El género *Arthrobotrys* se caracteriza morfológicamente por tener hifas fasciculadas, conidióforos hialinos, erectos y septados en su mayoría, los cuales producen conidios de forma asincrónica en denticulos cortos. Los conidios son subhialinos, delgados con paredes lisas y delgados de forma ovoidal, elipsoidal o caviforme (Rubner, 1996). Por lo general estas especies presentan clamidosporas. Dentro de las estructuras que desarrollan para atrapar los nemátodos se consideran los anillos constrictores, las redes adhesivas, hifas adhesivas o botones adhesivos (Pfister, 1994).

### **1.17.2 *Arthrobotrys musiformis***

*Arthrobotrys musiformis* (Figura 7) es un hongo saprofítico, aislado de diferentes sustratos en distintos países, debido a su gran capacidad de desarrollo en diferentes ambientes, se puede encontrar frecuentemente en zonas tropicales (Soares, 2006). *Arthrobotrys musiformis* es depredador facultativo de nemátodos y con gran potencial como controlador biológico en contra de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *H. contortus*. Morfológicamente la especie se caracteriza por tener conidióforos erectos con 7 a 12 conidios y ramificaciones, cada una con un único conidio terminal. Los conidios son

alargados, ovoidales, rectos o ligeramente curvos, con un septo medial (Alfaro *et al.*, 2011; Soto-Barrientos *et al.*, 2011)

Este HN desarrolla redes adhesivas tridimensionales y anillos simples que capturan nemátodos (Yang *et al.*, 2007b). *Arthrobotrys musiformis* pertenece al Phylum *Ascomycota*, Orden Helotiales, Familia Orbiliaceae, Género *Arthrobotrys*, Especie *Arthrobotrys musiformis*. Una de las ventajas que tienen este hongo es el desarrollo de clamidosporas (estructuras de reproducción) en cantidades considerables. Esta especie ha mostrado la habilidad de sobrevivir después de pasar por el tracto gastrointestinal de los ovinos, conservando su actividad depredadora contra las larvas de *H. contortus*, reduciendo el número de larvas en la pastura (Mendoza de Gives y Torres-Acosta, 2012; Graminha *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2002). Hasta la fecha, ha habido poca información sobre las enzimas extracelulares producidas por *A. musiformis* y su acción contra las larvas infectantes de *H. contortus*, lo cual es importante para comprender la acción nematocida de esta especie.



**Figura 7.** *Arthrobotrys musiformis* cultivado en PDA (AM-CENID-1).

### 1.17.3 *Arthrobotrys oligospora*

*Arthrobotrys oligospora* (Figura 8) es una de las especies de hongos nematófagos más comunes y más estudiadas. Este hongo puede ser aislado de sustratos diversos, como estiércol, composta o madera en descomposición (Liang *et al.*, 2013). Morfológicamente este hongo presenta conidióforos erectos, alargados, delgados y simples, generando



racimos con un promedio de 10 conidios, generalmente conformados por dos células, la célula proximal con menor longitud que la célula distal (Singh, 2005).

Las investigaciones indican que el hongo *A. oligospora* captura los nemátodos utilizando hifas especializadas en forma de redes tridimensionales, que emergen del sustrato y tienen una capa adhesiva que cubre la superficie de la trampa (Nordbring-Hertz, 2004; Gómez *et al.*, 2003). La red de anillos está cubierta por un tipo de lectina que reacciona con los azúcares de la piel de los nemátodos formando un adhesivo sumamente tenaz, además que los anillos de la red son constrictores. Se ha observado que estas estructuras especializadas sólo se forman en presencia de nemátodos, lo que indica que el hongo reacciona ante estímulos bioquímicos (Su *et al.*, 2007).

Algunos estudios demuestran que *A. oligospora* sembrado en APD o AHM después de un mes forma estructuras de multiplicación asexual conocidas como clamidosporas (Park *et al.*, 2002; Nagesh, 2005). El hongo *A. oligospora* se ha detectado atrapando numerosas especies de nemátodos, entre ellos algunos de importancia fitopatológica como *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera*, *Steinernema*, *Tylenchorhynchus*, *Apelenchoides* y *Apelenchus*. También se ha investigado su uso en el control biológico de nemátodos fitófagos y exo-parásitos de animales. Adicionalmente se ha comprobado que el hongo produce toxinas que paralizan rápidamente a los nemátodos atrapados. *Arthrobotrys oligospora* pertenece al Phylum Ascomycota, Orden Helotiales, Familia Orbiliaceae, Género *Arthrobotrys* y Especie *Arthrobotrys oligospora*.



**Figura 8.** *Arthrobotrys oligospora* cultivado en PDA (AO-CENID-1).

#### 1.17.4 *Clonostachys rosea*

El hongo *Clonostachys rosea* (*Gliocladium roseum*: telemorfo *Bionectria ochroleuca*) (Figura 9) es un saprófito micoparásito con una amplia distribución. Este hongo está asociado con organismos como: hongos, nemátodos y plantas, es variable en términos de su nicho ecológico. Se encuentra frecuentemente en suelos cultivados, en desechos que contienen ácidos fenólicos fitotóxicos y en órganos aéreos de plantas (Gan *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006).

En ciertos hospederos puede permanecer por periodos prolongados dentro de sus tejidos (actuando como endófito) o creciendo específicamente (Sutton *et al.*, 2002; Schroers, 2001; Sutton *et al.*, 1997; Yu y Sutton, 1997).

*Clonostachys rosea* es una especie micoparásita, destructiva y necrotrófica de hifas, esporas, esclerocios y otros cuerpos fructíferos de varios hongos. En otros trabajos se ha reportado la actividad de diferentes cepas, demostrando su eficiente actividad antagonista contra varios hongos fitopatógenos y contra nemátodos fitoparásitos. Los cultivos de *C. rosea* son de color blanco a salmón pálido.

El micelio es de aspecto tomentoso a granuloso, como resultado de la formación de conidióforos con masas de conidios, los que siempre son más abundantes en el centro que en los márgenes de la colonia (Piontelli y Giusiano, 2003, Schroers *et al.*, 1999).

Los conidióforos se presentan en micelio aéreo, existiendo dos tipos de conidióforos: verticilados y peniciliados, siendo estos últimos los que producen la mayor cantidad de conidias (Sutton *et al.*, 1997).

Los conidióforos verticilados son los primeros en formarse con fiálides largas y divergentes; y los conidióforos secundarios o penicilados, con ramas y fiálides adpresas o convergentes de menor tamaño que los verticilados.

Las conidias de *C. rosea* son hialinas, lisas, ligeramente curvadas con un lado un poco aplanado, formando masas viscosas sobre los conidióforos, generalmente miden entre 4.2-6.5 × 2.1-3.3 µm (Piontelli y Giusiano, 2003, Schroers *et al.*, 1999).

La taxonomía de *C. rosea* señala que pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Subclase Hypocreomycetidae, Orden Hypocreales, Familia Bionectriaceae, Género *Clonostachys*, y Especie *C. rosea*.



**Figura 9.** *Clonostachys rosea* cultivado en PDA (TZH-27).

#### **1.17.5 *Duddingtonia flagrans***

*Duddingtonia flagrans* (Figura 10) es un HN capaz de producir grandes cantidades de clamidosporas con paredes gruesas. Desarrolla tres redes tridimensionales adhesivas en las hifas. Su crecimiento es relativamente lento y está influenciado por la temperatura (Fernández *et al.*, 1999).

*Duddingtonia flagrans* ha sido probado con éxito en el control biológico indirecto de nemátodos parásitos de rumiantes, ya que las clamidosporas sobreviven al paso a través del tracto gastrointestinal del ganado y luego germinan y se extienden sobre el estiércol recién depositado, produciendo estructuras de captura de nemátodos especializadas, también se ha probado en ensayos *in vitro* contra *Meloidogyne incognita* y *M. arenaria* (Ojeda-Robertos *et al.*, 2009; Llerandi-Juárez y Mendoza de Gives, 1998).

En México, la reducción de la población de larvas infectantes de los principales nemátodos en heces de ovinos por acción de la administración oral de clamidosporas ha sido registrada en alrededor del 80% de actividad como control de las nematodiasis (Mendoza de Gives y Alatorre-Rosa, 2011). Clasificación taxonómica de *D. flagrans*:

Reino Fungi, División *Ascomycota*, Clase *Orbiliomycetes*, Orden *Orbiliales*, Familia *Orbiliaceae*, Género *Duddingtonia*, Especie *Duddingtonia flagrans*.



**Figura 10.** *Duddingtonia flagrans* cultivado en PDA (FTHO-8).

### **1.18 Pruebas *in vitro***

Las pruebas *in vitro* son un primer paso para determinar el potencial de los hongos nematófagos depredadores como controladores biológicos. La finalidad de estos ensayos es poner en contacto en condiciones óptimas los filtrados de los hongos con los nemátodos para evaluar la mortalidad de estos últimos. Con este tipo de pruebas se obtiene información que ayuda a seleccionar un filtrado de hongo como nematicida. El filtrado con menor actividad en las mismas condiciones da la pauta para descartarlo como potencial nematicida de nemátodos (Orozco *et al.*, 2009).

### **1.19 Estrategias para la detección de metabolitos secundarios**

La identificación de metabolitos en un extracto o filtrado, es un paso esencial para fortalecer la evidencia de la actividad antihelmíntica reportada por los microorganismos. La identificación de metabolitos activos a partir de filtrados de hongos nematófagos la integra el aislamiento por métodos fitoquímicos.

El método implica procedimientos de extracción, fraccionamiento, purificación y aislamientos de metabolitos. No obstante, algunos de los productos obtenidos pueden o no presentar actividad biológica al ser aislados del extracto, filtrado u organismo.

La cromatografía es el principal método utilizado para separar mezclas de especies químicas relacionadas entre sí. Se emplea para la identificación cualitativa y determinación cuantitativa de cada especie separada (Polo, 2015).

### **1.20 Cromatografía líquida de alta resolución**

Es una técnica de separación en la que la fase móvil es un líquido, se desarrolla en columnas en las cuales se emplean generalmente partículas pequeñas a una presión de entrada relativamente alta, denominándose como: cromatografía líquida de alta eficacia o de alta presión, por sus siglas en inglés HPLC (Bucar, 2013).

## JUSTIFICACIÓN

Los parásitos gastrointestinales son un problema que afecta severamente a la ganadería en México. El control de estos parásitos continúa realizándose con productos antihelmínticos tradicionales, los cuales tienen probadas consecuencias negativas: a) la resistencia en los parásitos hacia los medicamentos antiparasitarios, b) riesgos a la salud pública, debido a los residuos tóxicos que pueden permanecer en los productos, y c) subproductos de los animales para consumo humano.

Ante esta situación, se requieren estrategias integrales para el control de los NGI, desde una perspectiva sustentable y amigable al ambiente. El uso del control biológico basado en la utilización de enemigos naturales de los nemátodos, tales como los hongos nematófagos se encuentra en franco crecimiento. Durante los últimos años se ha descubierto que el mecanismo de acción de los HN es una combinación de la fuerza mecánica que ejercen los órganos de captura y la liberación de enzimas hidrolíticas extracelulares y otros metabolitos. En la búsqueda de estos compuestos nematotóxicos, el uso de filtrados obtenidos a partir de procesos fermentativos en medios de cultivo líquido se ha intensificado, por su rapidez y facilidad de controlar variables importantes. La adición de los nemátodos o sus partes, como cebos en medios de cultivo, pueden estimular de manera efectiva el crecimiento de órganos de captura y en su defecto, la producción de metabolitos secundarios. Por lo tanto, es sumamente urgente continuar trabajando desde diferentes perspectivas para encontrar alternativas que se integren al control de los NG. Este trabajo aporta información acerca del potencial nematicida que los hongos nematofagos pueden alcanzar, al agregar un extracto de larvas infectantes del nemátodo *H. contortus*, como un posible agente elicitador de compuestos nematicidas.

## HIPÓTESIS

Al menos un filtrado del cultivo de los hongos nematófagos *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys musiformis*, *Clonostachys rosea* y *Duddingtonia flagrans* suplementado con extracto crudo de larvas infectantes de *H. contortus*, ejercen un efecto letal *in vitro* superior al 80% contra larvas infectantes de *H. contortus*.

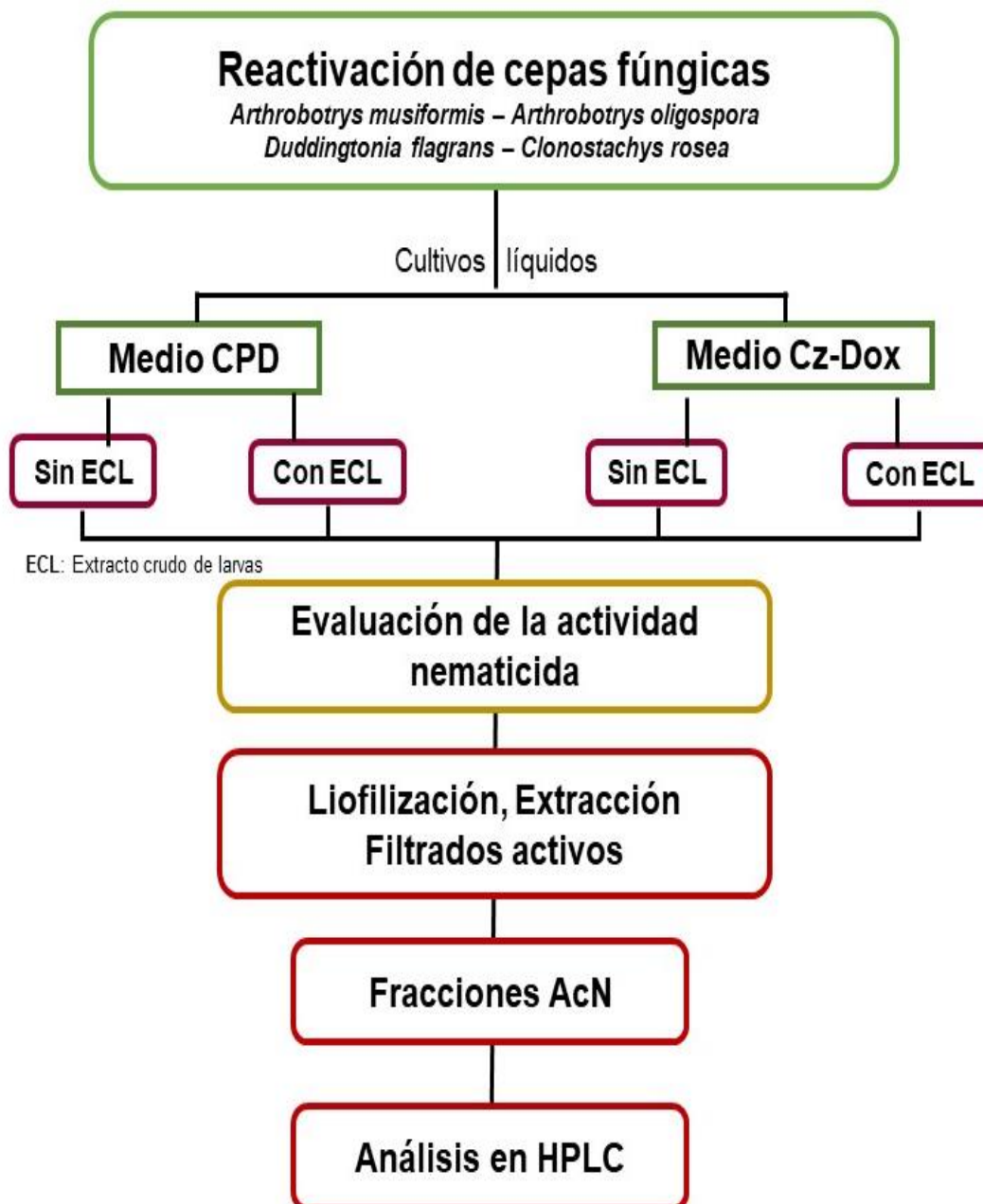
## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar *in vitro* la actividad nematocida de filtrados de hongos nematófagos, elicitados con un extracto de nemátodos, en contra de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la actividad nematocida *in vitro* de filtrados obtenidos de los hongos nematófagos *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys musiformis*, *Clonostachys rosea* y *Duddingtonia flagrans*, cultivados en dos medios líquidos suplementados con y sin extracto crudo de larvas L<sub>3</sub> de *Haemonchus contortus* como posible elicitador de compuestos nematocidas.
2. Obtener el perfil cromatográfico de los filtrados con actividad nematocida mediante cromatografía de líquidos de alta presión.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Figura 11.** Diagrama de la estrategia experimental para la identificación de filtrados de hongos nematófagos con actividad nematocida. Cz-dox = Czapek dox, CPD = caldo papa dextrosa, ECL = Extracto crudo de larva, FAcN = fracción orgánica de acetoneitrilo.



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 LOCALIZACIÓN

La presente investigación se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán CP. 97205 y en el Laboratorio de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Colonia Progreso, Jiutepec, Morelos, CP. 62550 (Figura 12).



Centro de Investigación Científica de Yucatán



Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad

**Figura 12.** Ubicación de centros de investigación donde se realizó la presente investigación.

#### 2.2 OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

##### 2.2.1 Larvas de *Haemonchus contortus*

La producción de larvas de *H. contortus* se llevó a cabo en ovinos Pelibuey (Figura 13). Para ésto, se inoculó (vía oral) un ovino de tres meses de edad, libre de parásitos siguiendo la técnica de McMaster, con una dosificación de 350 larvas infectantes (L<sub>3</sub>) por Kg de peso corporal. Transcurrido un período de 21 días se realizó la prueba de McMaster, las heces se colectaron por vía rectal para comprobar la presencia de huevos

del parásito en las heces, considerado como control positivo a la parasitosis. La técnica de McMaster consiste en detectar y cuantificar huevos de nemátodos y céstodos. Basándose en el método de flotación, por medio de diferencia de densidades, los elementos parasitarios ascienden a la superficie de las cámaras de McMaster, quedando los huevos en la parte inferior del área delimitada.

Para realizar la técnica de McMaster, se tomó un volumen total de 28 mL de disolución saturada de cloruro de sodio (NaCl), se agregó a un frasco cilíndrico graduado de 30 mL, el cual contenía 2 g de la muestra fecal (heces de ovino extraídas directamente del recto). La mezcla se agitó hasta disolver completamente y después se colocó una gasa como filtro, antes de introducir el gotero para evitar los residuos vegetales. Posteriormente, con el gotero se tomó el volumen suficiente, para llenar los compartimientos de la cámara de McMaster, evitando la formación de burbujas. Se dejó reposar por 3 min y mediante la observación directa al microscopio, con el objetivo de menor aumento (10X), se enfocó la cuadrícula marcada en la parte inferior del cubreobjetos de la cámara, para finalmente realizar el conteo de huevos.

Para realizar el conteo de los huevos se realizó el siguiente análisis: cada división de la cámara de McMaster mide  $1 \text{ cm}^2$ , la altura del fondo mide 0.15 cm por cada lado, dando un total de 0.30 que corresponden a 0.30 mL. El volumen de 0.15 mL es el 50% total de la probeta y 0.30 mL corresponde al 100%. Una vez que los huevos del parásito han sido contados, se multiplican por 100 y se divide entre dos, ya que se utilizaron 2 g de heces, dando como resultado, el número de huevos por gramo de heces (Campos y Bautista, 2009). Las heces se usaron para desarrollar coprocultivos, los cuales se incubaron durante 7 días a 27 °C. La técnica de coprocultivos se realizó a partir de huevos del nemátodo parásito para obtener larvas infectantes L<sub>3</sub> obtenidos de las heces del ovino, se colectaron y colocaron en una palangana, posteriormente, se trituraron y homogeneizaron con agua, se agregó hule espuma y se mezcló bien, finalmente se cubrió con una tapa de aluminio diseñada con una ventana cubierta con gasa, para permitir la oxigenación. Se removieron cada día los coprocultivos, agregando agua de ser necesario para mantener la humedad (Liébano, 2004).

Las larvas infectantes L<sub>3</sub> se recuperaron por la técnica de embudos de Baermann, la cual sirve para recuperar los estadios larvarios de nemátodos. El método se basa en la

capacidad que tienen las larvas de migrar de un sustrato líquido gracias a su movilidad e hidrotropismo positivo, hecho por el cual sedimentan al fondo del recipiente que las contiene. En un embudo se colocó en la parte inferior, una manguera (10 cm), la cual se une a un tubo de ensayo. Se llenaron los embudos con agua corriente y se colocaron los muñones (gasa con la muestra de heces atado en los cuatro extremos), el embudo fue llenado con agua hasta cubrir el muñón. Por un lapso de 24 h se dejó en reposo para que las larvas migraran al fondo del tubo, posteriormente se recolectaron las larvas y fueron colocadas en tubos falcon de 50 mL, dejándolas sedimentar durante 2 h a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, enseguida, todas las larvas se colocaron en tubos de 15 mL, aforando a 10 mL de volumen total con agua destilada para su conteo. Se realizó el conteo de las larvas, colocando en un portaobjetos 10 alicuotas de 5  $\mu$ L a 10  $\mu$ L de muestra, dependiendo la concentración de larvas; con ayuda de un microscopio compuesto, se realizó el conteo larval, obteniendo finalmente el total de larvas recuperadas (Liébano, 2004). Las larvas ya contabilizadas se colocaron en cajas de cultivo bien etiquetadas, se les agregó un poco más de agua destilada para una mejor distribución y evitar que se enredaran. Las cajas de cultivo con las larvas L<sub>3</sub> fueron almacenadas a 4 °C, hasta su uso.

Para la concentración y conservación de la población larvaria se mantuvieron a 4 °C en cajas de cultivo (Liébano *et al.*, 2011). Se lavaron usando la técnica de gradiente de densidad con una disolución de sacarosa al 40%. Para el lavado de larvas se preparó una disolución al 40% de sacarosa, posteriormente en una relación 3:1 se colocó la sacarosa y la muestra, en un tubo de ensayo y se centrifugó por 5 min a 3,500 rpm; una vez que se formó el anillo de larvas, se tomó cuidadosamente el anillo formado y con la ayuda de una pipeta se colocó en otro tubo de ensayo limpio.

Se realizaron lavados con agua destilada (3x) y se centrifugó a 3,500 rpm por 3 min. Una vez obtenido el pellet con larvas, éstas se cuantificaron para su posterior uso. Posteriormente algunas de las larvas se desenvainaron, con hipoclorito de sodio. En un tubo de ensayo se colocaron 0.187  $\mu$ L de hipoclorito de sodio (6%) y se ajustó a un volumen de 6 mL. Enseguida, se agregaron las larvas contenidas en 2 mL de agua destilada, se homogeneizó con la disolución de hipoclorito de sodio, se dejó por 10 min al tiempo que se observó (una gota) el desenvaine en el microscopio. Se centrifugó a 3,500

rpm por un minuto. El sobrenadante se desechó, y se realizaron lavados con agua destilada (3x) por 3 min, finalmente se cuantificó el total de larvas recuperadas.



Ovino donador de huevos de *H. contortus*



Coprocultivos



Embudos de Baermann



Larvas de *H. contortus* L<sub>3</sub> a 4 °C



Gradiente de larvas lavadas



Desenvaine de larvas

**Figura 13.** Proceso de obtención de larvas infectantes *H. contortus*.

### 2.3 Hongos nematófagos

Las cepas de los cinco hongos nematófagos (HN) estudiados se describen en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Hongos nematófagos en estudio y del cepario de origen.

