



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

Posgrado en microbiología

TESIS:

**"ESTUDIO DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE *PARABURKHOLDERIA*
SP. GB99 CONTRA HONGOS PATÓGENOS EN CULTIVO DE CAFÉ"**

GRADO ACADÉMICO A OBTENER

MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

Con opción en Bioquímica y Genética microbiana

P R E S E N T A:

ING. GRISEL RUIZ ANDRADE

DIRECTORA DE TESIS

D.C. VIANEY MARÍN CEVADA

H. de Puebla de Z. a 30 de Octubre de 2024.



BUAP

Puebla, Pue. a 30 de octubre 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Grisel Ruíz Andrade**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Estudio del efecto antagonico de *Paraburkholderia* sp. GB99 contra hongos patógenos en el cultivo del café”

A nuestro juicio, la alumna **Grisel Ruíz Andrade** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

D.C. Liliana López Pliego



D.C. Miguel Castañeda Lucio

D.C. Jesús Muñoz Rojas

D.C. Lidia Esmeralda García Díaz

AGRADECIMIENTOS

A Ofir Saa Barona y Porfirio Martínez Ortiz por ser siempre el impulsivo, el amor y dedicación en la llamada de mi corazón, por ser aquellos quienes me dedican sus conocimientos, sabidurías y acompañamiento para emprender y estar en cada etapa de mi vida.

A mi familia mi mamá, mi papá y mis hermanas por siempre brindarme su amor, su apoyo, su acompañamiento a lo largo de mi existencia y en cada una de mis etapas de formación con todo mi amor y cariño de verme crecer.

A mis mejores amigas Rosalía, Jani, Azu, Chío, Fer, Verito y Citlali quienes siempre fueron el pilar tanto de mis tristezas como alegrías, quienes me brindan su amor incondicional y me defienden a capa y espada.

A la D.C. Vianey Marín Cevada por elegirme, ante todo, brindarme su confianza como mujer y amiga, por brindarme su apoyo y dirección para lograr este trabajo y mi formación. A mi grupo de investigación los chicos, Rubén, Xime, Luz e Indi, por brindarme momentos muy agradables, su amistad, apoyo, conocimiento a lo largo de estos dos años.

A mi comité revisor: Dr. Jesús Muñoz Rojas por su conocimiento de vida, por defenderme y preocuparse en mi preparación durante el proyecto. Dr. Miguel Castañeda Lucio por ser el mejor colega a través de mi formación, por escucharme, exigirme, enseñarme, brindarme su compañerismo y amistad junto a su grupo y sobre todo creer en mí. Dra. Liliana López Pliego, por ser una gran maestra en el tema de la bioinformática, por creer siempre en mí, brindarme su apoyo en todo momento y acompañado de muchas alegrías. Dra. Lidia Esmeralda García Díaz por permitirme trabajar con ella, ser mi cómplice en el conocimiento químico, ser una persona que apoya la creatividad en el trabajo y la vida. Dr. Yagul Pedraza Pérez, por todo su conocimiento, enseñanza, paciencia, pláticas muy divertidas dentro de todo el desarrollo de este proyecto.

A todos los doctores que fueron parte de mi formación: Sandra, Vero Quintero, Rayo, Lolita, Luis Ernesto, José Munive, Cande, por brindarme valentía ante lo desconocido, por apoyarme con su conocimiento para lograr este proyecto, por alegrarse de mis metas, ser grandes seres humanos y únicos.

A todos mis compañeros de generación, quienes me apoyaron en lo desconocido, me brindaron su confianza, por los momentos muy divertidos. También a todas mis amistades del laboratorio, Majo, Karla, Ana, Kate, Mayra, Mari, Ale y todos aquellos que aún me falten sus nombres, pero están justo aquí en mis agradecimientos.

Al Instituto de investigación en Ciencias Microbiológicas y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa y al CONACYT como becaria 823452.

Índice de tablas

Tabla 1. Fitopatógenos principales que afectan el cultivo del café.	12
Tabla 2. Metabolitos secundarios producidos por diversas especies del género <i>Burkholderia</i>	18
Tabla 3. Parámetros de los diferentes ensamblajes realizados.	24
Tabla 4. Resultados de los diferentes ensamblajes realizados.	40
Tabla 5. Resultados obtenidos de la búsqueda realizada en BLASTn de los genes biosintéticos del antifúngico pirrolnitrina a partir de secuencias <i>query</i> de <i>B. cepacia</i> y <i>B. pyrrocinia</i>	41
Tabla 6. Resultados obtenidos de la búsqueda realizada en BLASTn de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina a partir de secuencias <i>query</i> de <i>B. contaminans</i> , <i>B. ambifaria</i> y <i>B. pyrrocinia</i>	42
Tabla 7. Resultados obtenidos del alineamiento global de los genes biosintéticos, A) Genes de biosíntesis, B) Genes de regulación y C) Genes de transporte.	43
Tabla 7. Espectro de masas de la occidiofungina A, B, C y D de la primera muestra.	54
Tabla 8. Espectro de masas de la occidiofungina A, B, C y D de la segunda muestra.	55

Índice de figuras

Figura 1. Características microscópicas de <i>F. solani</i>	12
Figura 2. Ciclo de vida de <i>F. solani</i>	13
Figura 3. Géneros válidos actuales de <i>Burkholderia</i> sensu lato y las especies más estudiadas para la producción de metabolitos secundarios.	15
Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento del diámetro de <i>F. solani</i> por método de medio envenenado sólido, A) Metabolitos obtenidos por fuente de Xilosa 3%, B) Metabolitos obtenidos por fuente de Fructosa 2%. El análisis se realizó mediante ANOVA de una vía ($p > 0.0001$). Cada barra representa la media ($n=3$), con barras de error estándar de la media.	26
Figura 5. Antagonismo de <i>F. solani</i> por método de medio envenenado sólido a 10, 30, 50% más el control. A) Metabolitos obtenidos por fuente de Xilosa 3%, B) Metabolitos obtenidos por fuente de Fructosa 2%.....	27
Figura 6. A) Control, B) Presencia de Fusarrubina, C) Estructura de esporoquicio y D) Estructuras de macro y micro conidias, bajo observación microscópica a objetivo de 40 X de la estructura de esporoquicio.	28
Figura 7. A) Control, con hifas desarrolladas con normalidad, sin afectación. B) y C) Presencia de estructuras de globo asociadas a daño estructural.....	29
Figura 8. Peso fresco y peso seco obtenido de medio envenenado, A-C) Metabolitos secundarios, 30% y 50% Fuente Xilosa 3%, C-D) Metabolitos secundarios, 30%-50% Fuente Fructosa 2%. El análisis se realizó mediante ANOVA de una vía ($p > 0.0005$). Cada barra representa la media ($n=4$), con barras de error estándar de la media.	30
Figura 9. Antagonismo en medio líquido por método de medio envenenado, A) Control, B) 30%, C) 50% metabolitos obtenidos en Fuente de Xilosa 3%, D) 30%, E) 50% metabolitos obtenidos en Fuente de Fructosa 2%.	31

Figura 10. Antagonismo en medio líquido por método de medio envenenado, A) Control, B) 30%, C) 50% metabolitos obtenidos a partir de fuente de Xilosa 3% y Fructosa 2%, las esporas viables retienen el colorante y las esporas no viables se observan traslucidas. 32

Figura 11. A) Conteo de esporas viables, B) Conteo de esporas no viables, a partir de metabolitos obtenidos por fuente de Xilosa 3% en medio envenenado sólido. ANOVA de una vía ($p > 0.0001$). Cada barra representa la media ($n=30$), con barras de error estándar de la media. 33

Figura 12. A) Conteo de esporas viables, B) Conteo de esporas no viables, a partir de metabolitos obtenidos por fuente de Fructosa 2% en medio envenenado sólido. ANOVA de una vía ($p > 0.0001$). Cada barra representa la media ($n=30$), con barras de error estándar de la media. 34

Figura 13. A) Conteo de esporas viables, B) Conteo de esporas no viables, a partir de metabolitos obtenidos por fuente de Xilosa 3% en medio envenenado líquido. ANOVA de una vía ($p > 0.0001$). Cada barra representa la media ($n=30$), con barras de error estándar de la media. 35

Figura 14. C) Conteo de esporas viables, D) Conteo de esporas no viables, a partir de metabolitos obtenidos por fuente de Fructosa 2% en medio envenenado líquido. ANOVA de una vía ($p > 0.0001$). Cada barra representa la media ($n=30$), con barras de error estándar de la media. 40

Figura 15. Resultados de la búsqueda de conservación de dominios de los genes de *biosíntesis* con su respectivo porcentaje de alineamiento, donde cada ícono representa a la cepa GB99 y las *query*. 41

Figura 16. Resultados de la búsqueda de conservación de dominios de los genes de *regulación* con su respectivo porcentaje de alineamiento, donde cada ícono representa a la cepa GB99 y las *query*. 42

Figura 17. Resultados de la búsqueda de conservación de dominios de los genes de *transporte* con su respectivo porcentaje de alineamiento, donde cada ícono representa a la cepa GB99 y las *query*. 43

Figura 18. Mapa de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina de la cepa GB99 y las <i>Burkholderias</i> utilizadas como <i>query</i>.	44
Figura 19. A) Muestra obtenida por la concentración por rotavapor, B) Muestras totalmente secas para llevar a resuspensión.	46
Figura 20. Detección de los antifúngicos producidos por la cepa GB99 mediante TLC utilizando las cinco muestras preparadas con los siguientes sistemas: A) Sistema uno, B) Sistema dos, C) Sistema tres y D) Sistema cuatro se señala con flechas roja la separación en cada zona.	47
Figura 21. Bioautografía realizada en los siguientes sistemas A) Sistema uno, B) Sistema dos, C) Sistema tres y D) Sistema cuatro, destacando en cada uno con una flecha roja los que presentaron mayor área de antagonismo.	48
Figura 22. Antagonismo por método de difusión de pozos, A) Control, B) M052, C) GB99 y D) Fracción II.	51

Índice

RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Fitopatógeno <i>Fusarium solani</i>	13
2.2 <i>Burkholderia</i> sensu lato	15
2.3 Medidas de control para hongos fitopatógenos del cultivo de café	19
3. JUSTIFICACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
4. OBJETIVOS.....	21
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Obtención de metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99	22
5.2 Evaluar <i>in vitro</i> la capacidad antagónica de los metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99 contra <i>Fusarium solani</i>	22
5.3 Prueba de viabilidad de esporas a partir de método de medio envenenado sólido-líquido	23
5.4 Análisis estadístico aplicado para evaluar el porcentaje de inhibición del diámetro y prueba de viabilidad de esporas.....	23
5.5 Secuenciación del genoma de la cepa GB99 y análisis de calidad de las secuencias.	23
5.6 Realización de diversos ensamblajes, manejo de su calidad y anotación del genoma de la cepa GB99.....	24
5.7 Búsqueda de los genes biosintéticos de los antifúngicos pirrolnitrina y occidiofungina en el genoma de la cepa GB99.	25
5.8 Alineamiento global y búsqueda de dominios mediante la plataforma de SMART PROTEIN de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina.	25
5.9 Construcción del mapa de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina.	26
5.10 Extracción y concentración de los metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99.....	26

5.11 Detección cualitativa de los antifúngicos producidos por la cepa GB99 mediante TLC (Thin-Layer Chromatography).....	26
5.12 Detección cuantitativa del antifúngico occidiofungina mediante análisis cromatográfico HPLC-Masas.....	27
5.13 Recolección y concentración del antifúngico occidiofungina.	27
5.14 Ensayo de antagonismo mediante la técnica de difusión de pozos del antifúngico occidiofungina.	27
5.15 Concentración mínima fungicida del antifúngico occidiofungina. . ¡Error! Marcador no definido.	
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1 Evaluar <i>in vitro</i> la capacidad antagónica producida por la cepa GB99 contra <i>F. solani</i>	28
A. Método envenenado sólido.....	28
B. Método envenenado líquido	32
C. Prueba de viabilidad de esporas a partir de método de medio envenenado sólido-líquido	36
6.2 Realizar un análisis bioinformático de los genes biosintéticos de los antifúngicos occidiofungina y pirrolnitrina en el genoma de la cepa GB99”.....	39
A. Secuenciación del genoma de la cepa GB99 y análisis de calidad de las secuencias. 39	
B. Realización de diversos ensamblajes, manejo de su calidad y anotación del genoma de la cepa GB99.	40
C. Búsqueda de los genes biosintéticos de los antifúngicos pirrolnitrina y occidiofungina en el genoma de la cepa GB99.....	41
D. Alineamiento global y búsqueda de dominios mediante la plataforma de SMART PROTEIN de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina.....	42
E. Construcción del mapa de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina. 47	
6.3 Establecer un método para extraer, concentrar, detectar e identificar los antifúngicos.....	50
A. Extracción y concentración de los metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99.....	50
B. Detección de los antifúngicos producidos por la cepa GB99 mediante TLC (Thin-Layer Chromatography).....	50

C. Detección del antifúngico occidiofungina mediante análisis cromatográfico HPLC-Masas.	53
D. Recolección y concentración del antifúngico occidiofungina.	56
E. Ensayo de antagonismo mediante la técnica de difusión de pozos del antifúngico occidiofungina.	56
7. PERSPECTIVAS	60
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. ANEXOS	70

RESUMEN

Dentro del género *Burkholderia* existe una amplia gama de especies capaces de producir una gran diversidad de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y antifúngica. Se han reportado varios compuestos como pirrolnitrina, occidiofungina, burkholdines, fenazina entre otros, que desatacan por tener actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos que afectan a cultivos de importancia económica como café, maíz, frijol, jitomate, etc. En el presente trabajo se analizó la cepa GB99 aislada de la rizosfera de maguey (*Agave* sp.) perteneciente al cepario del grupo *Burkholderia sensu lato*, para evaluar la capacidad antifúngica frente a *F. solani* de los metabolitos secundarios producidos a partir de dos fuentes de carbono Xilosa 3% y Fructosa 2%. La técnica de medio envenenando sólido-líquido demostró que los metabolitos secundarios producidos en ambas fuentes de carbono tienen efecto fungistático en porcentajes de 30-50% a partir de medio sólido y efecto fungicida en porcentajes de 30-50% a partir de medio líquido, además de afectar al hongo a nivel macro-microscópico presentando estructuras de esporodocios, producción de fusarubina y estructuras de globo asociadas a la presencia de dos posibles antifúngicos pirrolnitrina y occidiofungina. También se evaluó la viabilidad de esporas de los metabolitos secundarios producidos en ambas fuentes de carbono, destacando los porcentajes de 30-50% en medio sólido con el mayor número de esporas no viables y de igual manera en medio líquido.

Para corroborar que en efecto los antifúngicos pirrolnitrina y occidiofungina se encuentren a nivel del genoma de la cepa GB99, se realizó el análisis bioinformático conformado por la secuenciación, ensamble del genoma, análisis de calidad del ensamble, búsqueda Blastn de los genes biosintéticos, alineamiento global, búsqueda de conservación de dominios y mapa de los genes biosintéticos. Como parte de los resultados, se corroboró que la cepa GB99 tiene presente los genes biosintéticos con los dominios conservados para la producción del antifúngico occidiofungina. Sin embargo, para asegurar de que la cepa GB99 realmente es capaz de producir este antifúngico, se llevó a cabo la extracción y concentración general de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de la fuente de carbono Xilosa 3%, donde se observó que la resina Amberlita XAD-16 es útil para la adsorción de estos. Posteriormente se concentró por rotavapor para realizar la detección cualitativa mediante TLC (Thin-Layer Chromatography), observando que posiblemente este antifúngico puede ser polar o moderadamente polar y concuerda con el antagonismo obtenido en la bioautografía contra *F. solani*. La detección cuantitativa fue realizada mediante HPLC-Masas con las masas ya reportadas por Gu *et al*, 2009, donde en efecto se detectaron las occidiofunginas A, B, C y D, las cuales fueron evaluadas en conjunto mediante la técnica de difusión de pozos y en efecto presenta antagonismo frente a *F. solani*. Concluyendo que la cepa GB99 tiene los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina y es capaz de producirlo, a partir de fuente de carbono Xilosa 3%.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de café es de gran relevancia económica y social a nivel mundial, siendo una de las principales materias primas en el mercado global y fundamental para las economías de muchos países en desarrollo, donde proporciona empleo a millones de personas en la producción, procesamiento y comercialización. Según la Organización Internacional del Café, la producción total de todos los países exportadores fue de 8,88 millones de toneladas de café verde en la cosecha de café 2015/2016, las exportaciones totales en ese año alcanzaron los 6,71 millones de toneladas, por un valor aproximado de 17 700 millones de dólares (Avelino *et al.*, 2018). Dentro del cultivo del café se maneja hoy en día dos especies principales de café *C. arabica* (Arabiga) ocupa el primer lugar, representando el 63,5% de las exportaciones en el año cafetero 2015/2016 y la segunda especie es *Coffea canephora* (Robusta), que representa casi el 36.5% de la producción mundial en el mismo año de cosecha de café (Avelino *et al.*, 2018).

Por otro lado, la importancia del cultivo de café en México radica principalmente en su producción, empleando a más de 500 mil productores de 15 entidades federativas y 480 municipios. La producción mexicana de café cereza fue en promedio de 899 mil toneladas en el periodo 2017-2021. Para el año del 2022, los tres estados principales en producción de café cerezo fueron Chiapas con 111,528 ton, Puebla 106,992 ton y Veracruz 106,846 ton, los cuales aportan 30.3%, 29.1% y 29.0% (SIAP, 2022). Respectivamente, Puebla reporta el mayor incremento con 29 mil 678 toneladas más, en relación con lo obtenido a la producción obtenida en el año del 2019-2020 (SIAP, 2022). Asimismo, la producción de café tiene un papel crucial en la economía local dentro del Estado de Puebla, generando ingresos significativos para los pequeños productores y sus familias.

Actualmente, existen 54 municipios productores de café en el Estado de Puebla, de los cuales diez de ellos destacan por su valor de producción y extensión de tierras cultivadas y que, a su vez, son los pilares de la industria cafetalera poblana, contribuyendo significativamente al éxito de la región (SIAP, 2024): Xicotepec 7,201.40 ha, Zihuateutla 6,303.60 ha, Cuetzalan del Progreso 5,177 ha, Hueytamalco 4,806 ha, Jalpan 3,636 ha, Jopala 3,606 ha, Tlacuilotepec 3,324 ha, San Sebastián Tlacotepec 2,905 ha, Tlaola 2,180 ha y Tlaxco 2,040.50 ha. Además, la producción de café contribuye a la preservación de ecosistemas y la biodiversidad en la región, ya que muchas plantaciones se manejan de manera sostenible y bajo sombra.

Sin embargo, el cultivo de café está expuesto a muchas plagas y enfermedades que suelen estar asociadas al bajo rendimiento del cultivo y no obstante a la pérdida económica del agricultor. Existe una gran diversidad de fitopatógenos que pueden atacar a este cultivo, dentro de ellos encontramos una gran diversidad de hongos fitopatógenos que son capaces de invadir desde raíz, tallo, flor y fruto como se muestra en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Fitopatógenos principales que afectan el cultivo del café.

Hongo fitopatógeno	Síntomas	Referencia bibliográfica
<i>Hemileia vastatrix</i>	Aparición de manchas de color amarillo-naranja o rojo-anaranjado en el envés de la hoja, que van aumentando de tamaño gradualmente, esto por el desarrollo de uredosporas. Estas últimas son las estructuras en cargadas de la supervivencia e infección del hongo y pueden causar hasta un 60 % de defoliación.	Vidal-Martínez, 2021.
<i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Causan la marchitez y pudrición de las raíces, afectando severamente la salud y productividad del café.	AL-Faifi, 2022.
<i>Colletotrichum spp.</i>	Causante de la antracnosis o enfermedad de la cereza del café, afectando los frutos y reduciendo la calidad del grano.	AL-Faifi, 2022.
<i>Cercospora coffeicola</i>	Las manchas se presentan en ambas caras (haz y envés) y son redondas, con un diámetro aproximado de 1-3 mm. Tienen un centro blanco grisáceo, rodeado por un anillo marginal uniforme de color rojizo o marrón. En los frutos, el pergamino se mancha y la pulpa se adhiere a los granos, causando deformidad en la almendra.	Vidal-Martínez, 2021.
<i>Mycena citricolor</i>	Las hojas de café son la principal estructura afectada, presentando manchas circulares de color pardo rojizo que rodean de un halo amarillento, que contrastan con las áreas verdes de la superficie de la hoja. Esta condición causa defoliación, lo que disminuye la capacidad fotosintética de la planta, y afecta su desarrollo y producción.	Vidal-Martínez, 2021.
<i>Phoma spp.</i>	Los tallos se encogen, dando lugar a arrugas longitudinales. Las puntas de las hojas se tornan amarillas o, más a menudo, adquieren un color bronce cobrizo.	Leyva-Mir, 2019.
<i>Rhizoctonia solani</i>	Provoca la enfermedad del <i>colapso del café</i> , afectando las raíces y el cuello de la planta, lo que conduce a la marchitez y muerte de plantas jóvenes.	Sudha <i>et al.</i> , 2020.
<i>Armillaria mellea</i>	Es causante de la pudrición de la raíz, afectando severamente el sistema radicular, lo que debilita la planta y provoca la muerte de plantas adultas.	Zewdie <i>et al.</i> , 2020.
<i>Verticillium spp.</i>	Es responsable de la marchitez, afectando el sistema vascular de la planta, lo que causa marchitez y muerte regresiva.	Jepkoech <i>et al.</i> , 2021.

<i>Botrytis cinerea</i>	Causa la <i>podredumbre gris</i> , afectando principalmente los frutos y las flores, lo que reduce la calidad y el rendimiento de la cosecha.	Alvarado-Ambriz, 2020.
--------------------------------	---	------------------------

Los fitopatógenos de mayor importancia presentes en este cultivo son *H. vastatrix* y *F. solani*, el primero se caracteriza por generar pérdidas hasta en un 50 % en el ciclo productivo 2011-2012 (Monroy *et al.*, 2019). El segundo se caracteriza por generar pérdidas hasta del 40% en el rendimiento de este cultivo (González *et al.*, 2020). Para controlar dichas enfermedades, se han utilizado desde aplicaciones agroquímicas, métodos culturales, métodos físicos y control biológico, esta última estrategia ha tenido una relevancia importante debido al uso de microorganismos o sus metabolitos que son enemigos naturales de estos fitopatógenos y no impactan de manera negativa en el ecosistema (Carreón *et al.*, 2007). Dentro del control biológico, se ha estudiado el género *Burkholderia* spp., por su capacidad para producir metabolitos secundarios con efecto antimicrobiano y controlar los hongos fitopatógenos que afectan al cultivo del café (Bach *et al.*, 2021).

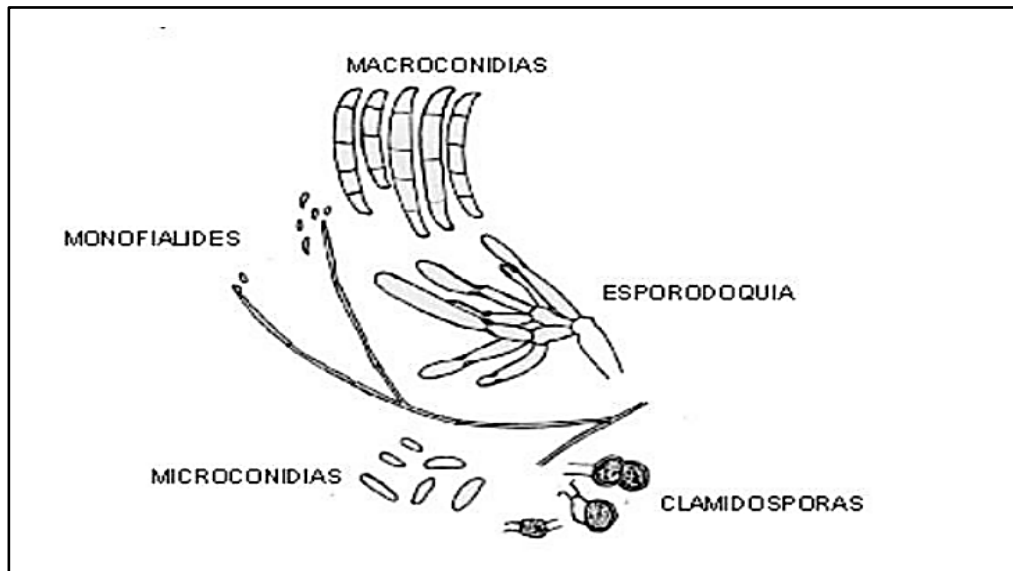
2. ANTECEDENTES

2.1 Fitopatógeno *Fusarium solani*

Fusarium solani es un hongo fitopatógeno que causa diversas enfermedades en una amplia gama de plantas, particularmente problemático en cultivos debido a su capacidad para sobrevivir en el suelo y atacar las raíces de las plantas, causando marchitez y podredumbre radicular. Se han registrado unas 20 especies, entre ellas *F. stilboides*, *F. xylarioides*, *F. oxysporum* y *F. solani* aisladas a partir de especímenes de café en el Herbario del Instituto Micológico Internacional (Flood y Brayford, 1997). La especie patógena en cultivo de café de importancia económica es *F. Solani*, este produce pudrición seca de la raíz y marchitez del cafeto (Serani *et al.*, 2007).

A nivel morfológico, este hongo se caracteriza por tener un micelio blanquecino a café, sus conidios son de dos tipos: microconidios y macroconidios. Los microconidios son pequeños, unicelulares y de forma ovalada, estos se forman en el micelio aéreo a partir de monofiálides o polifiálides, pero no en el esporodoquio, se pueden ver aislados, en masas o en cadenas (Salas-Tigrero, 2022). Mientras que los macroconidios son más grandes, multicelulares de forma fusiforme con extremos puntiagudos y puede formar una estructura especializada llamada esporodoquio, como también en monofiálides, polifiálides y en el micelio aéreo. Los esporodoquios son masas de conidióforos cortos y estrechamente ramificados que nacen directamente de una maraña de hifas (Salas-Tigrero, 2022). Además, este hongo produce clamidosporas, que son células resistentes de paredes gruesas, generalmente de forma esférica o elíptica, que le permiten sobrevivir en condiciones adversas como se observa en la Fig. 1.