No.	Especie	Clave	Cepario de origen
1	<i>Arthrobotrys oligospora</i>	AO-CENID-1	CENID-SAI
2	<i>Arthrobotrys musiformis</i>	AM-CENID-1	CENID-SAI
3	<i>Duddingtonia flagrans</i>	FTHO-8	CENID-SAI
4	<i>Clonostachys rosea</i>	TZH-27	CICY

Las tres primeras cepas pertenecen a la colección de hongos nematófagos del Departamento de Helminología del CENID-SAI, INIFAP. La cuarta cepa pertenece al cepario de la Unidad de Biotecnología del CICY, Mérida.

### 2.3.1 Reactivación de cepas

La reactivación de cada cepa se realizó en placas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA) y fueron incubadas por 15 días a una temperatura de 25 °C (Figura 14). Posteriormente, se realizaron resiembras de cada cepa nuevamente en placas de Petri, para realizar los cultivos, se dejó en las mismas condiciones de temperatura durante 15 días. También se realizó el cultivo de los hongos en tubos pequeños que contenían APD, las cuales se mantuvieron en refrigeración y oscuridad.

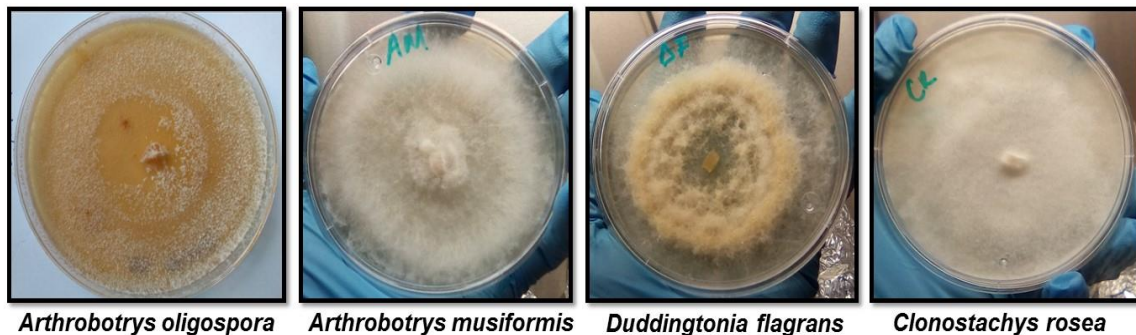


Figura 14. Hongos nematófagos re-activados en agar papa dextrosa.

## 2.4 Experimentos preliminares exploratorios de cultivo de los hongos nematófagos

### 2.4.1. Preparación de medio de cultivo y obtención de extractos orgánicos

Los medios de cultivo líquidos utilizados para el cultivo de los hongos nematófagos se prepararon de la siguiente forma: Czapek dox (Cz-Dox), el cual es un medio de cultivo semisintético usado generalmente para cultivo de hongos. Sus componentes son:

Componentes	g/L
Sacarosa	30.000
Nitrato de sodio	2.000
Fosfato bipotásico	1.000
Sulfato de magnesio	0.500
Cloruro de potasio	0.500
Sulfato ferroso	0.010
Agar	15.000
pH	7.3 ± 0.2
<b>*Si es cultivo líquido se omite el agar</b>	

Se disolvieron 34.01 g del medio de cultivo en 1,000 mL de agua destilada y se llevó a ebullición para disolver por completo los componentes. Se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión (121 °C), durante 15 min. Para el método casero, se pesó cada compuesto, se disolvieron en agua destilada y se esterizaron en autoclave en las mismas condiciones.

Para el medio Caldo papa dextrosa (CPD) se usaron los siguientes componentes:

Componentes	g/L
Papas enteras maduras	500
Dextrosa	20
Agua destilada	1

Las papas se pelaron y cortaron en pequeños trozos, se colocaron en un vaso de precipitado (1 L) con 400 mL de agua destilada y se llevaron a cocción durante 30 min. La mezcla se dejó enfriar, en seguida se filtró con ayuda de un colador y una gasa. El filtrado se aforó a 1,000 mL con agua destilada. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión (121 °C), durante 15 min.

El medio de cultivo sólido en arroz fermentado se preparó de la siguiente manera:

A partir de cultivos de los hongos nemátofagos en PDA incubados a 25 °C con un fotoperiodo de 12/12 horas luz/obscuridad y después de cubrirse la superficie de la caja con esporas y micelio, se realizó una suspensión de esporas adicionando en las cajas 5 mL de disolución salina (0.085%), para remover esporas y/o micelio. El líquido sobrenadante corresponde a la suspensión de esporas (Höller *et al.*, 2000).

Para obtener el arroz fermentado y realizar los cultivos se utilizó el arroz marca Verde Valle, se lavó y secó a 50 °C por 2 h o hasta quedar totalmente seco. En matraces Erlenmeyer se depositaron 20 g del arroz limpio y 20 mL de agua destilada, dejándolo fermentar por una noche. Los matraces se esterilizaron en forma inclinada por 30 min a 121 °C y 15 lb de presión. Ya frío el arroz fermentado se inoculó con la suspensión de esporas (5 mL) de los hongos en estudio. Los matraces con el arroz inoculado se incuban por 40 días a 25 °C y 12/12 h de luz/oscuridad. Como blanco se empleó el arroz fermentado estéril (Söman *et al.*, 2001).

Al finalizar el periodo de crecimiento de los hongos y verificada la pureza del cultivo, éste se fragmentó con ayuda de una espátula y se transfirió a un matraz de 2 L para macerarlo con etanol por 24 h (3x) a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida usando un evaporador rotatorio con un baño de agua a 40 °C. Los cuatro HN se cultivaron en arroz fermentado como medio de cultivo sólido (Gamboa-Angulo *et al.*, 2012). Después de 40 días se obtuvieron sus extractos con etanol destilado. Estos extractos orgánicos se evaluaron contra la larva infectante de *H. contortus*.

La actividad nematocida de los extractos etanólicos se evaluó realizando bioensayos para determinar el efecto de los extractos de los HN. La prueba se llevó a cabo en una placa de microtitulación de 96 pozos en donde se confrontaron 200 larvas de *H. contortus* contenidas en un volumen de 20 µL de agua; posteriormente, se agregaron 80 µL del extracto correspondiente.

Cabe mencionar que los extractos fueron disueltos en DMSO/H<sub>2</sub>O al 4%. La placa fue incubada durante 24 y 48 h a temperatura de laboratorio (25 °C ± 2 °C). Debido al rendimiento limitado de los extractos en este bioensayo, se realizaron dos lecturas a las 24 y 48 h post-tratamiento. El criterio de evaluación se basó en el conteo de larvas vivas y muertas en 10 gotas/alícuotas (n = 10), de 10 µL; en cada lectura se cubrió el volumen

total de cada pozo. Las variables dependientes fueron los promedios de larvas muertas en los pozos correspondientes a cada tratamiento.

#### **2.4.2 Metilación**

En un matraz balón de 10 mL se pesaron 20 mg de muestra, se mezcló con 990  $\mu$ L de metanol al 1% y 10  $\mu$ L de ácido sulfúrico (la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente por 12 h). La mezcla se vertió en 2 mL de agua destilada y la suspensión se extrajo con acetato de etilo (AcOEt: 2x, 2:2, 1:1, v/v). La fase orgánica fue lavada con 10 mL de agua destilada y posteriormente se le adicionó  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para eliminar trazas de agua. Después se evaporó y eliminaron las trazas del disolvente obteniendo las fracciones metiladas.

#### **2.4.3 Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas**

Los cromatogramas de gases y los espectros de masas se obtuvieron en un cromatógrafo Agilent Technologies 6890N, acoplado a un detector de masas selectivo Agilent Technologies 5975B (CG-EM). Se utilizó una columna HP-DB5MS (30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.5  $\mu$ m), con flujo de helio = 1.2 mL/min, con un tiempo de corrida de 37 min. Alícuotas de las fracciones hexánicas de los cuatro hongos nematófagos y las de sus correspondientes derivados metilados se disolvieron en MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se inyectaron (2  $\mu$ L, 1% p/v). Los tiempos de retención ( $t_R$ ) de los componentes se reportaron en minutos en un cromatograma y su patrón de fragmentación y peso molecular en un espectro de masas, los cuales se compararon con la base de datos NIST 05MS spectra 2006 del equipo.

### **2.5 Extracción y cuantificación de extracto crudo proteico de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (ECL)**

El extracto crudo de *H. contortus* (ECL), se preparó con  $L_3$  lavadas previamente con sacarosa al 40%. Las larvas se maceraron en PBS (pH 7.4 1x) con Tritón al 0.1% con ayuda de un macerador de tejidos (mortero), todo se realizó en frío. Se verificó la maceración de las larvas en el microscopio para confirmar que todas estuvieran desintegradas. Posteriormente, se recuperaron en un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4 °C, en una termocentrífuga (Thermo Fisher 75007203). Se recuperó el sobrenadante y se guardó a -80 °C. Se tomaron 200  $\mu$ L de volumen del



extracto crudo de proteínas, estéril, para su cuantificación y la determinación del patrón proteico por geles de poliacrilamida.

## **2.6 Cuantificación de proteínas totales**

Por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay®) se cuantificó la cantidad de proteína recuperada de la extracción de las larvas de *H. contortus*. Este método se basa en la unión del colorante Comassie Blue G-250 a las proteínas. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre (Bradford, 1976). A partir de una disolución concentrada de Bradford (5x) que se mantiene en refrigeración a 4 °C se tomaron 4 mL y se dejaron a temperatura ambiente por 2 h. Posteriormente, la disolución stock (4 mL) se mezcló con 16 mL de agua Milli-Q y se homogeneizó. La mezcla se filtró a través de papel Whatman #1 y se utilizó para la cuantificación de proteínas.

En un matraz se preparó el patrón de la proteína (1 mg/mL) con albúmina de suero (BSA, Sigma), pesando 10 mg de BSA, y aforando a 10 mL con PBS 10 mM, pH 7.4. La disolución patrón se utilizó para preparar la curva patrón de concentración proteica, agregando en cada caso: 0, 10, 20, 40, 80, 160 µL de BSA (1 mg/mL) en 200, 190, 180, 160, 120 y 40 µL de PBS, respectivamente, para obtener un volumen final de 200 µL. Las seis concentraciones de BSA obtenidas en total fueron: 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/mL. Cada muestra se realizó por triplicado. De la misma manera, se prepararon 10 µL de cada una de las diluciones de la muestra de extracto crudo por triplicado.

Posteriormente, se añadieron 200 µL de colorante de Bradford 1x a cada dilución, se resuspendieron y se dejaron reposar por 30 min, previo a la lectura a temperatura ambiente. La lectura de absorbancia fue a 595 nm de longitud de onda frente al blanco (el color es estable 1 h). La lectura se realizó en el espectro-fotómetro IMPLEN (NanoPhotometer NP80). De esta manera, se determinó la concentración de proteínas totales. Para confirmar la presencia de proteínas se realizó un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con geles al 12 y 5%.

## **2.7 Cultivos líquidos de hongos nematófagos**

### **2.7.1. Preparación e inoculación de los cultivos líquidos**

Los hongos se cultivaron en cajas de cultivo celular de 900 mL estériles, se colocaron en forma vertical con un volumen final de 15 mL de CPD a pH 6 y Cz-Dox a pH 7 (ambos por método casero). Los cultivos líquidos de CPD y Cz-Dox se inocularon con dos discos (5 mm) de PDA (cada caja) con el hongo correspondiente. Los cultivos se dejaron en reposo después de la inoculación a temperatura de  $25 \pm 2$  °C, con fotoperiodo de luz/oscuridad de 12/12 h. Después de cinco días, a cada caja de cultivo, conteniendo los medios de CPD y Cz-Dox, se le adicionaron 572 µg de ECL en un volumen de 133.33 µL. Estos cultivos se etiquetaron como CPD-ECL y Cz-Dox-ECL. Como blanco se utilizaron ambos medios de cultivo sin los HN y se les agregó la misma cantidad de ECL. Los medios de cultivo sin ECL se etiquetaron como CPD-SIN y CZ-Dox-SIN. Cada tratamiento se realizó con tres réplicas (3x) y se incubaron a las condiciones anteriormente descritas.

### **2.7.2. Procedimiento para obtener los filtrados de hongos nematófagos**

Al finalizar el período de incubación, el micelio se separó del filtrado a través de papel Whatman #1. El micelio se dejó secar en condiciones ambientales y se midió el pH de los filtrados recuperados (fase acuosa). Los filtrados se centrifugaron a 3,500 rpm durante 15 min y se esterilizaron utilizando una membrana de 0.22 µm de malla, evitando la contaminación. El sobrenadante recuperado se transfirió a tubos Falcón de 50 mL, posteriormente se congelaron y liofilizaron. Los filtrados liofilizados se disolvieron en agua destilada esterilizada, para su uso en los bioensayos, previamente se determinó su peso y se obtuvieron sus rendimientos.

## **2.8 Diseño experimental**

En el presente experimento, dos diferentes medios de cultivo (CPD y Cz-Dox) se utilizaron (Cuadro 5) para cada uno de los cuatro HN en estudio; cada uno con dos diferentes tratamientos (con y sin ECL), además de los blancos respectivos en cada tratamiento (n = 5) y con un tamaño de muestra (n = 4) en cada tratamiento (2 × 2 × 5 × 3). Como resultado, se obtuvieron 60 cajas de cultivo que se incubaron dispuestas al azar, a

temperatura de laboratorio (25 °C), con fotoperiodo de 12/12 h luz-oscuridad (Trigos *et al.*, 2005).

**Cuadro 5.** Diseño experimental de los tratamientos en estudio de cultivo de hongos nematófagos con y sin inductores en dos diferentes medios.

Hongos nematófagos	Clave cepas	Caldo papa dextrosa		Czapek Dox	
		ECL	SIN	ECL	SIN
<i>A. oligospora</i>	AO-CENID-1	3x	3x	3x	3x
<i>A. musiformis</i>	AM-CENID-1	3x	3x	3x	3x
<i>C. rosea</i>	TZH-27	3x	3x	3x	3x
<i>D. flagrans</i>	FTHO-8	3x	3x	3x	3x
Control blanco	CPD	3x	3x	3x	3x
	Cz-Dox	3x	3x	3x	3x

ECL: Inductor (extracto crudo de L3 de *Haemonchus contortus*) SIN: Sin inductor

Después de 10 días de incubación en los medios, la masa micelial se separó primero por filtración a través de papel Whatman # 2. Al filtrado obtenido se le midió el pH y posteriormente se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 min. El sobrenadante recuperado (filtrado) se esterilizó utilizando una membrana Millipore (0.2 µm) y se liofilizó (FL), para ser almacenado hasta su uso.

## 2.9 Mortalidad de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*

El filtrado liofilizado (FL) se diluyó en agua destilada estéril a una concentración de 200 mg/mL. Las pruebas se realizaron en placas de cultivo ELISA de 96 pozos (Figura 15); cada pocillo recibió 80 µL de cada FL, a los que se le agregaron 20 µL de agua conteniendo aproximadamente 100 larvas infectantes de *H. contortus* (Cuadro 6).

Los tratamientos incluyeron los filtrados liofilizados, como control negativo se utilizó agua destilada pura y como control positivo ivermectina comercial al 0.5%. Cada tratamiento se replicó cuatro veces (n = 4). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente (28 °C), durante 48 h de incubación. Posteriormente, se realizaron las lecturas de cada placa. Se cuantificó la cantidad de larvas vivas y muertas de cada pozo a través de 10 alícuotas de

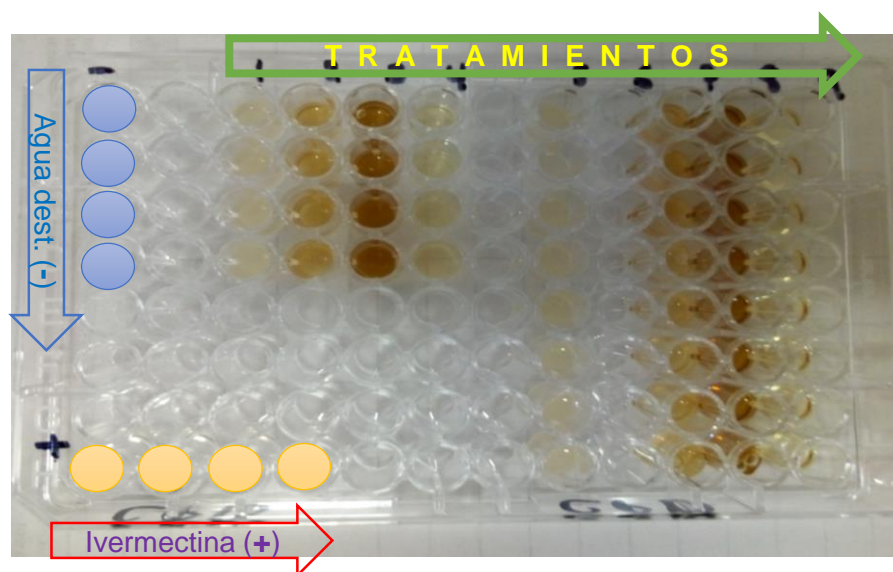
10  $\mu$ L. Las larvas se consideraron muertas si no se movían cuando se estimulaban con una aguja fina. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se determinó el porcentaje de mortalidad en cada caso, desarrollando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Larvas muertas}}{\text{Larvas totales}} * 100$$

**Cuadro 6.** Diseño experimental de la confrontación de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* con filtrados de hongos nematófagos.

Serie	Hongos nematófagos	Clave	<i>H. contortus</i> L <sub>3</sub>	CPD		Cz-D	
				ECL	SIN	ECL	SIN
1	<i>A. oligospora</i>	AO-CENID-1	100	+	-	+	-
2	<i>A. musiformis</i>	AM-CENID-1	100	+	-	+	-
3	<i>D. flagrans</i>	FTHO-8	100	+	-	+	-
4	<i>C. rosea</i>	TZH-27	100	+	-	+	-
5	Blanco	CPD	100	+	-	+	-
		Cz-D	100	+	-	+	-
6	Control (C -)	Agua destilada	100	+	-	+	-
7	Control (C +)	Ivermectina al 5%	100	+	-	+	-

n = 4 Repeticiones, Lecturas = 10 alícuotas de 10  $\mu$ L a 48 h post-confrontación. Este experimento fue llevado a cabo por triplicado. CPD = Caldo Papa Dextrosa; Cz-D = Czapek dox. ECL: extracto crudo de larvas. (-): sin ECL; (+): con ECL.



**Figura 15.** Placa de Elisa de 96 pozos. Cada bioensayo se realizó por triplicado contra larvas infectantes de *H. contortus*.

## **2.10 Análisis estadístico**

### **2.10.1 Diseño completamente al azar**

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando un diseño completamente al azar con arreglo factorial, donde los factores evaluados corresponden al efecto del hongo, efecto del medio y el porcentaje de mortalidad como respuesta. Las medias entre tratamientos fueron comparadas por una prueba de Tukey considerando un nivel de significancia de ( $p < 0.05$ ). Todos los datos fueron analizados por el paquete SAS 9.0 (SAS, 2006).

## **2.11 Métodos analíticos**

Con base en los resultados de la actividad antihelmíntica, se seleccionaron los filtrados que tuvieron mayor porcentaje de mortalidad para ser analizados. Se seleccionaron 10 de los filtrados de Czapek dox, los cuales incluyeron a los cuatro hongos nematófagos (Cuadro 3).

## **2.12 Obtención de la fracción orgánica de los filtrados**

El filtrado liofilizado se sometió a una extracción por sonicación con acetonitrilo (ACN) (3x, 2:1, 1:1, 1:1). El disolvente se eliminó bajo presión reducida y los extractos se llevaron a sequedad total con nitrógeno para obtener el peso seco. Las fracciones de ACN se mantuvieron a 4 °C en oscuridad para la realización del análisis químico. Para el análisis por HPLC fase reversa se prepararon 0.5 mg de la fracción orgánica en 500 µL de metanol/agua (80:20). El método usado fue el DI-01.

## **2.13 Cromatografía líquida de alta resolución**

Los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) se realizaron en un equipo Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity de bombas cuaternarias, con un detector de UV. Los disolventes se filtraron a través de discos Millipore 0.45 µm y se desgasificaron por sonicación 20 min. Las muestras se inyectaron (10 µL) a una concentración de 2 mg/0.5 mL en una columna Alltima C18 de 5 µm, diámetro de 4.6 mm y longitud de 250 mm. El análisis se realizó en gradiente de polaridad

descendiente con mezclas de metanol/agua (50:50) (5 min), metanol 100 (13 min) (17 min), metanol-agua (50:50) (18 min) (19 min), con un flujo de 0.8 mL/min, método DI-01. Las lecturas se realizaron a longitudes de onda de 210, 254, 280 y 330 nm (Anexo 3 A-J).

## RESULTADOS

### 2.14. Rendimiento del material fungal

El rendimiento de los extractos etanólicos obtenidos a partir de la fermentación de los hongos en arroz se muestran en el Cuadro 7. El mayor rendimiento se obtuvo con el hongo *A. musiformis* (12.90%) seguido de *C. rosea* (3.69%), *A. oligospora* (2.57%) y *D. flagrans* (2.38%).

**Cuadro 7.** Rendimiento de los extractos etanólicos obtenidos de la fermentación en arroz.

Cepas	Clave Extracto	Extracto etanólico	Rendimiento %
<i>A. musiformis</i>	MDF-01	25.8072	12.90
<i>C. rosea</i>	MCR-01	7.3906	3.69
<i>A. oligospora</i>	MAO-01	5.1581	2.57
<i>D. flagrans</i>	MDF-01	4.7752	2.38
Controles			
Blanco PDB 1	MBA1-01	0.8336	0.4168
Blanco PDB 2	MBA2-01	0.8336	0.4168

El rendimiento de los filtrados obtenidos a partir de los distintos hongos nematófagos en los medios de cultivo se muestran en el Cuadro 8.

**Cuadro 8.** Fracciones orgánicas de acetonitrilo de los filtrados de Czapek Dox con y sin el inductor.

Clave	Tratamientos	Volumen filtrado (mL)	W FL (mg)	Rend FL %	FO de ACN (mg)	Rend ACN %
CD	Medio de cultivo (Blanco)	15	346.8	96.41	2.7	0.78
AOCD	<i>A. oligospora</i>	14	306.9	98.90	3.6	1.17
AMCD	<i>A. musiformis</i>	14	190.7	99.69	2.4	1.26
DFCD	<i>D. flagrans</i>	14	374.9	98.19	5.9	1.57
CRCD	<i>C. rosea</i>	14	448.1	98.51	0.9	0.20
CD1	Medio de cultivo (Blanco) + Inductor	15	410.2	99.08	3.2	0.78
AOCD1	<i>A. oligospora</i> + Inductor	14	219	100.00	1.9	0.87
AMCD1	<i>A. musiformis</i> + Inductor	14	81.4	99.88	0.6	0.74
DFCD1	<i>D. flagrans</i> + Inductor	14	164	98.09	1.7	1.04
CRCD1	<i>C. rosea</i> + Inductor	14	95.2	99.06	1.1	1.16

FO: Fracción orgánica, ACN: Disolvente, Inductor: Extracto crudo de larvas de *Haemonchus contortus* (L<sub>3</sub>). FL: Filtrado liofilizado

### 2.14.1 Resultados de los experimentos preliminares

Los resultados preliminares referentes a la confrontación *in vitro* de extractos orgánicos etanólicos, de arroz fermentado, de *A. oligospora* (AO-CENID-1), *C. rosea* (TZH-27) y *A. musiformis* (AM-CENID-1) contra larvas infectantes de *H. contortus*, correspondientes al monitoreo inicial de extractos etanólicos se muestran en los Cuadros 9 y 10.

Estos resultados mostraron actividades importantes superiores al 60% y cercanas al 80% para los dos primeros y de casi el 100% para *A. musiformis*. Cabe mencionar que los experimentos preliminares se llevaron a cabo solamente como un monitoreo para seleccionar cepas candidatas para continuar estudiando y obtener extractos nematocidas. Estas cepas candidatas debían ser evaluadas con la validez estadística basada en la reproducibilidad.



**Cuadro 9.** Resultados de la confrontación *in vitro* de extractos de hongos nematófagos, cultivados en arroz fermentado, contra larvas infectantes de *H. contortus* expresados en porcentaje de mortalidad en dos tiempos de incubación.

Extracto etanólico	Clave	% Mortalidad 24 h (media $\pm$ de)	% Mortalidad 48 h (media $\pm$ de)
<i>C. rosea</i>	TZH-27	76.21 <sup>a</sup> $\pm$ 8.41	79.64 <sup>a</sup> $\pm$ 13.7
<i>A. oligospora</i>	AO-CENID-1	56.9 <sup>a</sup> $\pm$ 9.76	62.7 <sup>a</sup> $\pm$ 19.1
DMSO/Agua 4%	Control	0.33 <sup>b</sup> $\pm$ 0	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0

Medias en la misma fila con diferente literal son diferentes ( $p < 0.05$ ). Se utilizaron 6 pozos por cada tratamiento y cada pozo fue considerado como una unidad experimental; las lecturas se realizaron cuantificando el número promedio de larvas muertas en 10 alícuotas ( $n=10$ ). de: desviación estándar

**Cuadro 10.** Resultados de la confrontación *in vitro* de extractos del hongo *Arthrobotrys musiformis*, cultivados en arroz fermentado, contra larvas de *H. contortus* expresados en porcentaje de mortalidad en tres tiempos de incubación.

Extracto etanólico	Clave	% Mortalidad (h)		
		24	48	72
<i>A. musiformis</i>	AM-CENID-1	32.29 <sup>b</sup> $\pm$ 24.83	98.68 <sup>a</sup> $\pm$ 25	99.78 <sup>a</sup> $\pm$ 16.5
Ivermectina 5 %	Control (+)	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Agua	Control (-)	1.51 <sup>c</sup> $\pm$ 3.7	0.19 <sup>c</sup> $\pm$ 0,47	0 <sup>c</sup>
<b>Efecto extracto</b>				<0.001
<b>Efecto tiempo</b>				<0.001
<b>Efecto ext*tiem</b>				<0.001
<b>C.V</b>				22.55
<b>R<sup>2</sup></b>				0.93

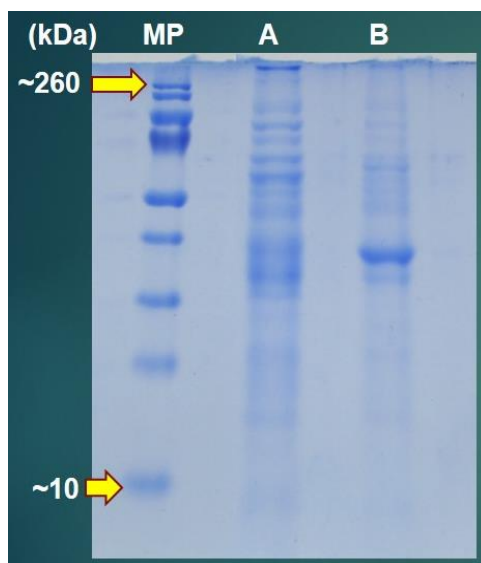
Medias en la misma fila con diferente literal son diferentes ( $p < 0.05$ ).

Asimismo, estos extractos se fraccionaron por partición y se analizaron por cromatografía de gases acoplada a masas con lo que se determinó el perfil químico de los compuestos

de las fracciones de baja polaridad, apoyados con sus derivados metilados (Anexo 1). En éstos se detectaron los ácidos grasos, siendo el ácido palmítico, el ácido oleico y el linoleico los predominantes y más comunes en las cuatro cepas de HN.

#### 2.14.2 Obtención del extracto de larvas de *Haemonchus contortus* para ser utilizado como inductor de la morfogénesis y como posible elicitor de compuestos nematicidas.

En cuanto a la obtención del inductor potencial de la morfogénesis a partir de la utilización de larvas infectantes del nemátodo *H. contortus*, cabe mencionar que el análisis de Bradford indicó que el extracto crudo obtenido a partir de 37,400 larvas infectantes de *H. contortus* contenía un total de 4.3 mg/mL de proteína. La presencia de bandas proteicas de distintos pesos moleculares se visualizó en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con geles al 12 y 5 % (Figura 16).



**Figura 16.** Perfil proteico de la larva infectante *H. contortus*, separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Carril A: marcador de peso molecular, Carril B: extracto de larvas de *H. contortus*.

### 2.14.3 Resultados del efecto nematocida *in vitro* de filtrados de cuatro hongos nematófagos contra larvas infectantes de *Haemonchus contortus*

Los resultados sobre la proporción de larvas muertas de *H. contortus* (L<sub>3</sub>) recuperadas a partir de las placas de microtitulación, después de 48 h de interacción con filtrados de los hongos nematófagos, así como los porcentajes de mortalidad atribuidos a los filtrados, se muestran en el Cuadro 11. Es importante mencionar que las larvas infectantes de *H. contortus* en los controles agua e ivermectina, resultaron contundentes siendo la mortalidad negativa en agua y en ivermectina se obtuvo un efecto letal del 100%. Sin embargo, el efecto de la mortalidad en los medios Cz-Dox y CPD en ausencia o en presencia del inductor (ECL) causaron entre el 15.3 y 42.4% de mortalidad, lo que indica que el medio caldo papa dextrosa *per se* ejerce cierto efecto nematocida. Asimismo, estos mismos medios en presencia del inductor provocaron mortalidades de 55.5 y 38.36%; respectivamente. En contraste, el control con agua no tuvo ningún efecto letal en contra de las larvas infectantes del parásito, motivo por el cual un efecto atribuido a los grupos controles con y sin inductor fue identificado. Por tal comportamiento, se tuvieron que realizar los ajustes correspondientes restando el efecto de la mortalidad atribuida a los respectivos grupos control.

Los resultados de esta prueba muestran que los filtrados sin inductor provocaron una mortalidad larval, que osciló en un rango entre 0-27% (previo ajuste con respecto a la mortalidad atribuida al efecto del medio de cultivo). En contraste, los filtrados que contenían el inductor causaron una mortalidad larval variable, encontrándose valores de 0 en *D. flagrans* y *C. rosea*, ambos cultivados en CPD; mientras que los valores más elevados de mortalidad correspondieron a *D. flagrans* con 80.5% (en Cz-Dox), *A. oligospora* con 69.9% (en Cz-Dox) y *A. musiformis* con 66.8% (en Cz-Dox) (Cuadro 11, Anexo 2).

**Cuadro 11.** Proporción de larvas muertas de *Haemonchus contortus* (L<sub>3</sub>) recuperadas de placas de microtitulación, <sup>a</sup> después de 48 h de interacción con los filtrados de cuatro hongos nematófagos y porcentajes de mortalidad.

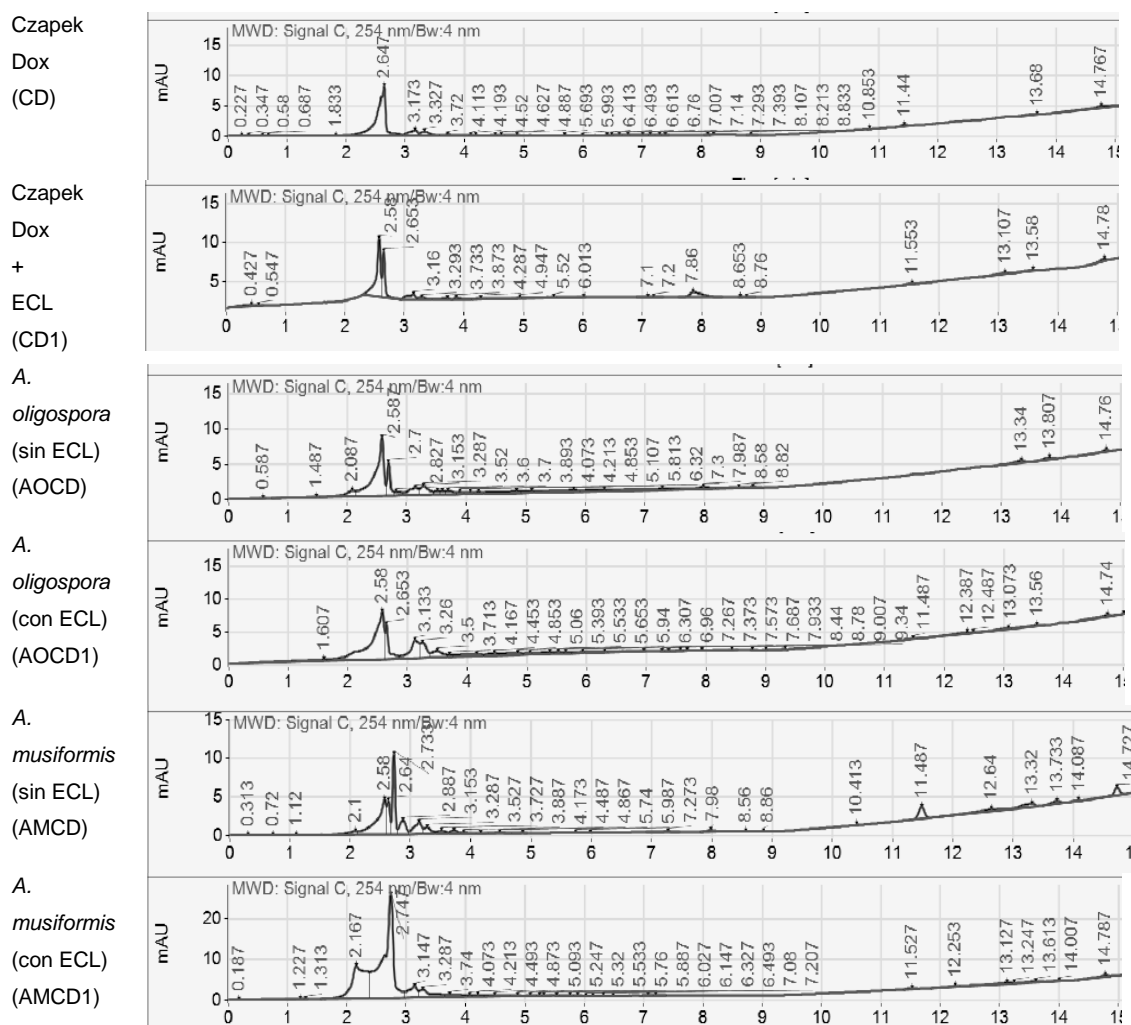
Serie	Sin Inductor de la Morfogénesis			Con Inductor de la Morfogénesis		
	PLR (Muertas/Total)	% Mortalidad + DE	% Mortalidad ajustada**	PLR (Muertas/Total)	% Mortalidad + DE	% Mortalidad ajustada **
	<b>Controles Sin Inductor de la Morfogénesis</b>			<b>Controles Con Inductor de la Morfogénesis</b>		
<b>Agua</b>	0/102.4	0	0	0	0	
<b>Ivermectina</b>	102.6/102.6	100a	100	100	100	
<b>Cz-Dox</b>	16.4/103.3	15.38 ± 11.89h	15.3 <sup>(1)</sup>	58.38/105.08	55.56 ± 33.48cdef	47.5 <sup>(2)</sup>
<b>CPD</b>	42.97/101.19	42.47 ± 23.4defg	42.4 <sup>(1)</sup>	37.05/98.86	38.36 ± 18.74efg	(-) <sup>(3)</sup>
	<b>Tratamientos sin Inductor</b>			<b>Tratamientos con Inductor</b>		
<b>A. oligospora Cz-Dox</b>	24.75/104.25	23.59 ± 11.3gh	8.2 <sup>(2)</sup>	94.13/110.19	85.30 ± 19.8ab	69.9 <sup>(2)</sup>
<b>A. oligospora CPD</b>	70.66/102.30	69.57 ± 21.3bc	27.1 <sup>(3)</sup>	82.41/100.91	82.15 ± 27.43ab	39.6 <sup>(3)</sup>
<b>A. musiformis Cz-Dox</b>	42.02/102.69	41.23 ± 24.5defg	25.85 <sup>(2)</sup>	89.11/103.47	82.24 ± 21.83ab	66.8 <sup>(2)</sup>
<b>A. musiformis CPD</b>	39.16/101.83	39.60 ± 24.5efg	0 <sup>(3)</sup>	67.19/102.13	65.91 ± 31.53bc	23.44 <sup>(3)</sup>
<b>D. flagrans Cz-Dox</b>	36/104.25	34.745 ± 15.71fgh	19.3 <sup>(2)</sup>	99.19/103.47	95.95 ± 6.42a	80.57 <sup>(2)</sup>
<b>D. flagrans CPD</b>	84.88/126.19	60.67 ± 32.9cd	18.2 <sup>(3)</sup>	35.05/98.41	36.96 ± 17.87fg	0 <sup>(3)</sup>
<b>C. rosea Cz-Dox</b>	30.13/103.36	29.32 ± 8.7hg	13.5 <sup>(2)</sup>	60.80/106.25	58.16 ± 27.61cde	42.78 <sup>(2)</sup>
<b>C. rosea CPD</b>	56.41/103.80	54.65 ± 29.8cdef	12.2 <sup>(3)</sup>	25.08/104.88	23.94 ± 14.09hg	0 <sup>(3)</sup>

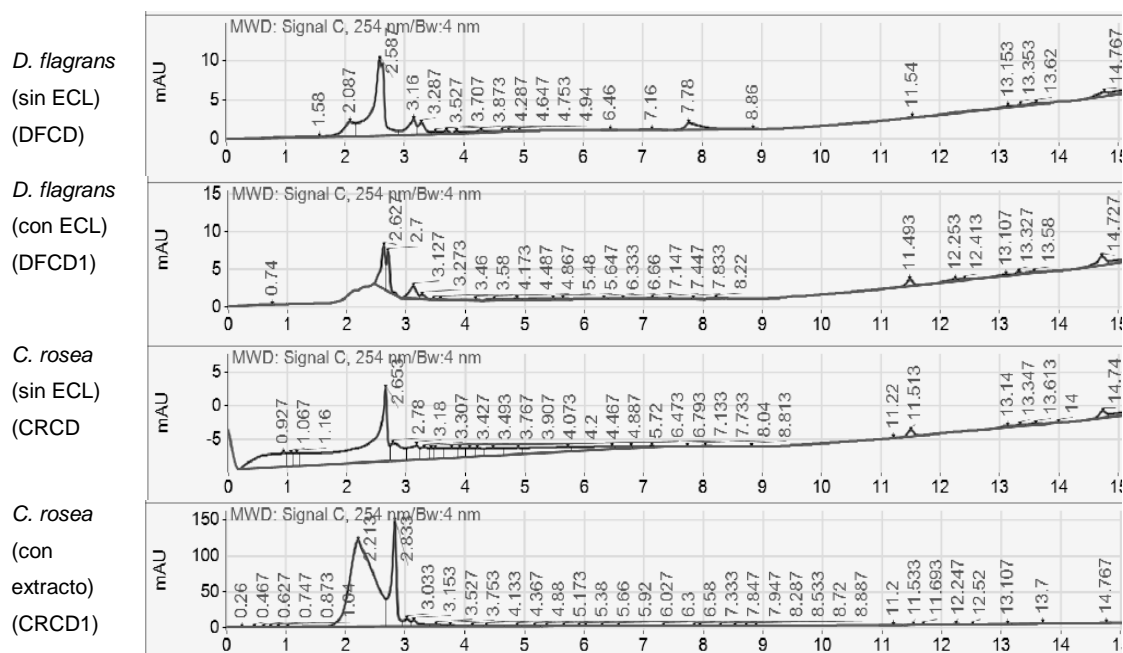
\*Los datos se ponderaron con respecto a la actividad larvicida de los controles negativos; <sup>a</sup> n = 4 pozos.

\*\*% Mortalidad ajustada con base en la mortalidad en sus controles correspondientes\* PLR: Proporción de Larvas Recuperadas <sup>(1)</sup> = Ponderación estimada con respecto al grupo control agua; ECL = Extracto Crudo de Larvas de *H. contortus* como inductor de la morfogénesis. <sup>(2)</sup> = Ponderación estimada con respecto al grupo control Czapek-dox (Sin ECL). <sup>(3)</sup> = Ponderación estimada con respecto al grupo control CPD (Sin ECL). (-) = Se obtuvieron valores superiores de mortalidad en el control CPD con Inductor.

### 2.14.4 Cromatografía líquida de alta resolución

Los resultados del análisis de cromatografía líquida de alta resolución de los filtrados liofilizados no mostraron la presencia de metabolitos secundarios, lo cual se atribuyó a la concentración muy baja en los mismos. Por lo anterior se realizó la extracción orgánica de todos los extractos con acetonitrilo, un disolvente de polaridad media-alta, y los extractos de acetonitrilo resultantes se analizaron por HPLC (Figura 17 y Anexo 3A-J). Los cromatogramas mostraron componentes entre los 2 a 4 min de tiempo de retención ( $t_R$ ) a 254 nm, que sugiere la presencia de metabolitos de mediana a alta polaridad observados en los blancos también ( $t_R = 2.5$  y  $2.6$  min).





**Figura 17.** Cromatogramas de líquidos de las fracciones de los filtrados de hongos nematofagos a 254 nm, en una columna C18.

## DISCUSIÓN

El presente estudio es el primer intento a nivel mundial por obtener filtrados y extractos de hongos nematófagos, adicionados con un posible inductor de la morfogénesis, con la finalidad de obtener un efecto elicitor de compuestos con actividad nematocida *in vitro* en contra de un nemátodo parásito de importancia pecuaria. Los rendimientos de los extractos etanólicos, obtenidos a partir de los distintos HN evaluados fueron aceptables, en general, ya que a partir de 200 g de arroz fermentado se obtuvo un rendimiento mínimo de 2.3% en *D. flagrans* y un máximo de 12.9% en *A. musiformis*. Noshad *et al.* (2015) reportan rendimientos de 0.31%, 0.25% y 0.24% en cuerpos frutales, micelio y filtrados fermentados, respectivamente, en los extractos orgánicos y filtrado, obtenidos de *P. ostreatus*. Existen reportes en donde se indica que el medio Cz-Dox, al ser suplementado con extracto de levadura, alcanzó un mayor rendimiento, al obtener mejor crecimiento de las especies estudiadas. También, los extractos de filtrados que se obtuvieron presentaron un mejor rendimiento. Además, los extractos de los filtrados presentaron mayor actividad antioxidante (Reyes-Estebanez, 2009).

Se utilizaron como blancos los medios de cultivo Cz-Dox y CPD, además del agua. Al utilizar estos medios como control de comparación, se esperaba que no hubiese ningún efecto letal en la población de larvas del nemátodo bajo estudio; no obstante, solamente en el agua no se encontró ninguna actividad nematocida, pues en el medio Cz-Dox al igual que en CPD se observó mortalidad larval. A este respecto, cabe mencionar que el medio CPD se elaboró de manera casera utilizando papa adquirida de manera comercial. Existen reportes donde se han encontrado en la papa compuestos fenólicos, saponinas, flavonoides (Ramírez y Suárez, 2014), además de polifenoles y carotenoides (Peña y Restrepo, 2013) y, particularmente, las saponinas, polifenoles y flavonoides han sido reportados con actividad nematocida (Azmir *et al.*, 2013). Muy importante es mencionar que el 100% de las larvas tratadas con el agua no sufrieron ningún cambio en su comportamiento y se mantuvieron en movimiento constante. Esto fortalece la hipótesis de que los compuestos presentes en el medio CPD ejercieron actividad nematocida sobre las larvas del nemátodo bajo estudio, lo que obligó a llevar a cabo los ajustes necesarios para eliminar el efecto del medio en la mortalidad de los nemátodos.

Por otra parte, los resultados preliminares de la mortalidad de extractos etanólicos de *C. rosea* (TZH-27), *A. oligospora* (AO-CENID-1) y *A. musiformis* (AM-CENID-1), producidos en arroz fermentado, mostraron actividades importantes de mortalidad. Sin embargo, al intentar reproducir y corroborar estos resultados en las pruebas posteriores, desafortunadamente, no se obtuvo ninguna actividad importante. A este respecto no se tiene una explicación categórica de porqué el efecto nematicida disminuyó, esto pudo haberse debido a que en la prueba confirmatoria se utilizaron los mismos extractos originales que habían sido utilizados en las pruebas preliminares y probablemente en éstos, durante el periodo de almacenamiento de seis meses, pudieron haberse degradado los metabolitos activos y, por lo tanto, se eliminó su efecto nematicida.

Asimismo, los compuestos identificados en las fracciones de los extractos orgánicos obtenidos de los HN en medio arroz fermentado fueron: ácido palmítico, ácido oleico (ácidos grasos insaturados), ésteres como son el palmitato de etilo, oleato de etilo, linoleato de etilo y estereato de etilo, que son compuestos que por vías metabólicas biosintetizan los hongos (Chan *et al.*, 2009; Schnürer *et al.*, 1999). La presencia de estos compuestos coincide con los reportados en trabajos donde se estudió la influencia de los medios de cultivo en la producción de metabolitos secundarios (Chegwin y Nieto, 2013).

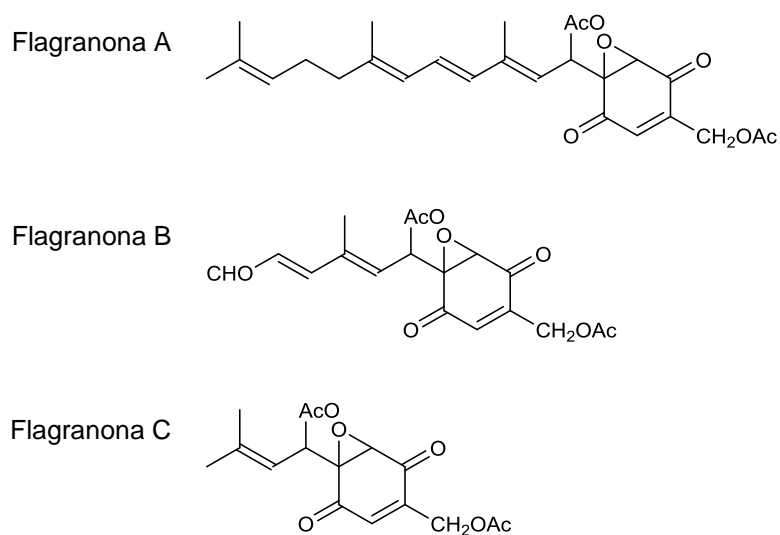
Es importante aclarar que preparar nuevamente estos ensayos lleva mucho tiempo, pues para obtener una importante biomasa fungal, los hongos son cultivados en PDA durante 7 días, seguido de su inoculación en medio de AF, donde permanecen en cultivo otros 40 días, para posteriormente llevar a cabo el proceso de maceración con etanol. Por tal motivo, se tomó la decisión de trabajar con filtrados cuyo proceso lleva mucho menos tiempo, además que para cultivos masivos se reporta el uso de medios de cultivos líquidos, como el Cz-Dox (Carvalho *et al.*, 2018; Gamboa-Angulo *et al.*, 2016; Mascarin *et al.*, 2015).