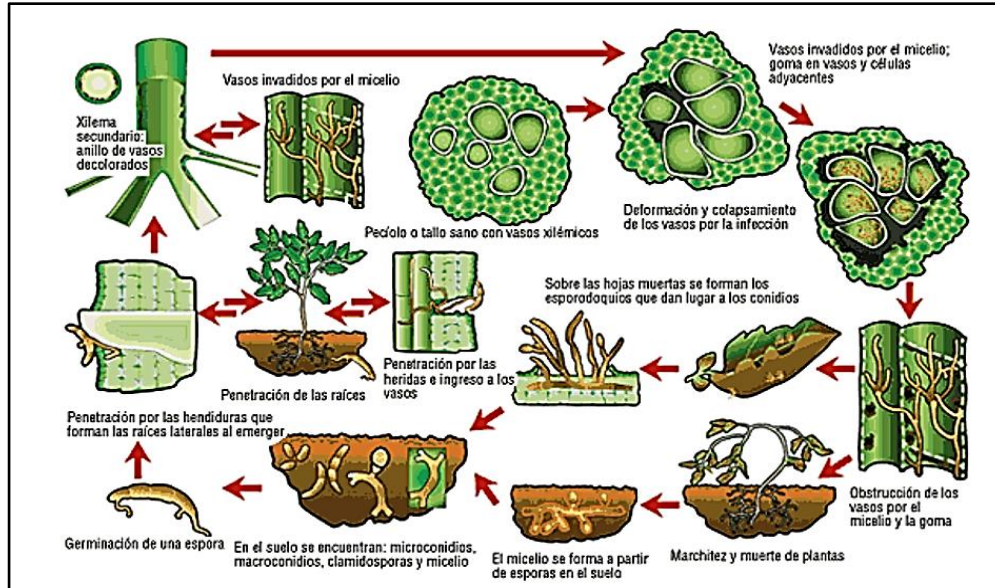
Figura 1. Características microscópicas de *F. solani*.



Fuente: Salas-Tigrero, 2022.

El ciclo de vida de *F. solani* comienza con la germinación de sus esporas en presencia de condiciones favorables de humedad y temperatura además de la presencia de restos vegetales. Una vez germinadas las macroconidias, comienza a desarrollarse el micelio el cual invade los tejidos de la planta huésped principalmente migrando hacia el xilema y floema, causando necrosis y descomposición de las raíces (Ali *et al.*, 2023). Los mecanismos que desencadenan la aparición de los síntomas en ambos casos pueden deberse a la obstrucción del sistema vascular de la planta o bien a la producción de toxinas por parte del fitopatógeno y a medida que la infección progresa, el hongo produce esporas adicionales que pueden dispersarse a través del suelo y el agua, infectando nuevas plantas. Sin embargo, las clamidosporas permiten que el hongo sobreviva en el suelo durante períodos desfavorables, reactivándose cuando las condiciones mejoran como se observa en la Fig. 2.

Figura 2. Ciclo de vida de *F. solani*.



Fuente: Salas-Tigrero, 2022.

Esta enfermedad se caracteriza por debilitar a las plantas al atacar sus raíces, reduciendo la absorción de nutrientes y agua, lo que resulta en un crecimiento pobre, clorosis de las hojas y eventualmente la muerte de la planta. La infección puede propagarse rápidamente en condiciones de alta humedad y suelos mal drenados, provocando pérdidas significativas en la producción del cultivo (Berruezo, 2018). Sin embargo, se ha reportado que *F. solani*, se encuentra entre los fitopatógenos principales que causan problemas en el rendimiento del cultivo de café, ocasionando bajo rendimiento y sobre todo pérdidas económicas para el agricultor (Gamboa-Becerra 2021).

2.2 *Burkholderia sensu lato*

El grupo *Burkholderia sensu lato* ha sido sujeto a un análisis exhaustivo, conduciendo a la división de siete géneros: *Burkholderia sensu stricto*, *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Robbsia*, *Mycetohabitans*, *Tricnikia* y *Pararobbsia*. Dentro de estos géneros existen algunas especies patógenas oportunistas de humanos, animales, plantas y también algunas especies que son promotoras benéficas en plantas, encontrándose a nivel de la rizosfera, donde establecen una relación beneficiosa (Coenye y Vandamme., 2003; Depoorter et al., 2016). El género *Burkholderia* pertenece al subfilo de las β -proteobacterias, se caracteriza morfológicamente por ser bacilos Gram negativos, aerobios, rectos o ligeramente curvados, con extremos redondeados y generalmente móviles por tener flagelos polares, además presentan oxidasa y catalasa positivos. Las diferentes especies de este género son capaces de crecer en presencia de escasa fuente de carbono, debido a la acumulación de gránulos poli- β -hidroxibutirato (PHB) que utilizan como material de reserva energética (Palleroni et al., 2015).

También se han reportado análisis de pangenomas de *Burkholderia* sensu lato, *Burkholderia* sensu stricto y del complejo de *Burkholderia cepacia* (Bcc). Las especies pertenecientes a *Burkholderia* sensu stricto poseen una estructura genómica inusual formada por múltiples replicones, mientras que los demás genomas están compuestos por dos o tres cromosomas. Para el caso de las especies de Bcc, poseen un cromosoma adicional que puede no ser esencial y considerarse un megaplásmido que codifica genes relacionados con la virulencia, el metabolismo secundario y otras funciones accesorias (Jiayuanjia y Shi-En lu, 2023).

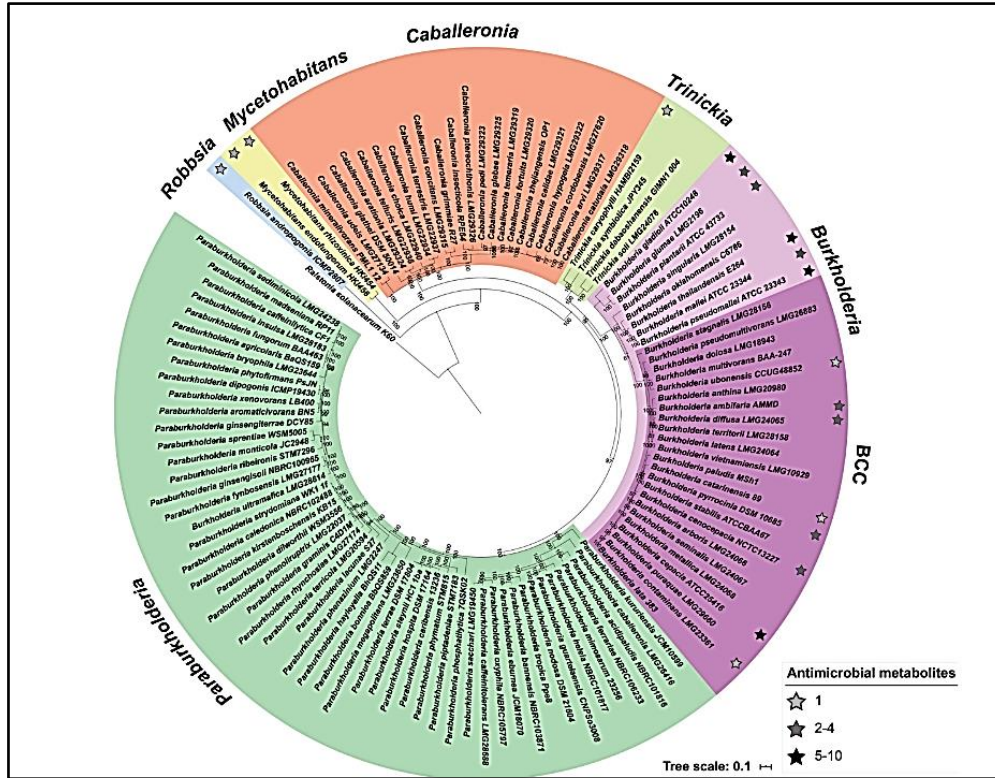
En el caso de *Burkholderia* sensu lato, los tamaños genómicos oscilan entre 3,28 Mb (*Mycetohabitans endofungorum*) y 11,5 Mb (*Paraburkholderia hospital*) (Bach *et al.*, 2021). Esta amplia variación en el tamaño del genoma podría estar relacionada, al menos en parte, con su notable versatilidad metabólica. Sin embargo, en un análisis pangenómico que incluyó nueve cepas endofíticas y treinta y tres cepas tipo, se identificó un pangenoma extenso y “abierto”, lo que sugiere que las cepas del género *Burkholderia* poseen una alta capacidad adaptativa. No se encontraron diferencias significativas entre los genes accesorios y únicos de las cepas endofíticas, lo que indica que estas comparten características comunes a nivel genético general (Jiayuanjia y Shi-En lu, 2023). Al comparar 2506 genes centrales y 6183 genes accesorios de las cepas endofíticas con la base de datos de cepas tipo *Burkholderia*, se identificaron 224 genes asociados al comportamiento endofítico (Jiayuanjia y Shi-En lu, 2023).

Existe una diversidad significativa de especies clasificadas tanto perjudiciales como beneficiosas que viven asociadas con la rizosfera de la mayoría de los cultivos agrícolas. Actualmente existe alrededor de 100 especies con una amplia distribución en diversos nichos ecológicos, donde se ha descrito la importancia relacionada a la versatilidad y la capacidad que tiene el género *Burkholderia* para desarrollarse en numerosos hábitats y estilos de vida diferentes (Barrera-Galicia 2021).

Sin embargo, estudios filogenómicos realizados entre los diferentes géneros, condujeron a encontrar especies dentro del género *Burkholderia* spp., consideradas como benéficas en plantas, debido a que son capaces de producir metabolitos secundarios que promueven el crecimiento nodular, pueden fijar nitrógeno en simbiosis con las leguminosas y controlar el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, a través de la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y antifúngica que podrían explotarse como inoculantes agrícolas, agentes de biocontrol o biorremediación (Bach *et al.*, 2022). También, se les reconoce por ser organismos multifacéticos que son ecológica y metabólicamente diversos, es decir, tiene potencial terapéutico y biotecnológico (Kunakom *et al.*, 2019).

A pesar de ello, existen diversos enfoques novedosos en la caracterización microbiana que pueden ayudar a explorar el exometaboloma en gran parte inexplorado de estos importantes microorganismos de la rizosfera, es decir, la exploración a nivel químico para la identificación de los metabolitos secundarios producidos que se sabe son secretados en una amplia gama, por ejemplo, cepalicina, pirrolnitrina, componentes del complejo xilocandina, occidiofungina y ornibactina que son activos contra patógenos fúngicos de plantas transmitidos por el suelo (Barrera-Galicia 2021).

Figura 3. Géneros válidos actuales de *Burkholderia* sensu lato y las especies más estudiadas para la producción de metabolitos secundarios.



Fuente: Bach *et al.*, 2022.

Estos metabolitos secundarios se generan en el sistema metabólico de la bacteria, donde se sintetizan a partir de sustratos que se originan en el metabolismo primario, aunque no son esenciales ni importantes como fuentes de energía o sustancias de reserva, confieren a las bacterias una ventaja de supervivencia antagónica, mejorando su competencia en ambientes como el suelo y la rizosfera vegetal (Mishra y Arora 2018). Hasta ahora, se han estudiado en profundidad dos metabolitos secundarios: la pirrolnitrina y la occidiofungina producidos por *B. contaminans*, *B. cepacia* y *B. pyrrocinia*. Se han identificado dos rutas metabólicas para su síntesis, una a partir de la degradación del triptófano y otra a través del grupo de sintasas peptídicas no ribosomales. No obstante, se han descrito un total de treinta y ocho metabolitos secundarios producidos por *Burkholderia* spp., de los cuales veintiuno tienen bioactividad, afectando directamente a hongos, bacterias y oomicetes (Bach *et al.*, 2021), como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Metabolitos secundarios producidos por diversas especies del género *Burkholderia*.

Metabolito secundario	Actividad	Especie
Bacteriocinas	<ul style="list-style-type: none"> Inhiben el alargamiento de la transcripción. 	<i>B. cenocepacia</i> BC0425 <i>B. pseudomallei</i>
Bactobolina	<ul style="list-style-type: none"> Efecto antitumoral. Bloqueo de síntesis de proteína ribosomal L2 50S. 	<i>B. pseudomallei</i> <i>B. thailandensis</i>
Betulinano	<ul style="list-style-type: none"> Estudio en aplicaciones terapéuticas relacionadas a enfermedades de inflamatorias. 	<i>B. pseudomallei</i> <i>B. thailandensis</i>
Ácido bongkrekico	<ul style="list-style-type: none"> Inhibidor de cadena respiratoria mitocondrial. 	<i>B. gladioli</i>
Dicetopiperazinas	<ul style="list-style-type: none"> Efecto citotóxico en las células. 	<i>B. cepacia</i>
Gladiolina (Lagriene)	<ul style="list-style-type: none"> Se dirige a la ARN polimerasa, inhibiendo el alargamiento de la transcripción. 	<i>B. gladioli</i> BCC0238
Gladiofungina (Gladiostatina)	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antitumoral. 	<i>B. gladioli</i> HKI0739
Lagriamida	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antifúngica. 	<i>Burkholderia</i> sp. Lv-StB
Lipopéptidos	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antifúngica y antioomicetes. Interfieren con la membrana celular. 	<i>B. gladioli</i> , <i>B. cepacia</i> , <i>B. cenocepacia</i> , <i>B. pyrrocinia</i> , <i>B. ambifaria</i> , <i>B. catarinensis</i> .
Fenazinas	<ul style="list-style-type: none"> Desencadenan la formación de compuestos reactivos de oxígeno (ROS). 	<i>B. cepacia</i> ATCC25416, <i>B. glumae</i>
Fenilpirroles	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antifúngica. Inhibición del sistema respiratorio de transporte de electrones. 	<i>B. pyrrocinia</i>
Polienos	<ul style="list-style-type: none"> Actividad contra patógenos Gram negativos multirresistentes. 	<i>B. ambifaria</i> , <i>B. gladioli</i> , <i>B. multivorans</i> , <i>B. thailandensis</i> .
Poliinos	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antimicrobiana. 	<i>B. cepacia</i> , <i>B. gladioli</i> , <i>B. caryophylli</i> .
Pyochelin	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antimicrobiana y antifúngica. 	<i>B. seminalis</i>
Pirazoles	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antimicrobiana y antitumoral. 	<i>B. plantarii</i> , <i>B. glumae</i> .
Quinolonas	<ul style="list-style-type: none"> Interviene en la generación de energía a nivel de membrana. 	<i>B. thailandensis</i> .

Ramnolípidos	<ul style="list-style-type: none"> Relacionado con membrana, citotoxicidad, motilidad, etc. 	<i>Burkholderia</i> spp.
Sulfazecina	<ul style="list-style-type: none"> Dificulta la reticulación de los peptidoglicanos. 	<i>B. ubonensis</i>
Sirbactinas	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antifúngica y antitumoral. 	<i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. cepacia</i> .
Toxoflavina	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antimicrobiana, antifúngica. 	<i>B. glumae</i> , <i>B. gladioli</i> .
Troponoloides	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antimicrobiana e inhiben las metaloproteasas. 	<i>B. glumae</i> , <i>B. plantarii</i> .
Sinapigladiósido	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antimicrobiana y antifúngica. 	<i>B. gladioli</i> .
Volátiles	<ul style="list-style-type: none"> Actividad antimicrobiana y antifúngica. 	<i>B. pyrrocinia</i> , <i>B. ambifaria</i> , <i>P. tropica</i> .

Fuente: Bach *et al.*, 2022.

2.3 Medidas de control para hongos fitopatógenos del cultivo de café

Se ha llegado a aplicar diferentes MIPES (Manejo Integral de Plagas y Enfermedades) que se aplican en el cultivo de café, con el objetivo tanto de prevenir y minorizar la presencia de los hongos fitopatógenos que atacan a este cultivo. Dentro de estos podemos encontrar tres clasificaciones que son: control cultural, control químico y control biológico. Iniciando con el control cultural, se basa en prácticas culturales que juegan un papel crucial en la reducción de la incidencia y severidad de las enfermedades fúngicas. Estas incluyen podas regulares para mejorar la circulación del aire, reducir la humedad, el uso de sombra para mantener un microclima estable, y el manejo adecuado del drenaje para evitar el encharcamiento del suelo. Las prácticas no solo disminuyen la presencia de enfermedades, sino que también promueven la salud general de las plantas (Leyva-Mir, 2019). El monitoreo constante, el diagnóstico preciso y la vigilancia regular permiten detectar tempranamente los brotes de enfermedades y aplicar las medidas de control adecuadas antes de que las infecciones se propaguen. Además, la investigación científica ha fomentado la integración de tecnologías modernas como el uso de sistemas de información geográfica (SIG) y sensores especializados, especialmente para el diagnóstico de enfermedades en hojas de café. Estas tecnologías mejoran significativamente la capacidad de monitoreo y la gestión de datos, facilitando la toma de decisiones informadas y oportunas (Benavides *et al.*, 2013).

Consecutivamente, tenemos el control químico, el cual está basado en el uso de agroquímicos clasificados como fungicidas que reprimen el desarrollo del hongo fitopatógeno como: endosulfán, oxiclورو de cobre, hidróxido de sodio, caldo bordalés y Benomil. Entre los fungicidas más utilizados se encuentran el mancozeb, el clorotalonil, el cobre y el tebuconazol, estos productos son efectivos para controlar hongos como *Hemileia vastatrix*, causante de la roya del café, y *Fusarium solani*, que provoca la podredumbre radicular (Benavides *et al.*, 2013). Los fungicidas sintéticos ofrecen ventajas como una acción rápida y un amplio espectro de control, sin embargo, su uso también presenta

limitaciones significativas. La eficacia de estos productos puede verse comprometida por la aparición de resistencias en los patógenos debido al uso continuado y excesivo. Además, el control químico no aborda las causas subyacentes de las enfermedades, lo que puede resultar en una dependencia constante de estos productos, causando el impacto ambiental negativo, incluyendo la contaminación del suelo y del agua, y los riesgos para la salud humana y la biodiversidad (Cermeli *et al.*, 2018).

Por último, tenemos el control biológico, que implica el uso de microorganismos antagonistas como bacterias y hongos para manejar las enfermedades fúngicas. Existen microorganismos como *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. han mostrado eficacia en el control de patógenos del café. También tenemos el uso de los metabolitos secundarios producidos por los mismos microorganismos que funcionan como fungicidas, entre ellos encontramos *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Calcarisporium* sp., *Lecanicillium* spp., *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. los cuales han demostrado ser capaces de inhibir el crecimiento radial de *F. solani* en un 42% (Escobar *et al.*, 2004). Estos agentes de control biológico actúan a través de varios mecanismos, incluyendo la antibiosis, donde producen compuestos que inhiben o matan a los patógenos; la competencia, donde los antagonistas compiten con los patógenos por espacio y nutrientes; y la inducción de resistencia, donde estimulan las defensas naturales de la planta huésped (Hernández *et al.*, 2019).

Un ejemplo de control biológico exitoso en el cultivo de café es el uso de *Trichoderma harzianum*, que ha demostrado ser efectivo contra *F. solani*. En estudios de campo, la aplicación de *Trichoderma harzianum* ha reducido significativamente la incidencia de la podredumbre radicular, mejorando la salud de las plantas y aumentando los rendimientos de las cosechas. Estos resultados subrayan el potencial del control biológico como una herramienta sostenible y eficaz en el manejo de enfermedades fúngicas en el café (Vidal-Martínez, 2021).

Sin embargo, se ha estudiado el uso de los metabolitos secundarios producidos por las especies del género *Burkholderia*. Diversos estudios realizados en nuestro grupo de investigación por Antonio-Flores (2015), Vega-Aguilar (2015) Cervantes-Álvarez (2016) y Jiménez-Gómez (2019) analizaron 46 cepas del grupo *Burkholderia* sensu lato, las cuales fueron aisladas de la rizosfera de plantas como maíz, pino, bromelia, ajo, chile canario, mora azul, helecho, maguey, orquídeas, alcatraz y café provenientes de cinco regiones diferentes del estado de Puebla. En estos estudios se evaluó la capacidad para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos que afectan el cultivo del café. Entre las 46 cepas aisladas, la cepa GB99 destacó por inhibir el crecimiento radial de *F. solani* en un 49 %, de acuerdo con ensayos de antagonismo *in vitro* realizados utilizando técnicas de cultivos duales o de doble capa (Jiménez-Gómez 2019).

Este hallazgo sugiere que la bacteria puede producir metabolitos secundarios incluso en ausencia de los hongos fitopatógenos y que es capaz de dañar la pared celular del hongo *F.*

solani, observándose estructuras globulares dentro de las hifas del hongo que sugieren la acumulación de quitina (Jiménez-Gómez, 2019). Este fenómeno indica la posible presencia de antifúngicos específicos como pirrolnitrina y occidiofungina, así como el potencial de producción de otros compuestos antifúngicos como fenazina, glidobactina, toxoflavina y pioluterina (Parra-González *et al.*, 2009; Tenorio-Salgado *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de café es de gran importancia para los productores de México, constituyendo una parte esencial de su sustento económico tanto en términos de exportación como de importación. El cambio climático global ha incrementado la incidencia de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en este cultivo, generando pérdidas económicas importantes en su rentabilidad. La investigación en esta área busca desarrollar y evaluar nuevas estrategias enfocadas al control biológico de estas enfermedades. Actualmente, los cafeticultores recurren al uso de agroquímicos, lo que incrementa los costos de producción y provoca efectos nocivos en la salud de los mismos productores, además de causar daños al medio ambiente, como la degradación y contaminación del suelo, la contaminación del agua subterránea y la pérdida de flora y fauna beneficiosa.

En el presente trabajo se investigará la actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99, con el objetivo de proponer una alternativa de control biológico que beneficie la rentabilidad de los cafeticultores. Se busca que estos metabolitos sean de fácil aplicación, no alteren los nichos ecológicos de la rizosfera de las plantas de café y resulten eficientes en la reducción del daño causado por hongos fitopatógenos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antagónica de manera *in vitro* utilizando los metabolitos secundarios producidos por la cepa *Burkholderia* sp. GB99 frente a hongos fitopatógenos que afectan el cultivo del café.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar *in vitro* la capacidad antagónica producida por la cepa GB99 contra *F. solani*.
- Realizar un análisis bioinformático de los genes biosintéticos de los antifúngicos occidiofungina y pirrolnitrina en el genoma de la cepa GB99.
- Establecer un método para extraer, concentrar detectar e identificar los antifúngicos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99

Se utilizó el aislado GB99 perteneciente a la colección de 46 cepas del grupo *Burkholderia sensu lato*, la cual se encontraba en conservación en glicerol al 30% y almacenada a -80°C. La reactivación fue realizada en medio NB modificado y medio PCAT (Jiménez-Gómez, 2019) en sólido-líquido para comprobar su viabilidad y pureza. Una vez comprobada la viabilidad de los cultivos, se prepararon los pre-inóculos ajustándose a una densidad óptica de 0.05 abs a 600 nm. Para ello se tomó 3 ml del pre-inoculo y se inocularon en 200 ml de medio MM9 adicionado con fuente de carbono Xilosa 3% y Fructosa 2% por separado, su incubación fue durante 72 h/30°C.

Posteriormente los medios de cultivo se dejaron a baño María a 96 °C/30min y se centrifugo tres veces (4.500 x g, 30 minutos), para obtener un medio libre de células bacterianas no vivas. Una vez obtenido el medio libre de células, se recuperó el sobrenadante donde están los presuntos metabolitos secundarios. Está suspensión de almacenó a 4 °C para su uso en las pruebas de antagonismo por el método de medio envenenado. Este método consiste en exponer al hongo fitopatógeno a los metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99, con el fin de observar un comportamiento fungistático o fungicida.

5.2 Evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de los metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99 contra *Fusarium solani*.

Para evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de los metabolitos secundarios, se utilizó el método de medio envenenado tanto sólido como líquido (Alburqueque-Andrade, 2018). En el caso del medio envenenado sólido, se preparó un medio PDA al que se le añadieron metabolitos secundarios obtenidos previamente a partir de fuente de carbono Xilosa 3% y Fructosa 2%, en porcentajes de 10, 30 y 50% por separado, y con tres repeticiones para cada tratamiento. Después de agregar los metabolitos, se vertió el medio en placas, se dejó solidificar y se inoculó un disco de 0.7 mm de diámetro el cual contenía agar y micelio vegetativo del hongo *F. solani* con un crecimiento de siete días con una concentración de esporas de 5.25×10^6 . Las placas se incubaron por siete días a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad. Finalmente, se evaluó la inhibición del crecimiento del diámetro, la viabilidad de esporas, y se realizaron observaciones macro y microscópicas de las afectaciones al micelio.

Para el medio envenenado líquido, se preparó un caldo LB modificado al que se le agregaron metabolitos obtenidos de las fuentes de carbono Xilosa al 3% y Fructosa al 2% en porcentajes de 30 y 50%, por separado, con cinco repeticiones cada uno. Cada matraz fue inoculado con 100 µl de una suspensión de esporas con una concentración de 2.8×10^5 esporas, y se incubaron durante cinco días en agitación (60 rpm) a 25 ± 2 °C. Finalmente, se evaluaron el peso fresco y seco del micelio, la viabilidad de esporas, y observaciones microscópicas de las afectaciones del micelio.

5.3 Prueba de viabilidad de esporas a partir de método de medio envenenado sólido-líquido

En el medio envenenado sólido (se preparó un medio PDA al cual se le añadieron metabolitos secundarios obtenidos previamente a partir de fuentes de carbono: xilosa 3% y fructosa 2%. Estos metabolitos fueron evaluados por separado en concentraciones del 10%, 30% y 50%. De esta forma, se analizaron los efectos de los metabolitos derivados de xilosa y fructosa sobre la viabilidad de las esporas. Se seleccionaron las placas que mostraban afectaciones al micelio de cada uno de los porcentajes de 10, 30 y 50%. Posteriormente, se realizó un corte con una duya de 0.07 mm de diámetro, el cual se colocó en una solución twin al 0.1% y se sometió a agitación en un “Vórtex” durante 10 minutos. A continuación, se tomó una alícuota de 100 µl y se mezcló en un tubo eppendorf con 100 µl de colorante Azul de Evans (Wang *et al.*, 2021). Las muestras se incubaron durante 24, 48, 72 y 96 h, tomando una alícuota de 10 µl a las 48 h para realizar un conteo de esporas viables y no viables (Wang *et al.*, 2021) en 32 campos, por triplicado, utilizando un microscopio óptico a 40X.

En el caso del medio envenenado líquido se preparó un medio LB modificado al que se le añadieron metabolitos secundarios obtenidos previamente a partir de fuentes de carbono xilosa 3% y fructosa 2%, en porcentajes de 10, 30 y 50% por separado), evaluándose los metabolitos de cada por separado. Se tomó directamente una alícuota de 100 µl de los porcentajes de 30 y 50%, la cual se mezcló con 100 µl de colorante Azul de Evans (Wang *et al.*, 2021) en un tubo eppendorf. Las muestras fueron incubadas durante 24, 48, 72 y 96 h, tomando una alícuota de 10 µl a las 48 h para realizar un conteo de esporas viables y no viables en 32 campos por triplicado, leídos a 40 X en microscopio óptico.

5.4 Análisis estadístico aplicado para evaluar el porcentaje de inhibición del diámetro y prueba de viabilidad de esporas.

Las pruebas estadísticas del porcentaje de inhibición del diámetro, halo de inhibición, y el número de esporas viables y no viables se realizó mediante un ANOVA de una vía utilizando el programa Graph-Pad Prism versión 9.0.

5.5 Secuenciación del genoma de la cepa GB99 y análisis de calidad de las secuencias.

La extracción de ADN de la cepa GB99 fue realizada por Jiménez-Gómez utilizando un kit de extracción Promega y la pureza del ADN se corroboró mediante electroforesis. La calidad y concentración de la muestra se determinaron con un espectrofotómetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific). La muestra de ADN genómico obtenida presentó una absorbancia adecuada para ser procesada en el laboratorio Humanizing Genomics Macrogen y secuenciada mediante la técnica de MiSeq ILLUMINA. Una vez obtenida las secuencias en formato fastq se procedió a su análisis de calidad utilizando el programa FastQC, que genera diversas métricas que nos indican la calidad de las secuencias.

5.6 Realización de diversos ensamblajes, manejo de su calidad y anotación del genoma de la cepa GB99.

Como se mencionó anteriormente, una vez analizadas las secuencias y confirmada su buena calidad, se procedió a realizar cinco ensamblajes diferentes a partir del uso de programas VELVET, SPADES y la plataforma BV-BRC. El objetivo fue obtener el menor número de *contig* posible y N50. Para ello, se utilizaron los parámetros de ensamblaje que se muestran en la Tabla 3. Posteriormente, se analizó la calidad de cada ensamblaje con el programa QUASt (Quality Assessment Tool for genoma Assemblies). La anotación del genoma se llevó a cabo utilizándola plataforma RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology), utilizando el archivo gbff para el análisis posterior de los genes biosintético de los antifúngicos pirronitrina y occidiofungina.

Tabla 3. Parámetros de los diferentes ensamblajes realizados.

NO. DE ENSAMBLES	PROGRAMA	PARÁMETROS -K: K-MERO, -T: THREADS, COV: COBERTURA	FUENTE
1	SPADES (SPADES 1)	-K= 21,33,39 -T= 8	PC UBUNTU
2	SPADES (SPADES 2)	-K= 21,33,39,41,43,49 -T= 10	PC UBUNTU
3	SPADES (SPADES 3)	GENERADOS AUTOMÁTICAMENTE POR EL PROGRAMA: -K= 21,33,55,77 -T=10	PC UBUNTU
4	VELVET OP-H-G (VELVET G)	OBTENIDOS A PARTIR DE VELVET OPTIMISER: -K= 81 COV= 164	PC UBUNTU
5	BV-BRC (METASPADES) (GB99_contings)	TRIM READS BEFORE ASSEMBLY: TRUE MIN CONTIG LENGTH: 300 MIN. CONTING COVERAGE: 5	Centro de recursos de bioinformática bacteriana y viral (BV- BRC), https://www.bv-brc.org/

5.7 Búsqueda de los genes biosintéticos de los antifúngicos pirrolnitrina y occidiofungina en el genoma de la cepa GB99.

Para identificar los genes biosintéticos de los antifúngicos pirrlonitrina y occidiofungina en el genoma de la cepa GB99, se llevó a cabo una búsqueda BlastN y BlastP, mediante el programa de XY Plot Viewer modificado (Pedraza-Pérez, 2018), donde se utilizó el archivo FASTA generado del ensamblaje de mayor calidad, denominado "SPADES3". Se empleó como secuencias de referencia (*query*) los genomas de *B. contaminans* (NC_008392), *B. ambifaria* (NC_EU938698.5) y *B. pyrrocinia* (NC_AF161186), reportados en la plataforma de NCBI.

Se investigaron las rutas metabólicas y los genes implicados los genes biosintéticos de los antifúngicos pirrolnitrina y occidiofungina. En la plataforma KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), se encontró reportada la ruta metabólica del antifúngico pirrolnitrina, que inicia en la biosíntesis del triptófano. Esta ruta involucra cuatro genes: *prnA* (tryptophan 7-halogenase), *prnB* (monodechloroaminopyrrolnitrin synthase), *prnC* (monodechloroaminopyrrolnitrin halogenase) y *prnD* (aminopyrrolnitrin oxigenase) ver Anexos 3. La plataforma también proporciona información sobre las especies del género *Burkholderia* que tienen a ruta completa, por lo que se tomó como *query las* secuencias de *B. pyrrocinia* (NC_AF161186) y *B. cepacia* ATTC25416.

Para el antifúngico occidiofungina, a pesar de no encontrar la ruta metabólica en la plataforma KEGG, se referenció en el artículo de Gu *et al.*, 2011, que describe la participación de diecisiete genes en total: cinco genes de sintasas peptídicas no ribosomales (NRPS), dos genes de regulación tipo LuxR, y diez genes de transporte (ver Anexo 3 para la ruta metabólica). Se tomaron como *query* las secuencias de *B. contaminans* (NC_008392), *B. ambifaria* (NC_EU938698.5) y *B. pyrrocinia* (NC_AF161186).

5.8 Alineamiento global y búsqueda de dominios mediante la plataforma de SMART PROTEIN de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina.

Se utilizó el programa de Bioedit para realizar el alineamiento global por *pairwise* entre las secuencias de las *query B. contaminans* (NC_008392), *B. ambifaria* (NC_EU938698.5) y *B. pyrrocinia* (NC_AF161186) con las secuencias extraídas de la anotación del genoma de la cepa GB99 de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina. Posteriormente, utilizando las secuencias obtenidas de la anotación, se buscaron los dominios pertenecientes a los genes de biosíntesis, regulación y transporte del antifúngico occidiofungina, empleando la plataforma SMART PROTEIN.

5.9 Construcción del mapa de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina.

Se utilizó el programa Power Point para construir el mapa de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina. Este mapa incluye información sobre el tamaño, orientación y función de cada uno de los genes involucrados en la biosíntesis, regulación y transporte.

5.10 Extracción y concentración de los metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99.

La obtención de los metabolitos secundarios se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 5.1. Para la extracción de los metabolitos secundarios, se utilizó el método de Jiménez-Gómez 2023. Los metabolitos secundarios fueron expuestos a la resina Amberlita XAD-16 durante 24 h. Luego, se llevó a cabo una desorción en metanol al 50% y un lavado con acetato de etilo. Posteriormente se concentró la muestra por rotavapor durante 5 minutos a 100 °C. Finalmente, se dejó evaporar en bloque térmico a 40 °C durante 72h, y la muestra resultante se re-suspendió en metanol puro y se filtró para su análisis por cromatografía acoplada a espectrometría de masas.

5.11 Detección cualitativa de los antifúngicos producidos por la cepa GB99 mediante TLC (Thin-Layer Chromatography).

Para la detección cualitativa, se prepararon bajo campana de extracción cuatro sistemas de solventes diferentes, según lo citado por Gu, *et al.*, 2009; Dudnik, *et al.*, 2012; Choi, *et al.*, 2018; Jun, *et al.*, 2018; Xu, *et al.*, 202; Lee, *et al.*, 2017. El sistema uno consistió en cloroformo: metanol: agua en una relación de 60:16:2; el sistema dos, cloroformo: metanol: agua en una relación 30:30:2; el sistema tres, cloroformo: etanol: agua en una relación 20:60:2; y el sistema cuatro, acetato de etilo: metanol en una relación 2:1. Posteriormente, se colocaron en una placa de TLC cinco muestras proporcionadas por Jiménez- Gómez (2023): A= Rotavapor, B= Re suspensión en agua, C= Re suspensión en metanol 50%, D= Metabolitos secundarios y F= Re suspensión en etanol 50%.

Las placas se sometieron a los cuatro sistemas de solventes mencionados hasta que alcanzaron el frente de corrimiento. Luego, se revelaron bajo UV para medir la distancia de corrida y calcular el (Factor de retención). Se aplicó el mismo procedimiento de solventes y muestras para la placa de TC, seguida de bioautografía. Las placas de TLC Para ellos se colocaron las placas de TLC se colocaron en cajas Petri estériles, y se vertió medio PDA semi sólido con 100 µl del hongo *F. solani* crecido con 48 h en medio LB modificado. Finalmente, se dejó gelificar y se incubaron a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad por 48 h para observar el antagonismo.

5.12 Detección cuantitativa del antifúngico occidiofungina mediante análisis cromatográfico HPLC-Masas.

Para la detección cuantitativa del antifúngico occidiofungina, se prepararon dos muestras. La primera muestra se obtuvo siguiendo la metodología de obtención de metabolitos secundarios de la cepa GB99 descrita en el apartado 5.1, luego se extrajo y concentró como se indica en el apartado 5.10. La segunda muestra también se obtuvo según la metodología descrita anteriormente y se dejó en resina (como se detalla en el apartado 5.10). Posteriormente, se concentró utilizando nitrógeno líquido durante 18 h y se pasó por carbón grafito comercial.

Una vez obtenidas las muestras, se llevaron al análisis cromatográfico en un equipo HPLC Agilent Technologies 1260 con inyector automático y dos detectores: un detector UV-vis de arreglo de diodos (DAD) y el detector de masas QqQ-ToF, que consta de un espectrómetro de masas con fuente de ionización por electrospray (ESI) y un triple cuadrupolo (QqQ) en serie con un tubo de tiempo de vuelo (ToF). Se utilizó una columna Zorbax Eclipse Plus, 3.5 μm , 100 x 4.6 mm, con un flujo de 1ml/min a una temperatura de 35°C, empleando una fase móvil conformada por A: H₂O + 0.1% ácido fórmico; B: ACN + 0.1% ácido fórmico.

5.13 Recolección y concentración del antifúngico occidiofungina.

Las occidiofunginas A, B, C y D se recolectaron a partir de las masas ionizadas detectadas (1200.5994, 1216.5943, 1234.5605 y 1249.56, respectivamente), ubicando los picos correspondientes denominándolos como "fracción 2". Con un tiempo de retención de 4-8 minutos, se realizó la recolección durante un periodo de 10 h. Posteriormente, se concentró utilizando rotavapor de la marca Witeg, operando a una temperatura de 45-60°C a 45 rpm. Se dejó evaporar en un bloque térmico a 40 °C durante 96 h y se re-suspendió en metanol al 50% para realizar ensayos de antagonismo y concentración mínima fungicida.

5.14 Ensayo de antagonismo mediante la técnica de difusión de pozos del antifúngico occidiofungina.

Se utilizó el método de difusión de pozos (Jiménez-Gómez, 2019), para evaluar el antagonismo del antifúngico occidiofungina frente a *F. solani*. Se preparó un medio LB sin sal semisólido con 7.5 % de agar, al cual se le agregaron 50 μl del hongo *F. solani* por cada 20 ml de medio, asegurando que el hongo quedara inmerso en el agar. El medio se dejó gelificar a temperatura ambiente.

Una vez solidificado, se realizaron pozos en la superficie del agar con ayuda de un sacabocados de 5 mm de diámetro. En cada uno de los pozos se colocaron 100 μl del antifúngico occidiofungina re-suspendida en metanol al 50%. Como control, se agregó la fase móvil de manera similar. Se dejó reposar por 12 horas para permitir la difusión del líquido en el agar, y luego se incubaron a 25 \pm 2 °C durante 48 h. Finalmente, se midieron los halos de inhibición con un vernier.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluar *in vitro* la capacidad antagonista producida por la cepa GB99 contra *F. solani*.

A. Método envenenado sólido

A continuación, tenemos los resultados a partir de medio envenenado sólido. Estos indican que los metabolitos obtenidos a partir de fuente de Xilosa al 3% y de Fructosa al 2% generan un efecto fungistático frente a *F. solani*, ya que permite el crecimiento retardado del hongo.

En la figura 4, se muestran los resultados de los tratamientos con metabolitos obtenidos de fuente de carbono xilosa al 3% (A), los cuales lograron una inhibición del diámetro del micelio de entre 70-80% en los tratamientos con concentraciones del 30% y 50%, evaluados al séptimo día. En comparación, con los metabolitos obtenidos de la fuente de carbono Fructosa al 2% (B) mostraron una inhibición del del diámetro del micelio del 50-60% en los mismos tratamientos también evaluados en el séptimo día. Se corroboró que el mayor efecto fungistático de estos metabolitos secundarios sobre el hongo se produce en ambos casos con en el tratamiento al 50%.

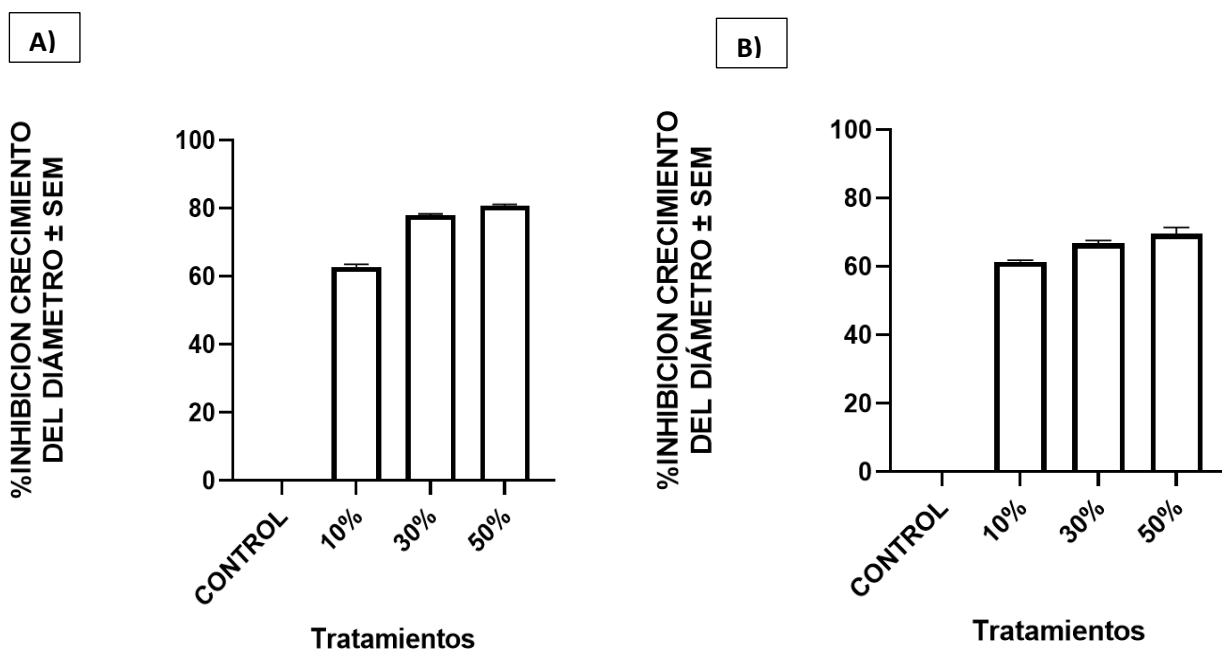


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento del diámetro de *F. solani* por método de medio envenenado sólido, A) Metabolitos obtenidos por fuente de Xilosa 3%, B) Metabolitos obtenidos por fuente de Fructosa 2%. El análisis se realizó mediante ANOVA de una vía ($p > 0.0001$). Cada barra representa la media ($n=3$), con barras de error estándar de la media.

Sin embargo, *F. solani* presentó cambios morfológicos de igual manera a partir de los porcentajes de 30 y 50% de los metabolitos obtenidos en ambas fuentes de carbono

utilizadas. Presentando pigmentos de color café oscuro en el micelio responsable de la producción de compuestos ROS (Compuestos reactivos de oxígeno), halos de color naranja alrededor del micelio y un crecimiento radial no uniforme a comparación de nuestro control que presenta un micelio amarillo claro, crecimiento radial uniforme con anillos determinados y sin pigmentaciones.

Estos cambios en *F. solani* se pueden asociar al estrés sometido por el conjunto de estos metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99 como se observa en la Fig. 5.

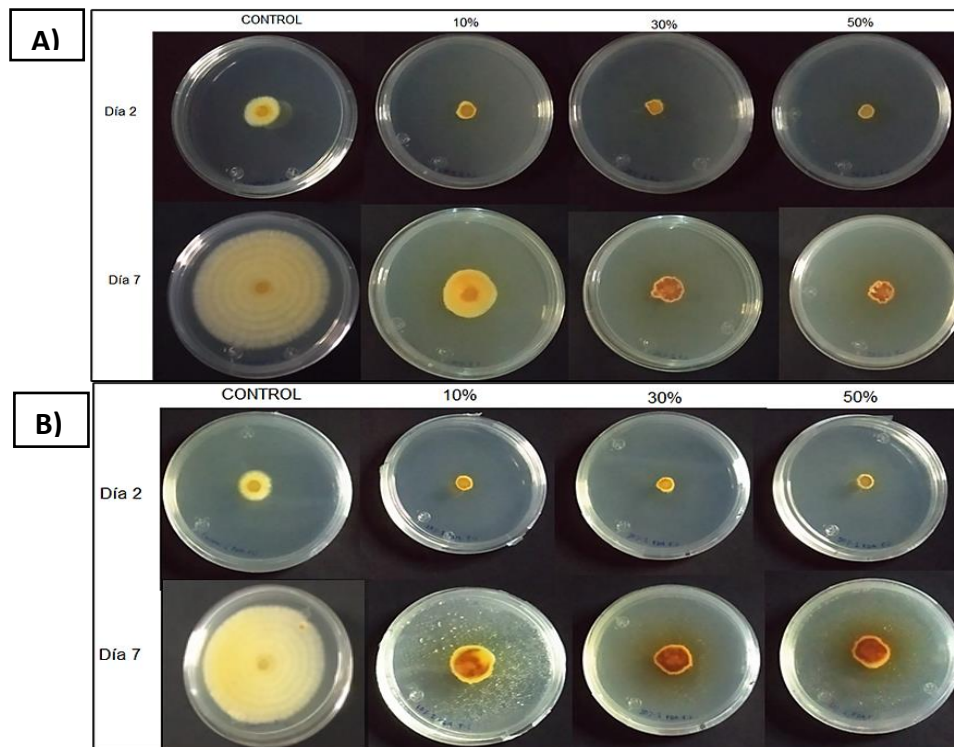


Figura 5. Antagonismo de *F. solani* por método de medio envenenado sólido a 10, 30, 50% más el control. A) Metabolitos obtenidos por fuente de Xilosa 3%, B) Metabolitos obtenidos por fuente de Fructosa 2%.

A nivel macroscópico, el micelio aéreo de *F. solani* mostró exudados de color rojizo y esporodocios con una apariencia viscosa de color rosa-crema. Al observar estas estructuras bajo microscopio óptico con objetivo de 40X, se identificaron únicamente macro y micro conidias. En comparación, el control, mostró un micelio blanco y algodónoso, como se observa en la figura 6.

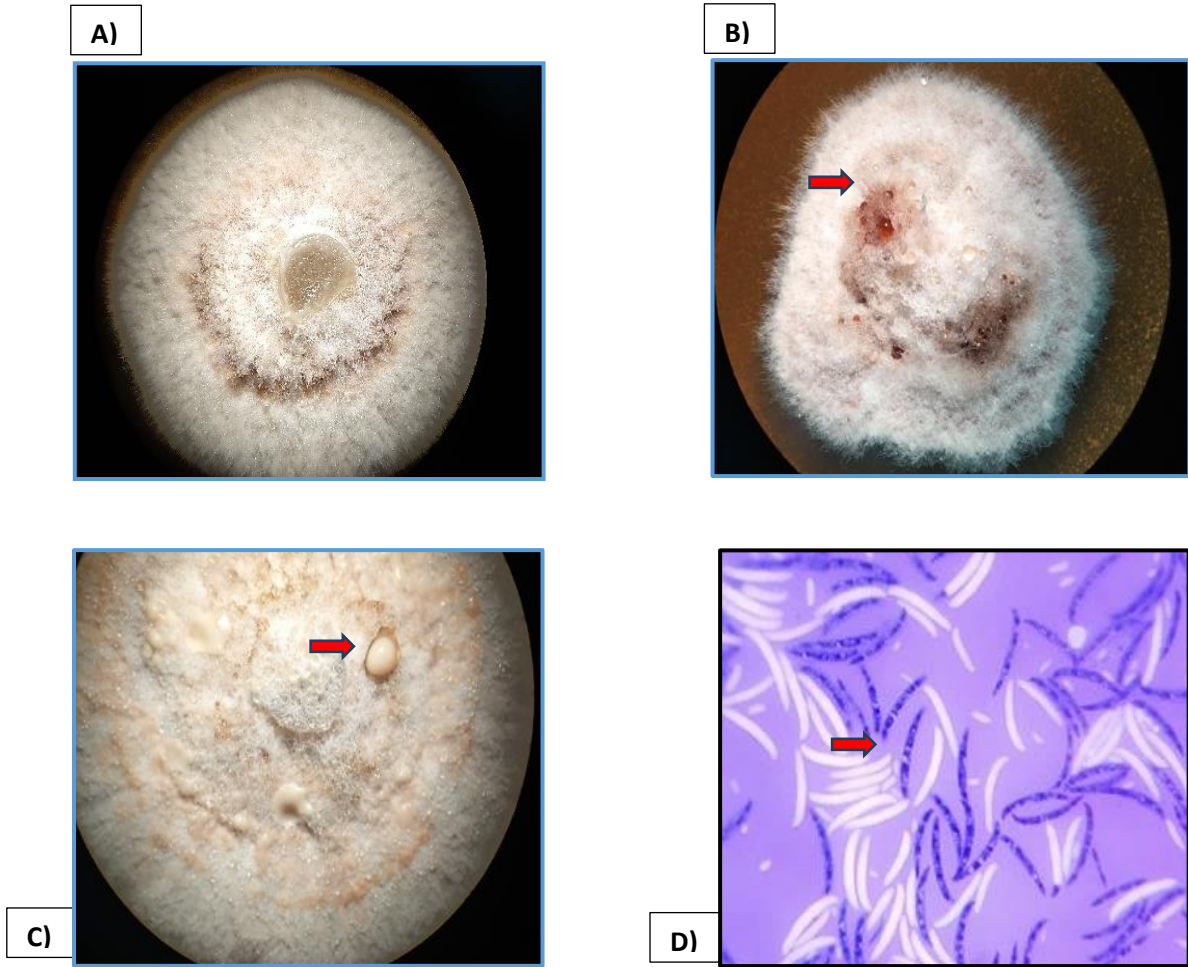


Figura 6. A) Control, B) Presencia de Fusarrubina, C) Estructura de esporodoquio y D) Estructuras de macro y micro conidias, bajo observación microscópica a objetivo de 40 X de la estructura de esporodoquio.

A)

B)

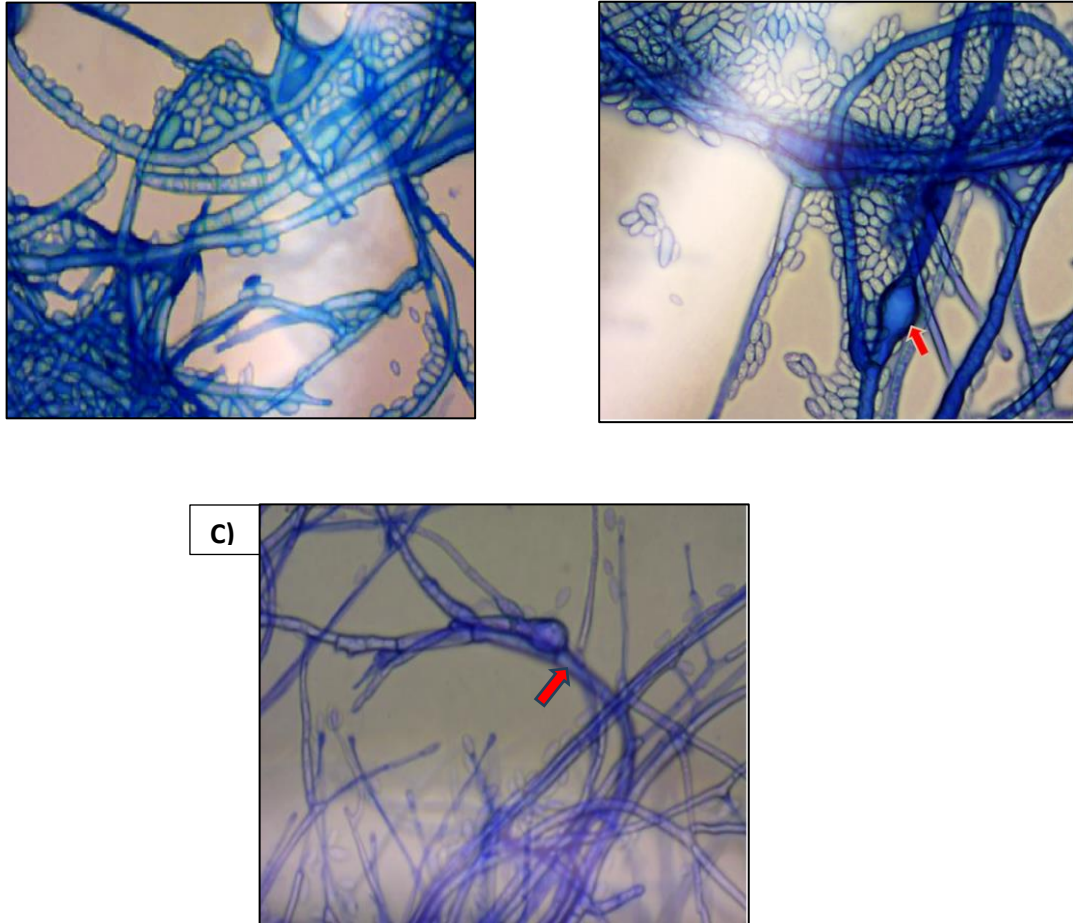


Figura 7. A) Control, con hifas desarrolladas con normalidad, sin afectación. B) y C) Presencia de estructuras de globo asociadas a daño estructural.