Los resultados de la evaluación de la mortalidad de los filtrados de los hongos seleccionados en contra de larvas infectantes de *H. contortus* indican que los distintos hongos presentan un comportamiento nematicida muy diferente, dependiendo de las condiciones en donde sean cultivados. Además, los hongos responden de manera diferente cuando se encuentran en presencia o ausencia de componentes presentes en



las larvas de *H. contortus*, considerados como inductores de la morfogénesis, la cual es inducida por sustancias que secretan los nemátodos (Pramer y Stoll, 1959).

En la presente contribución, la actividad nematocida del filtrado de *D. flagrans* fue la más efectiva en el medio Cz-Dox enriquecido con el ECL. Es importante destacar que las clamidosporas de este hongo tienen la capacidad de pasar a través del tracto gastrointestinal de los animales domésticos (Silva *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2013). Reportes previos indican que este HN produce enzimas como quitinasas y proteasas (Braga *et al.*, 2015). En cuanto a su actividad estos compuestos degradan péptidos, proteínas, almidón, pectina, lipasas y lecitina, también se reporta la producción de fosfolipasa C (Meyer y Wiebe, 2003). De igual forma, la producción de antibióticos por parte de *D. flagrans* identificados como flagranona A, B y C (Figura 18) (Anderson *et al.*, 1999).



**Figura 18.** Estructuras de las flagranonas A, B y C aisladas de *Duddingtonia flagrans*.

El HN *D. flagrans* en CPD con o sin presencia del inductor mostró valores muy bajos de mortalidad larval, el cual se incrementa notoriamente en el medio Cz-Dox. La literatura indica que los hongos atrapadores de nemátodos evolucionan en respuesta a ambientes ricos en carbohidratos, pero pobres en nitrógeno (Barron, 2003), tal como se observó en el medio Cz-Dox. En el Cuadro 12 se muestran los componentes nutricionales que ofrecen los medios de cultivo Cz-Dox y CPD.

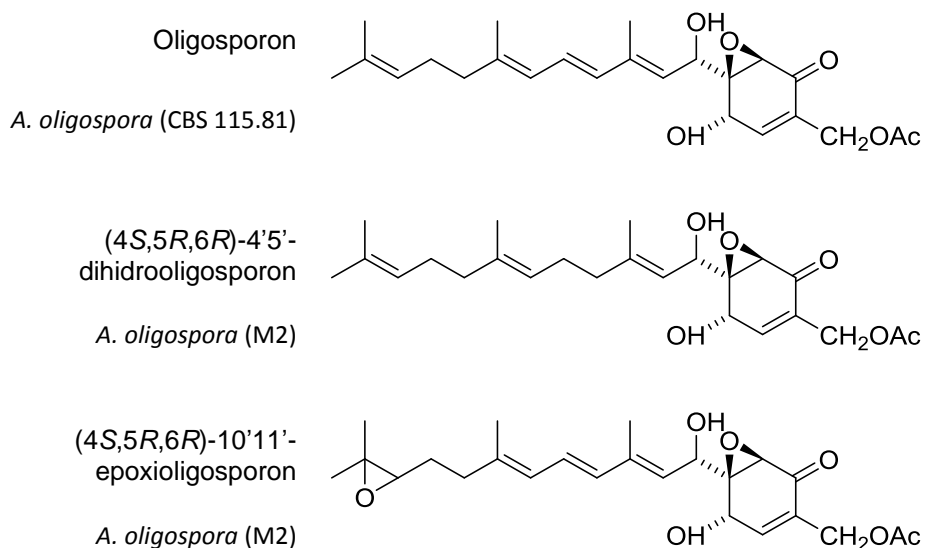
**Cuadro 12.** Componentes nutricionales de los medios de cultivo Czapek Dox y caldo de papa-dextrosa.

<b>Medios de cultivo líquido (Método casero)</b>			
	Compuestos	g/L	Fundamento
<b>Czapek dox</b>	Sacarosa	30.000	Fuente de carbono
	Nitrato de sodio	2.000	Fuente de nitrógeno (inorgánico)
	Fosfato bipotásico	1.000	Sustancia reguladora de la osmolaridad
	Sulfato de magnesio	0.500	Aportan minerales esenciales para el crecimiento de los microorganismos
	Cloruro de potasio	0.500	
	Sulfato ferroso	0.010	
<b>Caldo papa dextrosa</b>	Papas enteras maduras	500.00	Rica en nutrientes
	Dextrosa	20.00	Fuente de energía
	Agua destilada		

Teniendo en cuenta que la composición del sustrato es de vital importancia para el cultivo de los HN, realizar los cultivos por procesos fermentativos en estado líquido es considerado muy útil por su facilidad de controlar variables como rendimientos de biomasa obtenida, tanto del micelio como en los filtrados (Gregori *et al.*, 2007).

En cuanto al HN *A. musiformis*, su resistencia a condiciones adversas y su acción contra los NGI (Graminha *et al.*, 2005) lo ha hecho tema de estudio, pero la información que se tiene sobre la producción de productos extracelulares es escasa. Actualmente, se han identificado algunos productos extracelulares con actividad, siendo las proteasas las involucradas en el daño larval (Acevedo-Ramírez *et al.*, 2015).

Por otra parte, el HN *A. oligospora* ha sido ampliamente estudiado como organismo modelo para entender la interacción entre hongos y nemátodos (Niu y Zhang, 2011). Es importante destacar que de este género y especie se han identificado importantes metabolitos, los cuales incluyen los aceites oligosporon, oligosporol A y oligosporol B (Figura 19) (Stadler y Anke, 1994). (4*S*,5*R*,6*R*)-4',5'-dihidrooligosporon, (4*S*,5*R*,6*R*)-hidroxiloligosporon y (4*S*,5*R*,6*R*)-10'11'-epoxioligosporon (Anderson *et al.*, 1995).



**Figura 19.** Estructura química de metabolitos identificados de *A. oligospora*.

En cuanto a *C. rosea*, en el presente estudio, mostró actividades menores al 40% contra *H. contortus* L<sub>3</sub>. En otros estudios se ha reportado que tiene propiedades insecticidas (Ruiz-Jiménez *et al.*, 2017) y nematocidas contra *Meloidogyne incognita* (Díaz-Braga, 2009), *Caenorhabditis elegans* y *Panagrellus redivivus*; con una DE<sub>50</sub> de 10 y 40 µg/mL. El hongo *C. rosea* ha mostrado actividad de depredación *in vitro* contra *H. contortus* en medio PDA (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2018), así, a un extracto de acetona de *Clonostachys* se le evaluó su actividad nematocida contra *H. contortus*. Sin embargo, en la literatura no se menciona alguna actividad de compuestos obtenidos a partir de filtrados contra *H. contortus*. Los metabolitos reportados de *C. rosea* son de tipo verticilina, los cuales han sido aislados a partir de cultivos fermentados de trigo y han sido nombrados como gliocladina A, B, C, D y E (Dong *et al.*, 2005). La actividad mostrada de los filtrados de *C. rosea* en CPD y Cz-Dox, con y sin inductor ECL, contrasta con otros estudios, y esto puede deberse a la pérdida de la actividad del hongo. En general, los compuestos bioactivos se producen en estado de estrés por escases de alimento, por competencia del organismo en su entorno, su medio de cultivo o bien por factores abióticos (Díaz-Braga, 2012). En este sentido, la pérdida de la actividad en estos filtrados puede deberse a algunos de estos factores, los cuales podrían estar interviniendo en la producción de

metabolitos con actividad nematocida. En cuanto a la información que se tiene de algunas cepas de *C. rosea*, se ha encontrado que son eficaces contra varias enfermedades de los cultivos agrícolas; además, hay compuestos patentados como bioestimulantes y/o agentes de biocontrol contra enfermedades fúngicas foliares (Stewart y Brown, 2006). También se debe de considerar que cada cepa mantiene actividades diferentes dependiendo del ecosistema donde fue aislado; para diferenciar y mantener el rastreo del hongo se han diseñado marcadores de reacción en cadena de polimerasa para discriminar cepas relacionadas (Demissie, 2019).

La actividad nematocida de los componentes vertidos en sus filtrados es probablemente debida a las condiciones químicas y biológicas presentes en el entorno, ya que los hongos pueden ser afectados en su forma de crecimiento, al ser expuestos a diferentes condiciones de estrés, ya sea nutricional o ambiental (Tortora *et al.*, 2007).

En las últimas décadas, el estudio de los HN ha ido más allá y se ha puesto mucha atención en el estudio de los productos metabólicos de estos hongos y sus actividades biológicas. Sin embargo, la literatura continua escasa en estudios que evalúen la actividad nematocida de los compuestos biosintetizados por los HN obtenidos a partir de medios de cultivo líquido. También es insuficiente la información sobre diversos aspectos biológicos, tales como las proteínas y genes involucrados en la formación de trampas (Yang, 2011), pero sobre todo se desconoce cuáles metabolitos se encuentran presentes al cultivar estos hongos con diferentes medios de cultivo, al cambiar sus condiciones de desarrollo generando un estrés biótico y abiótico.

En nuestro estudio utilizamos un macerado de larvas infectantes de *H. contortus* como un elicitador potencial de compuestos nematocidas por los hongos cultivados en los distintos medios y los resultados apuntan a que, efectivamente, la presencia de este macerado de larvas de nemátodos actuó como un agente promotor de la producción de compuestos con actividad nematocida *in vitro*. Las cepas de los hongos nematófagos *A. oligospora*, *A. musiformis*, *D. flagrans* y *C. rosea* utilizados en el presente estudio al ser cultivadas en el medio Czapek Dox enriquecido con el inductor respondieron produciendo compuestos nematocidas. Esto se observa en los cromatogramas de líquidos obtenidos y comparados con los respectivos blancos del ECL. En ellos se observan componentes entre los 2 a 4 min de tiempo de retención ( $t_R$ ) a 254 nm, que sugieren la presencia de metabolitos de

mediana a alta polaridad, algunos de ellos observados en los blancos también ( $t_R = 2.5$  y  $2.6$  min). Las diferencias más notables se detectaron en los extractos activos enriquecidos con el ECL de *A. oligospora* en los componentes a  $3.13$  y  $3.26$  min; en *A. musiformis* con el pico mayoritario a  $2.74$  min; finalmente, en *D. flagrans* con los picos a  $2.62$ ,  $2.7$  y  $3.12$  min. Aun cuando no se conoce la naturaleza de estos componentes, se reconoce la producción de metabolitos secundarios, dada la polaridad de la fase estacionaria (C18).

Los filtrados de los HN con actividad nematocida *in vitro* deberán ser analizados mediante técnicas cromatográficas como HPLC acoplado a espectrometría de masas y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, con la finalidad de identificar el o los compuestos bioactivos producidos por los hongos. La producción de compuestos por hongos nematófagos puede ser obtenida a través de su producción en medios líquidos, como lo que se llevó a cabo en este estudio. Los procesos biofermentativos utilizando biorreactores pueden ser una herramienta para producir compuestos a partir de cambios en diversos factores abióticos como temperatura, velocidad de agitación, fotoperíodo, etc., y otra herramienta puede ser la exploración de otros medios de cultivo y/o inductores que permitan obtener en mayor cantidad los compuestos; esto dejará llevar a cabo bioevaluaciones en animales parasitados a nivel de unidades productoras de ovinos, caprinos e inclusive en bovinos, para demostrar la utilidad de esta nueva tecnología del uso de filtrados de hongos nematófagos, mejorando la salud de los animales y para beneficio de los productores.



## CAPÍTULO III

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 3.1 CONCLUSIONES

Los hongos son organismos notables, los cuales tienen un papel prometedor desde el punto de vista antropocéntrico, ya que son de gran interés en el área farmacéutica, agropecuaria y de alimentos. Debido a la amplia gama de propiedades y los metabolitos que producen, los HN son buenos candidatos para su producción a gran escala, ya que son resistentes a la presión de flujo, agitación y otras condiciones de cultivo en biorreactores.

Mediante la utilización de un medio simple, como el caldo papa dextrosa, los filtrados de los hongos evaluados presentaron actividad nematocida muy baja.

Al utilizar el medio Czapek Dox, los filtrados de *A. oligospora*, *A. musiformis*, *D. flagrans* y *C. rosea* alcanzaron actividad nematocida inferiores en comparación con los filtrados con extracto crudo de larvas de *H. contortus*.

El medio Czapek Dox enriquecido con el extracto crudo de larvas de *H. contortus*, como inductor de la morfogénesis, potencializó la actividad nematocida en el 75% de los filtrados, siendo más efectivo el de *D. flagrans* con 80.57% de mortalidad.

La capacidad del HN *D. flagrans* de producir diversos metabolitos con mayor efecto nematocida, hacen de este hongo un recurso biotecnológico sumamente importante, siendo el más promisorio en el presente estudio para controlar las larvas de *H. contortus*.

La fermentación de los hongos en estado líquido permite la obtención de altos niveles de metabolitos en contraste con los medios en estado sólido; su eficiencia se puede optimizar mediante la adición de inductores al medio de cultivo.

Los productos extracelulares biosintetizados dependerán del sustrato en que se encuentren los hongos nematófagos.

Los filtrados que tuvieron mayor actividad nematicida a nivel *in vitro* biosintetizan metabolitos secundarios de alta y mediana polaridad detectados en sus cromatogramas de líquidos.

### **3.2 PERSPECTIVAS**

Realizar estudios más amplios en diferentes condiciones de cultivo de los HN (medio, fotoperiodo, temperatura, agitación/estático, etc.) para potenciar el efecto nematicida con la presencia de inductores.

Obtener los componentes mayoritarios en los diferentes filtrados e identificar la naturaleza de los principios activos, para descubrir si son proteínas, enzimas o metabolitos secundarios.

De acuerdo con los resultados de actividad nematicida obtenidos, los filtrados de los HN son altamente valorados para evaluar su potencial a nivel *in vivo*.

Los filtrados de hongos nematófagos que presentaron potencial nematicida pueden ser probados en posteriores investigaciones como una alternativa para la prevención y control de las parasitosis de pequeños rumiantes a nivel de campo.



## REFERENCIAS

- Acevedo-Ramírez, P.M.C., J.A. Figueroa-Castillo, R. Ulloa-Arvizú, L.G. Martínez-García, A. Guevara-Flores, J. L. Rendón, R.O. Valero-Coss, P. Mendoza-de Gives y H. Quiroz-Romero (2015). Proteolytic activity of extracellular products from *Arthrobotrys musiformis* and their effect *in vitro* against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Veterinary Record Open*, 2: 1-6.
- Adrio, J.L. y A.L Demain (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 6: 191-199.
- Aguilar-Marcelino, L., P. Mendoza-de-Gives, G. Torres-Hernández M.E. López-Arellano, C.M. Becerril-Pérez, A. Orihuela-Trujillo, J.F.J. Torres-Acosta y A. Olmedo-Juárez (2016). Consumption of nutritional pellets with *Duddingtonia flagrans* fungal chlamydospores reduces infective nematode larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of Saint Croix lambs. *Journal of Helminthology*, 91: 665–671.
- Alfaro, I., P. Mendoza-de-Gives, E. Liébanos, M. Eugenia, R. Valero y V. Hernández (2011). Nematophagous fungi (Orbiliiales) capturing, destroying and feeding on the histotrophic larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Revista Mexicana de Micología*, 33: 29-35.
- Anderson, M.G., R.W. Rickards y E. Lacey (1999). Structures of flagranones A, B and C, cyclohexenoxide antibiotics from the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *The Journal of Antibiotics*, 52: 1023-1028.
- Anderson, M.G., T.B. Jarmin y R.W. Rickards (1995). Structures and absolute configurations of antibiotics of the oligosporon group from the nematotrapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *The Journal Antibiotics*, 48: 391–398.
- Anziani, O.S y C.A. Fiel (2015). Resistencia a los antihelmínticos en nemátodos que parasitan a los rumiantes en la Argentina. *Revistas de Investigaciones Agropecuarias*, 41: 125-135.

- Araújo, J.V., M.A. Mota, A.K. Campos (2004). Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13: 165-169.
- Arroyo-Balán, L.F., P. Mendoza de Gives, M.E. López Arellano, E. Liébano-Hernández, V.M. Vázquez Prats, E. Miranda-Miranda y N.A.M. Ortiz-de-Montellano (2008). Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina bajo condiciones controladas. *Técnica Pecuaria en México*, 46: 217-223.
- Arias, M.S., J. Suárez, C.F. Cazupal-Monteiro, I. Francisco, M.E. Lopez-Arellano, P. Piñeiro, J.L. Suarez, R. Sánchez-Andrade, P. Mendoza-de-Gives y A. Paz-Silva (2013). Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys (Duddingtonia) flagrans*. *Fungal Biology*, 1178: 540-544.
- Azmir J., I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H,A, Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini y A.K.M. Omar (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117: 426-436.
- Balan, J. y H.A. Lechevalier (1972). The Predaceous Fungus *Arthrobotrys dactyloides*: Induction of Trap Formation. *Mycologia*, 64: 919-922.
- Barrios-González, J., J. Baños, A. Covarruvias y A. Garay-Arroyo (2008). Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid state and in liquid submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 179-186.
- Barron, G.L (2003). Hongos depredadores, descomposición de la madera y el ciclo del carbono. *Biogeosciences*, 4: 3-9.
- Barron, G.L (1992). Lignolytic and cellulolytic fungi as predators and parasites. In G. C. Carroll & D. T. Wicklow (Eds.). *The fungal community, its organization and role in the ecosystems*. New York: Marcel Dekker.
- Barron, G.L (1977). The nematode-destroying fungi. *Canadian Biological Publications*, Guelph. pp. 140.

- Blaxter, M.L. y W.M. Robertson (1998). La cutícula. En RN Perry y DJ Wright (Eds.), La fisiología y bioquímica de los nemátodos parasitarios y de vida libre. Wallingford, Oxon. pp. 25-48.
- Bradford, M (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Braga F.R., S.F.E. Freitas T.Z. Giuberti L.A.C. Garcias, T. Larcerda A.T. De-Hollandia, V.P. Queiroz, De-S.A., Gouveia, L. Pinheiro A.L. Araujo, J.H. Queiroz y J.V. Araujo (2015). Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Veterinary Parasitology*, 212: 214-218.
- Braga F.R. y J.V. Araujo (2014). Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 71-82.
- Bogús, M.I., M. Czygier, E. Kddra y J. Samborski (2005). Evaluación *in vitro* de la influencia de la nutrición y la temperatura en las tasas de crecimiento de cinco aislados de *Duddingtonia flagrans*, sus propiedades insecticidas y su capacidad para alterar la motilidad *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasitología Experimental*, 109: 115-123.
- Bulman, M.G (2012). Pérdidas económicas directas e indirectas por parásitos internos y externos de los animales domésticos en Argentina. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. TOMO LXVI. Buenos Aires. Argentina. ISSN 0327-8093. pp. 76- 176.
- Bucar, F., A. Wube y Schmid, M (2013). Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Natural Product Reports*, 30: 525-545.
- Caicedo Rivas, R.E (2019). En busca de una raza de ovinos libre de parásitos. Agencia Informativa Conacyt. [Online] (Actualizado 22 de enero 2019). Disponible en:

- 
- <http://www.cienciamx.com/index.php/ciencia/salud/23342-raza-ovinos-libre-parasitos> [Acceso 18 abril 2019].
- Calvo, M.A., R.A., Wilson, J.W., Bok y N.P. Keller (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 447-459.
- Carvalho, A.L.A., L.C. Rezende, L.B. Costa, B.A. Halfeld-Vieria y Z.V. Pinto (2018). Optimizing the mass production of *Clonostachys rosea* by- Liquid-state fermentation. *Biological Control*, 118: 16-25.
- Casillas-Aguilar, J.A., P. Mendoza de Gives, M.E. López Arellano y E. Liébano Hernández (2008). Evaluation of multi-nutritional bio-pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine haemonchosis. *Annals of the New York Academy of Science*, 1149: 161-163.
- Cayrol, J.C., Djian, C. y L. Pijarowski (1989). Study of nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagus fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Revue Nematology*, 12: 331-336.
- Chauhan, J.B., P.K. Sanyal y R.B Subramanian (2005). The nematode-trapping efficacy of two chlamydospore-forming fungi against *Haemonchus contortus* in sheep. *Journal of Helminthology*, 79: 315-319.
- Chan, Y.A.; A.M. Podevels, B.M. Kevany y M.G. Thomas (2009). Biosynthesis of polyketide synthase extender units. *Natural Product Reports*, 26: 90-114.
- Chegwin A.C y R.I.J. Nieto (2013). Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando cereales como fuente de carbono. *Revista Mexicana de Micología*, 37: 1-9.
- Cruz, D.G., C.P. Silva, C.N.B. Carneiro, C.A. Retamal, J.T.L. Thiébaud, R.A. DaMatta y C.P. Santos (2009). Acid phosphatase activity during the interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* with the nematode *Panagrellus* sp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102: 238-244.

- Cuadra, T., F.J. Fernández, A. Tomasini y J. Barrios-González (2008). Influence of pH regulation and nutrient content on cephalosporin C in solid-state fermentation by *Acremonium chrysogenum* C10. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 216-220.
- Demissie, Z.A., W.G. Brown y M.C. Loewen (2019). A Universally Primed-Polymerase Chain Reaction (UP-PCR) Marker to Discriminate *Clonostachys rosea* ACM941 from Related Strains. *Journal of Fungi*, 5: 1-11.
- Dhingra, O.D. y J.B. Sinclair (1995). *Basic plant pathology methods*. 2 ed. Boca Raton. Florida. CRC Press. Inc.
- Díaz-Braga, A.J (2012). Evaluación de extractos fúngicos contra *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood y establecimiento de bioensayos de inocuidad. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. pp. 53.
- Díaz-Braga A.J (2009). Uso de *Clonostachys rosea* Samuels, Seifert & Gams para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, en condiciones protegidas. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal. México. pp. 67.
- Dibarrat, A.J. y J.R. Montes de Oca (2012). Epidemiología de las enfermedades de los ovinos en México. Centro de Investigación y estudios avanzados en Salud Animal. FMVZ. UAEM, 21: 05-09.
- Dong, J.Y., H.P. He, Y.M. Shen y K.Q. Zhang (2005). Nematicidal epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*. *Journal Natural Products*, 68: 1510-1513.
- Ertola, R., C. Mignone, P. Yantorno (1994). *Microbiología Industrial*. Washington (Estados Unidos de América). pp.104.
- Esteban-Andrés, D., R. González-Garduño, G. Garduza-Arias, N.J. Ojeda-Robertos, F. Reyes-Montes y S. Gutiérrez-Cruz (2013). Desarrollo de resistencia a nemátodos gastrointestinales en ovinos de pelo desafiados con diferentes niveles de infección. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 60: 169-181.