Los metabolitos obtenidos a partir de fuente de xilosa al 3%, tienen mayor porcentaje de inhibición del diámetro del micelio a comparación de aquellos obtenidos con fuente de fructosa al 2%. Esto sugiere que la xilosa podría actuar como una fuente de carbono involucrada directamente en la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y/o antimicrobiana significativa. Estudios previos han demostrado que la xilosa participa directamente en la síntesis de compuestos antifúngicos, como la occidiofungina y sus variantes, los cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Gu *et al.*, 2011).

Por otra parte, estos metabolitos secundarios obtenidos de ambas fuentes son capaces de causar estrés en *F. solani*, mostrando anomalías morfológicas como la coloración de presencia de pigmentación oscura y la aparición de halos naranjas alrededor del micelio asociados con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, la apariencia viscosa del micelio aéreo relacionado con las estructuras de esporodoquios (Márquez-Fernández, 2020) lo cual indica una alteración en la reproducción de *F. solani*, es decir, no

se observó la fase de esporulación del hongo, pero si los esporodocios que albergan macro y microconidios viables, todo esto relacionado a un mecanismo de supervivencia. También se observó la producción del pigmento rojo conocido como “fusarrubina” (Kristensen *et al.*, 2021), que se asocia a mecanismos de defensa del hongo en respuesta a factores de estrés como temperatura extrema, salinidad, agroquímicos, metabolitos secundarios de otros microorganismos, etc. Las observaciones microscópicas revelaron además anomalías en la estructura de las hifas, donde se observaron estructuras de globo. Estas se encuentran asociadas a mecanismos de estrés inducido por metabolitos secundarios que tienen acción en la membrana de la hifa y que en respuesta de defensa genera una sobre producción de quitina aumentando el tamaño y dando una estructura inflada (Jiménez-Gómez, 2019; Tenorio-Salgado *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos mediante el método de medio envenenado sólido indican que los metabolitos secundarios obtenidos ejercen un efecto fungistático, limitando el crecimiento del hongo, afectando su fase de esporulación, e induciendo mecanismos de defensa como la producción de fusarrubina y compuestos reactivos de oxígeno en *F. solani*.

B. Método envenenado líquido

Los resultados estudiados en medio envenenado líquido indican que los metabolitos obtenidos a partir de fuente de Xilosa al 3% y de Fructosa al 2% generan un efecto fungicida frente a *F. solani*, ya que inhiben por completo el crecimiento del hongo. Para corroborar el desarrollo del micelio, se evaluaron tanto el peso fresco como el peso seco. En el caso del peso fresco, se registraron valores por debajo de 1 gramo, que se atribuyen al medio LB junto con los metabolitos y el inóculo que el papel arroz (utilizado como filtro) es capaz de retener. Sin embargo, el peso seco resultó ser cero gramos, lo que confirma que no hay desarrollo de micelio en los porcentajes de 30% y 50% con los metabolitos secundarios de ambas fuentes de carbono, tal como se muestra en las Figuras 8 y 9.

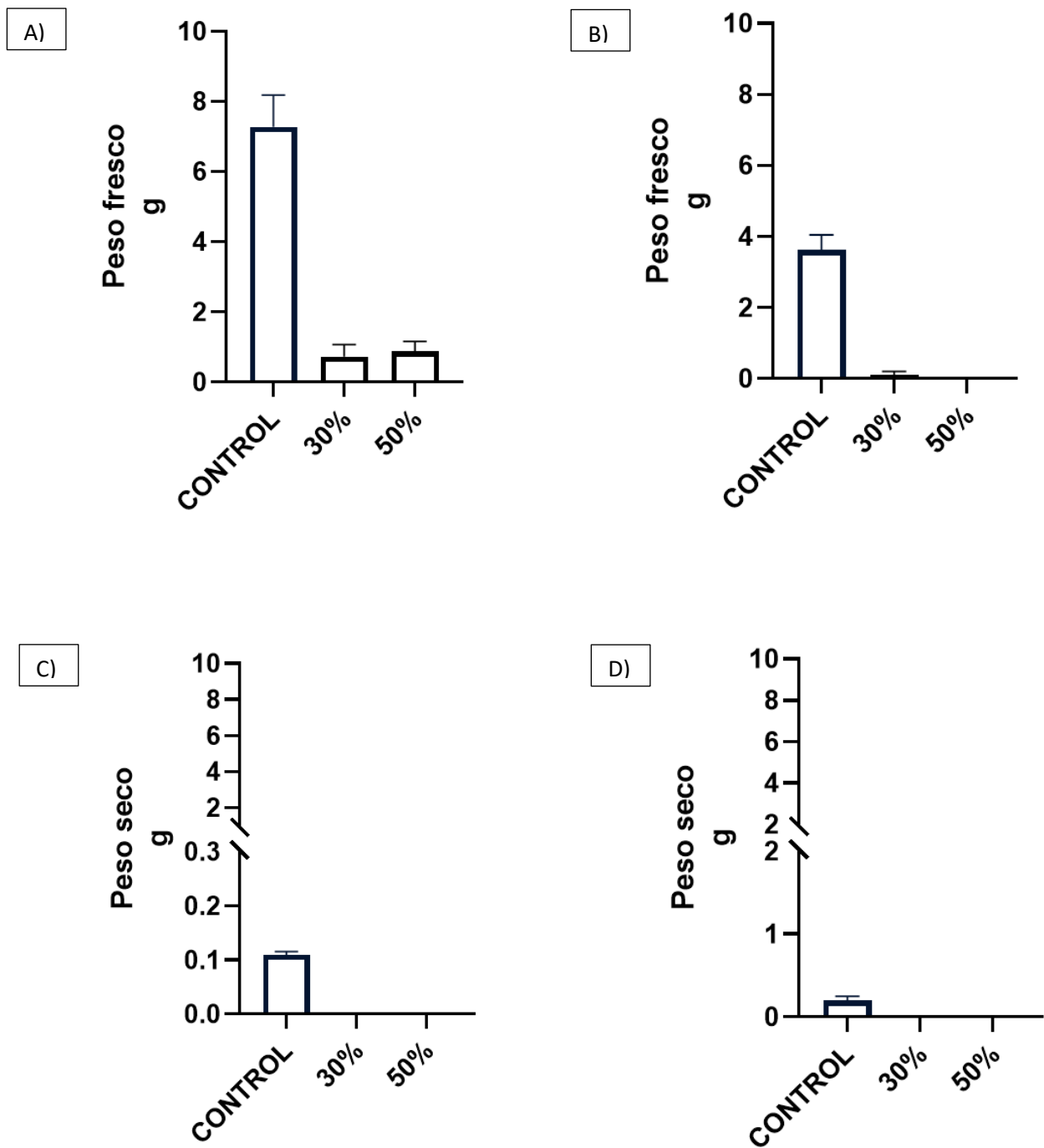


Figura 8. Peso fresco y peso seco obtenido de medio envenenado, A-C) Metabolitos secundarios, 30% y 50% Fuente Xilosa 3%, C-D) Metabolitos secundarios., 30%-50% Fuente Fructosa 2%. El análisis se realizó mediante ANOVA de una vía ($p > 0.0005$). Cada barra representa la media ($n=4$), con barras de error estándar de la media.

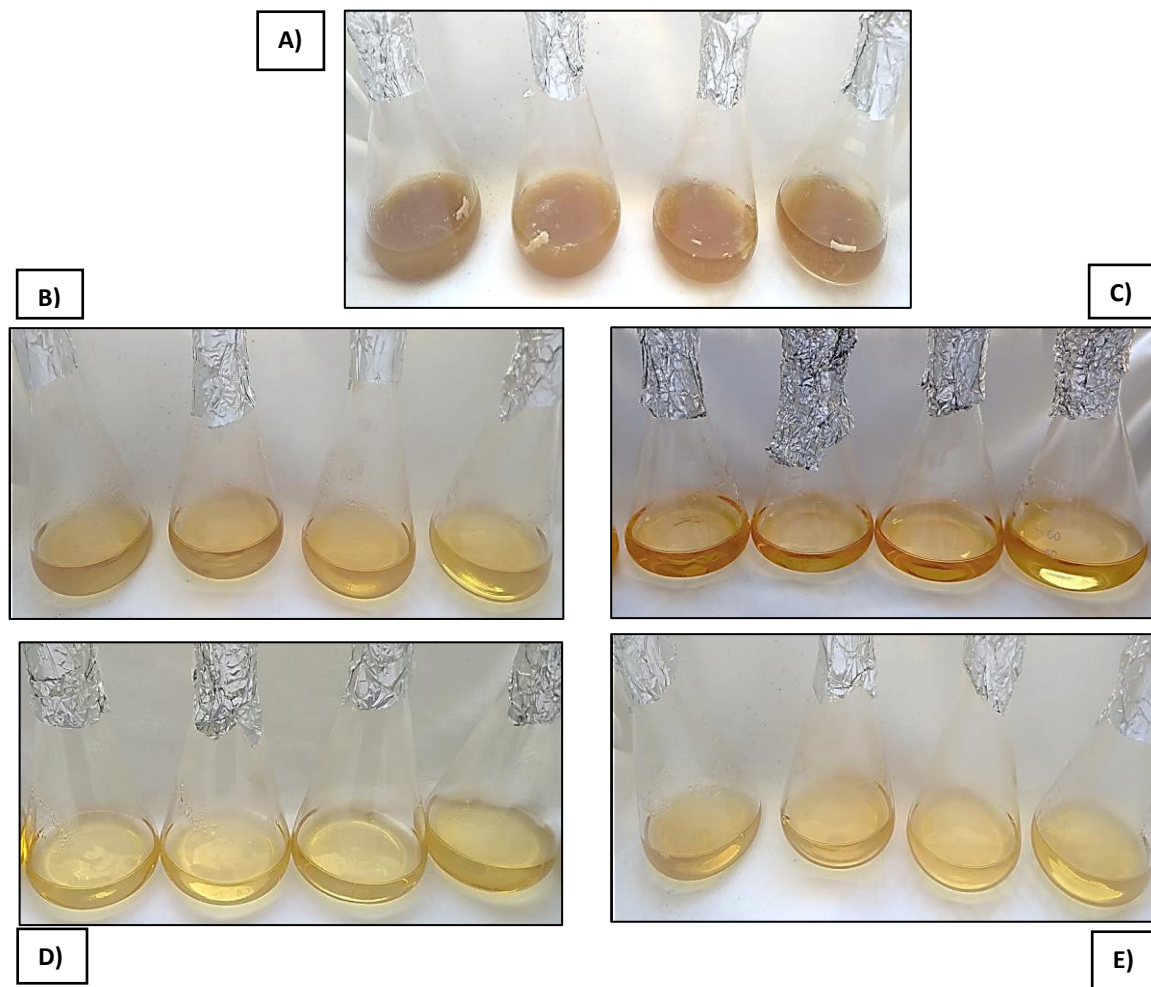


Figura 9. Antagonismo en medio líquido por método de medio envenenado, A) Control, B) 30%, C) 50% metabolitos obtenidos en fuente de Xilosa 3%, D) 30%, E) 50% metabolitos obtenidos en fuente de Fructosa 2%.

También se realizó una observación microscópica de los cultivos con porcentajes de 30% y 50% en ambas fuentes de carbono. Se puede observar que no hay desarrollo de micelio ni presencia de macro y micro-conidios, en contraste con el control. Sin embargo, se detectó la presencia de esporas deformadas, que, en lugar de conservar su estructura ovalada, no lograron retener el colorante Azul de Evans (Wang *et al.*, 2021), lo cual indica que no son viable, como se observa en la Fig. 10. Estos hallazgos confirman que los metabolitos, al estar en contacto directo con las esporas, impiden su germinación y el desarrollo micelial del hongo.

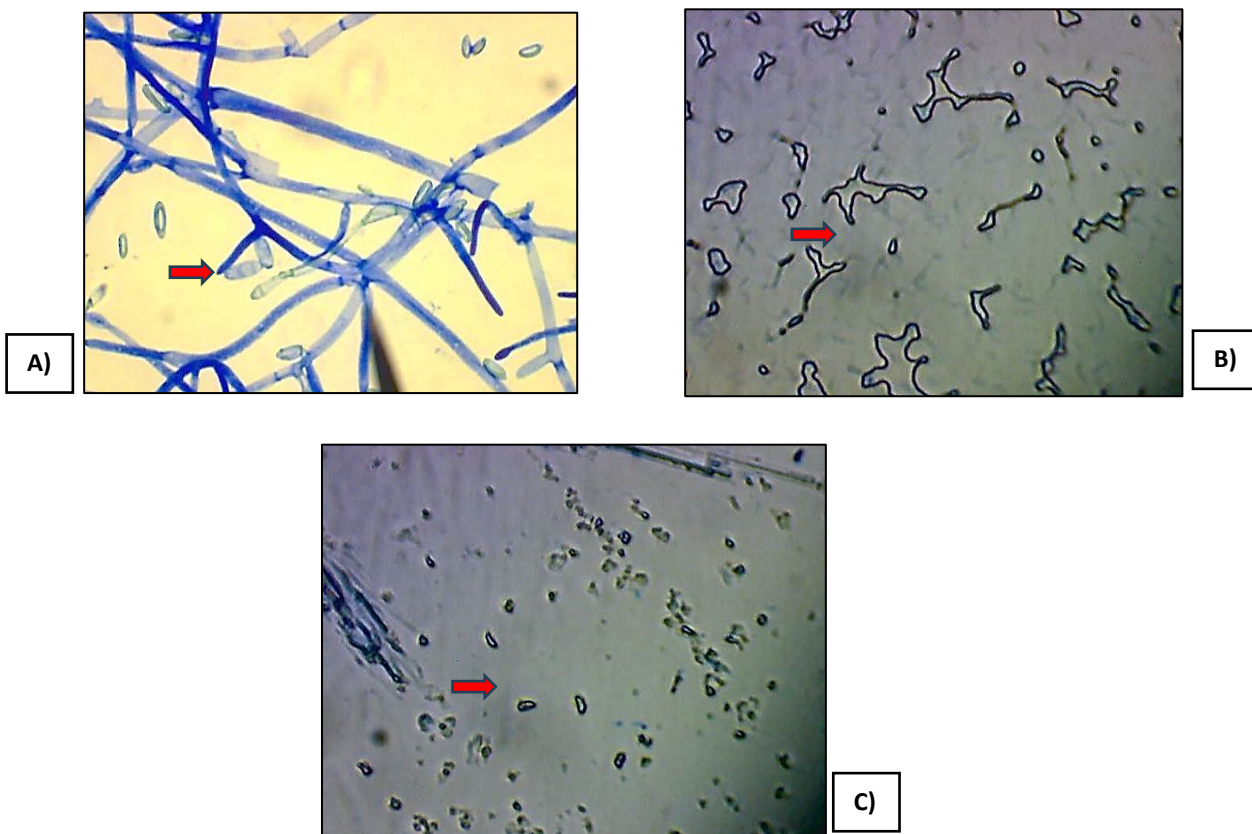


Figura 10. Antagonismo en medio líquido por método de medio envenenado, A) Control, B) 30%, C) 50% metabolitos obtenidos a partir de fuente de Xilosa 3% y Fructosa 2%, las esporas viables retienen el colorante y las esporas no viables se observan traslucidas.

El resultado más importante en este experimento es la capacidad fungicida de los metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99, utilizando xilosa al 3% y fructosa al 2% como fuentes de carbono. Se observó una inhibición total del crecimiento micelial de *F. solani*, confirmada por la ausencia de peso seco, con resultados de cero gramos en los tratamientos con concentraciones del 30% y 50%, lo cual evidencia la ausencia de crecimiento fúngico. Sin embargo, otro aspecto relevante es la diferencia entre los efectos fungicidas observados en el medio envenenado líquido y los efectos fungistáticos en el medio envenenado sólido, mientras que en el medio líquido se logra una inhibición total del desarrollo micelial, en el medio sólido solo se observa un efecto fungistático, que retrasa el crecimiento del hongo en lugar de detenerlo por completo.

Es importante destacar que en el medio líquido están en mayor contacto con las esporas que el efecto de estos metabolitos en medio líquido le permite estar en mayor contacto con las esporas del hongo a diferencia del medio sólido. Esto se confirmó mediante observaciones microscópicas, donde se detectaron esporas deformadas, sin retención del colorante Azul de Evan, un marcador de viabilidad y sin desarrollo micelial en contraste con el control. Se conoce que existen metabolitos como: burkholdines, cepacidina A, B, pirrolnitrina, occidiofungina y xilocandina, que son capaces de degradar la membrana fúngica de mediante mecanismos de estrés oxidativo, desporelización de la membrana, entre otros (Jiménez-Gómez, 2019). Estos hallazgos sugieren la hipótesis de que la cepa GB99 podría producir alguno de estos compuestos fungicidas.

C. Prueba de viabilidad de esporas a partir de método de medio envenenado sólido-líquido

Para confirmar el efecto fungistático y fungicida observado en los experimentos de medio envenenado sólido y líquido, se realizó una prueba de viabilidad de esporas, contando las esporas viables y no viables en estos ensayos. En el medio envenenado sólido, el mayor número de esporas viables se encontró en el control y en el tratamiento al 10%, en comparación con los tratamientos al 30 y 50%. Sin embargo, en el conteo de esporas no viables, los porcentajes del 30 y 50 destacaron en comparación con el control y el 10%. Esto sugiere, que a los metabolitos secundarios obtenidos de Xilosa 3% y Fructosa al 2% validan el efecto fungistático, como se observa en la figura 11. en comparación con el medio envenenado líquido, se puede observar que la mayor cantidad de esporas viables es en el control y la mayor cantidad de esporas no viables son los tratamientos del 30 y 50% en los metabolitos producidos por ambas fuentes de carbono como se observa en la figura 12 y 13.

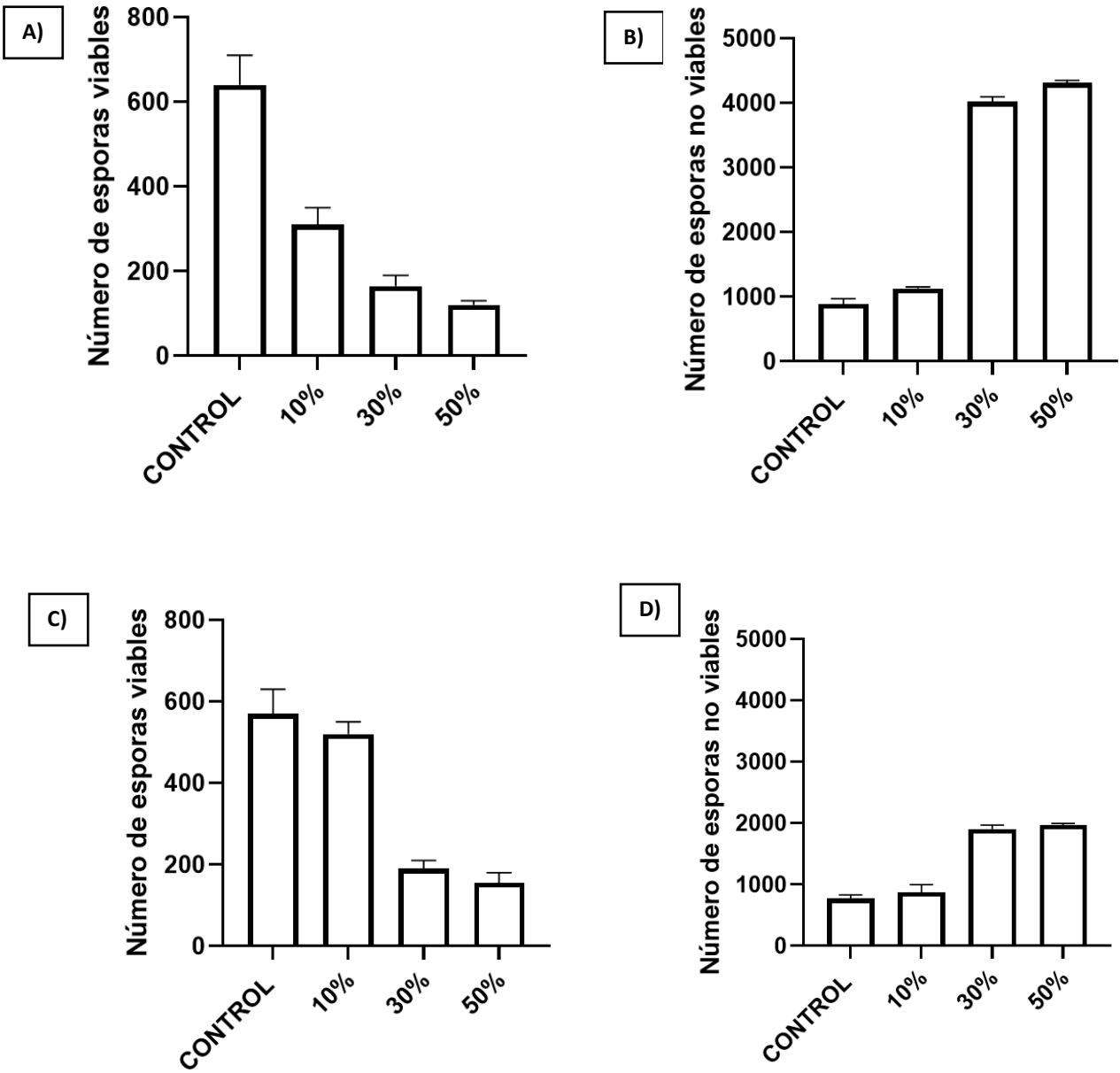


Figura 11. A) Conteo de esporas viables, B) Conteo de esporas no viables, a partir de metabolitos obtenidos por fuente de Xilosa 3% en medio envenenado sólido, C) Conteo de esporas viables, D) Conteo de esporas no viables, a partir de metabolitos obtenidos por fuente de Fructosa 2% en medio envenenado sólido. ANOVA de una vía ($p > 0.0001$). Cada barra representa la media ($n=30$), con barras de error estándar de la media.

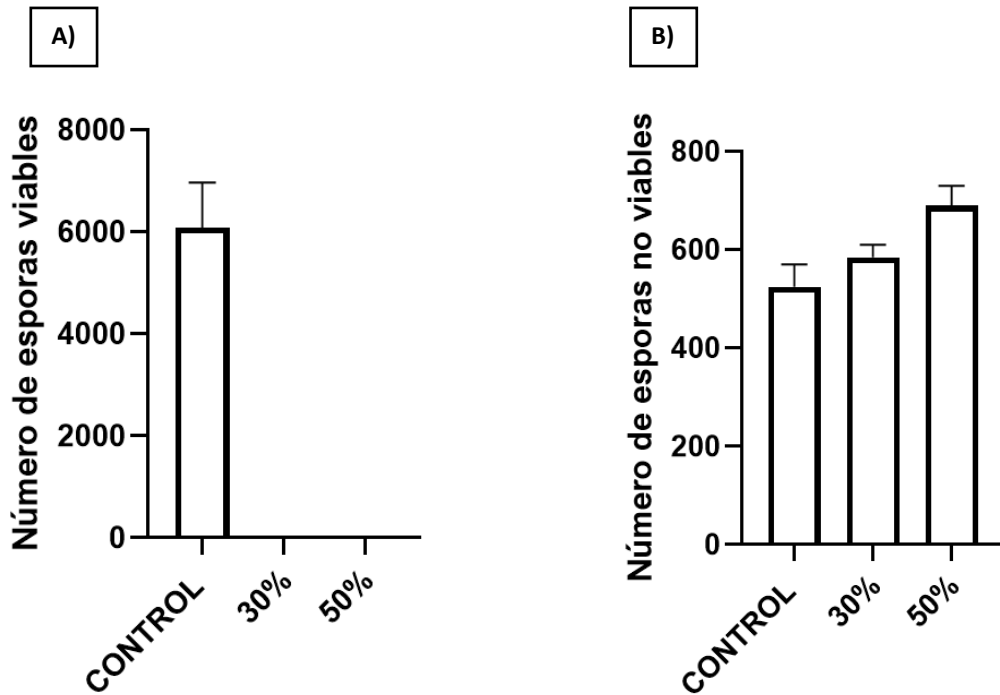


Figura 12. C) Conteo de esporas viables, D) Conteo de esporas no viables, a partir de metabolitos obtenidos por fuente de Xilosa 3% en medio envenenado líquido. ANOVA de una vía ($p > 0.0001$). Cada barra representa la media ($n=30$), con barras de error estándar de la media.

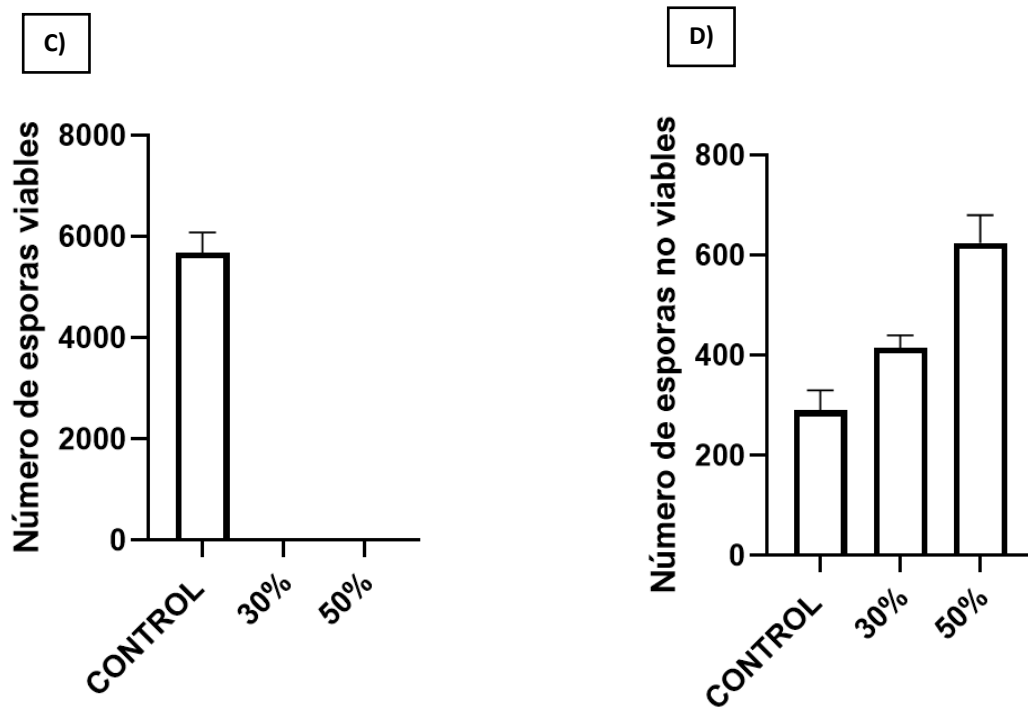


Figura 13. C) Conteo de esporas viables, D) Conteo de esporas no viables, a partir de metabolitos obtenidos por fuente de Fructosa 2% en medio envenenado líquido. ANOVA de una vía ($p>0.0001$). Cada barra representa la media ($n=30$), con barras de error estándar de la media.