- 
- FAO (2012). Interventions against intestinal nematodes: Nutritional and chemotherapeutic solutions. Technologies and practices for small agricultural producers. Disponible en: <http://teca.fao.org/read/4461>
- Fernández, A.S., M. Larsen, P. Nansen, J. Grønvold, S.A. Henriksen, H. Bjørn y J. Wolstrup (1999). The efficacy of two isolates of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Dictyocaulus viviparus* larvae in faeces. *Veterinary Parasitology*, 85: 289–304.
- Floate, K.D (1998). Off-target effects of ivermectin on insects and on dung degradation in southern Alberta, Canada. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 25-35.
- Frisvad, J.C., U. Thrane, O. Filtenborg (1998). Role and use of secondary metabolites in fungal taxonomy. In *Chemical Fungal Taxonomy*. New York: Marcel Dekker. pp. 289-319.
- Galindo-Barboza, A.J., A.J. Aguilar-Caballero R. Cámara-Sarmiento, C.A. Sandoval Castro, N.F. Ojeda-Robertos, R. Reyes Ramírez, E. España-España y J.F.J. Torres-Acosta (2011). Persistence of the efficacy of copper oxide wire particles against *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 176: 261-267.
- Gamboa-Angulo, M.J., Moreno-Escobar E. Herrera-Parra, J. Pérez-Cruz, J. Cristóbal Alejo y G. Heredia-Abarca (2016). *In vitro* toxicity of tropical Mexican micromycetes on infective juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34: 100-109.
- Gamboa-Angulo, M., S.C. De la Rosa-García, G. Heredia-Abarca, I. L. y Medina-Baizabal (2012). Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatan peninsula, Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 2305-2312.
- Gamboa-Angulo, M. y S.G. De la Rosa (2008). Potencial biológico y creatividad química de los hongos microscópicos del trópico americano, in *Tópicos sobre diversidad, ecología y usos de los hongos microscópicos en Iberoamérica*. Programa

- Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED) e Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Ver. México. pp. 253-272.
- Gan, Z., J. Yang, N. Tao, Z. Yu y K.-Q. Zhang (2007). Cloning and expression analysis of a chitinase gene Crchi1 from the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*). *The Journal of Microbiology*, 45: 422-430.
- Gaugler, R (2004). *Nematode Behavior*. A Bilgrami, Universidad de Rutgers, EE. UU. CAB Publishing. Wallingfors. pp. 219.
- Gómez, L., G. Baró, L. Sánchez y M. Rodríguez (2003). Identification and characterization of Cuban isolates of nematode-trapping fungi. *Revista de Protección Vegetal*, 18: 53-57.
- González-Garduño, R., P. Mendoza, J.F.J. Torres-Acosta, C. Becerril, E. Ortega y O. Hernández (2005). Estudio *in vitro* de la capacidad depredadora de *Duddingtonia flagrans* contra larvas de nemátodos gastrointestinales de ovinos de pelo. *Técnica Pecuaria en México*, 43: 405-514.
- González-Garduño, R., H.G. Torres, A.M.E. López y P. Mendoza-de-Gives (2012). Resistencia antihelmíntica de nemátodos parásitos en ovinos. *Revista de Geografía Agrícola*, (48-49): 63-74.
- Graminha E., A. Costa G. Oliveira A. Monteiro y S. Palmeira (2005). Biological control os sheep parasite nematodes by nematode-trapping fungi: *in vitro* activity and after passage through the gastrointestinal tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 717-722.
- Gray, N.F (1983). Ecology of nematophagous fungi: distribution and habitat. *Annals of Applied Biology*, 102: 501-509.
- Gregori, A., M. Svagelj y J. Pohleven (2007). Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, 45: 238-249.

- Guilleard, J (2012). *Haemonchus contortus*. Wellcome Trust Sanger Institute. Citado en: <http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/helminths/haemonchus-contortus.html>
- Haard, K (1968). Taxonomic Studies on the Genus *Arthrotrys* Corda. *Mycologia*, 60: 1140-1159.
- Holden-Dye, L. y R.J. Walker (2014). Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *The Online Review of C. elegans Biology*, 1-29.
- Höller, U., A.D. Wright, G.F. Mattheé, G.M. König, S. Draeger, H.J. Aust, B. Schulz (2000). Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*, 104: 1354-1365.
- Hoste, H.H., S. Sotiraki y J.F.J Torres-Acosta (2011). Control of endoparasitic nematode infections in goats. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*, 27: 163–173.
- Hoste, H., N.B. Chilton, R.B. Gasser y I. Beveridge (1995). Differences in the second international transcribed spacer (Ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *International Journal for Parasitology*, 25: 75-80.
- Huang, X.W., NH. Zhao y K.Q. Zhang (2004). Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Research Microbiology*, 155: 811–816.
- Huby, F., H. Hoste, S. Mallet, S. Fournel y J.L. Nano (1999). Effects of the excretory/secretory products of *Trichostrongylus colubriformis* on the growth of different cell lines. *International Journal for Parasitology*, 29: 697-702.
- Irum, S., H. Ahmed, M. Mukhtar, M. Mushtaq, B. Mirza, K. Donskow-Lysoniewska, M. Qayyum y S. Simsek (2015). Anthelmintic activity of *Artemisia vestita* Wall ex DC. and *Artemisia maritime* L. against *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Parasitology*, 212: 451-455.



- Jabbar, A., Z. Iqbal, D. Kerboeuf, G. Muhammad, N.K. Muhammad y M. Afaq (2006). Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sciences*, 79: 2413-2431.
- Jackson, F. y J. Miller (2006). Alternative approaches to control - Quo vadit? *Veterinary Parasitology*, 139: 371-384.
- Jaffee, B.A. y D.R. Fuerte (2005). Strong bottom-up and weak top-down effects in soil: nematode-parasitized insects and nematode-trapping fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1011-1021.
- Jansson, H.B (1994). Adhesion of Conidia of *Drechmeria coniospora* to *Caenorhabditis elegans* Wild Type and Mutants. *Journal of Nematology*, 26: 430-435.
- Jong, S.C. y J.M. Birminham (2001). Cultivation and preservation on fungi in culture. In: *The Mycota Systematics and evolution VII*, Mclaughin, D.J., E.G. Mclaughim and Lemke, P.A. (Eds). Springer-Verlag. Berin, Heidelberg. pp. 193-202.
- Kerry, B.R (2000). Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 38: 423-441.
- Ketzis, J.K., J. Vercruysee, B.E. Stromberg, M. Larsen, S. Athanasiadou y J.G. Houdijk (2006). Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. *Veterinary Parasitology*, 139: 321-325.
- Köhler, P (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, 31: 336-345.
- Larsen, M (1999). Biological control of helminths. *International Journal for Parasitology*, 29: 139-146.
- Larsen, M. (2000). Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*, 120: 121-131.

- Li, J., J. Yang, X. Huang y K.Q. Zhang (2006). Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process in Biochemistry*, 41: 925-929.
- Liang, L., H. Wu, Z. Liu, R. Shen, H. Gao, J. Yang y K. Zhang (2013). Proteomic and transcriptional analyses of *Arthrobotrys oligospora* cell wall related proteins reveal complexity of fungal virulence against nematodes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 8683-8692.
- Liébano, H. E., A.M.E. López, P. Mendoza-de-Gives y M.L. Aguilar (2011). Manual de diagnóstico para identificación de larvas de nemátodos gastrointestinales en rumiantes. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, 2: 2-3.
- Liébano, H.E (2004). Identificación de larvas infectantes de nemátodos gastroentéricos y pulmonares en rumiantes domésticos de México. In: Diagnóstico y Control de los Nemátodos Gastrointestinales de los Rumiantes en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET). Jiutepec, Morelos, México. pp. 26–67.
- Liu, T., L. Wang y Y.X. Duan (2008). Nematicidal activity of culture filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. *World Journal of Microbiolofy and Biotechnology*, 24: 113-118.
- Llerandi-Juárez, R. D. y P. Mendoza de Gives (1998). Resistance of chlamydospores nematophagous fungi to the digestive processes of sheep in México. *Journal of Helminthology*, 72: 151-178.
- López Arellano, M.E., P. Mendoza de Gives, L. Aguilar Marcelino, Liébano E. Hernández (2010). Buenas prácticas en el manejo de antihelmínticos para el control de parásitos rumiantes. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Folleto Técnico No. 8: 11-15.

- López-Llorca, L.V. y H.B. Jansson (2006). Fungal parasites of invertebrates: multimodal biocontrol agents. In: Robson GD, van West P, Gadd GM (eds). Exploitation of Fungi. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 310-335.
- López-Llorca LV, J.G. Maciá-Vicente, y H.B. Jansson (2008). Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In: Ciancio A, Mukerji K.G. (eds). Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. Springer. pp. 49-74.
- López, R.O.A., R. González-Garduño, A.M.M. Osorio, I. E. Aranda y R.P. Díaz (2013). Cargas y especies prevalentes de nemátodos gastrointestinales en ovinos de pelo destinados al abasto. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4: 223-234.
- Mascarin, G.M., M.A. Jackson, N.N. Kobori, R.W. Behle, C.A. Dunlap y J.I. Delalibera (2015). Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 6653–6665.
- Meyer, W.J. y M.G. Wiebe (2003). Enzyme production by the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*. *Biotechnology*, 25: 791-795.
- Mayer, A., M. Kilian, B. Hoster, O. Sterner y H. Anke (1999). In-vitro and in-vivo nematocidal activities of the cyclic dodecapeptide omphalotin A. *Pesticide Science*, 55: 27-30.
- Mejía, A.H (2014). Importancia de la crianza de cabras y ovejos, ventajas y desventajas. Disponible en: <https://zootecniaparaunfuturomejor.wordpress.com/2014/11/17/importancia-de-la-crianza-de-cabras-y-ovejos-por-hipolita-mejia-abreu-100278412/> [Consultado 22-08-2018].
- Mendoza de Gives, P., A.M.E. López, M.L. Aguilar, J.S. Olazarán, G.D. Reyes, V.G. Ramírez M.V.E. y Vega (2018). The nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* reduces the gastrointestinal parasitic nematode larvae population in faeces of orally

- treated calves maintained under tropical conditions. Dose/Response assessment. *Veterinary Parasitology*, 1-17.
- Mendoza de Gives, P. y B. Braga-Ribeiro (2017). *Pochonia chlamydosporia*: A Promising Biotechnological Tool against Parasitic Nematodes and Geohelminths. En: *Perspectives in Sustainable Nematode Management Through Pochonia chlamydosporia: Applications for Root and Rhizosphere Health*. Springer Interantional Publishing AG 2017, Switzerland. pp. 311-342.
- Mendoza-de-Gives, P. y J.F.J. Torres-Acosta (2012). Biotechnological use of fungi in the control of ruminant parasitic nematodes. *Nova Science Publishers*, 19: 1-27.
- Mendoza-De Gives, P. y R. Alatorre-Rosas (2011). Nemátodos. Un mundo de gusanos. *Ciencia y desarrollo*. Disponible en: <http://www.cyd.conacyt.gob.mx> [Acceso 9 mayo 2017].
- Mendoza de Gives, P., K.G. Davies, S. Clark y M.J. Behnke (1999). Predatory behaviour of trapping fungi against *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitology*, 119: 95-104.
- Mendoza de Gives P. y R.O. Valero-Coss (2009) Uso de hongos nematófagos: una herramienta biotecnológica para el control de nemátodos parásitos del ganado. CENID-SAI-INIFAP. Folleto técnico, 7:29.
- Mendoza, G.P (2000). El uso de hongos nematófagos en programas de control de nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes. En: 1er curso internacional Nuevas perspectivas de diagnóstico y control de nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes. Universidad Autónoma del estado de Yucatán. F.M.V.Z. México. pp.130.
- Mendoza de Gives, P (1998) Perspectives of the use of nematode-trapping fungi in the livestock industry in Mexico. *In: International Workshop on Biological Control of Gastro-intestinal nematodes of ruminant using predacious fungi*. Veterinary Research Institute, 141: 82-85.

- Millares, P (2010). Proteomic Fingerprinting to Identify Markers for Monitoring Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*, Tesis de Doctorado, University of Liverpool. Inglaterra, pp.15-20.
- Mitchell, C., R.M. Brennan, J. Graham y A.J. Karley (2016). Plant Defense against Herbivorous Pests: Exploiting Resistance and Tolerance Traits for Sustainable Crop Protection. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1132.
- Molento, M.B (2009). Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Veterinary Parasitology*, 163: 229-234.
- Morales G. y L.A. Pino (1999) Métodos alternativos para el control para los Estróngilos digestivos en ovinos. Laboratorio de Parasitología, Instituto de Investigaciones Veterinarias. CENIAP, 3-8.
- NADIS (2015). Gastrointestinal Nematode Infestations in Sheep. National Animal Disease Information Service Disponible en: <http://www.nadis.org.uk/bulletins/gastrointestinal-nematode-infestations-in-sheep.aspx> [Acceso 15 julio 2019].
- Nagesh, M., S. Hussaini, B. Chidanandaswamy y S. Biswas (2005). Isolation *in vitro* characterization and predaceous activity of an Indian isolate of the fungus, *Arthrobotrys oligospora* on the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea*, 33: 179-183.
- Niu, X.M. y K.Q. Zhang (2011). *Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. *Mycology*, 2: 59-78.
- Nordbring-Hertz B., J. Hans-Börje y A. Tunlid (2006). Nematophagous fungi. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-11.
- Nordbring-Hertz, B (2004). Morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*-and extensive plasticity of infection structures. *Mycologist*, 18: 125-133.
- Nordbring-Hertz. B (1977). Nematode-induced morphogenesis in the predatory fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Nematology*, 23: 443-451.

- Noshad, A., M. Iqbal, Z. Iqbal, H. Bibi, B.S. Saifullah y H.U. Shah (2015). Aphidicidal potential of ethyl acetate extract from *Pleurotus ostreatus*. Sarhad Journal of Agriculture, 31: 101-105.
- Ojeda-Robertos, N. F., J.F.J. Torres-Acosta, A.J. Ayala-Burgos, C.A. Sandoval-Castro, R.O. Valero-Coss y P. Mendoza-de-Gives (2009). Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamyospores in ruminants: *in vitro* and *in vivo* studies. BMC Veterinary Research, 5: 1-7.
- Orozco, A.M., C.V. Álvarez, R.A. Jiménez y N.O. Acuña (2009). Evaluación *in vitro* de hongos nematófagos para el control biológico de nemátodos gastrointestinales de rumiantes. Revista MVZ Córdoba, 14: 1820-1830.
- Ortiz-Pérez, D.O., M.B. Sánchez, T.J. Nahed, Z.M.A. Orantes, L.J.L. Cruz, G.M.E. Reyes y P. Mendoza-de-Gives (2017). Using *Duddingtonia flagrans* in calves under an organic milk farm production system in the Mexican tropics. Experimental Parasitology, 75: 74-78.
- Park, J., W. Gams, M. Scholler, E. Ghisalberti y K. Sivasithamparam (2002). Orbiliaceous nematode-trapping fungi and related species in Western Australia and their biological activities. Australasian Mycologist, 45-52.
- Partida-De la P., V.D. Braña, S.H. Jiménez, R. F.G. Ríos y R.G. Buendía (2013). Problemática y oportunidades de la cadena productiva de carne ovina. Producción de carne ovina. Libro Técnico, 5: 32.
- Paz-Silva, A., I. Francisco, R.O. Valero-Coss, F.J. Cortiñas, J.A. Sánchez, R. Francisco, M. Arias, J.L. Suárez, M.E. López-Arellano, R. Sánchez-Andrade y P. Mendoza de Gives (2011). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamyospores. Veterinary Parasitology, 179: 277-282.
- Peña B.C. y L.P. Restrepo (2013). Phenolic Compounds and Carotenoids in Potatoes – Revision. Actualización en nutrición, 14: 1-32.

- Pfister, D.H (1994). *Orbilia fimicola*, a nematophagous discomycete and its *Arthrobotrys anamorph*. Mycologia, 86: 451–453.
- Piontelli, E. y G. Giusiano (2003). Mycological notes: A selection of microfungi associated with vegetal material and keratine from Argentina and Chile. Boletín Micológico, 18: 89-99.
- Polo, L. M (2015). Fundamentos de Cromatografía. Editorial DEXTRA. pp. 390.
- Pramer, D (1964). Nematode-trapping fungi. Science, 144: 382-388.
- Pramer, D. y N.R. Stoll (1959). Nemin: a Morphogenic Substance Causing Trap Formation by Predaceous Fungi. Science, 129: 3354.
- Quiroz-Romero, H (2017). Parasitología veterinaria. Ciencia, 68: 86-88. Disponible en: [https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68\\_1/PDF/Parasitologia\\_veterinaria.pdf](https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_1/PDF/Parasitologia_veterinaria.pdf)
- Quiroz-Romero, H (2014). Elaboran catálogo de parásitos en México. Ciencia. El Universal. Disponible en: <https://archivo.eluniversal.com.mx/ciencia/2014/parasitos-mexico-91240.html>
- Ramírez, E. y S. Suárez (2014). Effect of aqueous extract of native potato *Solanum tuberosum* "puca simi" on enzymes of phase II detoxification. Ciencia e Investigación, 17: 43-48.
- Regaieg, H., A. Ciancio, N.H. Raouani G. Grasso y L. Rosso (2010). Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26: 2285–228.
- Reyes-Estebanez M., E. Herrera-Parra, J. Cristóbal-Alejo, G. Heredia-Abarca, B. Canto-Canché, I.L. Medina-Barizabal y M. Gamboa-Angulo (2011). Antimicrobial and nematocidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in Mexico. African Journal of Microbiology Research, 5: 1083-1089.

- Reyes-Estebanez, M.M.J (2009). Estudio exploratorio de la bioactividad de hongos microscópicos asociados a restos vegetales, en zonas tropicales de México. Tesis. pp. 126.
- Roberts, S.C. y M.L. Shuler (1997). Large-scale plant cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 154-159.
- Rodríguez-Martínez, R., P. Mendoza-de-Gives, L. Aguilar-Marcelino, M.E. López-Arellano, M. Gamboa-Angulo, G.H. Rosas-Saito, M. Reyes-Estébanez y V.G. García-Rubio (2018). *In Vitro* Lethal Activity of the Nematophagous Fungus *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) against Nematodes of Five Different Taxa. *BioMed Research International*, 1-7.
- Rodríguez-Vivas, R.I., L. Grisi, de-L.A.A. Pérez, V.H, Silva, J.F.J. Torres-Acosta, S.H. Fragoso, S.D. Romero, C.R. Rosario, F. Saldierna y C.D. García (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8: 61-74.
- Roeber, F., A.R. Jex y R.B. Gasser (2013a). Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasite & Vectors*, 6: 1-13.
- Roeber, F., A.R. Jex y R.B. Gasser (2013b). Next-Generation Molecular-Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants. A Turning Point? *Advances in Parasitology*, 83: 267-333.
- Rogers, W.P (1982). Enzymes in the exsheathing fluid of nematodes and their biological significance. *International Journal for Parasitology*, 12: 495-502.
- Romero, J.R. y C.A. Boero (2001). Epidemiology of parasitic gastroenteritis of sheep in temperate and warm areas in Argentina. *Analecta Veterinaria*, 21-37.
- Ruiz-Jiménez, A.L., A. González-Coloma, M.-Fe Andrés-Yeves, E. Ruiz-Sánchez, G. Heredia, S. R. Peraza-Sánchez, I.L. Medina-Baizabal, M. Reyes-Estebanez, B. Canto-Canché y M. Gamboa-Angulo (2017). Insect deterrent and nematocidal



- screening of microfungi from Mexico and anti-aphid compounds from *Gliomastix masseei*. *Revista Argentina de Microbiología*, 49: 83-92.
- Rubner, A. (1966). Revision of predacious hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. *Studies in Mycology*, 39: 1-134
- SAS Institute (2006). *SAS User's Guide: Statistics*. Ver 9.0. SAS Institute. Cary, North Carolina, 956.
- Scarcella, S., C. Ceriani, J. Rodríguez y H.D. Solana (2007). Caracterización de la proteína microtubular de diferentes helmintos parásitos. Sus implicancias en el modo de acción de los benzimidazoles antihelmínticos. *REDVET. Electrónica de Veterinaria*, 8: 1-8.
- Schnürer, J., J. Olsson y T. Börjesson (1999). Volátiles fúngicos como indicadores de deterioro de alimentos y piensos. *Genética y biología fúngica*, 27: 209–217.
- Schroers, H.J (2001). A monograph of Bionectria (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys anamorphs*. *Studies in Mycology*, 46: 1-96.
- Schroers, H., G. Samuels, K. Seifer y W. Gams (1999). Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, 91: 365-385.
- SADER Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2019). SADER. Beneficios de consumir carnes rojas. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/beneficios-de-consumir-carnes-rojas?idiom=es>
- SADER Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2019). SADER. Caprinos y ovinos una ganadería de mucha lana. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/las-cabras-y-ovejas-en-la-ganaderia-mexicana?idiom=es>
- Silva, M. E., R.B. Braga, P. Mendoza de Gives, J. Millán-Orozco, M.A. Mercado-Uriostegui, M.L. Aguilar, S.F.E. Freitas A.L. Araujo, V.T. Souza A.A. Rocha, T.

- Senna, R.T. Gorete, F.F. Vieira y de-A.J. Victor (2015). Fungal Antagonism Assessment of Predatory Species and Producers Metabolites and Their Effectiveness on *Haemonchus contortus* Infective Larvae. *BioMed Research International*, 241582: 1-6.
- Singh, R., N. Kumar y K. Singh (2005). Morphological variations in conidia of *Arthrobotrys oligospora* on different media. *Microbiology*, 33: 118-120.
- Soares, P (2006). Estudos do control biologico de fironematoides com fungos nematófagos. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias agrarias y veterinarias. Universidad Estadual Paulista (FCAV- UNESP), Jaboticabal, Sao Paulo, Brazil.
- Solana, H., S. Scarcella, M.L. Gentile, A. Martinez y R. Alzola (2009). Inmunolocalización de Tubulina en Túbulos testiculares de *Fasciola hepatica* expuesta a triclabendazole “*in vivo*”. *Investigación Veterinaria*, 11: 105-115.
- Söman, A.G., J.B. Gloer, R.F. Angawi, D.T. Wicklow y P.F. Dowd (2001). Vertilecanin: New phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products* 64: 189-192.
- Soto-Barrientos, N., J. Oliveira, R. Vega-Obando, D. Montero-Caballero, B. Vargas, J. Hernández-Gamboa y C. Orozco-Solano (2011). *In-vitro* predatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes. *Revista de Biología Tropical*, 59: 37-52.
- Sprat, D.M (1997). Endoparasites control strategies: implications for biodiversity of native fauna. *International Journal of Parasitology*, 27: 173-180.
- Stadler, M., y H. Anke (1994). Metabolites with nematocidal and antimicrobial activities from the Ascomycete *Lachnum papyraceum* (Karst.) Karst. *The Journal of Antibiotics*, 48: 261-266.
- Stewart, J. y W. Brown (2006). The production and use of endophytes as novel inoculants for promoting enhanced plant vigor, health, growth, yield reducing environmental stress and for reducing dependency on chemical pesticides for pest control.