Los resultados de las pruebas de viabilidad de esporas respaldan la observación de que los metabolitos tienen un efecto fungistático en el medio sólido y fungicida en el medio líquido. Es importante destacar que el uso del Azul de Evans como marcador de viabilidad resultó fundamental en este experimento, ya permite distinguir entre esporas viables, que retienen el colorante, y esporas no viables, que se observan translúcidas. Este hallazgo coincide con la deformidad estructural de las esporas causada por la acción de estos metabolitos, lo que refuerza su efectividad en la inhibición del crecimiento de *Fusarium solani*.

6.2 Realizar un análisis bioinformático de los genes biosintéticos de los antifúngicos occidiofungina y pirrolnitrina en el genoma de la cepa GB99”.

A. Secuenciación del genoma de la cepa GB99 y análisis de calidad de las secuencias.

Los datos obtenidos de los resultados de la secuenciación del genoma incluyen el número total de lecturas (*reads*), el total de pares de bases y el contenido de GC% (guanina y citocina), entre otros parámetros de calidad. Las secuencias muestran un alto contenido de GC%, lo cual se detalla en el Anexo 6.

El análisis de calidad se realizó mediante el programa FastQC, el gráfico de calidad de secuencia por base indica que todas las bases se encuentran dentro de la zona verde, que corresponde a una alta calidad (>28) (Ver Anexo 6). Además, se distingue un decaimiento de la señal a medida que avanza la secuenciación, asociado a la disminución de la señal fluorescente.

Adicionalmente, se generaron gráficos de calidad asociados a las celdas de flujo, puntuaciones de calidad por secuencia, contenido de GC por secuencia, distribución de tamaños de los fragmentos de la secuenciación, grado de duplicación para cada secuencia, secuencias sobrerrepresentadas y adaptadores presentes, los cuales se detallan en el Anexo 1. Dado que las secuencias obtenidas son de alta calidad, se procedió a realizar el ensamblaje del genoma de la cepa GB99.

B. Realización de diversos ensamblajes, manejo de su calidad y anotación del genoma de la cepa GB99.

Entre los cinco ensamblajes realizados utilizando diferentes programas y una plataforma, los más exitosos, con el menor número de *contig* fueron el ensamblaje denominado “GB99” con 103 *contig* y “SPADES 3” con 227 *contig*, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de los diferentes ensamblajes realizados.

NO. DE ENSAMBLES	PROGRAMA	NÚMERO DE CONTIG	N50 Pares de bases	TAMAÑO DEL ENSAMBLE Pares de bases	FUENTE
1	SPADES (SPADES 1)	583	4267505,5	8535011	PC UBUNTU
2	SPADES (SPADES 2)	538	4404628	8809256	PC UBUNTU
3	SPADES (SPADES 3)	227	373362	8763169	PC UBUNTU
4	VELVET OP-H-G (VELVET G)	602	4346060,5	8692121	PC UBUNTU
5	BV-BRC (METASPADES) (GB99_conting)	103	4346060,5	8692121	PÁGINA: https://www.bv-brc.org/ (Oldson RM., <i>et al</i> , 2022)

También, se calcularon el valor de N50 y el tamaño del ensamblaje. La calidad de los ensamblajes se analizó con el programa QUAST, determinando que “SPADES 3” presentaba los mejores parámetros de ensamblaje, considerando el número de *contig*, N50, N90 y longitud de *contig*, los cuales están resaltados en colores que varían de color morado a lila como se observa en la Fig. 17.

Para la búsqueda de los genes biosintéticos de los antifúngicos pirrolnitrina y occidiofungina, se seleccionó el ensamblaje “SPADES 3”, debido a que presentó los resultados de mejor calidad. La anotación del genoma se realizó utilizando el programa PROKKA y la plataforma RAST, los cuales permitieron identificar los marcos de lectura abiertos tomando como referencia los genomas del género *Burkholderia*. Estos análisis generaron una serie de diferentes archivos (ver Anexo 2) que se utilizan en el análisis

posterior para identificar los genes relacionados con los genes biosintéticos de los antifúngicos mencionados.

C. Búsqueda de los genes biosintéticos de los antifúngicos pirrolnitrina y occidiofungina en el genoma de la cepa GB99.

Los datos obtenidos incluyeron la ubicación de los genes, porcentaje de identidad, porcentaje de cobertura, E-value y Bit-score. Los resultados para el antifúngico pirrolnitrina indican que los genes biosintéticos no están presentes en la cepa GB99. Esto se debe a que los parámetros obtenidos no alcanzaron los umbrales esperados: los porcentajes de identidad no llegaron al 80%, el E-value no fue de 0.0 o cercano a e-100, y el Bit-score no correspondió al tamaño del gen. Además, el gen *prnB* no arrojó resultados, y no todas las coberturas superaron el 80%, como se muestra en la tabla 5. En el caso de las secuencias de ADN y proteínas (ver Anexo 4) se requiere que todos los parámetros sean adecuados para confirmar la presencia de los genes biosintéticos.

Tabla 5. Resultados obtenidos de la búsqueda realizada en BLASTn de los genes biosintéticos del antifúngico pirrolnitrina a partir de secuencias *query* de *B. cepacia* y *B. pyrrocinia*.

Comparación de los genes biosintéticos de pirrolnitrina en GB99 con <i>B. cepacia</i> query						
	SUBJECT	TAMAÑO DEL GEN	% IDENTIDAD	% COBERTURA	E-VALUE	BIT-SCORE
PRN A	CONTING 2	538	45.455	6.15	0.046	34.7
PRN B	Cero resultados de búsqueda					
PRN C	CONTING 6	566	25.000	34.63	0.014	36.6
PRN D	CONTING 5	370	23.822	100.00	2.29e-16	79.3
Comparación de los genes biosintéticos de pirrolnitrina en GB99 <i>B. pyrrocinia</i> query						
	SUBJECT	TAMAÑO DEL GEN	% IDENTIDAD	% COBERTURA	E-VALUE	BIT-SCORE
PRN A	CONTING 2	537	48.148	5	0.080	33.9
PRN B	Cero resultados de búsqueda					
PRN C	CONTING 4	566	24.599	33	0.043	35.0
PRN D	CONTING 5	373	25.348	81	2.57e-18	85.1

En el caso del antifúngico occidiofungina, se logró identificar todos los genes en la misma ubicación, con datos que cumplen los parámetros aceptables. Se obtuvieron porcentajes de identidad al 80%, un E-value de 0.0 o inferior a e-100, un Bit-score acorde al tamaño del gen, y todas las coberturas del 80%, como se observa en la tabla 6. Esta tabla presenta los datos organizados por rangos, desde el gen más pequeño al más grande, y viceversa para los demás parámetros, en el contexto de las, secuencias de ADN. En Anexo 5 proporciona un desglose detallado de los datos correspondientes a cada gen de las secuencias de ADN y proteína. Por lo tanto, se puede asegurar que los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina está presente en la cepa GB99.

Tabla 6. Resultados obtenidos de la búsqueda realizada en BLASTn de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina a partir de secuencias query de *B. contaminans*, *B. ambifaria* y *B. pyrrocinia*.

Query vs GB99	Subject	Tamaño del gen	% Identidad	% Cobertura	E-value	Bit-score
<i>B. contaminans</i> vs GB99	CONTING 9	657- 13418	89.911- 95.324	98.9- 100	0.0	687- 19560
<i>B. ambifaria</i> vs GB99	CONTING 9	657- 13437	90.038- 96.549	96.2- 100	0.0	720-21264
<i>B. pyrrocinia</i> vs GB99	CONTING 9	657- 13395	90.417- 97.371	98.3- 100	0.0	659- 20844

D. Alineamiento global y búsqueda de dominios mediante la plataforma de SMART PROTEIN de los genes biosintéticos del antifungico occidiofungina.

Se realizó el alineamiento global de los genes biosintéticos para corroborar la similitud entre los genes de la cepa GB99 y los de las especies *B. contaminans* (NC_008392), *B. ambifaria* (NC_EU938698.5) y *B. pyrrocinia* (NC_AF161186), respecto a las query agrupándolos según su función. En la tabla 7 se presentan: A) Genes de biosíntesis, B) Genes de regulación y C) Genes de transporte.

En el inciso A) se puede observar que en la mayoría de los alineamientos con cada query presentan porcentajes de similitud en el rango del 47-50%. En el inciso B), se nota que el “gen 2” muestra altos los porcentajes de similitud del 45-48% con respecto las tres query. Finalmente, en el inciso C) los porcentajes varían entre 18-50% entre las tres query, destacando que el “gen 1” no está presente en *B. pyrrocinia*.

Dado que la mayoría de los porcentajes de similitud se encuentran en torno al 80% (excepto en los “genes 2 y 3”), no es posible asegurar que los genes biosintéticos de la cepa GB99 se conserven en comparación con las secuencias *query*.

Tabla 7. Resultados obtenidos del alineamiento global de los genes biosintéticos, A) Genes de biosíntesis, B) Genes de regulación y C) Genes de transporte.

A) Genes de biosíntesis					
Porcentaje de identidad del alineamiento global					
	GB99 vs <i>B. contaminans</i>	GB99 vs <i>B. ambifaria</i>	GB99 vs <i>B. pyrrocinia</i>	Tamaño Pares de bases	Función
GEN 7	49.63	49.52	49.09	9595	NRPS
GEN 8	50.19	49.30	50.14	9066	NRPS
GEN 9	50.41	48.35	50.04	3921	NRPS
GEN 11	47.26	47.03	49.00	13410	Hybrid NRPS-PKS
GEN 13	45.81	48.85	47.53	4428	NRPS

B) Genes de regulación					
Porcentaje de identidad del alineamiento global					
	GB99 vs <i>B. contaminans</i>	GB99 vs <i>B. ambifaria</i>	GB99 vs <i>B. pyrrocinia</i>	Tamaño Pares de bases	Función
GEN 2	94.06	94.50	23.09	822	LuxR-Type regulator
GEN 3	45.15	48.45	47.42	891	LuxR-Type regulator

C) Genes de transporte					
Porcentaje de identidad del alineamiento global					
	GB99 vs <i>B. contaminans</i>	GB99 vs <i>B. ambifaria</i>	GB99 vs <i>B. pyrrocinia</i>	Tamaño Pares de bases	Función
GEN1	42.52	43.61	NO PRESENTE	1749	FAD-linked oxidase domain protein
GEN 4	46.96	45.02	46.44	1704	Cyclic peptide transporter
GEN 5	42.53	42.27	45.83	483	Hypothetic protein
GEN 6	38.40	38.73	46.65	657	Glycosyl transferase
GEN 10	48.80	47.29	47.32	3324	Hydrolase
GEN 12	49.27	50.35	48.23	987	Flavin-dependent monooxygenase
GEN 14	42.19	45.68	41.68	1371	Halogenase
GEN 15	33.26	48.28	49.05	951	Transaminase
GEN 16	33.26	37.24	48.69	720	Epimerase
GEN17	18.78	45.86	43.92	987	Thioesterase

No obstante, se procedió a realizar la búsqueda de dominios de los genes biosintéticos en la plataforma de SMART PROTEIN para verificar que los diecisiete genes que lo constituyen conservan los dominios fundamentales para llevar a cabo sus funciones. En el caso de los genes de biosíntesis, se consideró la presencia de los dominios básicos que pertenecen a la síntesis de péptidos no ribosomales, que incluyen adenilación, tiolación, condensación y tioesterasa. Es crucial confirmar la conservación de estos dominios para asegurar que el clúster puede llevar a cabo la síntesis del antifúngico occidiofungina.

Para el caso de los genes de regulación y transporte, se realizó una búsqueda general debido a la falta de conocimiento sobre si comparten los mismos dominios que los presentes en la cepa GB99 en comparación con las *query*, y para observar si los porcentajes de alineamientos superan el 80% de similitud.

En cuanto a los genes de biosíntesis, se encontró que comparten los dominios básicos y algunos dominios accesorios. Sin embargo, para el “gen 8” tenemos que *B. contaminans* no presenta el dominio de PKS-PP (policétido sintasa), como se observa en la Fig.18. Esto indica que la cepa GB99, al conservar los dominios básicos y tener dominios accesorios, posee una mayor versatilidad para producir compuestos con una amplia diversidad estructural a partir de las sintasas peptídicas no ribosomales, además, de sintetizar la occidiofungina. Así mismo, los porcentajes de alineamiento global se encuentran en un rango de 87-98%, excepción para el dominio Acyl transferasa presente en el “gen 11”, que mostró un 34% con respecto a la *query B. contaminans*.

Para el caso de los genes de regulación están presentes en todas las *query* y en la cepa GB99 con altos porcentajes de alineamiento como se observa en la Fig 19.

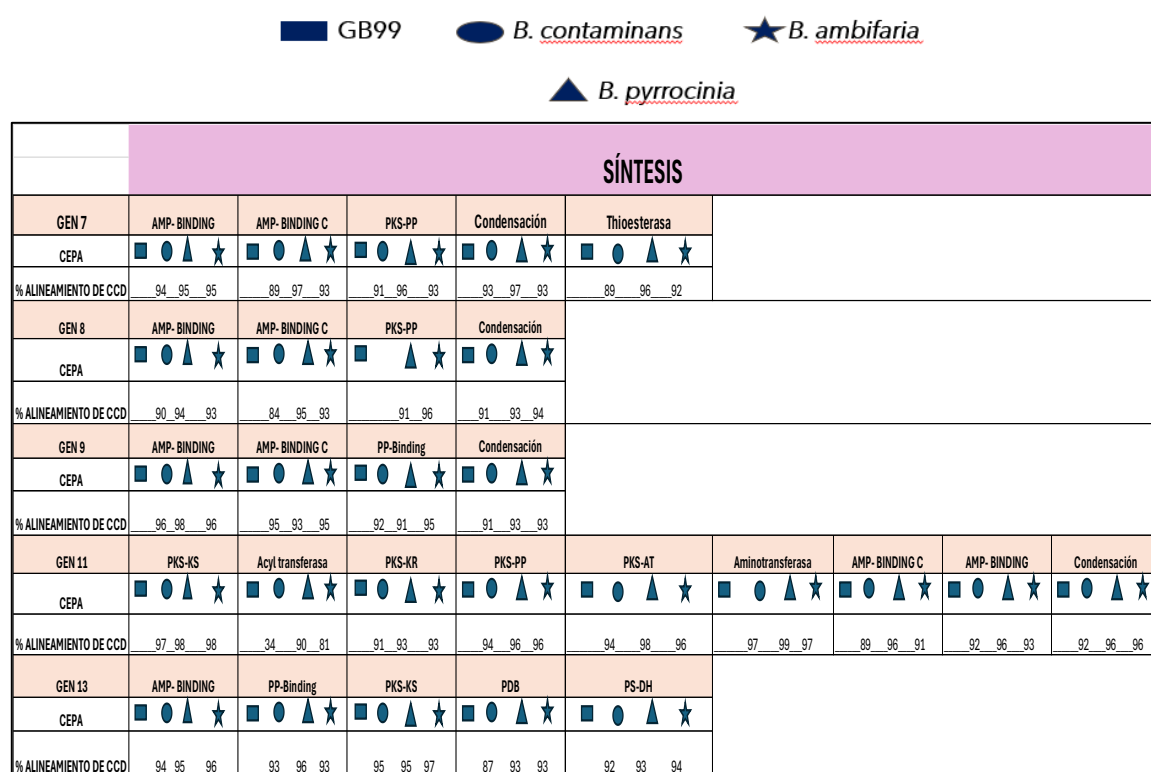


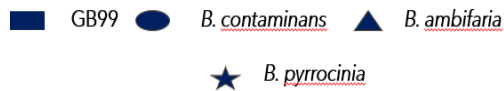
Figura 14. Resultados de la búsqueda de conservación de dominios de los genes de *biosíntesis* con su respectivo porcentaje de alineamiento, donde cada ícono representa a la cepa GB99 y las *query*.

■ GB99 ● *B. contaminans* ▲ *B. ambifaria*
★ *B. pyrrocinia*

		REGULADORES			
GEN2	DOMINIO Lux R				
CEPA	■	●	▲	★	
% ALINEAMIENTO DE CCD		95	100	98	
GEN 3	DOMINIO Lux R				
CEPA	■	●	▲	★	
% ALINEAMIENTO DE CCD		93	97	95	

Figura 15. Resultados de la búsqueda de conservación de dominios de los genes de *regulación* con su respectivo porcentaje de alineamiento, donde cada ícono representa a la cepa GB99 y las *query*.

En los genes de transporte podemos observar que la query *B. pyrrocinia* no tiene el “gen 1” correspondiente a un FAD-linked oxidase domain protein. Además, *B. contaminans* presenta un bajo porcentaje de similitud del 37% en el dominio Chol en el “gen 1”. Por otro lado, los demás dominios correspondientes a los otros genes se encuentran conservados con altos porcentajes de alineamiento en un rango de 83-100%, como se observa en la Fig. 20. Estos resultados indican que los genes biosintéticos se encuentran conservado comparado con las *query* y que las variaciones que encontradas en los dominios de los genes nos permiten conocer que tan versátil es la cepa GB99 para producir los cuatro tipos de occidiofunginas: A, B, C y D, reportadas por Gu *et al.*, 2011.


 GB99 ● *B. contaminans* ▲ *B. ambifaria*
 ★ *B. pyrrocinia*

		TRANSPORTE							
GEN 1		Dominio FAD				Dominio Chol			
CEPA									
% ALINEAMIENTO DE CCD			83	97			37	96	
GEN 4		DOMINIO ABC MEMBANA				DOMINIO AAA			
CEPA					★				★
% ALINEAMIENTO DE CCD			94	95	94		93	96	93
GEN 5		Dominio d1irax1							
CEPA									★
% ALINEAMIENTO DE CCD				77		79			81
GEN 6		Dominio Glycosil Transferasa							
CEPA									★
% ALINEAMIENTO DE CCD				93		95			93
GEN 10		Dominio Lactamasa B							
CEPA									★
% ALINEAMIENTO DE CCD				94		98			96
GEN 12		Bac luciferasa		PS-DH		PKS-KR		PKS-PP	
CEPA					★				★
% ALINEAMIENTO DE CCD		96	98	97		88	90	93	
GEN 14		Dominio TauD							
CEPA									★
% ALINEAMIENTO DE CCD				89		92			96
GEN 15		Dominio Aminotransferasa							
CEPA									★
% ALINEAMIENTO DE CCD				93		96			94
GEN 16		Dominio Epimerasa							
CEPA									★
% ALINEAMIENTO DE CCD				98		98			100
GEN 17		Dominio Abhydrolasa							
CEPA									★
% ALINEAMIENTO DE CCD				87		92			93

Figura 16. Resultados de la búsqueda de conservación de dominios de los genes de *transporte* con su respectivo porcentaje de alineamiento, donde cada ícono representa a la cepa GB99 y las *query*.

E. Construcción del mapa de los genes biosintéticos del antifúngico occidiofungina.

Se construyó el mapa de los genes biosintéticos contemplando la cepa GB99, *B. contaminans*, *B. ambifaria* y *B. pyrrocinia*, para observar posibles cambios en tamaño y orientación. En la Fig. 21 se muestra que en efecto en cuanto al tamaño no varían, pero que *B. pyrrocinia* no tiene el “gen 1”, la cepa GB99 no tiene el “gen 18”, lo que nos aproxima a que existe variabilidad en la producción del antifúngico. Además, el “gen 2” correspondiente al regulador tipo LuxR y el “gen 16” presenta diferente orientación en comparación las *query*. Esto implica la necesidad de realizar un análisis de las regiones intergénicas para identificar posibles diferencias entre ellas.

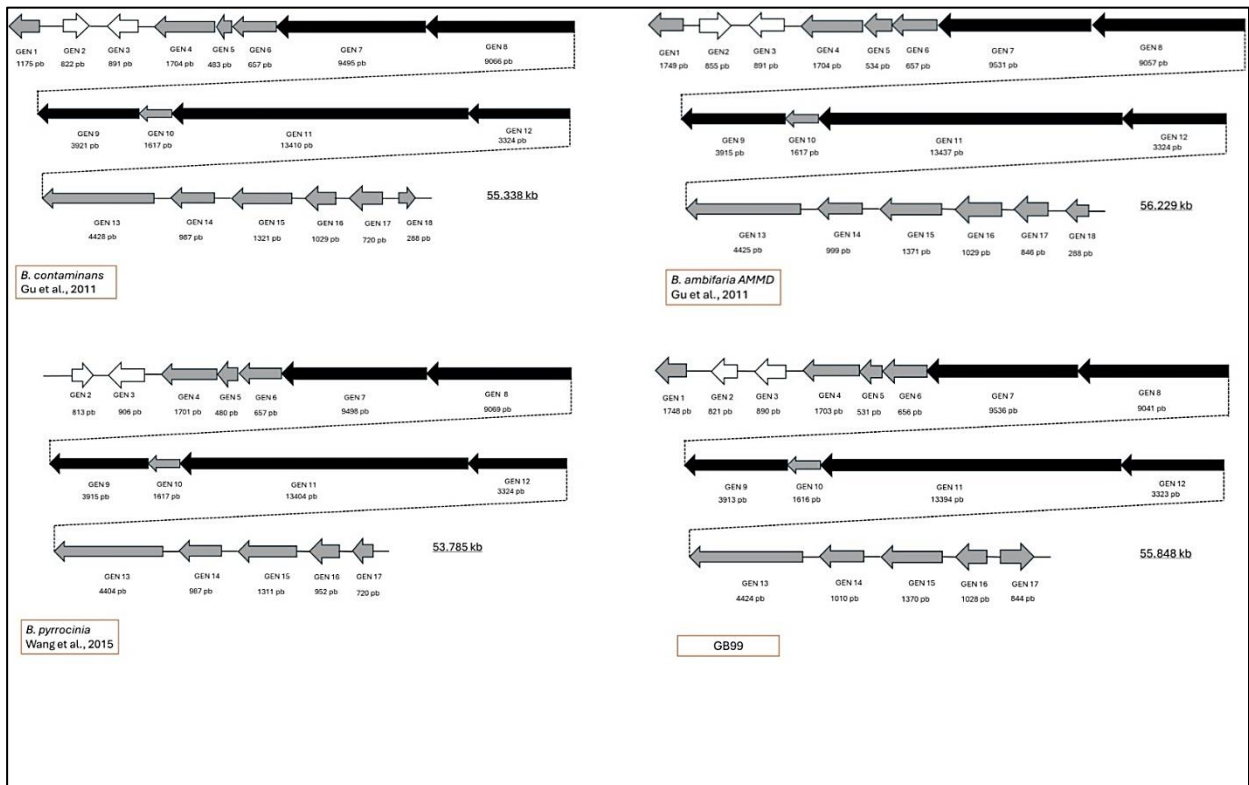


Figura 17. Mapa de los genes biosintético del antifúngico occidiofungina de la cepa GB99 y las *Burkholderias* utilizadas como *query*.

Los resultados obtenidos por la secuencia de MacroGen indican una alta calidad de las secuencias, con valores superiores a Q28 y un contenido elevado de GC%. Esto fue corroborado mediante la herramienta FastQ, que permitió verificar la ausencia de secuencias sobrerrepresentadas y asegurar la correcta eliminación de adaptadores utilizados en la secuenciación, confirmando así la precisión en la identificación y anotación de los genes biosintéticos, lo cual es esencial para la fiabilidad en los ensamblajes posteriores.

En cuanto a la comparación de los diferentes ensamblajes, el análisis sugiere que el ensamblaje "SPADES 3" es el más adecuado, basado en los parámetros obtenidos como N50, número de contigs y longitud de los contigs evaluados con el programa QUAST. Esta herramienta asegura la calidad del ensamblaje minimizando errores en la identificación de genes biosintéticos.

La búsqueda de los genes biosintéticos para los antifúngicos occidiofungina y pirrolnitrina muestra resultados relevantes. Los valores de identidad por debajo del 80%, coberturas menores al 80%, E-values bajos y Bit-scores no coincidentes con el tamaño del gen sugieren la ausencia de genes para pirrolnitrina. En contraste, los genes biosintéticos necesarios para producir occidiofungina están presentes, con valores de identidad dentro del 80%, coberturas alrededor del 80%, E-value de 0.0 y Bit-score adecuado, lo que confirma la similitud de las secuencias encontradas con las secuencias reportadas. Sin embargo, el alineamiento global mostró variabilidad en los genes de la cepa GB99 respecto a las de *B. ambifaria*, *B. pyrrocinia* y *B. contaminans*, lo que sugiere diferencias en genes de regulación y transporte que podrían influir en la síntesis de variantes de occidiofungina.

Los resultados de la búsqueda de los genes biosintéticos de los antifúngicos occidiofungina y pirrolnitrina, es un punto crucial para aproximarnos que estos puedan estar presentes de manera completa y que puedan ser producidos por la cepa GB99. Los valores de porcentaje de identidad debajo del 80%, Cobertura menor del 80%, E-value menores a 0.0 y Bit-score no correspondiente al tamaño de cada gen, esto nos indican la ausencia de los genes biosintéticos para el antifúngico pirrolnitrina. En comparación, de los valores obtenidos del porcentaje de identidad dentro del 80%, Cobertura dentro del 80%, E-value del 0.0 y Bit-score correspondiente al tamaño de cada gen, indican que la cepa GB99 tiene los genes biosintéticos para producir el antifúngico occidiofungina, estos parámetros nos permiten asegurar la presencia de estos genes biosintéticos y la similitud que pueden tener las secuencias encontradas con respecto a las secuencias reportadas. Sin embargo, en el alineamiento global realizado, se muestra que los genes de la cepa GB99 tienen variabilidad con los de *B. ambifaria*, *B. pyrrocinia* y *B. contaminans*, este análisis permite comprender cómo las diferencias en los genes de regulación y transporte pueden afectar la capacidad de la cepa GB99 para sintetizar diferentes variantes de occidiofungina.