- International application published under the patent cooperation treaty. World Intellectual Property Organization, 1-64.
- Strohl, W.R (2000). The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, 5: 39-41.
- Su, H., Y. Hao, M. Mo y K. Zhang (2007). The ecology, of nematode-trapping hyphomycetes in cattle dung from three plateau pastures. *Veterinary Parasitology*, 144: 293-298.
- Sutton, J.C., W. Liu, R. Huang y N. Owen-Going (2002). Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in defoliated stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology*, 12: 413-425.
- Sutton, J.C., D.W. Li, G. Peng, H. Yu, P. Zhang y R.M. Valdebenito-Sanhueza (1997). *Gliocladium roseum*, a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease*, 81: 316–328.
- Szabó, M, P. Urbán, F. Virányi, L. Kredics y C. Fekete (2013). Comparative gene expression profiles of *Trichoderma harzianum* proteases during *in vitro* nematodes egg parasitism. *Biological Control*, 67: 337-346.
- Tabarant, P., C. Villenave, J.M. Risede, J. Roger, I. Thuries y M. Dorel (2011). Effects of four organic amendments on banana parasitic nematodes and soil nematode communities. *Applied Soil Ecology*, 49: 59-67.
- Torres-Acosta, J.F.J., C.A. Sandoval-Castro, H. Hoste, A.J. Aguilar-Caballero, R. Cámara Sarmiento y M.A. Alonso-Díaz (2012a). Nutritional manipulation of sheep and goats for the control of gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. *Small Ruminant Research*, 103: 28-40.
- Torres-Acosta, J.F.J., P. Mendoza, A. Aguilar y J.A. Cuéllar (2012b) Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*, 189: 89-96.

- Tortora, G.J., B.R. Funke y C.L. Case (2007). Introducción a la microbiología. Editorial Medica Panamericana, 9: 346-354.
- Trigos, A., G. Mendoza, G.M. Luna, G. Heredia y R.M. Arias (2005). Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. Revista Mexicana de Micología, 20: 89-92.
- Uniprot Consortium (2016). Uniprot Taxonomy. *Haemonchus contortus* (Barber pole worm). [Consultado: 20 de enero de 2019] Disponible en: <https://www.uniprot.org/taxonomy/6289>
- Verdejo, S (2005). Control Biológico de nemátodos fitoparásitos. En: El control Biológico de Plagas y Enfermedades. La sostenibilidad de la agricultura Mediterránea. (Editado por Josep Jacas, Primitivo Caballero, Jesús Ávila Eds.). Castelló de la Plana: Publicaciones de la Universidad Jaume I.D.L., Castelló, Pamplona, España. pp. 153-169.
- Wang, R.B., J.K. Yang, C. Lin, Y. Zhang y KQ. Zhang (2006). Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylella shizishanna*. Microbiology, 42: 589-594.
- Wang, J. y V.J. Higgins (2005). Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. Fungal Genetics and Biology, 42: 284-292.
- Wolstenholme, A.J. y R.M. Kaplan (2012). Resistance to macrocyclic Lactones. Current Pharmaceutical Biotechnology, 13: 873-887.
- Wootton L.M.O. y D. Pramer (1966). Valine-induced morphogenesis in *Arthrobotrys conoides*. Bacteriol Proc, 75: 225–232.
- Wyborn, C., D. Priest y C. Duddington (1969). Selective technique for the determination of nematophagous fungi in soils. Soil Biology and Biochemistry, 1: 101–102.
- Xalxo, P.C., D. Karkun y A.N. Poddar (2013). Rhizospheric fungal associations of root knot nematode infested cucurbits: *In vitro* asseement of their nematicidal potencial. Research Journal of Microbiology, 8: 81-91.

- Xu, L.L., Y.L. Lai, L. Wang y X.Z. Liu (2011). Effects of abscisic acid and nitric oxide on trap formation and trapping of nematodes by the fungus *Drechslerella stenobrocha* AS6.1. *Fungal Biology*, 115: 97-101.
- Yan, F., L. Xu, L. Liu, R. Yan, X. Song y X. Li (2010). Immunoproteomic analysis of whole proteins from male and female adult *Haemonchus contortus*. *The Veterinary Journal*, 185: 174-179.
- Yang, J.K., L. Wang, X.L. Ji, Y. Feng, X.M. Li, C.G. Zou, J.P. Xu, Y. Ren, Q.L. Mi, J.L. Wu, S.Q. Liu, Y. Liu, X.W. Huang, H.Y. Wang, X.M. Niu, J. Li, L.M. Liang, Y.L. Luo, K.F. Ji, W. Zhou, Z.F. Yu, G.H. Li, Y.J. Liu, L. Li, M. Qiao, L. Feng y K.Q. Zhang (2011). Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *PloS Pathogens*, 7: 1-13.
- Yang, Y., E. Yang, Z. Ans y X. Liu (2007a). Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. *PNAS*, 104: 8379-8384.
- Yang, J.K., B.Y. Tian, L.M. Liang y K.Q. Zhang (2007b). Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75: 21–31.
- Yatsuda, P.A., J. Krijgsveld, W.C.A.A. Cornelissen, J.R.A. Heck y E. Vries (2003). Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 16941-16951.
- Yu, H. y J.C. Sutton (1997). Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 237-246.
- Zhao, M.L., M.H. Mo y K.Q. Zhang (2004). Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycologia*, 96: 16-22.

Zopf, W (1888). Zur kenntnis der infektions-krankheiten neiderer thiere und pflanzen. Nova Acta Leopold Carol Dtsch Akad Naturf Halle, 53: 314-376.

Zuckerman, B., M. Matheny y N. Acosta (1994). Control of Plant-Parasitic Nematodes by a Nematicidal Strain of *Aspergillus niger*. Journal of Chemical Ecology, 20: 33–43.

## ANEXOS

## 1.- LISTA DE COMPUESTOS DETECTADOS POR CG-EM EN EXTRACTOS DE ARROZ FERMENTADO

Análisis de CG-EM de fracciones hexánicas (FHx), sus derivados metilados (FHxm) y de las fracciones de acetonitrilo (FACn) de partición de los extractos etanólicos de <i>Arthrobotrys oligospora</i> , <i>Arthrobotrys musiformis</i> , <i>Duddingtonia flagrans</i> y <i>Clonoctachys rosea</i> .						
Hongo nematófago	Clave	TR* (min)	Área	Compuestos	Identidad %	
<i>A. oligospora</i> (AO-CENID1)	FHxAO	15.836	22.1	Palmitato de etilo	98	
		17.4	9.71	Linoleato de etilo	98	
		17.45	11.7	Oleato de etilo	91	
		17.67	16.9	Estearato de etilo	98	
	FHxAOm	9.18	2.46	9-oxo-Nonanoato de metilo	91	
		12.859	0.73	Miristato de metilo	95	
		15.029	34.3	Palmitato de metilo	98	
		15.961	0.63	Heptadecanoato de metilo	97	
		16.693	21.4	Linoleato de metilo	99	
		16.931	22	Estereato de metilo	99	
	FACNAO	15.542	10.2	Ácido palmítico	98	
		17.162	14.5	Ácido linoleico	93	
		22.341	3.35	2- Etilacridina	83	
		15.605	29.2	Ácido palmítico	96	
<i>A. musiformis</i> (AM-CENID1)	FHxAM	15.83	0.86	Palmitato de etilo	94	
		16.793	0.51	Linoleato de metilo	99	
		17.244	26	Ácido oleico	97	
		17.425	6.03	Ácido esteárico	99	
	FHxAMm	9.18	3.14	Ácido nonanoico, 9-oxo-, éster de metil	91	
		15.023	35.1	Palmitato de metilo	98	
		16.693	29.3	Oleato de metilo	99	
		16.912	9.19	Estereato de metilo	99	
		FACNAM	15.542	5.87	Ácido palmítico	95
		17.168	12.7	Ácido linoleico	97	
	<i>D. flagrans</i> (FTHO-8)	FHxDF	15.554	12.5	Ácido palmítico	95
			15.836	1.42	Palmitato de etilo	89
			16.793	1.66	Linoleato de metilo	98
			17.218	13.6	Ácido oleico	98
17.4			4.81	Linoleato de etilo	98	
20.027			7.72	9, 17- Octadecadienol, (Z)-	97	
FHxDFm		14.998	27.2	Palmitato de metilo	98	
		16.674	31.2	Linoleato de metilo	99	
		16.906	6.72	Estearato de etilo	99	
		18.263	5.08	Ácido oxiraneoctanoico, 3-octil-, éster metil, cis-Ácido 1,2-Bencenidicarboxílico, mono (2-etilhexil) éster	87	
		20.434	18.2		91	
		6.134	7.22	2-Furancarboxaldehído, 5- (Hidroximetil)-	83	
FACNDF		6.703	2.04	2H-piran-2-ona, tetrahidro-4-hidroxi-4-metilo	87	
		12.389	7.7	Ácido Bencenoacetico, 4-hidroxi-3- metoxi-	96	
	15.567	7.89	Palmitato de etilo	94		
	17.206	25.1	Linoleato de metilo	93		
	17.425	0.95	2-Metil-Z, Z-3, 13-Octadecadienol	91		
	15.548	21.3	Ácido palmítico	98		
<i>C. rosea</i> (THZ-27)	FHxCR	15.83	11.4	Palmitato de etilo	99	
		17.4	9.44	Linoleato de etilo	98	
		17.675	4.28	Estereato de etilo	98	
		14.998	48.5	Palmitato de metilo	98	
	FHxCRm	16.668	19	Oleato de metilo	99	
		16.906	29.5	Estereato de metilo	99	
		15.567	6.56	Ácido palmítico	94	
	FACNCR	17.206	23.9	Linoleato de metilo	90	
		17.425	1.63	Ácido esteárico	97	
		21.703	6.36	9, 12-octadecadienol	93	
Blanco (AF)	FHxAF	14.998	53	Palmitato de metilo	98	
	FHxAFm	16.668	33.2	Oleato de metilo	99	
		16.899	5.72	Estereato de metilo	98	
	FACNAF	15.542	26.9	Ácido mirístico	95	
		17.168	45.1	Ácido linoleico	93	

\*TR: Tiempo de retención (min); FHx: Fracción hexanica; FHxm: Fracción hexanica metilada; FACn: Fracción de acetonitrilo

## 2.- DATOS ESTADÍSTICOS DE LA ACTIVIDAD DE LOS FILTRADOS DE HONGOS NEMATÓFAGOS

*A. oligospora* 08:47 Saturday, December 11, 2018 13

Obs	TRAT	REP	HONGO	MEDIO	MORTA
1	Ao0PD	1	0	PD	59.06
2	Ao0PD	2	0	PD	58.25
3	Ao0PD	3	0	PD	38.70
4	Ao0PD	4	0	PD	40.23
5	Ao0PD	5	0	PD	34.88
6	Ao0PD	6	0	PD	79.23
7	Ao0PD	7	0	PD	24.42
8	Ao0PD	8	0	PD	.
9	Ao0PD	9	0	PD	.
10	AoPD	1	Ao	PD	80.80
11	AoPD	2	Ao	PD	85.63
12	AoPD	3	Ao	PD	100.00
13	AoPD	4	Ao	PD	68.00
14	AoPD	5	Ao	PD	43.94
15	AoPD	6	Ao	PD	60.10
16	AoPD	7	Ao	PD	52.27
17	AoPD	8	Ao	PD	55.20
18	AoPD	9	Ao	PD	80.22
19	Ao0CD	1	0	CD	0.00
20	Ao0CD	2	0	CD	0.00
21	Ao0CD	3	0	CD	0.00
22	Ao0CD	4	0	CD	19.14
23	Ao0CD	5	0	CD	22.70
24	Ao0CD	6	0	CD	26.37
25	Ao0CD	7	0	CD	25.37
26	Ao0CD	8	0	CD	19.14
27	Ao0CD	9	0	CD	25.70
28	AoCD	1	Ao	CD	21.14
29	AoCD	2	Ao	CD	14.15
30	AoCD	3	Ao	CD	28.69
31	AoCD	4	Ao	CD	28.33
32	AoCD	5	Ao	CD	27.49
33	AoCD	6	Ao	CD	33.20



34	AoCD	7	Ao	CD	25.38
35	AoCD	8	Ao	CD	34.00
36	AoCD	9	Ao	CD	.
37	Ao0PDIn	1	0	PDIn	40.86
38	Ao0PDIn	2	0	PDIn	35.69
39	Ao0PDIn	3	0	PDIn	46.51
40	Ao0PDIn	4	0	PDIn	59.22
41	Ao0PDIn	5	0	PDIn	27.75
42	Ao0PDIn	6	0	PDIn	28.09
43	Ao0PDIn	7	0	PDIn	44.55
44	Ao0PDIn	8	0	PDIn	39.77
45	Ao0PDIn	9	0	PDIn	22.87
46	AoPDIn	1	Ao	PDIn	99.73
47	AoPDIn	2	Ao	PDIn	99.74
48	AoPDIn	3	Ao	PDIn	99.74
49	AoPDIn	4	Ao	PDIn	98.52
50	AoPDIn	5	Ao	PDIn	.
51	AoPDIn	6	Ao	PDIn	61.27
52	AoPDIn	7	Ao	PDIn	68.25

*A. oligospora* 08:47 Saturday, December 11, 2018 14

Obs	TRAT	REP	HONGO	MEDIO	MORTA
53	AoPDIn	8	Ao	PDIn	75.60
54	AoPDIn	9	Ao	PDIn	92.63
55	Ao0CDIn	1	0	CDIn	80.90
56	Ao0CDIn	2	0	CDIn	98.26
57	Ao0CDIn	3	0	CDIn	80.11
58	Ao0CDIn	4	0	CDIn	.
59	Ao0CDIn	5	0	CDIn	.
60	Ao0CDIn	6	0	CDIn	.
61	Ao0CDIn	7	0	CDIn	62.03
62	Ao0CDIn	8	0	CDIn	60.96
63	Ao0CDIn	9	0	CDIn	63.47
64	AoCDIn	1	Ao	CDIn	85.88
65	AoCDIn	2	Ao	CDIn	97.60
66	AoCDIn	3	Ao	CDIn	79.45
67	AoCDIn	4	Ao	CDIn	60.55
68	AoCDIn	5	Ao	CDIn	74.57
69	AoCDIn	6	Ao	CDIn	78.60
70	AoCDIn	7	Ao	CDIn	99.75

71	AoCDIn	8	Ao	CDIn	94.83
72	AoCDIn	9	Ao	CDIn	96.50
73	Am0PD	1	0	PD	59.06
74	Am0PD	2	0	PD	58.25
75	Am0PD	3	0	PD	38.70
76	Am0PD	4	0	PD	40.23
77	Am0PD	5	0	PD	34.88
78	Am0PD	6	0	PD	.
79	Am0PD	7	0	PD	24.42
80	Am0PD	8	0	PD	22.85
81	Am0PD	9	0	PD	23.20
82	AmPD	1	Am	PD	32.49
83	AmPD	2	Am	PD	.
84	AmPD	3	Am	PD	43.72
85	AmPD	4	Am	PD	65.85
86	AmPD	5	Am	PD	73.77
87	AmPD	6	Am	PD	70.32
88	AmPD	7	Am	PD	20.89
89	AmPD	8	Am	PD	.
90	AmPD	9	Am	PD	.
91	Am0CD	1	0	CD	0.00
92	Am0CD	2	0	CD	0.00
93	Am0CD	3	0	CD	0.00
94	Am0CD	4	0	CD	19.14
95	Am0CD	5	0	CD	22.70
96	Am0CD	6	0	CD	26.37
97	Am0CD	7	0	CD	25.37
98	Am0CD	8	0	CD	19.14
99	Am0CD	9	0	CD	25.70
100	AmCD	1	Am	CD	.
101	AmCD	2	Am	CD	36.24
102	AmCD	3	Am	CD	30.70
103	AmCD	4	Am	CD	38.63
104	AmCD	5	Am	CD	38.37

*A. musiformis* 08:47 Saturday, December 11, 2018 15

Obs	TRAT	REP	HONGO	MEDIO	MORTA
105	AmCD	6	Am	CD	35.94
106	AmCD	7	Am	CD	37.06
107	AmCD	8	Am	CD	36.21

---

108	AmCD	9	Am	CD	.
109	Am0PDIn	1	0	PDIn	40.86
110	Am0PDIn	2	0	PDIn	35.69
111	Am0PDIn	3	0	PDIn	46.51
112	Am0PDIn	4	0	PDIn	59.22
113	Am0PDIn	5	0	PDIn	27.75
114	Am0PDIn	6	0	PDIn	28.09
115	Am0PDIn	7	0	PDIn	44.55
116	Am0PDIn	8	0	PDIn	39.77
117	Am0PDIn	9	0	PDIn	22.87
118	AmPDIn	1	Am	PDIn	100.00
119	AmPDIn	2	Am	PDIn	99.44
120	AmPDIn	3	Am	PDIn	99.44
121	AmPDIn	4	Am	PDIn	84.94
122	AmPDIn	5	Am	PDIn	48.84
123	AmPDIn	6	Am	PDIn	62.33
124	AmPDIn	7	Am	PDIn	44.49
125	AmPDIn	8	Am	PDIn	30.79
126	AmPDIn	9	Am	PDIn	.
127	Am0CDIn	1	0	CDIn	80.90
128	Am0CDIn	2	0	CDIn	98.26
129	Am0CDIn	3	0	CDIn	80.11
130	Am0CDIn	4	0	CDIn	.
131	Am0CDIn	5	0	CDIn	.
132	Am0CDIn	6	0	CDIn	.
133	Am0CDIn	7	0	CDIn	62.03
134	Am0CDIn	8	0	CDIn	60.96
135	Am0CDIn	9	0	CDIn	63.47
136	AmCDIn	1	Am	CDIn	96.20
137	AmCDIn	2	Am	CDIn	93.71
138	AmCDIn	3	Am	CDIn	98.99
139	AmCDIn	4	Am	CDIn	43.66
140	AmCDIn	5	Am	CDIn	70.88
141	AmCDIn	6	Am	CDIn	59.90
142	AmCDIn	7	Am	CDIn	86.24
143	AmCDIn	8	Am	CDIn	92.81
144	AmCDIn	9	Am	CDIn	97.81
145	Df0PD	1	0	PD	59.06
146	Df0PD	2	0	PD	58.25
147	Df0PD	3	0	PD	38.70
148	Df0PD	4	0	PD	40.23
149	Df0PD	5	0	PD	34.88

150	Df0PD	6	0	PD	79.23
151	Df0PD	7	0	PD	.
152	Df0PD	8	0	PD	.
153	Df0PD	9	0	PD	.
154	DfPD	1	Df	PD	97.42
155	DfPD	2	Df	PD	99.24
156	DfPD	3	Df	PD	99.51

*D. flagrans* 08:47 Saturday, December 11, 2018 16

Obs	TRAT	REP	HONGO	MEDIO	MORTA
157	DfPD	4	Df	PD	66.76
158	DfPD	5	Df	PD	56.82
159	DfPD	6	Df	PD	60.63
160	DfPD	7	Df	PD	.
161	DfPD	8	Df	PD	.
162	DfPD	9	Df	PD	.
163	Df0CD	1	0	CD	0.00
164	Df0CD	2	0	CD	0.00
165	Df0CD	3	0	CD	0.00
166	Df0CD	4	0	CD	19.14
167	Df0CD	5	0	CD	22.70
168	Df0CD	6	0	CD	26.37
169	Df0CD	7	0	CD	25.37
170	Df0CD	8	0	CD	19.14
171	Df0CD	9	0	CD	25.70
172	DfCD	1	Df	CD	25.00
173	DfCD	2	Df	CD	.
174	DfCD	3	Df	CD	35.65
175	DfCD	4	Df	CD	24.36
176	DfCD	5	Df	CD	22.29
177	DfCD	6	Df	CD	28.93
178	DfCD	7	Df	CD	38.46
179	DfCD	8	Df	CD	35.71
180	DfCD	9	Df	CD	34.74
181	Df0PDIn	1	0	PDIn	40.86
182	Df0PDIn	2	0	PDIn	35.69
183	Df0PDIn	3	0	PDIn	46.51
184	Df0PDIn	4	0	PDIn	59.22
185	Df0PDIn	5	0	PDIn	.
186	Df0PDIn	6	0	PDIn	28.09

187	Df0PDIn	7	0	PDIn	44.55
188	Df0PDIn	8	0	PDIn	39.77
189	Df0PDIn	9	0	PDIn	.
190	DfPDIn	1	Df	PDIn	56.34
191	DfPDIn	2	Df	PDIn	36.42
192	DfPDIn	3	Df	PDIn	58.82
193	DfPDIn	4	Df	PDIn	54.58
194	DfPDIn	5	Df	PDIn	.
195	DfPDIn	6	Df	PDIn	.
196	DfPDIn	7	Df	PDIn	28.88
197	DfPDIn	8	Df	PDIn	33.14
198	DfPDIn	9	Df	PDIn	33.55
199	Df0CDIn	1	0	CDIn	80.90
200	Df0CDIn	2	0	CDIn	98.26
201	Df0CDIn	3	0	CDIn	80.11
202	Df0CDIn	4	0	CDIn	.
203	Df0CDIn	5	0	CDIn	.
204	Df0CDIn	6	0	CDIn	.
205	Df0CDIn	7	0	CDIn	62.03
206	Df0CDIn	8	0	CDIn	60.96
207	Df0CDIn	9	0	CDIn	63.47
208	DfCDIn	1	Df	CDIn	99.51

*D. flagrans* 08:47 Saturday, December 11, 2018 17

Obs	TRAT	REP	HONGO	MEDIO	MORTA
209	DfCDIn	2	Df	CDIn	100.00
210	DfCDIn	3	Df	CDIn	99.77
211	DfCDIn	4	Df	CDIn	82.61
212	DfCDIn	5	Df	CDIn	96.32
213	DfCDIn	6	Df	CDIn	97.33
214	DfCDIn	7	Df	CDIn	91.37
215	DfCDIn	8	Df	CDIn	98.11
216	DfCDIn	9	Df	CDIn	98.59
217	Cr0PD	1	0	PD	59.06
218	Cr0PD	2	0	PD	58.25
219	Cr0PD	3	0	PD	38.70
220	Cr0PD	4	0	PD	40.23
221	Cr0PD	5	0	PD	34.88
222	Cr0PD	6	0	PD	79.23
223	Cr0PD	7	0	PD	.

224	Cr0PD	8	0	PD	.
225	Cr0PD	9	0	PD	.
226	CrPD	1	Cr	PD	.
227	CrPD	2	Cr	PD	.
228	CrPD	3	Cr	PD	.
229	CrPD	4	Cr	PD	33.72
230	CrPD	5	Cr	PD	24.02
231	CrPD	6	Cr	PD	27.27
232	CrPD	7	Cr	PD	45.22
233	CrPD	8	Cr	PD	38.62
234	CrPD	9	Cr	PD	40.71
235	Cr0CD	1	0	CD	0.00
236	Cr0CD	2	0	CD	0.00
237	Cr0CD	3	0	CD	0.00
238	Cr0CD	4	0	CD	19.14
239	Cr0CD	5	0	CD	22.70
240	Cr0CD	6	0	CD	26.37
241	Cr0CD	7	0	CD	25.37
242	Cr0CD	8	0	CD	19.14
243	Cr0CD	9	0	CD	25.70
244	CrCD	1	Cr	CD	25.77
245	CrCD	2	Cr	CD	27.53
246	CrCD	3	Cr	CD	25.23
247	CrCD	4	Cr	CD	25.45
248	CrCD	5	Cr	CD	27.55
249	CrCD	6	Cr	CD	29.86
250	CrCD	7	Cr	CD	27.82
251	CrCD	8	Cr	CD	39.05
252	CrCD	9	Cr	CD	35.66
253	Cr0PDIn	1	0	PDIn	40.86
254	Cr0PDIn	2	0	PDIn	35.69
255	Cr0PDIn	3	0	PDIn	46.51
256	Cr0PDIn	4	0	PDIn	59.22
257	Cr0PDIn	5	0	PDIn	27.75
258	Cr0PDIn	6	0	PDIn	28.09
259	Cr0PDIn	7	0	PDIn	44.55
260	Cr0PDIn	8	0	PDIn	39.77

C. rosea 08:47 Saturday, December 11, 2018 18

Obs TRAT REP HONGO MEDIO MORTA

261	Cr0PDIn	9	0	PDIn	22.87
262	CrPDIn	1	Cr	PDIn	40.68
263	CrPDIn	2	Cr	PDIn	34.78
264	CrPDIn	3	Cr	PDIn	41.43
265	CrPDIn	4	Cr	PDIn	27.33
266	CrPDIn	5	Cr	PDIn	18.44
267	CrPDIn	6	Cr	PDIn	17.58
268	CrPDIn	7	Cr	PDIn	14.28
269	CrPDIn	8	Cr	PDIn	.
270	CrPDIn	9	Cr	PDIn	.
271	Cr0CDIn	1	0	CDIn	.
272	Cr0CDIn	2	0	CDIn	.
273	Cr0CDIn	3	0	CDIn	.
274	Cr0CDIn	4	0	CDIn	11.61
275	Cr0CDIn	5	0	CDIn	.
276	Cr0CDIn	6	0	CDIn	23.34
277	Cr0CDIn	7	0	CDIn	62.03
278	Cr0CDIn	8	0	CDIn	60.96
279	Cr0CDIn	9	0	CDIn	63.47
280	CrCDIn	1	Cr	CDIn	32.54
281	CrCDIn	2	Cr	CDIn	41.07
282	CrCDIn	3	Cr	CDIn	36.18
283	CrCDIn	4	Cr	CDIn	77.75
284	CrCDIn	5	Cr	CDIn	.
285	CrCDIn	6	Cr	CDIn	.
286	CrCDIn	7	Cr	CDIn	39.25
287	CrCDIn	8	Cr	CDIn	58.43
288	CrCDIn	9	Cr	CDIn	69.01
289	IV	1	0	0	100.00
290	IV	2	0	0	100.00
291	IV	3	0	0	100.00
292	IV	4	0	0	100.00
293	IV	5	0	0	100.00
294	IV	6	0	0	100.00
295	IV	7	0	0	100.00
296	IV	8	0	0	100.00
297	IV	9	0	0	100.00

*D. rosea* 08:47 Saturday, December 11, 2018 19

Procedimiento GLM  
Información del nivel de clase

Clase Niveles Valores

TRAT 33 Am0CD Am0CDIn Am0PD Am0PDIn AmCD AmCDIn AmPD AmPDIn Ao0CD Ao0CDIn  
Ao0PD Ao0PDIn  
AoCD AoCDIn AoPD AoPDIn Cr0CD Cr0CDIn Cr0PD Cr0PDIn CrCD CrCDIn CrPD CrPDIn  
Df0CD  
Df0CDIn Df0PD Df0PDIn DfCD DfCDIn DfPD DfPDIn IV

HONGO 5 0 Am Ao Cr Df

MEDIO 5 0 CD CDIn PD PDIn

Número de observaciones 297

NOTA: Due to missing values, only 252 observations can be used in this analysis.

D. rosea 08:47 Saturday, December 11, 2018 20

Procedimiento GLM

Variable dependiente: MORTA

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	20	157946.6900	7897.3345	37.28	<.0001
Error	231	48937.4302	211.8503		
Total correcto	251	206884.1202			

R-cuadrado Coef Var Raiz MSE MORTA Media  
0.763455 28.91405 14.55508 50.33913

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo III SS	la media	F-Valor	Pr > F
HONGO	4	30365.09464	7591.27366	35.83	<.0001
MEDIO	4	85812.96243	21453.24061	101.27	<.0001
HONGO*MEDIO	12	16929.34103	1410.77842	6.66	<.0001

D. rosea 08:47 Saturday, December 11, 2018 21

Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase Niveles Valores

TRAT 33 Am0CD Am0CDIn Am0PD Am0PDIn AmCD AmCDIn AmPD AmPDIn Ao0CD Ao0CDIn  
Ao0PD Ao0PDIn



AoCD AoCDIn AoPD AoPDIn Cr0CD Cr0CDIn Cr0PD Cr0PDIn CrCD CrCDIn CrPD CrPDIn  
Df0CD

Df0CDIn Df0PD Df0PDIn DfCD DfCDIn DfPD DfPDIn IV

Número de observaciones 297

NOTA: Due to missing values, only 252 observations can be used in this analysis.

D. rosea 08:47 Saturday, December 11, 2018 22

Procedimiento GLM

Variable dependiente: MORTA

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	32	162506.7780	5078.3368	25.06	<.0001
Error	219	44377.3422	202.6363		
Total correcto	251	206884.1202			
R-cuadrado		Coef Var	Raiz MSE	MORTA Media	
	0.785497	28.27827	14.23504	50.33913	

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo III SS	la media	F-Valor	Pr > F
TRAT	32	162506.7780	5078.3368	25.06	<.0001

D. rosea 08:47 Saturday, December 11, 2018 23

Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para MORTA

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	219
Error de cuadrado medio	202.6363
Valor crítico del rango estudentizado	5.44211
Diferencia significativa mínima	28.48
Media armónica de tamaño de celdas	7.399235

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	100.000	9	IV
A			
B	95.957	9	DfCDIn
B	A		

B	A	86.935	8	AoPDIn
B	A			
B	A	85.303	9	AoCDIn
B	A			
B	A	82.244	9	AmCDIn
B	A			
B	A C	80.063	6	DfPD
B	A C			
B	D A C	74.288	6	Am0CDIn
B	D A C			
B	D A C	74.288	6	Ao0CDIn
B	D A C			
B	D A C	74.288	6	Df0CDIn
B	D C			
B	D E C	71.284	8	AmPDIn
B	D E C			
F	B D E C	69.573	9	AoPD
F	D E C			
F	G D E C	51.725	6	Cr0PD
F	G D E C			
F	G D E C	51.725	6	Df0PD
F	G D E			
F	G D E	51.173	6	AmPD
F	G D E			
F	G D E	50.604	7	CrCDIn
F	G D E			
F	G D E	47.824	7	Ao0PD

D. rosea 08:47 Saturday, December 11, 2018 24

#### Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para MORTA

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
F G E			
F G E	44.282	5	Cr0CDIn
F G E			
F G E H	43.104	7	DfPDIn
F G H			
F G H	42.099	7	Df0PDIn
G H			

G	H	38.368	9	Am0PDIn
G	H			
G	H	38.368	9	Cr0PDIn
G	H			
G	H	38.368	9	Ao0PDIn
G	H			
G	H	37.699	8	Am0PD
G	H			
G	H	36.164	7	AmCD
G	H			
G	H	34.927	6	CrPD
G	H			
G	H	30.643	8	DfCD
G	H			
G	H	29.324	9	CrCD
G	H			
G	H	27.789	7	CrPDIn
G	H			
G	H	26.548	8	AoCD
	H			
	H	15.380	9	Ao0CD
	H			
	H	15.380	9	Cr0CD
	H			
	H	15.380	9	Df0CD
	H			
	H	15.380	9	Am0CD

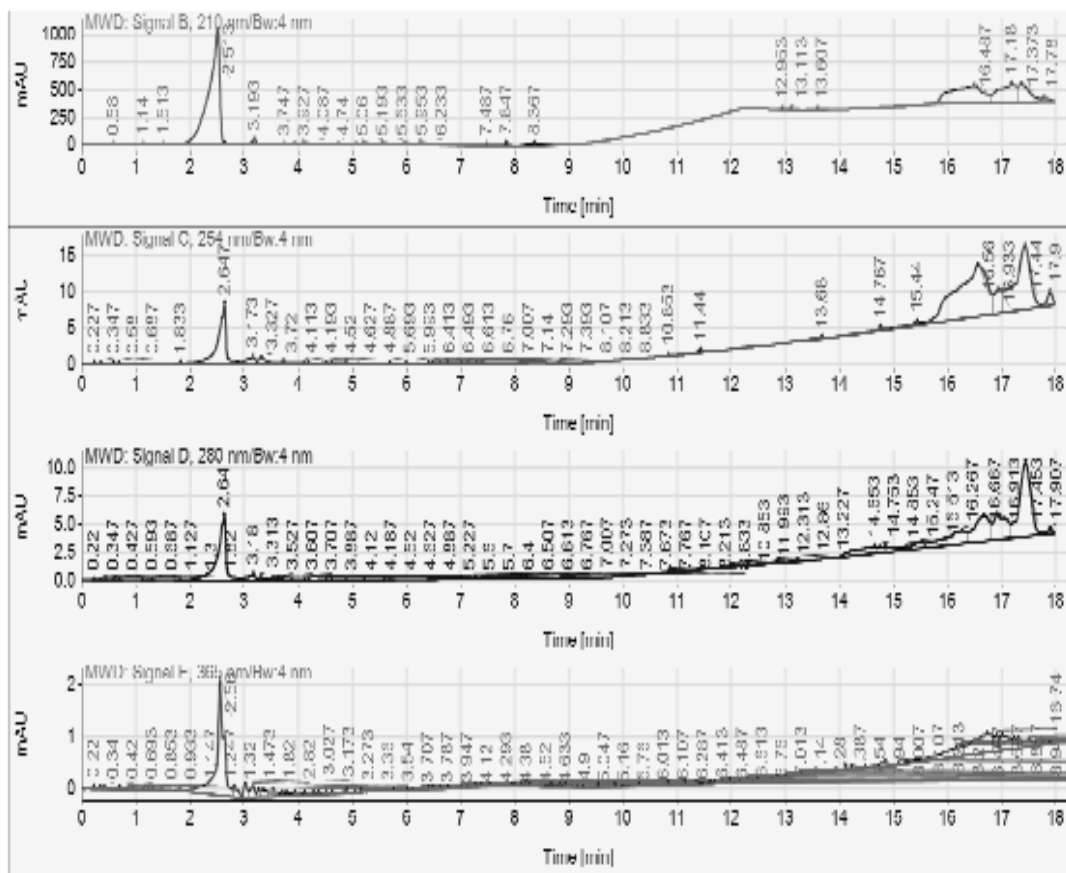
**VALOR DE P<0.05**

EFFECTO DE HONGO	<0.001
EFFECTO MEDIO	<0.001
HONGO*MEDIO	<0.001
O	<0.001
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	46.48
R <sup>2</sup>	0.5

## 3.- CROMATOGRAMAS DE LÍQUIDOS DE LAS FRACCIONES ORGÁNICAS

## A. Medio Czapek Dox

Data file: CD (001)2019-01-30 15-52-34 (GMT -06-00).dat  
 Sample name: CD (001)  
 Injection date: 1/30/2019 3:53:39 PM Sample type: Sample  
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\Marcela\Result\CD (001).rs\ItDI-01.met Location:  
 Analysis method: DI-01.met Injection: 1  
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:  
 Last changed: 2/19/2018 11:41:04 AM

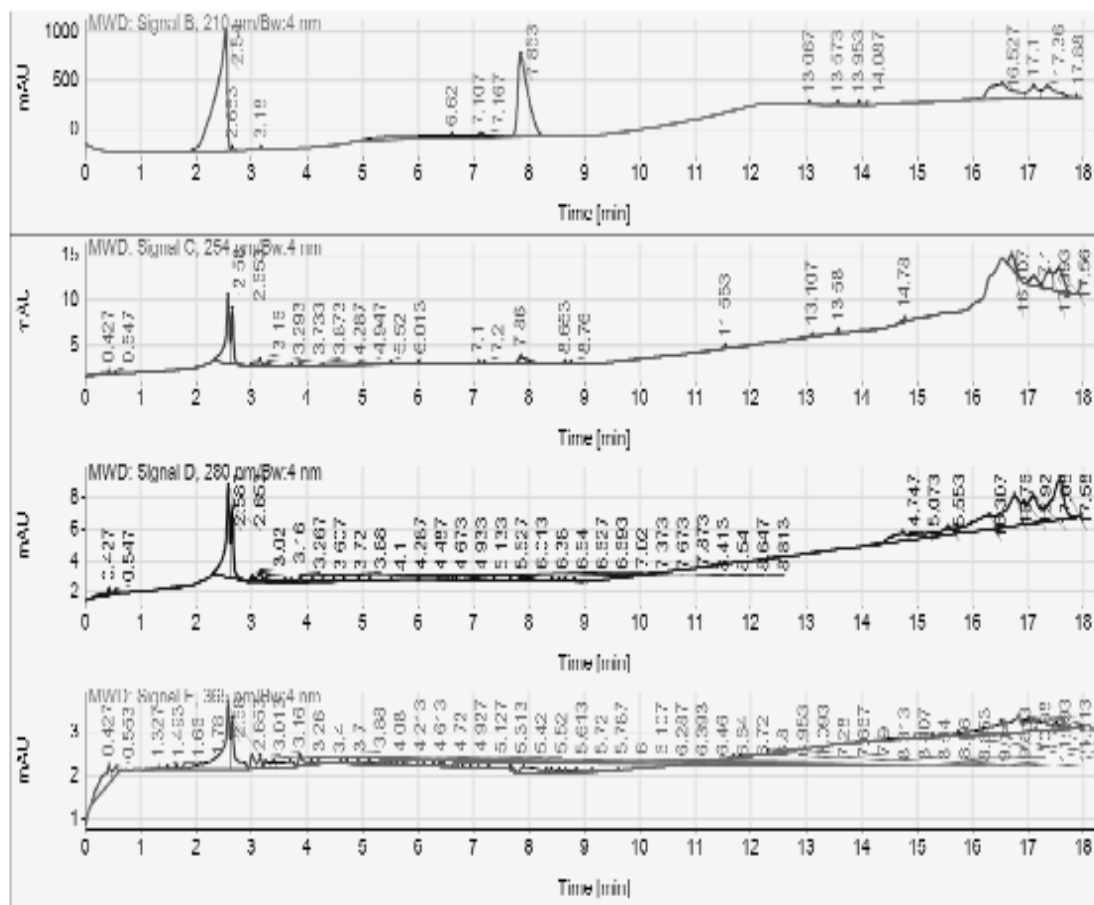


Sample\_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm  
 Metodo: DI-01 Agua/Metanol 50:50 (5'), MeOH 100 (13') (17'),  
 MeOH/Agua 50:50 (18') (19')

flujo: 08 ml/min  
 [C]=2.0 mg/0.5 ml en agua/metanol, 20:80

## B. Medio Czapek Dox con inductor ECL

Data file: CD1 (001)2019-01-31 16-01-12 (GMT -06-00).dat  
 Sample name: CD1 (001)  
 Injection date: 1/31/2019 4:01:59 PM Sample type: Sample  
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\IM Location: arcela\Result\CD1 (001).rs\DI-01.met  
 Analysis method: DI-01.met Injection: 1  
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:  
 Last changed: 2/19/2018 11:41:04 AM

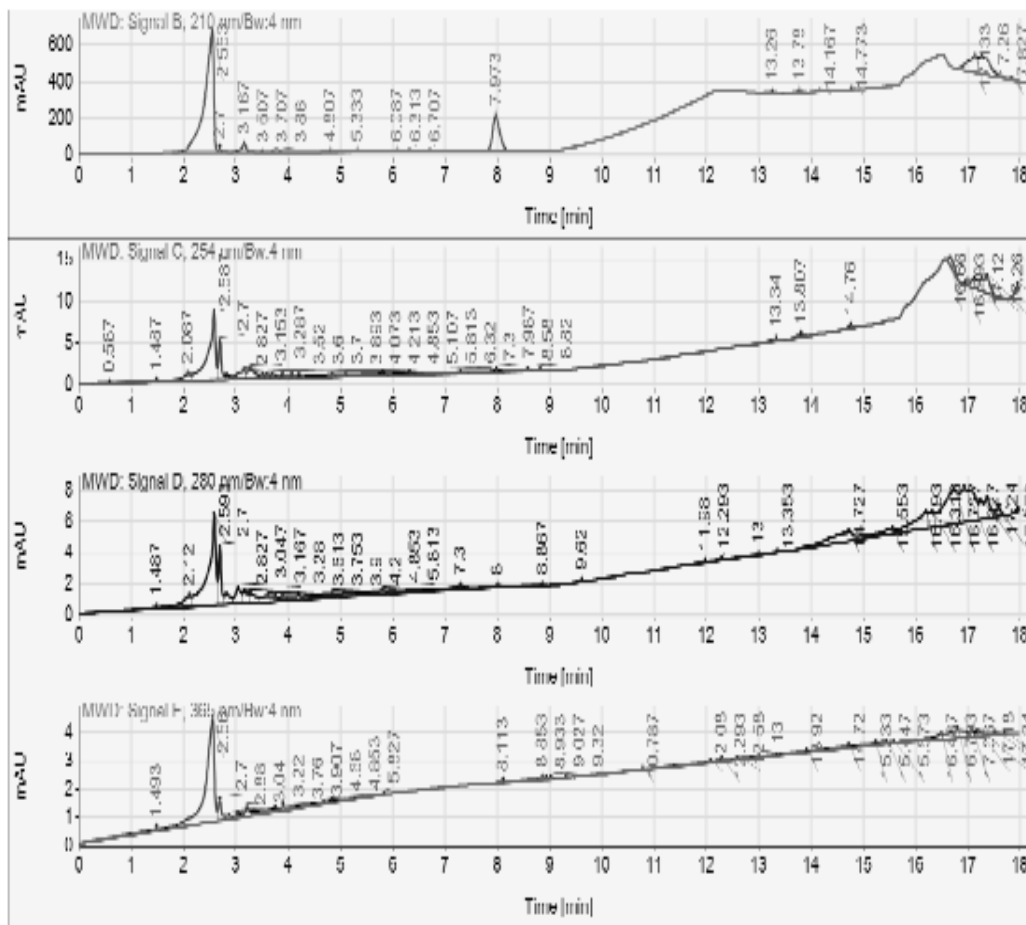


Sample\_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm  
 Metodo: DI-01 Agua/Metanol 50:50 (5'), MeOH 100 (13') (17'),  
 MeOH/Agua 50:50 (18') (19')

flujo: 08 ml/min  
 [C]=2.0 mg/0.5 ml en agua/metanol, 20:80

### C. *Arthrotrys oligospora* en medio Czapek Dox sin inductor ECL

Data file: AOCD (001)2019-01-31 14-27-08 (GMT -06-00).dat  
 Sample name: AOCD (001)  
 Injection date: 1/31/2019 2:27:52 PM Sample type: Sample  
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\I arcela\Result\AOCD (001).rs\DI-01.met Location:  
 Analysis method: DI-01.met Injection: 1  
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:  
 Last changed: 2/19/2018 11:41:04 AM



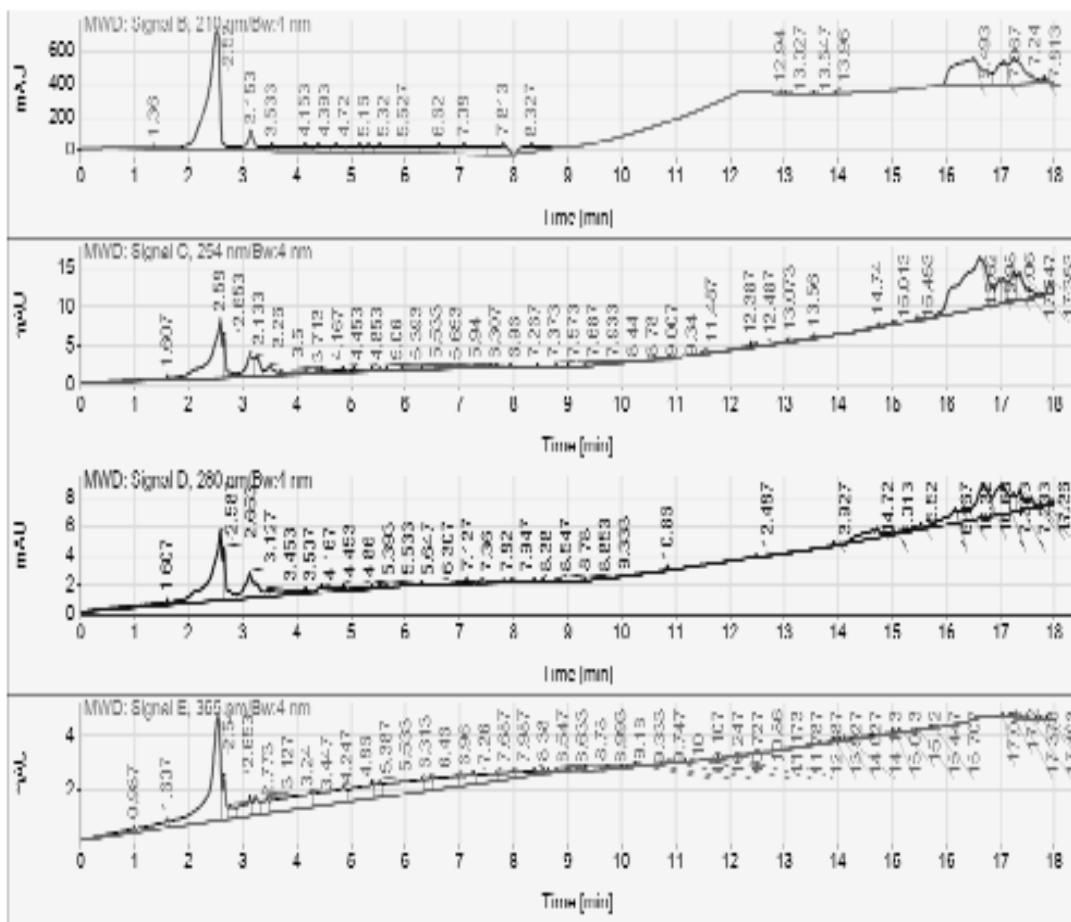
Sample\_Description Grace /Alltima C18/ 5 um , 250 mm x 4.6 mm  
 Metodo: DI-01 Agua/Metanol 50:50 (5'), MeOH 100 (13') (17'),  
 MeOH/Agua 50:50 (18') (19')

flujo: 08 ml/min

[C]=2.0 mg/0.5 ml en agua/metanol, 20:80

### D. *Arthrotrrys oligospora* en medio Czapek Dox con inductor ECL

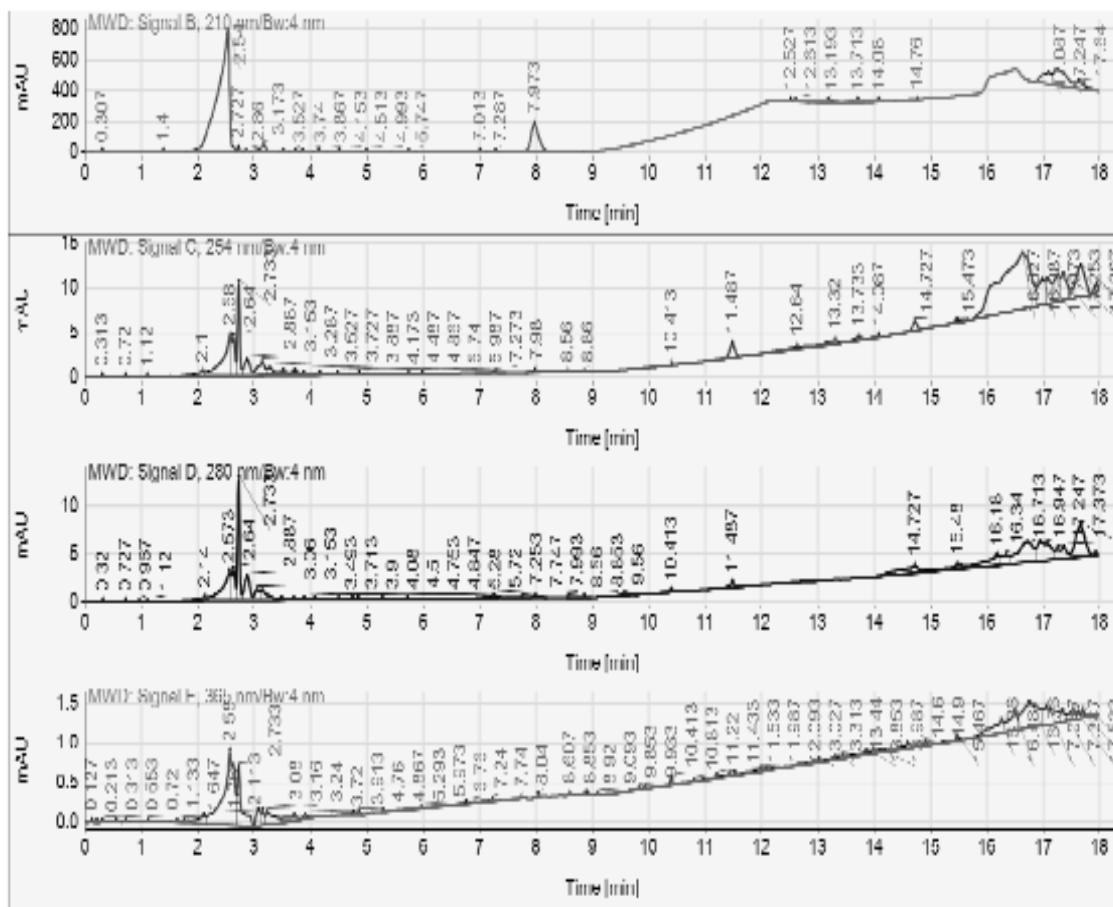
Data file: AOCD1 (001) 2019-02-01 14-52-05 (GMT -06-00).dat  
 Sample name: AOCD1 (001)  
 Injection date: 2/1/2019 2:53:00 PM Sample type: Sample  
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\M arcela\Result\AOCD1 (001).rsf\DI-01.met Location:  
 Analysis method: DI-01.met Injection: 1  
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:  
 Last changed: 2/19/2018 11:41:04 AM