El análisis de conservación de dominios básicos de genes relacionados con la biosíntesis, regulación y transporte indica que la cepa GB99 conserva dominios fundamentales (adenilación, condensación, tiolación) para la síntesis de péptidos no ribosomales, además de ciertos dominios accesorios. La ausencia del dominio PKS-PP en *B. contaminans* apunta a una posible mayor versatilidad de la cepa GB99 en la producción de compuestos antifúngicos. Estas diferencias estructurales son clave para entender la capacidad biosintética comparativa y cómo la conservación de ciertos dominios es crucial para la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antifúngica.

Por lo cual, el análisis de conservación de dominios básicos para los genes de biosíntesis, regulación y transporte, nos indican que la cepa GB99 conserva los dominios base (adenilación, condensación, tiolación) para la síntesis de péptidos no ribosomales, incluyendo aquellos dominios accesorios, también se identificó la ausencia del dominio PKS-PP en *B. contaminans* lo que sugiere que la cepa GB99 podría tener una mayor versatilidad en la producción de compuestos antifúngicos. Esta diferencia estructural es importante para entender la capacidad biosintética comparada entre las cepas y cómo la conservación de ciertos dominios puede ser crítica para la síntesis de metabolitos secundarios con función antifúngica.

La construcción del mapa de genes biosintéticos muestra que los genes de la cepa GB99 están completos y organizados para la producción de occidiofungina. Sin embargo, la orientación divergente de genes específicos, como el "gen 2" (regulación) y el "gen 17" (transporte), respecto a las secuencias de referencia, sugiere posibles variaciones en la expresión o regulación de la biosíntesis del antifúngico. Este hallazgo plantea interrogantes para futuras investigaciones sobre cómo estas variaciones estructurales podrían afectar la síntesis y efectividad de occidiofungina.

Los resultados de la construcción del mapa de los genes biosintéticos muestran que los genes de la cepa GB99 están completos y bien organizados para la producción de occidiofungina. Sin embargo, la diferencia en la orientación de algunos genes, como el "gen 2" (regulación) y el "gen 17" (transporte), respecto a las queries, sugiere una posible variación en la expresión o regulación de la biosíntesis del antifúngico.

Finalmente, la conservación de dominios en genes biosintéticos, reguladores y transportadores en la cepa GB99 respalda su capacidad para producir distintas variantes de occidiofungina (A, B, C y D), lo que subraya su potencial en aplicaciones biotecnológicas, específicamente en la producción de antifúngicos para el control de patógenos en cultivos.

Este hallazgo abre la puerta a futuras investigaciones para comprender cómo estas variaciones estructurales pueden influir en la síntesis y eficacia de la síntesis de la occidiofungina. A pesar de ello, la conservación de dominios en los genes *biosintéticos*, *reguladores* y *transportadores* respalda la capacidad de la cepa GB99 para producir las diferentes variantes de occidiofungina (A, B, C y D). Esto es particularmente importante para discutir el potencial de esta cepa en aplicaciones biotecnológicas, como la producción de antifúngicos para el control de patógenos en cultivos.

6.3 Establecer un método para extraer, concentrar, detectar e identificar los antifúngicos.

A. Extracción y concentración de los metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99.

Para la extracción y concentración de los metabolitos secundarios, nuevamente estos fueron producidos por la cepa GB99 en fuente de Xilosa al 3% con medio MM9, se inactivaron y se centrifugo para obtener el medio libre de células. Posteriormente se realizó la extracción por medio de la resina Amberlita XAD-16 donde se obtuvo un extracto de color amarillo el cual se llevó a concentrar en rotavapor hasta obtener 5 ml de muestra cómo se observa en la Fig. 22. Por último, estos 5ml se repartieron en tubos eppendor de 1 ml, se llevaron a evaporación en termoblock y se resuspendió en metanol 50%, etanol 50% y agua, estas muestras se utilizaron la para detección cualitativa de los antifúngicos por TLC.

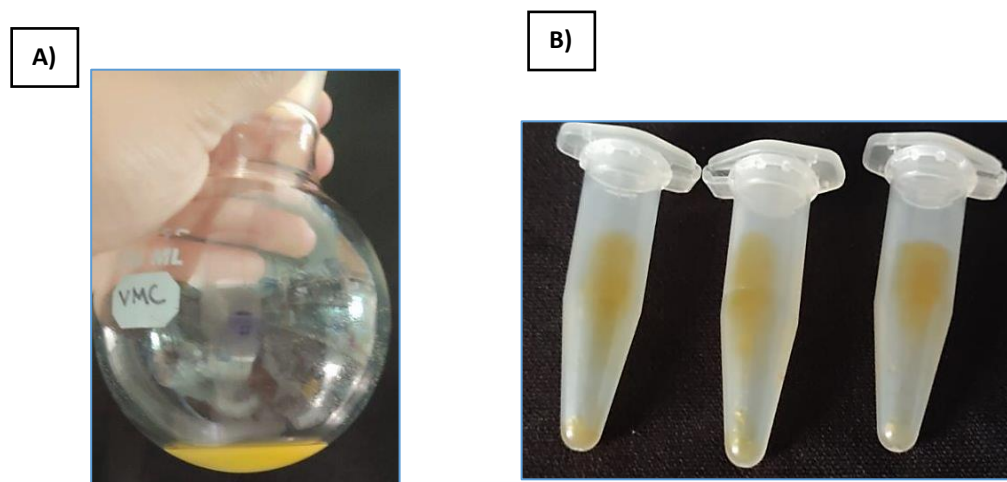


Figura 18. A) Muestra obtenida por la concentración por rotavapor, B) Muestras totalmente secas para llevar a resuspensión.

B. Detección de los antifúngicos producidos por la cepa GB99 mediante TLC (Thin-Layer Chromatography).

Las muestras obtenidas de la concentración y que se resuspendieron, fueron rotuladas de la siguiente manera: A) Muestra concentrada por Rotavapor, B) Resuspensión en agua, C) Resuspensión en metanol 50%, D) Metabolitos secundarios obtenidos por centrifugación y F) Resuspensión en etanol 50%. Estas fueron sometidas a cuatro sistemas de solventes: sistema uno conformado por cloroformo: metanol: agua en una relación de 60:16:2; el sistema dos cloroformo: metanol: agua en una relación 30:30:2; el sistema tres, cloroformo: etanol: agua en una relación 20:60:2; y el sistema cuatro, acetato de etilo: metanol en una relación 2:1. Como podemos observar en la Fig. 23, el sistema cuatro fue el que mejor separo las muestras A), B), C), D) y F) con base a su polaridad, es decir, se observa la

separación en la zona polar, moderadamente polar y no polar en comparación de los sistemas uno, dos y tres.

Con respecto a la bioautografía como se observa en la Fig. 24, en el sistema uno todas las muestras presentan antagonismo, destacando la F) con mayor área de inhibición. En el sistema dos, las muestras A), B), C) y F) presentan antagonismo y la D) no, sin embargo, la muestra F) destaca nuevamente con mayor área de inhibición. En el sistema tres, las muestras A), B), C) y F) presentan antagonismo y la D) no, sin embargo, la muestra A) destaca con mayor área de inhibición. Por último, en el sistema cuatro las muestras A), B), C) y F) presentan antagonismo y la D) no, sin embargo, la muestra F) destaca nuevamente con mayor área de inhibición.

El método de extracción por resina y concentración por rotavapor nos permitió separar la mayor parte de los metabolitos secundarios que pueda producir la cepa GB99, además de estos se encontraron en la zona polar, moderadamente polar y no polar, donde destaco la zona polar y moderadamente polar con la mayor área de antagonismo contra *F. solani*. Existe la posibilidad de que la occidiofungina se encuentre en la zona polar y/o moderadamente polar, basándonos en el sistema cuatro de acetato de etilo: metanol, con respecto a los antecedentes reportados por Lemtukei *et al.*, 2017 donde ellos utilizaron un sistema de acetato de etilo: tolueno en una relación de 2:1 y hacen alusión a que la occidiofungina se encuentre en la zona polar.

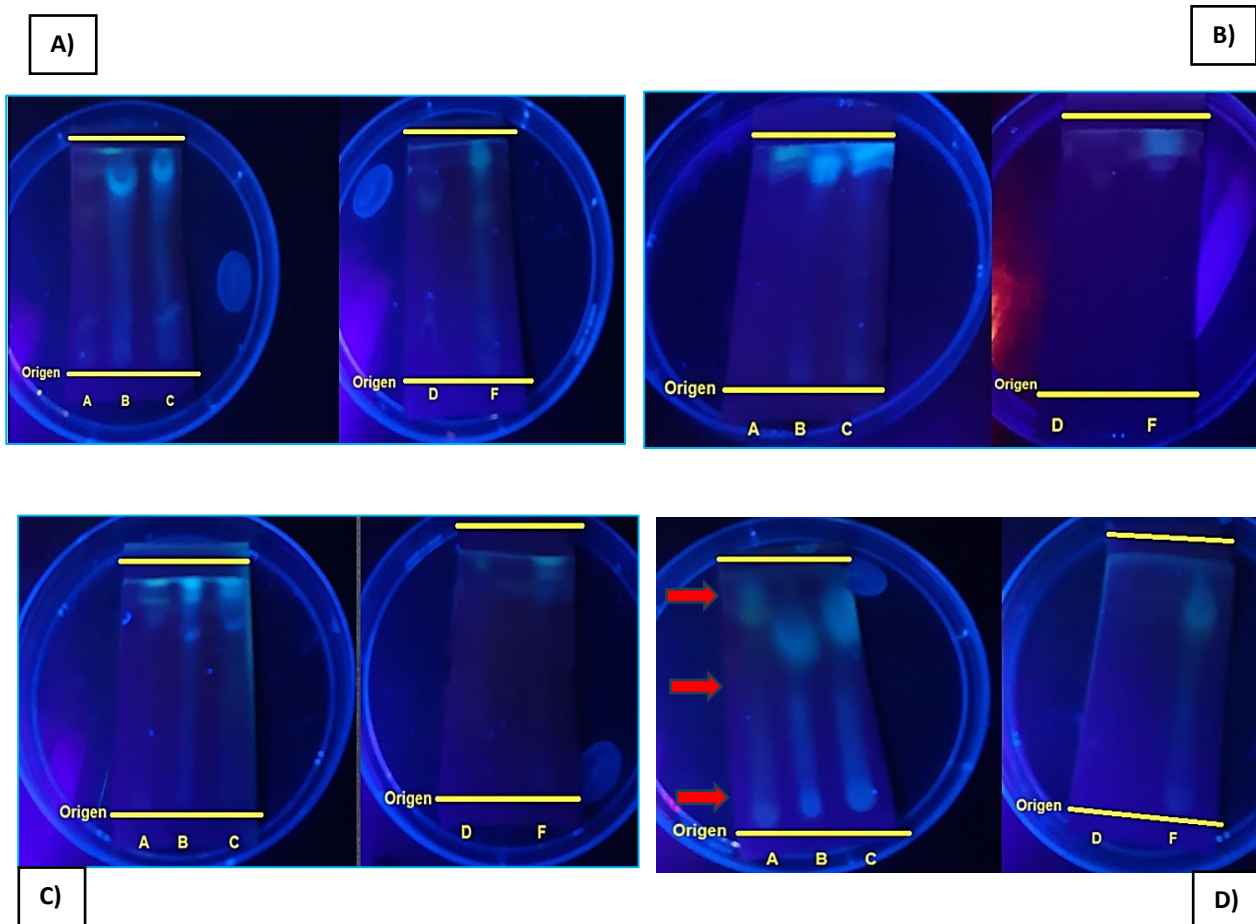


Figura 19. Detección de los antifúngicos producidos por la cepa GB99 mediante TLC utilizando las cinco muestras preparadas con los siguientes sistemas: A) Sistema uno, B) Sistema dos, C) Sistema tres y D) Sistema cuatro se señala con flechas roja la separación en cada zona.

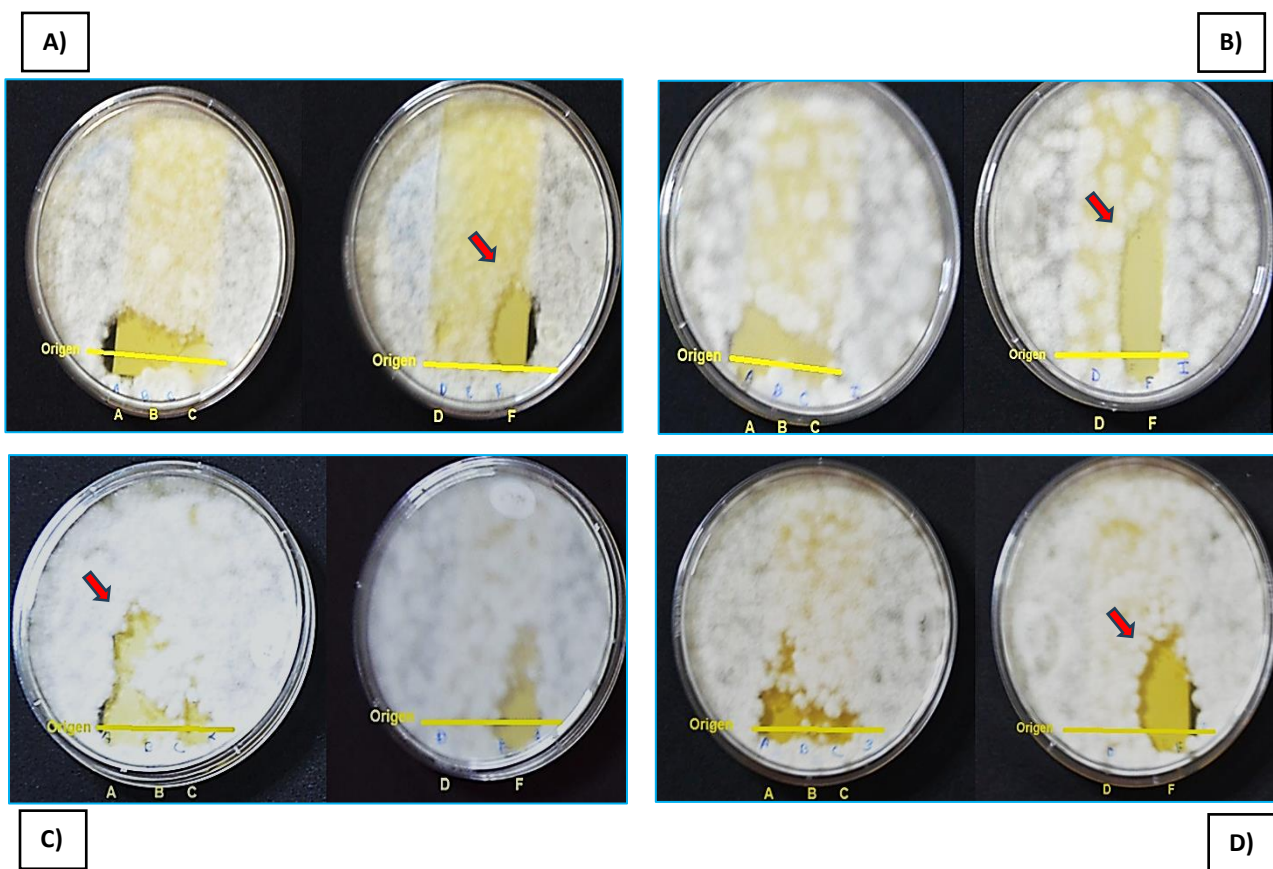


Figura 20. Bioautografía realizada en los siguientes sistemas A) Sistema uno, B) Sistema dos, C) Sistema tres y D) Sistema cuatro, destacando en cada uno con una flecha roja los que presentaron mayor área de antagonismo.

C. Detección del antifúngico occidiofungina mediante análisis cromatográfico HPLC-Masas.

Se detectaron los espectros de masas de tres occidiofunginas (A, B y C), utilizando las referencias reportadas por Gu *et al*, 2009 y Prihatna *et al.*, 2009. Como se muestra en la Tabla 7, se identificaron los espectros de masas con picos bien definidos para cada una de las occidiofunginas, junto con sus respectivos tiempos de retención, masas ionizadas y concentración de 10^2 de cada compuesto. Las occidiofunginas B y C comparten el mismo tiempo de retención; sin embargo, a nivel estructural, la diferencia radica en la presencia de un radical OH en la occidiofungina B, y un H en la occidiofungina C en el anillo de aminoácidos. Además, se detectaron las cuatro occidiofunginas: A, B, C y D, como se muestra en la Tabla 8, con picos igualmente definidos, tiempo de retención, masa ionizada y una concentración mayor, alcanzando 10^6 .

Tabla 7. Espectro de masas de la occidiofungina A, B, C y D de la primera muestra.

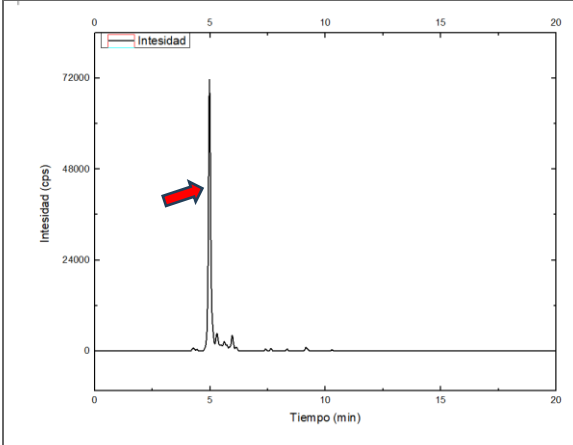
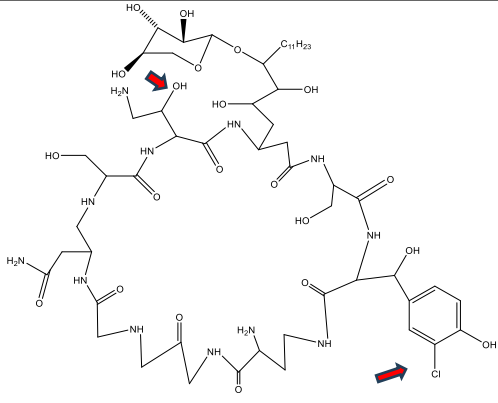
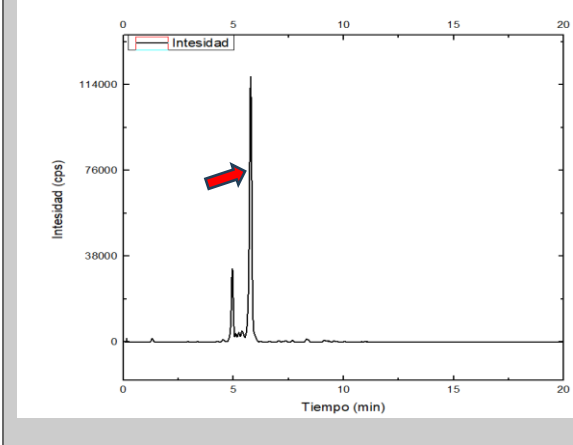
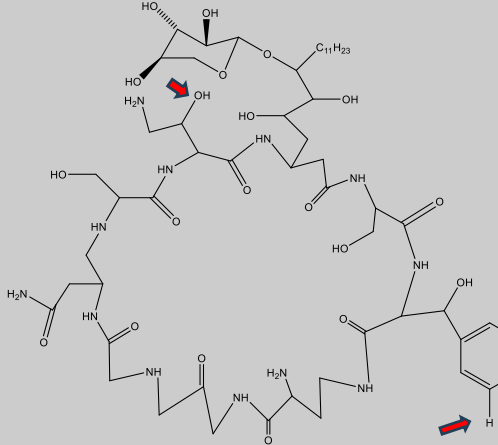
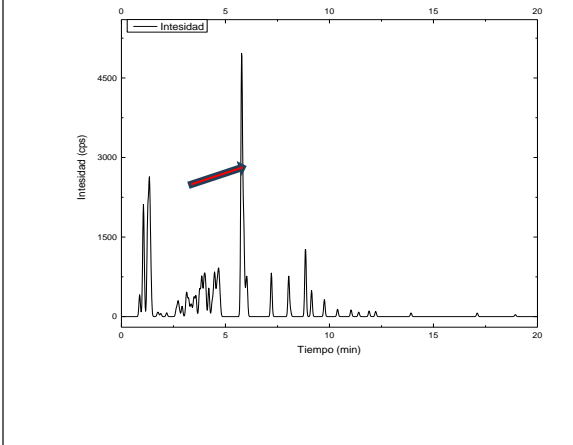
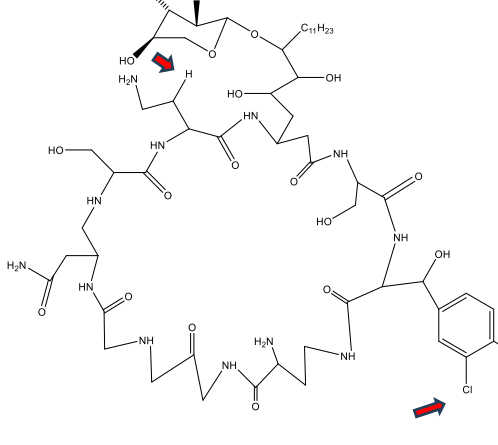
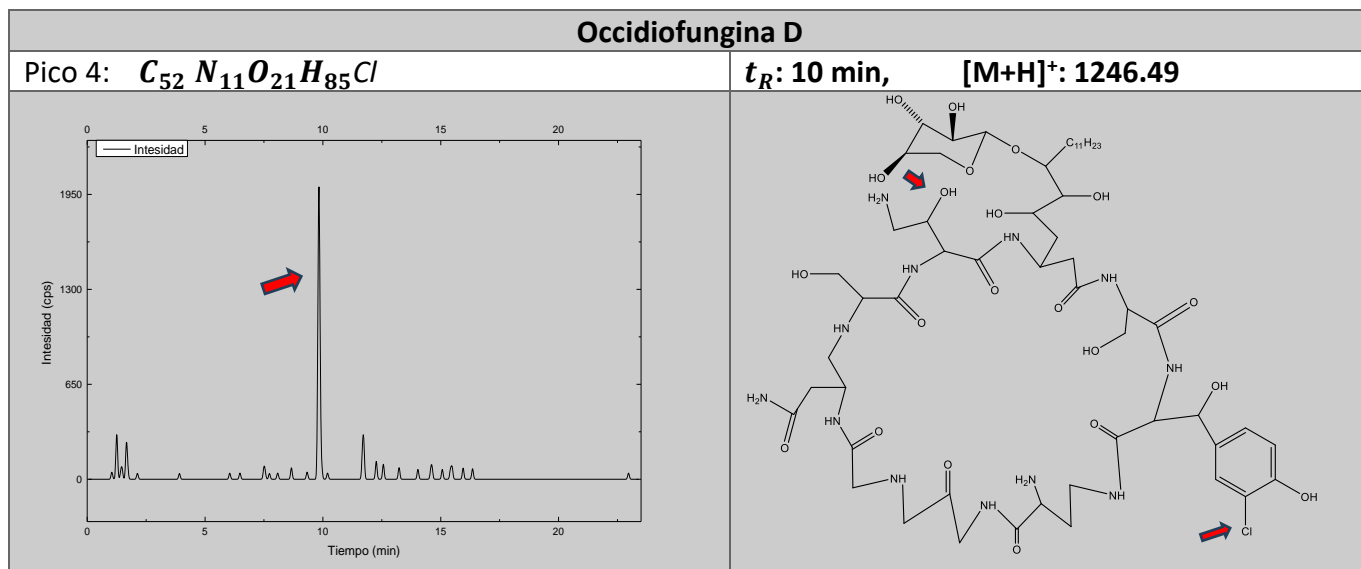
Occidiofungina A	
<p>Pico 1: $C_{52}N_{11}O_{21}H_{85}$</p> 	<p>t_R: 4.97 min, $[M+H]^+$: 1200.5994</p> 
Occidiofungina B	
<p>Pico 2: $C_{52}N_{11}O_{22}H_{85}$</p> 	<p>t_R: 5.77 min, $[M+H]^+$: 1216.5943</p> 
Occidiofungina C	
<p>Pico 3: $C_{52}N_{11}O_{21}H_{85}Cl$</p> 	<p>t_R: 5.77 min, $[M+H]^+$: 1234.5605</p> 

Tabla 8. Espectro de masas de la occidiofungina A, B, C y D de la segunda muestra.

Occidiofungina A	
Pico 1: $C_{52}N_{11}O_{21}H_{85}$	t_R : 7 min, $[M+H]^+$: 1200.5994
Occidiofungina B	
Pico 2: $C_{52}N_{11}O_{22}H_{85}$	t_R : 7 min, $[M+H]^+$: 1216.5943
Occidiofungina C	
Pico 3: $C_{52}N_{11}O_{21}H_{85}Cl$	t_R : 8 min, $[M+H]^+$: 1234.5605



D. Recolección y concentración del antifúngico occidiofungina.

Al observar que se obtuvo mejor espectro de masas y alta concentración en la detección de las cuatro occidiofunginas a partir de la segunda muestra, se llevó a cabo la recolección del minuto 4 al 8. Esta se realizó directamente en el equipo durante 10 h, se obtuvo un volumen final de aproximadamente 50 ml. Después se llevó a concentrar por rotavapor hasta que dejara de condensar la separación y de ello se recuperó aproximadamente 20 ml. Por último, se dejaron 3 ml repartidos en tubos eppendor para dejar evaporar completo la muestra y se resuspendió en metanol al 50% para utilizar en los siguientes ensayos de antagonismo.

E. Ensayo de antagonismo mediante la técnica de difusión de pozos del antifúngico occidiofungina.

Para llevar a cabo el antagonismo mediante la técnica de difusión de pozos, se utilizaron las siguientes muestras: "Fracción II" resuspendida con metanol al 50% donde se encuentran las cuatro occidiofunginas, GB99 producto de la producción de los metabolitos y separados por centrifugación, "M052" que fue separada por nitrógeno y concentrada mediante grafito de carbón comercial y nuestro control con agua estéril. Después de las 48 h de incubación, se procedió a realizar la medición del halo de inhibición, en la Fig. 25 podemos observar que nuestro control no presenta halos de inhibición, la muestra "M052" fue la que obtuvo mayor halo de inhibición con un promedio de 26.55 mm, seguido de las muestras GB99 con 19 mm y Fracción II con 17.8 mm halo de inhibición. Sin embargo, la muestra "Fracción II" no se diluyó por completo en metanol al 50%, lo que nos lleva a establecer la hipótesis de si al diluirla por completo, esta podría tener halos de inhibición más grandes o similares a la muestra "M052" y cabe resaltar que, mediante este ensayo las cuatro occidiofunginas recolectadas presentan antagonismo contra *F. solani*.