Sample\_Description Grace /Altima C18 / 5 um , 250 mm x 4.8 mm  
 Metodo: 20  
 MeOH  
 flujo: 1 ml/min  
 [C]=0.5 mg/ml

### E. *Arthrobotrys musiformis* en medio Czapek Dox sin inductor ECL

Data file: AMCD (001)2019-01-31 14:55:45 (GMT -08-00).dat  
 Sample name: AMCD (001)  
 Injection date: 1/31/2019 2:56:23 PM Sample type: Sample  
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\M Location: arcela\Result\AMCD (001).rs1\DI-01.met  
 Analysis method: DI-01.met Injection: 1  
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:  
 Last changed: 2/19/2018 11:41:04 AM



Sample\_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm  
 Metodo: DI-01 Agua/Metanol 50:50 (5'), MeOH 100 (13') (17'),  
 MeOH/Agua 50:50 (18') (19')

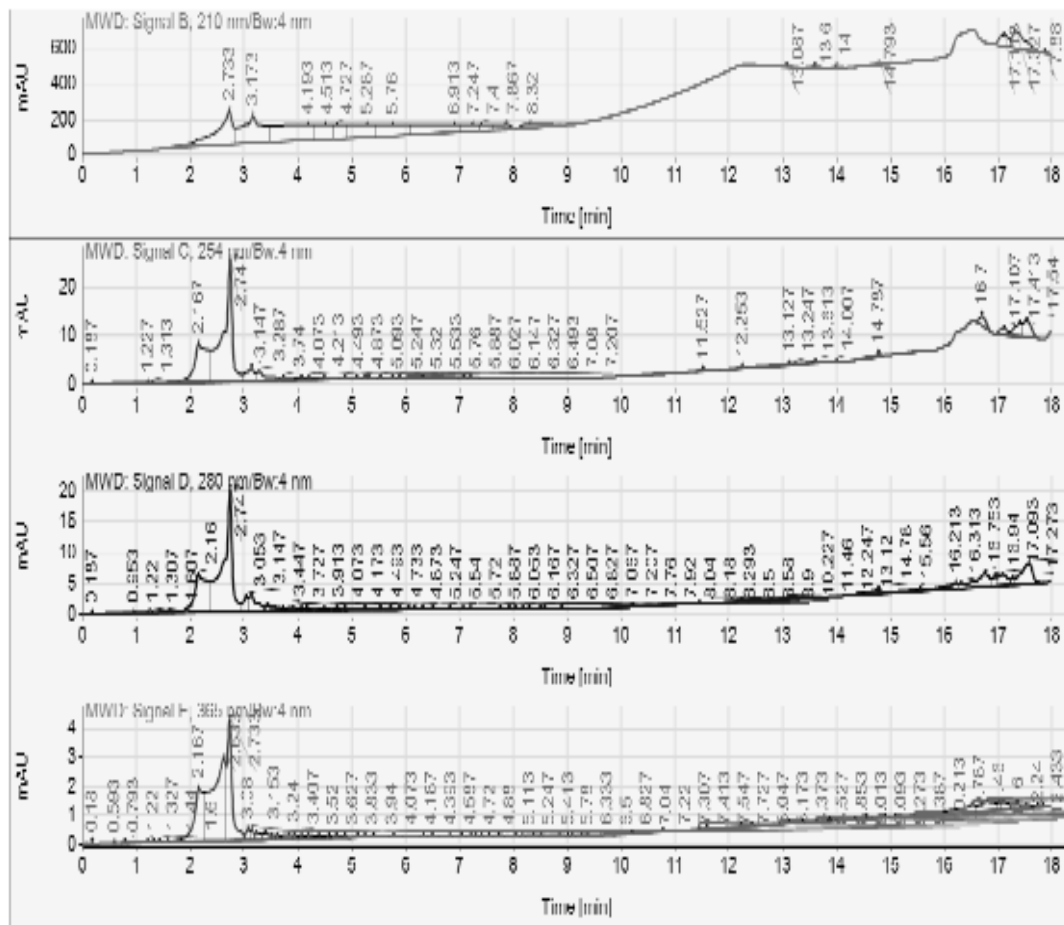
flujo: 08 ml/min

[C]=2.0 mg/0.5 ml en agua/metanol, 20:80



## F. *Arthrobotrys musiformis* en medio Czapek Dox con inductor ECL

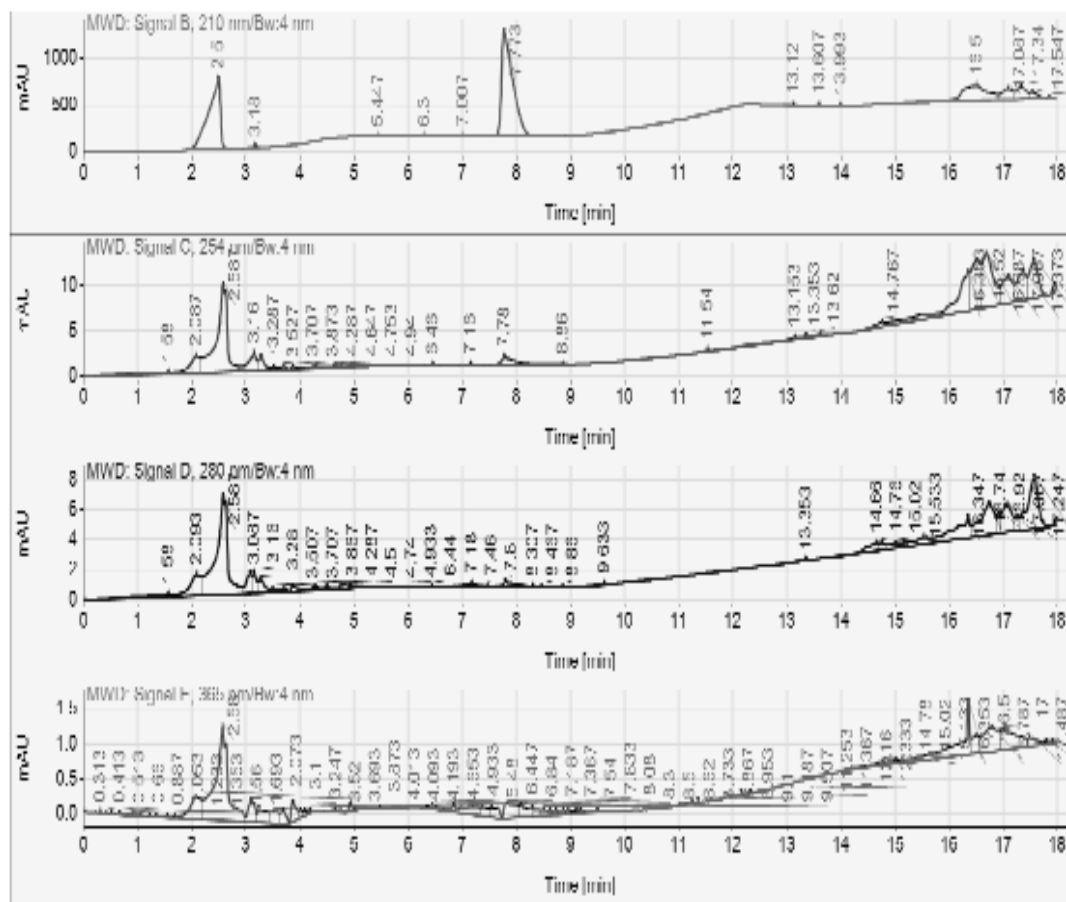
Data file: AMCD1 (001) 2019-02-01 15-16-25 (GMT -06-00).dat  
 Sample name: AMCD1 (001)  
 Injection date: 2/1/2019 3:17:13 PM Sample type: Sample  
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\IM Location: arcela\Result\AMCD1 (001).rslt\DI-01.met  
 Analysis method: DI-01.met Injection: 1  
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:  
 Last changed: 2/19/2018 11:41:04 AM



Sample\_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm  
 Metodo: DI-01  
 MeOH/AGUA  
 flujo: 0.8 ml/min  
 [C]=2 mg/ 0.5 ml

### G. *Duddingtonia flagrans* en medio Czapek Dox sin inductor ECL

Data file: DFCD (001)2019-01-31 15-18-11 (GMT-08-00).dat  
 Sample name: DFCD (001)  
 Injection date: 1/31/2019 3:18:50 PM Sample type: Sample  
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\Marcela\Result\DFCD (001).rslt\DI-01.met Location:  
 Analysis method: DI-01.met Injection: 1  
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:  
 Last changed: 2/19/2018 11:41:04 AM

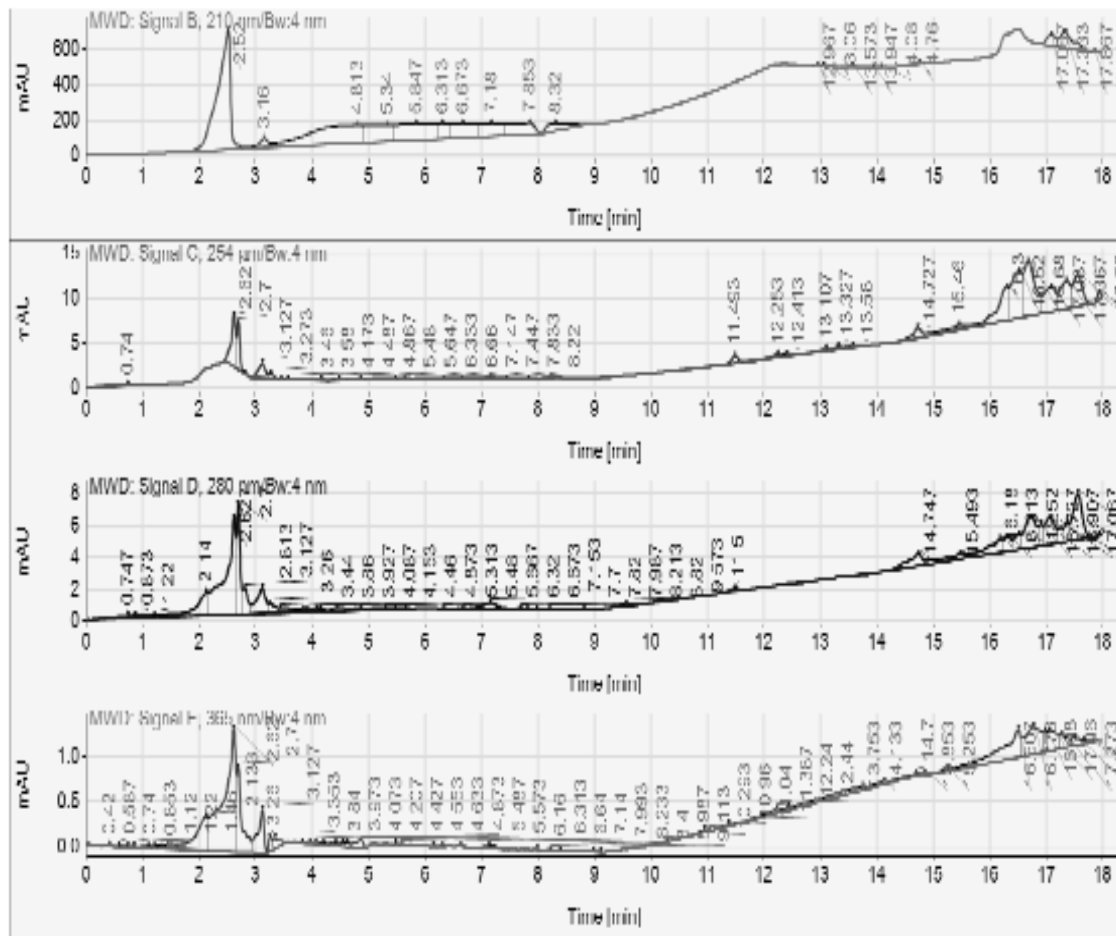


Sample\_Description Grace /Alltima C18/ 5 um , 250 mm x 4.6 mm  
 Metodo: DI-01 Agua/Metanol 50:50 (5'), MeOH 100 (13') (17'),  
 MeOH/Agua 50:50 (18') (19')

flujo: 08 ml/min  
 [C]=2.0 mg/0.5 ml en agua/metanol, 20:80

## H. *Duddingtonia flagrans* en medio Czapek Dox con inductor ECL

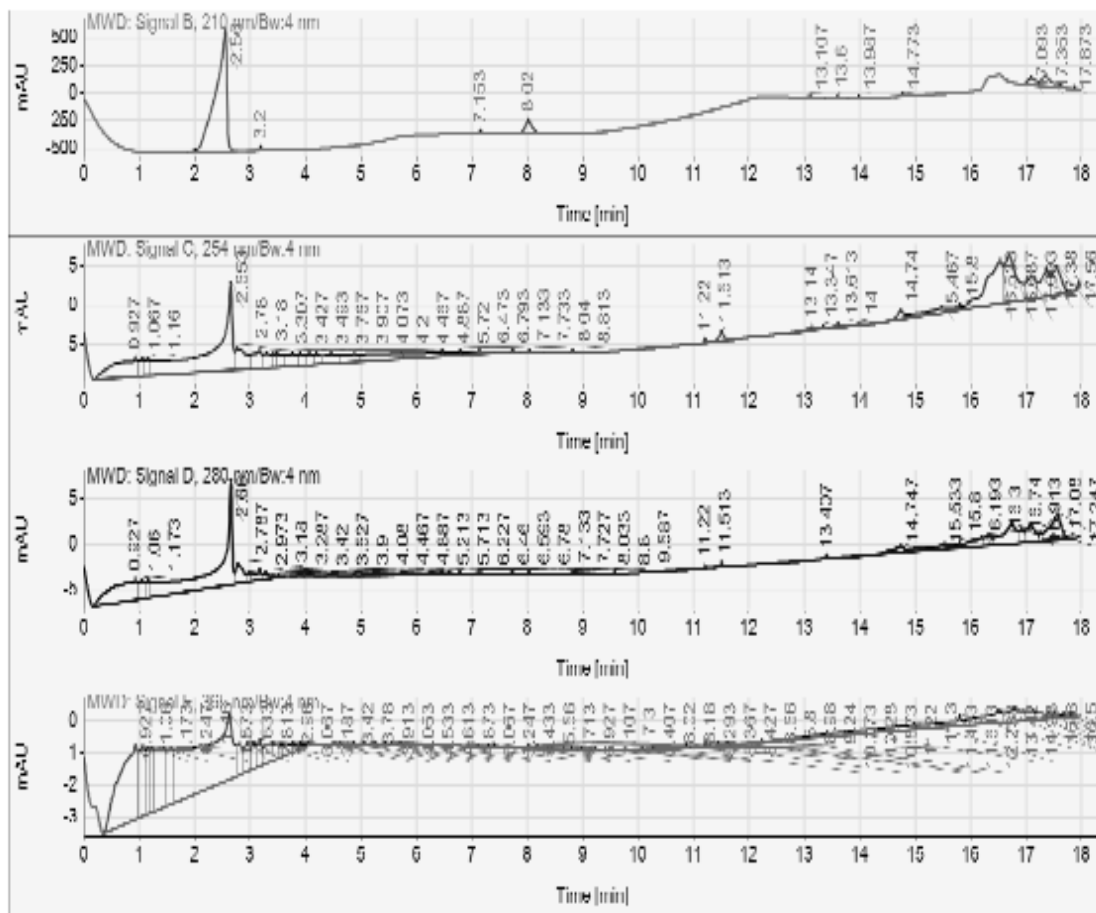
Data file: DFCD1 (001) 2019-02-01 15-38-15 (GMT -08-00).dat  
 Sample name: DFCD1 (001)  
 Injection date: 2/1/2019 3:40:00 PM Sample type: Sample  
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\Marcela\Result\DFCD1 (001).rslt\DI-01.met Location:  
 Analysis method: DI-01.met Injection: 1  
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:  
 Last changed: 2/19/2018 11:41:04 AM



Sample\_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm  
 Metodo: DI-01  
 MeOH/AGUA  
 flujo: 0.8 ml/min  
 [C]=2 mg/ 0.5 ml

I. *Clonostachys rosea* en medio Czapek Dox sin inductor ECL

Data file: CRCD (001)2019-01-31 15-39-31 (GMT -06-00).dat  
 Sample name: CRCD (001)  
 Injection date: 1/31/2019 3:40:09 PM Sample type: Sample  
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\IM Location: arcela\Result\CRCD (001).rslt\DI-01.met  
 Analysis method: DI-01.met Injection: 1  
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:  
 Last changed: 2/19/2018 11:41:04 AM



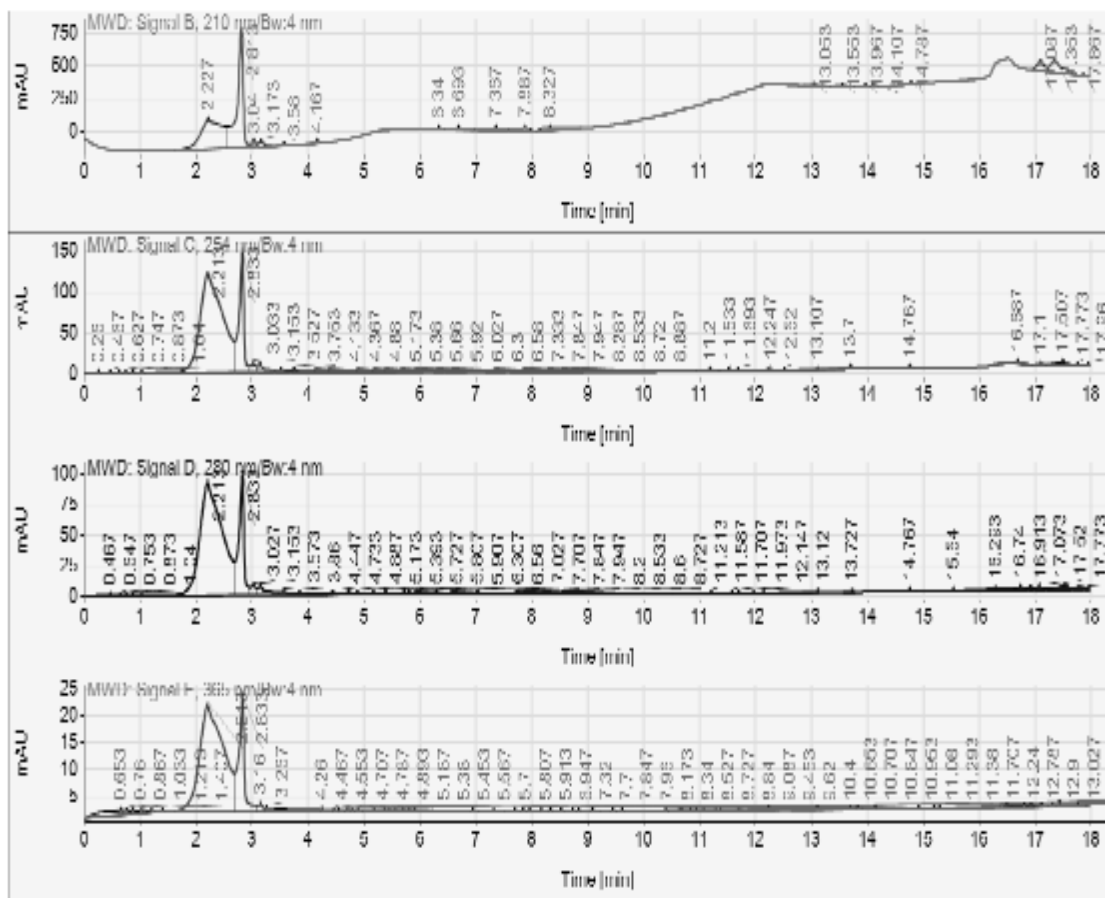
Sample\_Description Grace /Alltima C18/ 5 um , 250 mm x 4.6 mm  
 Metodo: DI-01 Agua/Metanol 50:50 (5'), MeOH 100 (13') (17'),  
 MeOH/Agua 50:50 (18') (19')

flujo: 08 ml/min

[C]=2.0 mg/0.5 ml en agua/metanol, 20:80

### J. *Clonostachys rosea* en medio Czapek Dox con inductor ECL

Data file: CRCDD1 (001) 2019-02-01 16-01-05 (GMT -06-00).dat  
 Sample name: CRCDD1 (001)  
 Injection date: 2/1/2019 4:01:48 PM Sample type: Sample  
 Acq. method: C:\Enterprise\Projects\W arcela\Result\CRCDD1 (001).rslt\DI-01.met Location:  
 Analysis method: DI-01.met Injection: 1  
 Acq. operator: SYSTEM (SYSTEM) Injection volume:  
 Last changed: 2/19/2018 11:41:04 AM



Sample\_Description Grace /Alltima C18 / 5 um , 250 mm x 4.6 mm  
 Metodo: DI-01  
 MeOH/AGUA  
 flujo: 0.8 ml/min  
 [C]=2 mg/ 0.5 ml