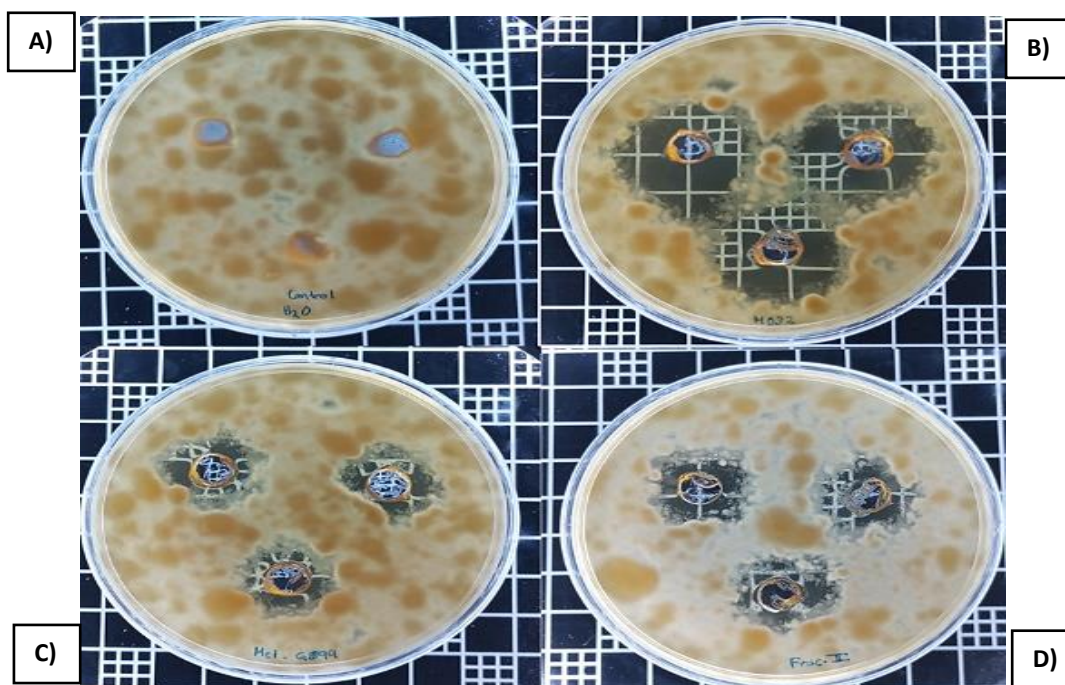


Figura 21. Antagonismo por método de difusión de pozos, A) Control, B) M052, C) GB99 y D) Fracción II.

El uso de la resina Amberlita XAD-16 para la extracción de metabolitos secundarios y del rotavapor para concentrar las muestras a 5 ml fueron aspectos clave en este experimento. La resina permitió la adsorción de la mayoría de los metabolitos sin afectar su polaridad, separándolos eficazmente del resto de componentes del medio MM9. Posteriormente, se realizó la desorción y concentración mediante rotavapor, permitiendo reducir el volumen de la muestra a 5 ml y separar los solventes de forma eficiente sin alterar los metabolitos, lo cual fue fundamental para los ensayos posteriores.

De manera similar, los resultados del TLC (cromatografía en capa fina) mostraron una separación efectiva de los metabolitos utilizando distintos sistemas de solventes. El sistema 4 (acetato de etilo: metanol) destacó en la separación de compuestos polares, moderadamente polares y no polares, proporcionando una clara diferenciación de las muestras bajo luz UV. La bioautografía reveló actividad antifúngica en la mayoría de las muestras (A, B, C y F) en los sistemas 1, 2, 3 y 4, siendo la muestra F la que presentó la mayor área de inhibición, lo que sugiere que los metabolitos en esta fracción son solubles en etanol al 50%. Además, estas muestras de inhibición se encuentran en las zonas polar y moderadamente polar, apoyando estudios previos (Lemtukei et al., 2017) que ubican la occidiofungina en esta zona, lo cual refuerza la hipótesis de su presencia en el área de inhibición.

La detección de las cuatro variantes de occidiofungina mediante HPLC-Masas, con picos bien definidos, tiempos de retención y concentraciones elevadas (hasta 10^6), confirma la

presencia de estos compuestos en la cepa GB99. Los análisis bioinformáticos también indicaron que la cepa GB99 contiene los genes biosintéticos y es capaz de producir occidiofungina, incluidas las cuatro variantes (A, B, C y D), gracias a la presencia de dominios accesorios que permiten la variación en radicales OH, H y Cl a nivel estructural. La recolección de compuestos durante 10 horas y su concentración a 20 ml demuestra la eficacia de los métodos empleados para recuperar metabolitos en cantidades adecuadas para pruebas posteriores.

El método de separación por nitrógeno y concentración mediante grafito comercial permitió obtener resultados superiores en la técnica de difusión en pozos. La muestra "M052" mostró el mayor halo de inhibición (26.55 mm), seguida de "GB99" (19 mm) y la "Fracción II" (17.8 mm). Esto indica que los metabolitos en su conjunto tienen un mayor efecto antagónico en comparación con la "Fracción II". Aunque la "Fracción II" representa la recolección de las cuatro variantes de occidiofungina y no se disolvió completamente en metanol al 50%, mostró una actividad antagónica comparable a la muestra "GB99". Estos resultados sugieren la necesidad de realizar pruebas de solubilidad adicionales para confirmar el antagonismo de la "Fracción II" y evaluar la implicación de metabolitos polares producidos por la cepa GB99, incluyendo la occidiofungina, en la inhibición de *F. solani*.

Estos hallazgos destacan el potencial de la occidiofungina producida por la cepa GB99 como un potente agente antifúngico, así como la capacidad de sus metabolitos secundarios para actuar como agentes de biocontrol al inhibir el crecimiento micelial y afectar la viabilidad de las esporas de *F. solani*. Sin embargo, es necesario investigar la estabilidad y vida útil de estos metabolitos, así como la occidiofungina, para garantizar su efectividad como biofungicidas en aplicaciones agrícolas futuras y el control de enfermedades fúngicas en distintos cultivos.

En relación con el uso de la resina Amberlita XAD-16 para la extracción de metabolitos secundarios y el uso del rotavapor para concentrar las muestras a 5 ml son aspectos clave. Esta resina no afectó la polaridad de los metabolitos secundarios y llevo a cabo la adsorción de la mayoría de ellos, permitiendo separarlos por polaridad del resto de los componentes del medio MM9 que posiblemente pueden estar presentes. Posteriormente, se llevó a cabo la desorción y la concentración por rotavapor, este punto clave nos hizo posible concentrar la muestra hasta obtener un volumen de 5ml y separa los solventes con eficacia sin alterar los metabolitos secundarios, para poder utilizarlos en los ensayos posteriores.

Similarmente los resultados del TLC mostraron una separación efectiva de los metabolitos obtenidos de la manera descrita anteriormente y en distintos sistemas de solventes. El sistema 4 (acetato de etilo: metanol) mostró la mejor separación de los metabolitos en zonas polares, moderadamente polares y no polares proporcionando la mejor separación

de las muestras de manera visible bajo luz UV a diferencia de los demás sistemas. Cabe añadir que la bioautografía reveló que la mayoría de las muestras (A, B, C y F) presentaron actividad antifúngica en los sistemas 1, 2, 3 y 4, destacando la muestra F con mayor área de inhibición. Así mismo, esta muestra F nos lleva a la hipótesis de que los metabolitos secundarios son solubles en etanol al 50%. Por otra parte, estas muestras que mostraron inhibición se encuentran dentro de la zona polar y moderadamente polar, asociado según con los estudios realizados por Lemtukei *et al.* (2017), que sugieren que la occidiofungina se localiza en la zona polar y que existe la hipótesis de que la occidiofungina se encuentre dentro de esta area de inhibición con respecto a los resultados observados.

Por otro lado, la detección de las cuatro occidiofunginas mediante HPLC-Masas, con picos definidos, tiempos de retención y concentraciones elevadas (hasta 10^6), es un hallazgo crucial que confirma la presencia de estos compuestos en la cepa GB99. Sobre todo que los resultados bioinformáticos nos aproximaron con seguridad de que en efecto la cepa GB99 tiene los genes biosintéticos y que es capaz de producir la occidiofungina, además de observar los dominios accesorios presentes, relacionados con los genes biosintéticos, y que nos señala la versatilidad que tiene la cepa GB99 para producir los cuatro tipos de occidiofungina (A, B, C y D), asociado particularmente en la variación de los radicales OH, H y Cl a nivel estructural de esta variantes. No obstante, la recolección de los compuestos durante 10 horas y su concentración hasta 20 ml resalta la efectividad de los métodos empleados para recuperar los metabolitos en cantidades suficientes para ensayos posteriores.

El método de separación por nitrógeno y concentración mediante grafito comercial nos permitió obtener mejores resultados observados en la técnica de difusión de pozos. Donde se muestran que la muestra "M052" presenta el mayor halo de inhibición (26.55 mm), seguida de la muestra "GB99" (19 mm) y la "Fracción II" (17.8 mm). Lo que indica que los metabolitos en conjunto tienen mayor efecto antagónico a comparación de la "Fracción II" y sobre todo que este método de separación mejora la captación de estos. Sin embargo, la "Fracción II" que representa la recolección de los cuatro tipos de occidiofungina y aunque la muestra no se diluyo completamente en metanol al 50%, nos muestra una actividad antagónica similar a la muestra "GB99". Lo que conduce a la hipótesis de realizar ensayos de solubilidad para repetir nuevamente este experimento que arroje un resultado más certero sobre el antagonismo de la muestra "Fracción II" y reforzar que los metabolitos de naturaleza polar producidos por la cepa GB99 incluyendo la occidiofungina, estén implicados en el antagonismo contra *F. solani*.

Estos hallazgos obtenidos, confirman el potencial de la occidiofungina producida por la cepa GB99 como un potente agente antifúngico, al igual que poder utilizar los metabolitos secundarios producidos por la cepa GB99 como agentes de biocontrol efectivo por la capacidad que tienen de inhibir el crecimiento micelial y afectar la viabilidad de las esporas

de *F. solani*. Sin embargo, aún falta por explorar la vida de anaquel y la estabilidad de estos metabolitos más la occidiofungina para su aplicación en campo en un futuro, lo que conlleva poder garantizar su efecto biofungicida contra enfermedades fúngicas en diversos cultivos.

7. PERSPECTIVAS

Las perspectivas que se plantean en este trabajo son:

- Analizar las regiones intergénicas de los dos genes con diferente orientación mediante herramientas bioinformáticas.
- Corroborar la ruta metabólica del antifúngico occidiofungina mediante mutagénesis dirigida de los genes de síntesis y/o reguladores.
- Mejorar la optimización de los métodos de extracción y concentración para obtener una mejor recuperación y actividad de los metabolitos secundarios.
- Mejorar la solubilidad de la occidiofungina con respecto al uso de solventes polares como el metanol al 50% para incrementar el área de inhibición en los ensayos de antagonismo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdulhameed Abdullah, A., Hussien Al-Juboory, H., & Al-Juboory, H. H. (2020). Isolation of the fungus fusarium solani causing cucumber root rot disease and its morphological and molecular identification. *Int. J. Agricult. Stat. Sci*, 16, 1959–1966. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19717.17120>
2. Alburqueque Andrade, D. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2). <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>
3. Alejandra, I., Jauregui, R., Daniel Hernández Castillo, F., Lissethe, S., Ligas, P., Roció, S., Alemán, M., Alberto, J., Valdés, A., & Herrera, R. R. (n.d.). Polifenoles de diferentes fuentes vegetales y su efecto in vitro contra patógenos del garbanzo.
4. Alejandro Morillo Quereigua, P. (n.d.). INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.
5. Ali, W. M., Abdel-Mageed, M. A., Hegazy, M. G. A., Abou-Shlell, M. K., Sultan, S. M. E., Salama, E. A. A., & Yousef, A. F. (2023). Biocontrol agent of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and root-rot fungi, *Fusarium solani* in okra morphological, anatomical characteristics and productivity under greenhouse

- conditions. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37837-z>
6. Alvarado-Ambriz, S., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, L., & Vernon-Carter, E. J. (2020). Wet processing coffee waste as an alternative to produce extracts with antifungal activity: In vitro and in vivo valorization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19, 135–149. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1612>
 7. Alvarez, F., Simonetti, E., Draghi, W. O., Vinacour, M., Palumbo, M. C., Do Porto, D. F., Montecchia, M. S., Roberts, I. N., & Ruiz, J. A. (2022). Genome mining of *Burkholderia ambifaria* strain T16, a rhizobacterium able to produce antimicrobial compounds and degrade the mycotoxin fusaric acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(7). <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03299-0>
 8. Araújo, F. D. da S., Araújo, W. L., & Eberlin, M. N. (2017). Potential of *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 as Biocontrol Agent Against *Fusarium oxysporum* Evaluated by Mass Spectrometry Imaging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(5), 901–907. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1610-6>
 9. Avelino, J., Allinne, C., Cerda, R., Willocquet, L., & Savary, S. (2018a). Annual Review of Phytopathology Multiple-Disease System in Coffee: From Crop Loss Assessment to Sustainable Management. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417>
 10. Avelino, J., Allinne, C., Cerda, R., Willocquet, L., & Savary, S. (2018b). Annual Review of Phytopathology Multiple-Disease System in Coffee: From Crop Loss Assessment to Sustainable Management. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417>
 11. Avelino, J., Treminio, E., Casanoves, F., Vílchez, S., Cárdenas, J., & Lizardo, C. (n.d.). Guía para la vigilancia de la roya del café (*Hemileia vastatrix*).
 12. Bach, E., Passaglia, L. M. P., Jiao, J., & Gross, H. (2022). *Burkholderia* in the genomic era: from taxonomy to the discovery of new antimicrobial secondary metabolites. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 48, Issue 2, pp. 121–160). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1946009>
 13. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. In *Journal of Pharmaceutical Analysis* (Vol. 6, Issue 2, pp. 71–79). Xi'an Jiaotong University. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
 14. Barrera-Galicia, G. C., Peniche-Pavía, H. A., Peña-Cabriales, J. J., Covarrubias, S. A., Vera-Núñez, J. A., & Délano-Frier, J. P. (2021). Metabolic footprints of *Burkholderia sensu lato* rhizosphere bacteria active against maize *Fusarium* pathogen†. *Microorganisms*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102061>

15. Batista, G. R. (n.d.). Universidade federal do amazonas-ufam instituto de ciências exatas e tecnologia-icet programa de pós-graduação em ciências e tecnologia para recursos amazônicos-ppgctra.
16. Beukes, C. W., Steenkamp, E. T., van Zyl, E., Avontuur, J., Chan, W. Y., Hassen, A. I., Palmer, M., Mthombeni, L. S., Phalane, F. L., Sereme, T. K., & Venter, S. N. (2019). *Paraburkholderia strydomiana* sp. nov. and *Paraburkholderia steynii* sp. nov.: rhizobial symbionts of the fynbos legume *Hypocalyptus sophoroides*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 112(9), 1369–1385. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01269-5>
17. Bilal, M., Yue, S. J., Hu, H. B., Wang, W., & Zhang, X. H. (2018). Adsorption/desorption characteristics, separation and purification of phenazine-1-carboxylic acid from fermentation extract by macroporous adsorbing resins. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(11), 3176–3184. <https://doi.org/10.1002/jctb.5673>.
18. Café mexicano planeación agrícola nacional. (2017).
19. Casey, J. T., Walsh, P. K., & O'Shea, D. G. (2007). Characterisation of adsorbent resins for the recovery of geldanamycin from fermentation broth. *Separation and Purification Technology*, 53(3), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.07.014>
20. Cheel, J., Urajová, P., Hájek, J., Hrouzek, P., Kuzma, M., Bouju, E., Faure, K., & Kopecký, J. (2017). Separation of cyclic lipopeptide puwainaphycins from cyanobacteria by countercurrent chromatography combined with polymeric resins and HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(4), 917–930. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0066-z>
21. Chen, K. C., Ravichandran, A., Guerrero, A., Deng, P., Baird, S. M., Smith, L., & Lu, S. E. (2013). The *Burkholderia contaminans* MS14 *ocfC* gene encodes a xylosyltransferase for production of the antifungal occidiofungin. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 2899–2905. <https://doi.org/10.1128/AEM.00263-13>
22. Claydon, N., Grove, J. F., & Pople, M. (1977). Insecticidal Secondary Metabolic Products from the Entomogenous Fungus *Fusarium solani*. In *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY* (Vol. 3).
23. Córdova-Alcántara, I. M., Venegas-Cortés, D. L., Martínez-Rivera, M. Á., Pérez, N. O., & Rodríguez-Tovar, A. V. (2019). Biofilm characterization of *Fusarium solani* keratitis isolate: increased resistance to antifungals and UV light. *Journal of Microbiology*, 57(6), 485–497. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8637-2>
24. Cothrell, A. T., & Majeti, R. K. (2021a). Development and validation of a bioanalytical method for occidiofungin a dissertation.

25. Deng, P. (n.d.). Genetic Characterization of Antimicrobial Activities of the Bacteria *Burkholderia Contaminans* MS14 and *Pseudomonas Chlororaphis* UFB2. <https://scholarsjunction.msstate.edu/td>
26. Deng, P., Wang, X., Baird, S. M., Showmaker, K. C., Smith, L., Peterson, D. G., & Lu, S. (2016). Comparative genome-wide analysis reveals that *Burkholderia contaminans* MS14 possesses multiple antimicrobial biosynthesis genes but not major genetic loci required for pathogenesis. *MicrobiologyOpen*, 5(3), 353–369. <https://doi.org/10.1002/mbo3.333>
27. Dwivedi, G. R., Sisodia, B. S., & Shikha. (2019). Secondary metabolites: Metabolomics for secondary metabolites. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications* (pp. 333–344). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00022-0>
28. Edwards, S. G., & Seddon, B. (n.d.). Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. <https://academic.oup.com/jambio/article/91/4/652/6721810>
29. El-Banna, N., & Winkelmann, G. (1998a). Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 85).
30. El-Banna, N., & Winkelmann, G. (1998b). Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 85).
31. Elshafie, H. S., & Camele, I. (2021a). An overview of metabolic activity, beneficial and pathogenic aspects of *burkholderia* spp. In *Metabolites* (Vol. 11, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo11050321>
32. Elshafie, H. S., & Camele, I. (2021b). An overview of metabolic activity, beneficial and pathogenic aspects of *burkholderia* spp. In *Metabolites* (Vol. 11, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo11050321>
33. Esmaeel, Q., Pupin, M., Jacques, P., & Leclère, V. (2018a). Nonribosomal peptides and polyketides of *Burkholderia*: new compounds potentially implicated in biocontrol and pharmaceuticals. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 25, Issue 30, pp. 29794–29807). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9166-3>
34. Esmaeel, Q., Pupin, M., Jacques, P., & Leclère, V. (2018b). Nonribosomal peptides and polyketides of *Burkholderia*: new compounds potentially implicated in biocontrol and pharmaceuticals. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 25, Issue 30, pp. 29794–29807). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9166-3>
35. Esmaeel, Q., Pupin, M., Jacques, P., & Leclère, V. (2018c). Nonribosomal peptides and polyketides of *Burkholderia*: new compounds potentially implicated in biocontrol and pharmaceuticals. In *Environmental Science and*

- Pollution Research (Vol. 25, Issue 30, pp. 29794–29807). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9166-3>
36. Esmael, Q., Pupin, M., Kieu, N. P., Chataigné, G., Béchet, M., Deravel, J., Krier, F., Höfte, M., Jacques, P., & Leclère, V. (2016). Burkholderia genome mining for nonribosomal peptide synthetases reveals a great potential for novel siderophores and lipopeptides synthesis. *MicrobiologyOpen*, 5(3), 512–526. <https://doi.org/10.1002/mbo3.347>
 37. Francoeur, C. B., May, D. S., Thairu, M. W., Hoang, D. Q., Panthofer, O., Bugni, T. S., Pupo, M. T., Clardy, J., Pinto-Tomás, A. A., & Currie, C. R. (2021). Burkholderia from Fungus Gardens of Fungus-Growing Ants Produces Antifungals That Inhibit the Specialized Parasite Escovopsis. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(14), 1–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.00178-21>
 38. Gamboa-Becerra, R., López-Lima, D., Villain, L., Breitler, J. C., Carrión, G., & Desgarenes, D. (2021). Molecular and environmental triggering factors of pathogenicity of fusarium oxysporum and f. Solani isolates involved in the coffee corky-root disease. *Journal of Fungi*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/jof7040253>
 39. Ganyu Gu, B., & State, M. (2010). Template Created By: James Nail 2010 Characterization of the occ gene cluster required for the production of antifungal compound occidiofungin in burkholderia contaminans strain ms14.
 40. Geográficos, C. (n.d.). 70 PABLO PÉREZ AKAKI y FLAVIA ECHÁNOVE HUACUJA.
 41. Gu, G., Smith, L., Liu, A., & Lu, S. E. (2011). Genetic and biochemical map for the biosynthesis of occidiofungin, an antifungal produced by Burkholderia contaminans strain MS14. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6189–6198. <https://doi.org/10.1128/AEM.00377-11>
 42. Gu, G., Smith, L., Wang, N., Wang, H., & Lu, S. E. (2009). Biosynthesis of an antifungal oligopeptide in Burkholderia contaminans strain MS14. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380(2), 328–332. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.073>
 43. Hansanant, N., & Smith, L. (2022). Occidiofungin: Actin Binding as a Novel Mechanism of Action in an Antifungal Agent. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091143>
 44. Heo, A. Y., Koo, Y. M., & Choi, H. W. (2022). Biological Control Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Burkholderia contaminans AY001 against Tomato Fusarium Wilt and Bacterial Speck Diseases. *Biology*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/biology11040619>
 45. Hernández, C., López, L., & Sánchez, L. (2021). Agentes de control biológico de la roya del café ¿Cómo funcionan y qué tan efectivos son? (Vol. 25, Issue 1).
 46. Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Acebo-Guerrero, Y., Velazquez-del Valle, M. G., & Hernández-Lauzardo, A. N. (2008). Antagonistic activity of

- Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). *Applied Soil Ecology*, 39(2), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.12.008>
47. Huaman, A., Torres, M., Ramirez, G., Leiva, S., Sanchez, T., & Oliva, S. (2021). Caracterización morfológica de hongos asociados al agroecosistema café (*Coffea arabica* L.), en el estado de Tabasco, México. *Revista Científica Pakamuros*, 9(3), 44–58. <https://doi.org/10.37787/pakamuros-unj.v9i3.217>
 48. Ibarra, J. E., Cristina, M., Rincón-Castro, D., & Patino, M. (2006). Microorganisms in the biological control of insects y phytopathogens Leobardo Serrano-Carreón Universidad Nacional Autónoma de México. <https://www.researchgate.net/publication/6259263>
 49. Jenul, C., Sieber, S., Daepfen, C., Mathew, A., Lardi, M., Pessi, G., Hoepfner, D., Neuburger, M., Linden, A., Gademann, K., & Eberl, L. (2018). Biosynthesis of fragin is controlled by a novel quorum sensing signal. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03690-2>
 50. Jepkoech, J., Mugo, D. M., Kenduiyo, B. K., & Too, E. C. (2021). Arabica coffee leaf images dataset for coffee leaf disease detection and classification. *Data in Brief*, 36. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.107142>
 51. Jia, J., Ford, E., Hobbs, S. M., Baird, S. M., & Lu, S. E. (2022a). Occidiofungin Is the Key Metabolite for Antifungal Activity of the Endophytic Bacterium *Burkholderia* sp. MS455 Against *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 112(3), 481–491. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-21-0225-R>
 52. Jia, J., Ford, E., Hobbs, S. M., Baird, S. M., & Lu, S. E. (2022b). Occidiofungin Is the Key Metabolite for Antifungal Activity of the Endophytic Bacterium *Burkholderia* sp. MS455 Against *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 112(3), 481–491. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-21-0225-R>
 53. Jung, B. K., Hong, S. J., Park, G. S., Kim, M. C., & Shin, J. H. (2018). Isolation of *Burkholderia cepacia* JBK9 with plant growth-promoting activity while producing pyrrolnitrin antagonistic to plant fungal diseases. *Applied Biological Chemistry*, 61(2), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s13765-018-0345-9>
 54. Khan, A., Bharti, P., Saraf, I., Mittal, N., Tewari, R., & Singh, I. P. (n.d.). Two new Aromatic Glycosides from a Soil Bacterium *Burkholderia gladioli* OR1.
 55. Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Sanders, E. R., Kaplan, D., & Hirsch, A. M. (2018). Antifungal activity of bacillus species against fusarium and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>
 56. Konno, H., Otsuki, Y., Matsuzaki, K., & Nosaka, K. (2013). Synthesis and antifungal activities of cyclic octa-lipopeptide burkholdine analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(14), 4244–4247. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.04.091>

57. Lemtukei, D., Tamura, T., Nguyen, Q. T., & Ueno, M. (2017). Inhibitory Activity of *Burkholderia* sp. Isolated from Soil in Gotsu City, Shimane, against *Magnaporthe oryzae*; Advances in Microbiology, 07(02), 137–148. <https://doi.org/10.4236/aim.2017.72011>
58. Lestari, A., Henri, H., Sari, E., & Wahyuni, T. (2021). Microscopic Characterization of *Fusarium* sp. Associated with Yellow Disease of Pepper (*Piper nigrum* L.) in South Bangka Regency. PLANTA TROPICA: Jurnal Agrosains (Journal of Agro Science), 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.18196/pt.v9i1.7753>
59. Leyva Mir, G. (n.d.). Variedades de café cultivadas en México, principales enfermedades del café (*Coffea arabica*).
60. Li, X., Yu, H. Y., Lin, Y. F., Teng, H. M., Du, L., & Ma, G. G. (2010). Morphological changes of *Fusarium oxysporum* induced by CF66I, an antifungal compound from *Burkholderia cepacia*. Biotechnology Letters, 32(10), 1487–1495. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0316-7>
61. Li, Y., Zhang, F., Banakar, S., & Li, Z. (2018). Comprehensive optimization of precursor-directed production of BC194 by *Streptomyces rochei* MB037 derived from the marine sponge *Dysidea arenaria*. Applied Microbiology and Biotechnology, 102(18), 7865–7875. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9237-5>
62. Lu, S. E., Novak, J., Austin, F. W., Gu, G., Ellis, D., Kirk, M., Wilson-Stanford, S., Tonelli, M., & Smith, L. (2009a). Occidiofungin, a unique antifungal glycopeptide produced by a strain of *Burkholderia contaminans*. Biochemistry, 48(35), 8312–8321. <https://doi.org/10.1021/bi900814c>
63. Lu, S. E., Novak, J., Austin, F. W., Gu, G., Ellis, D., Kirk, M., Wilson-Stanford, S., Tonelli, M., & Smith, L. (2009b). Occidiofungin, a unique antifungal glycopeptide produced by a strain of *Burkholderia contaminans*. Biochemistry, 48(35), 8312–8321. <https://doi.org/10.1021/bi900814c>
64. Manejo integrado de plagas en el cultivo de café contenido. (n.d.).
65. Márquez-Fernández, O., Medel-Ortiz, R., Palestina, E. N., & Belingheri, M. E. (2020). Identificación de dos cepas de *Fusarium* productoras de pigmentos aisladas de *Bemisia* sp. (Hemiptera). Scientia Fungorum, 50, e1262. <https://doi.org/10.33885/sf.2020.50.1262>
66. Marshall, V. P., Mcwethy, S. J., Sirotti, J. M., & Cialdella, J. I. (1990). The effect of neutral resins on the fermentation production of rubradirin. In Journal of Industrial Microbiology (Vol. 5).
67. Meca, G., Ruiz, M. J., Soriano, J. M., Ritieni, A., Moretti, A., Font, G., & Mañes, J. (2010). Isolation and purification of enniatins A, A1, B, B1, produced by *Fusarium tricinctum* in solid culture, and cytotoxicity effects on Caco-2 cells. Toxicon, 56(3), 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.04.008>
68. Medjeldi, S., Bouzlama, L., Benabdallah, A., Essid, R., Haou, S., & Elkahoui, S. (2018). Biological activities, and phytochemicals of northwest Algeria *Ajuga*

- iva (L) extracts: Partial identification of the antibacterial fraction. *Microbial Pathogenesis*, 121, 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.022>
69. Menezes, B. S., Solidade, L. S., Conceição, A. A., Santos Junior, M. N., Leal, P. L., de Brito, E. S., Canuto, K. M., Mendonça, S., de Siqueira, F. G., & Marques, L. M. (2020). Pigment production by *Fusarium solani* BRM054066 and determination of antioxidant and anti-inflammatory properties. *AMB Express*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01054-y>
70. Meng, X. J., Galileya Medison, R., Cao, S., Wang, L. qin, Cheng, S., Tan, L. tao, Sun, Z. xiang, & Zhou, Y. (2023). Isolation, identification, and biocontrol mechanisms of endophytic *Burkholderia vietnamiensis* C12 from *Ficus tikoua* Bur against *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, 178. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105132>
71. Mohammednur, T., & Yesuf, N. (2021). Review on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) and its Management in Ethiopia. *International Journal of Research Studies in Science, Engineering and Technology*, 8(4), 5–13. <https://doi.org/10.22259/2349-476X.0804002>
72. Obregón Cárdenas, A. (n.d.). Universidad Autónoma de Nuevo León facultad de ciencias biológicas control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola utilizando como agente a *Bacillus thuringiensis* (Berliner).
73. Ong, K. S., Aw, Y. K., Lee, L. H., Yule, C. M., Cheow, Y. L., & Lee, S. M. (2016). *Burkholderia paludis* sp. nov., an antibiotic-siderophore producing novel *Burkholderia cepacia* complex species, isolated from Malaysian tropical peat swamp soil. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02046>
74. Olson RD, Assaf R, Brettin T, Conrad N, Cucinell C, Davis JJ, Dempsey DM, Dickerman A, Dietrich EM, Kenyon RW, Kuscuoglu M, Lefkowitz EJ, Lu J, Machi D, Macken C, Mao C, Niewiadomska A, Nguyen M, Olsen GJ, Overbeek JC, Parrello B, Parrello V, Porter JS, Pusch GD, Shukla M, Singh I, Stewart L, Tan G, Thomas C, VanOeffelen M, Vonstein V, Wallace ZS, Warren AS, Wattam AR, Xia F, Yoo H, Zhang Y, Zmasek CM, Scheuermann RH, Stevens RL. Ácidos nucleicos res. 9 de noviembre de 2022: gkac1003. doi: 10.1093/nar/gkac1003.
75. Petrova, Y. D., & Mahenthalingam, E. (2022). Discovery, mode of action and secretion of *Burkholderia sensu lato* key antimicrobial specialised metabolites. In *The Cell Surface* (Vol. 8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2022.100081>
76. Prasad, J. K., Pandey, P., Anand, R., & Raghuvanshi, R. (2021). Drought Exposed *Burkholderia seminalis* JRBHU6 Exhibits Antimicrobial Potential Through Pyrazine-1,4-Dione Derivatives Targeting Multiple Bacterial and Fungal Proteins. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.633036>

77. Productividad, A., & Agroproductividad. (n.d.). Coffee quality (coffea arabica l.) in two agroforestry systems in central veracruz, mexico (Vol. 11).
78. Quan, C. S., Zheng, W., Liu, Q., Ohta, Y., & Fan, S. D. (2006). Isolation and characterization of a novel Burkholderia cepacia with strong antifungal activity against Rhizoctonia solani. Applied Microbiology and Biotechnology, 72(6), 1276–1284. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0425-3>
79. Ravichandran, A., Geng, M., Hull, K. G., Romo, D., Lu, S.-E., Nutter, C., Gordon, D. M., Ghannoum, M. A., & Smith, L. (n.d.). Occidiofungin, an actin binding antifungal with in vivo efficacy in a vulvovaginal Short Title: Occidiofungin, an actin binding antifungal 4 5. <https://doi.org/10.1101/368720>
80. Ravichandran, A., Gu, G., Escano, J., Lu, S. E., & Smith, L. (2013a). The presence of two cyclase thioesterases expands the conformational freedom of the cyclic peptide occidiofungin. Journal of Natural Products, 76(2), 150–156. <https://doi.org/10.1021/np3005503>
81. Ravichandran, A., Gu, G., Escano, J., Lu, S. E., & Smith, L. (2013b). The presence of two cyclase thioesterases expands the conformational freedom of the cyclic peptide occidiofungin. Journal of Natural Products, 76(2), 150–156. <https://doi.org/10.1021/np3005503>
82. Rojas-Rojas, F. U., Salazar-Gómez, A., Vargas-Díaz, M. E., Vásquez-Murrieta, M. S., Hirsch, A. M., De Mot, R., Ghequire, M. G. K., Antonio Ibarra, J., & Estrada-de los Santos, P. (2018a). Broad-spectrum antimicrobial activity by burkholderia cenocepacia TATL-371, a strain isolated from the tomato rhizosphere. Microbiology (United Kingdom), 164(9), 1072–1086. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000675>
83. Rojas-Rojas, F. U., Salazar-Gómez, A., Vargas-Díaz, M. E., Vásquez-Murrieta, M. S., Hirsch, A. M., De Mot, R., Ghequire, M. G. K., Antonio Ibarra, J., & Estrada-de los Santos, P. (2018b). Broad-spectrum antimicrobial activity by burkholderia cenocepacia TATL-371, a strain isolated from the tomato rhizosphere. Microbiology (United Kingdom), 164(9), 1072–1086. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000675>
84. Santos, A. V., Dillon, R. J., Dillon, V. M., Reynolds, S. E., & Samuels, R. I. (2004). Occurrence of the antibiotic producing bacterium Burkholderia sp. in colonies of the leaf-cutting ant Atta sexdens rubropilosa. FEMS Microbiology Letters, 239(2), 319–323. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.005>
85. Schmidt, S., Blom, J. F., Pernthaler, J., Berg, G., Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., & Eberl, L. (2009). Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the Burkholderia cepacia complex. Environmental Microbiology, 11(6), 1422–1437. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01870.x>
86. siap 2021. (n.d.).

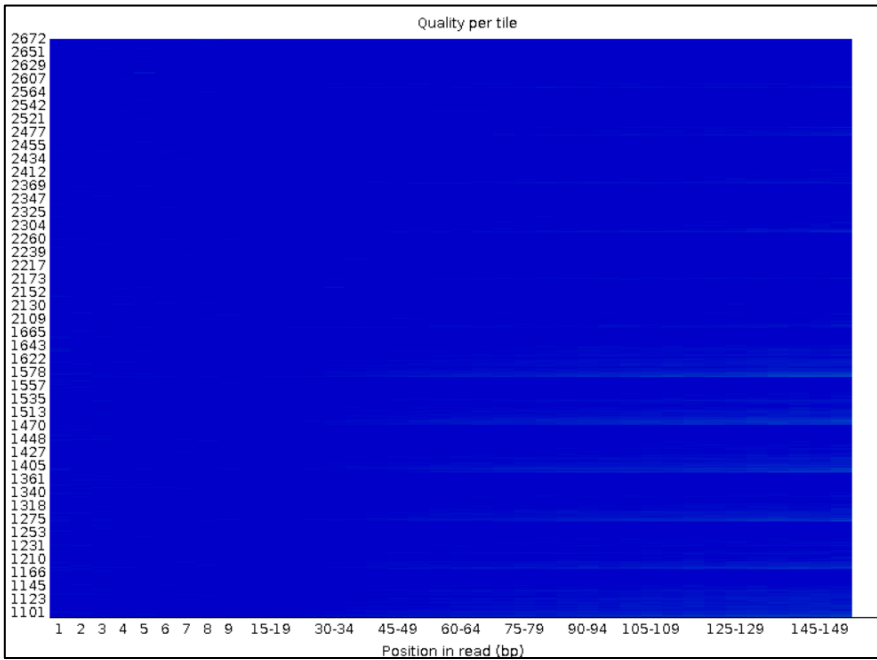
87. Simonetti, E., Alvarez, F., Feldman, N., Vinacour, M., Roberts, I. N., & Ruiz, J. A. (2021). Genomic insights into the potent antifungal activity of *B. ambifaria* T16. *Biological Control*, 155. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104530>
88. Simonetti, E., Roberts, I. N., Montecchia, M. S., Gutierrez-Boem, F. H., Gomez, F. M., & Ruiz, J. A. (2018). A novel *Burkholderia ambifaria* strain able to degrade the mycotoxin fusaric acid and to inhibit *Fusarium* spp. growth. *Microbiological Research*, 206, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.008>
89. Suárez-Estrella, F., Vargas-García, C., López, M. J., Capel, C., & Moreno, J. (2007). Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop Protection*, 26(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.04.003>
90. Subramoni, S., Agnoli, K., Eberl, L., Lewenza, S., & Sokol, P. A. (2013). Role of *Burkholderia cenocepacia* *afcE* and *afcF* genes in determining lipid-metabolism-associated phenotypes. *Microbiology (United Kingdom)*, 159(PART3), 603–614. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064683-0>
91. Sudha, M., Giri, M. S., Machenahalli, S., Ranjini, A. P., Surya, N., & Rao, P. (2020). Effective management of Collar Rot disease caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. in coffee using native biocontrol isolates. In *J. Mycopathol. Res (Vol. 58, Issue 3)*.
92. Tenorio-Salgado, S., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., Caballero-Mellado, J., & Perez-Rueda, E. (2013). Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered*, 4(4), 236–243. <https://doi.org/10.4161/bioe.23808>
93. Tesis Maestria IIJG Impresion Microbiologia 2. (n.d.).
94. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito. (n.d.).
95. Urgiles-Gómez, N., Avila-Salem, M. E., Loján, P., Encalada, M., Hurtado, L., Araujo, S., Collahuazo, Y., Guachanamá, J., Poma, N., Granda, K., Robles, A., Senés, C., & Cornejo, P. (2021). Plant growth-promoting microorganisms in coffee production: From isolation to field application. In *Agronomy (Vol. 11, Issue 8)*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081531>
96. Vial, L., Lépine, F., Milot, S., Groleau, M. C., Dekimpe, V., Woods, D. E., & Déziel, E. (2008). *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *Journal of Bacteriology*, 190(15), 5339–5352. <https://doi.org/10.1128/JB.00400-08>
97. Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Ba-Surto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Current situation of *Fusarium* spp in the control and evaluation of the an-tifungal activity on vegetables extracts. *Acta Agronomica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>

98. Vio, S. A., García, S. S., Casajus, V., Arango, J. S., Galar, M. L., Bernabeu, P. R., & Luna, M. F. (2020). Paraburkholderia. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi* (pp. 271–311). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00015-0>
99. Wang, X., Chen, D., Wang, J., Feng, C., Wang, W., Zhang, W., Li, B., Yu, J., & Xia, B. (2019). Cloning and Analysis of Genes Controlling Antibacterial Activities of Burkholderia pyrrocinia Strain Lyc2. *Current Microbiology*, 76(9), 1003–1009. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01690-z>
100. Wang, Y., Wang, Y. B., Zhang, W. G., Zhou, L., Wang, N. N., Yan, C. Y., & Li, X. (2012). Identification and separation of the novel antifungal antibiotic of streptomyces hygroscopicus BOS-013 strain by Simulated Moving Bed Chromatography. *Applied Mechanics and Materials*, 485, 245–248. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.485.245>
101. Wu, L., Tang, L., He, Y., Han, C., Wang, L., Zhang, Y., & E, Z. (2023). BysR, a LysR-Type Pleiotropic Regulator, Controls Production of Occidiofungin by Activating the LuxR-Type Transcriptional Regulator AmbR1 in Burkholderia sp. Strain JP2-270. *Microbiology Spectrum*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02684-22>
102. Zewdie, B., Tack, A. J. M., Adugna, G., Nemomissa, S., & Hylander, K. (2020). Patterns and drivers of fungal disease communities on Arabica coffee along a management gradient. *Basic and Applied Ecology*, 47, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2020.05.002>
103. Zhou, Y. H., Liu, Y. L., Yin, X. G., Lu, J. N., & Tang, J. R. (2019). First Report of Fusarium Root Rot of Castor Caused by Fusarium solani Species Complex in Zhanjiang, China. In *Plant Disease* (Vol. 103, Issue 9). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0125-PDN>
104. Zou, S. P., Liu, M., Wang, Q. L., Xiong, Y., Niu, K., Zheng, Y. G., & Shen, Y. C. (2015). Preparative separation of echinocandin B from Aspergillus nidulans broth using macroporous resin adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 978–979, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.028>

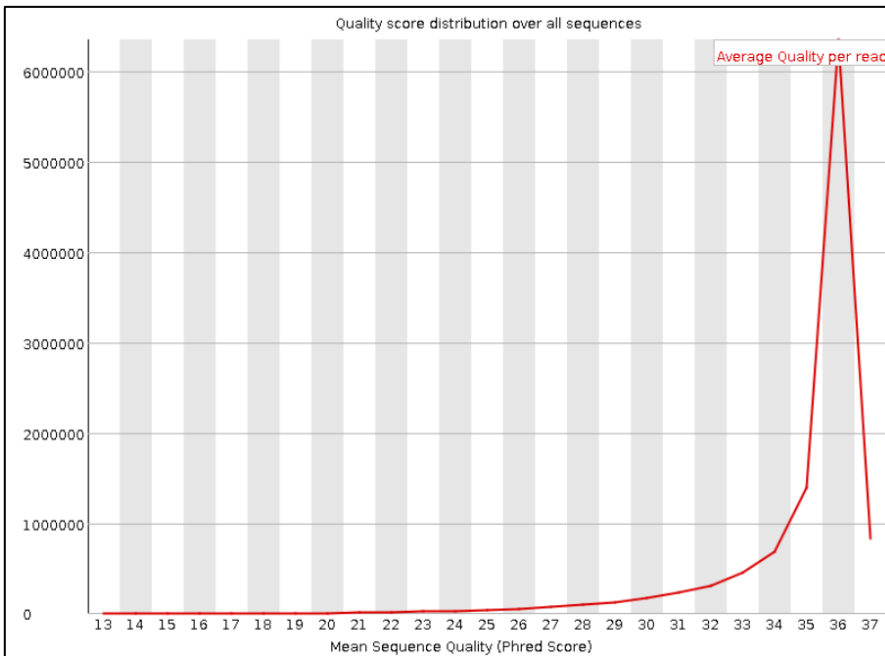
9. ANEXOS

Anexo 1: Datos complementarios del análisis de secuencias mediante FastQC.

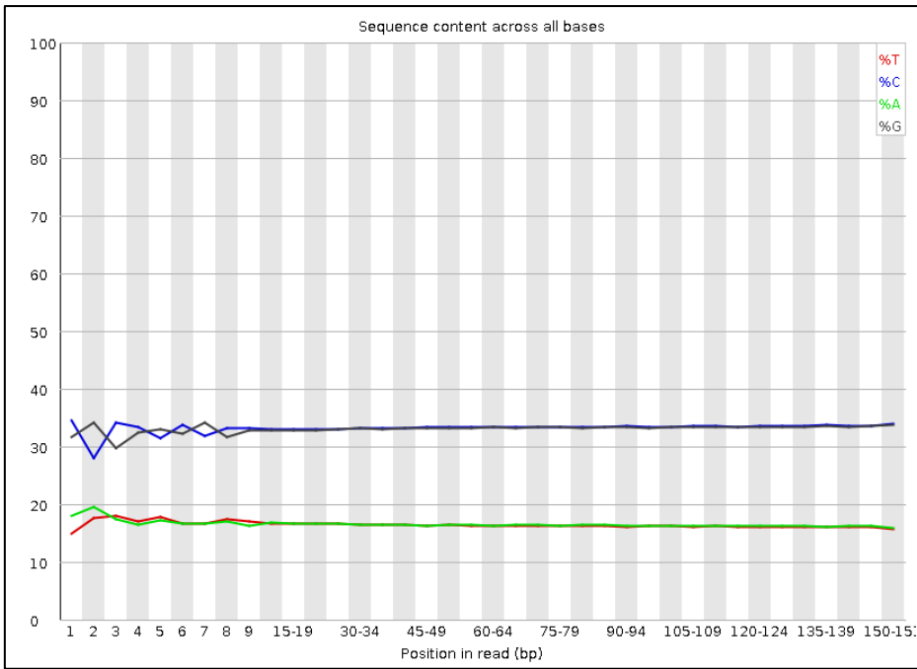
1. Celdas de flujo



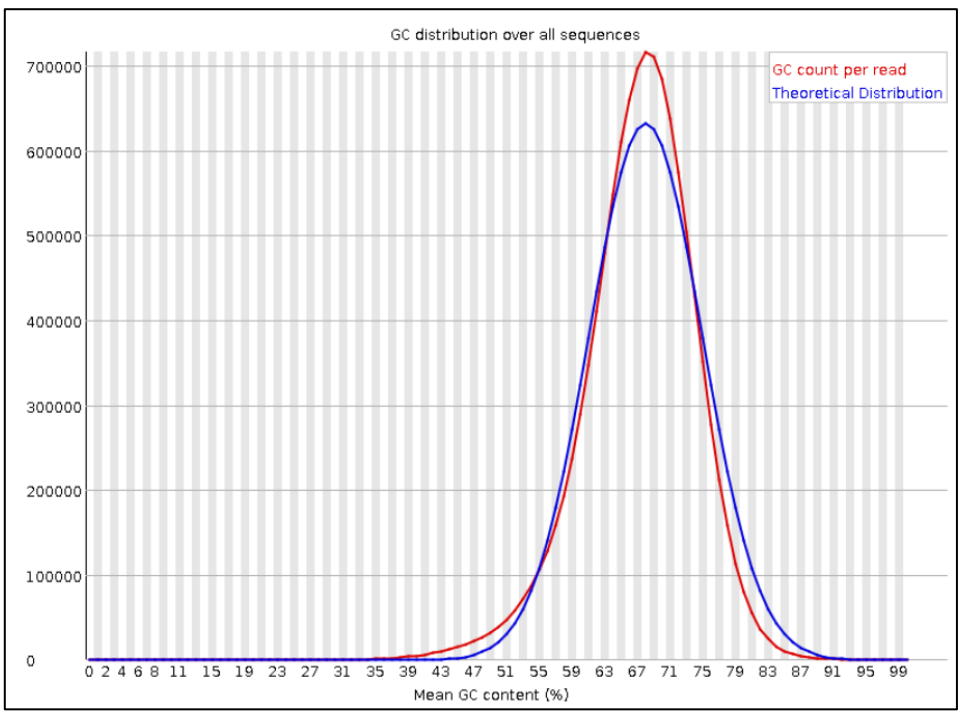
2. Puntuaciones de calidad por secuencia



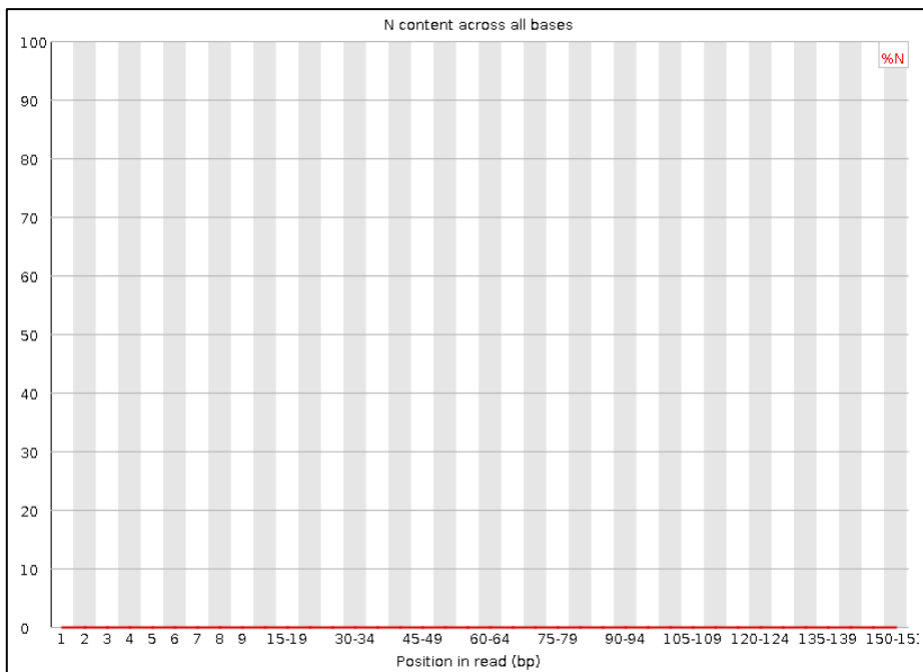
3. Contenido por secuencia



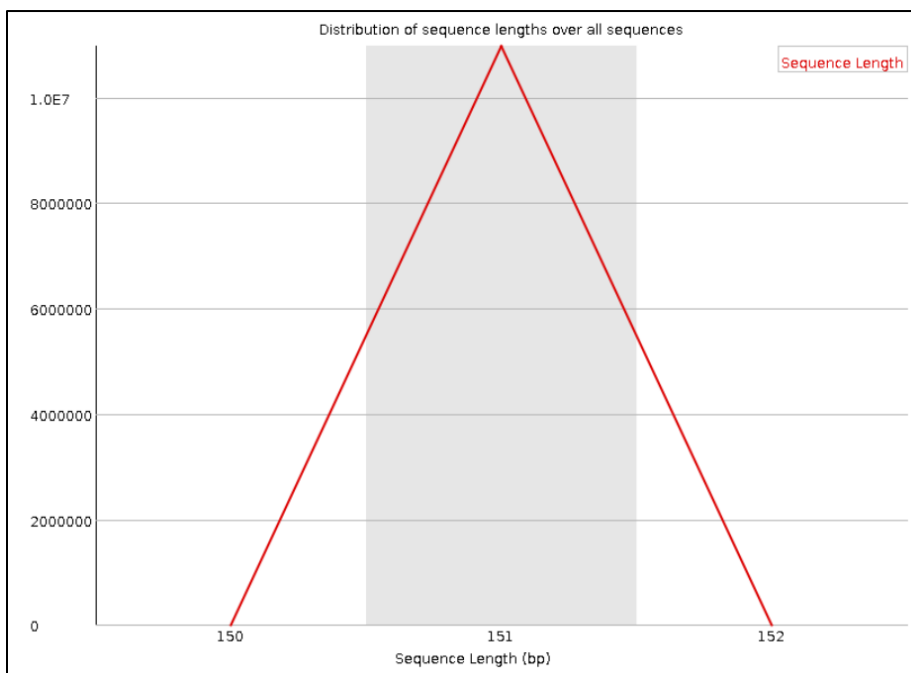
4. Contenido de GC por secuencia



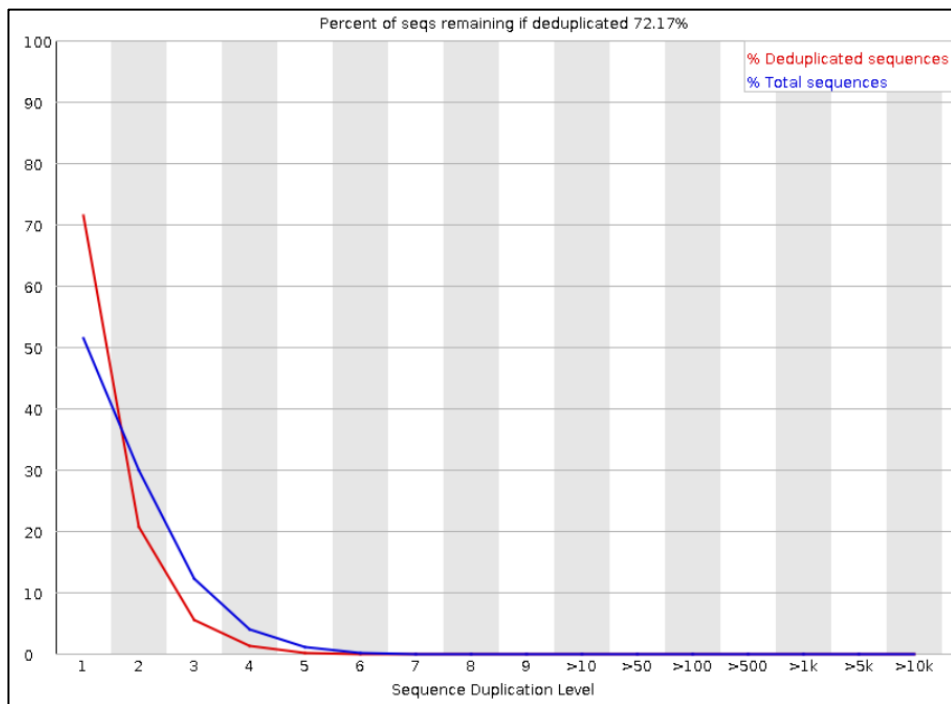
5. Contenido de N por base



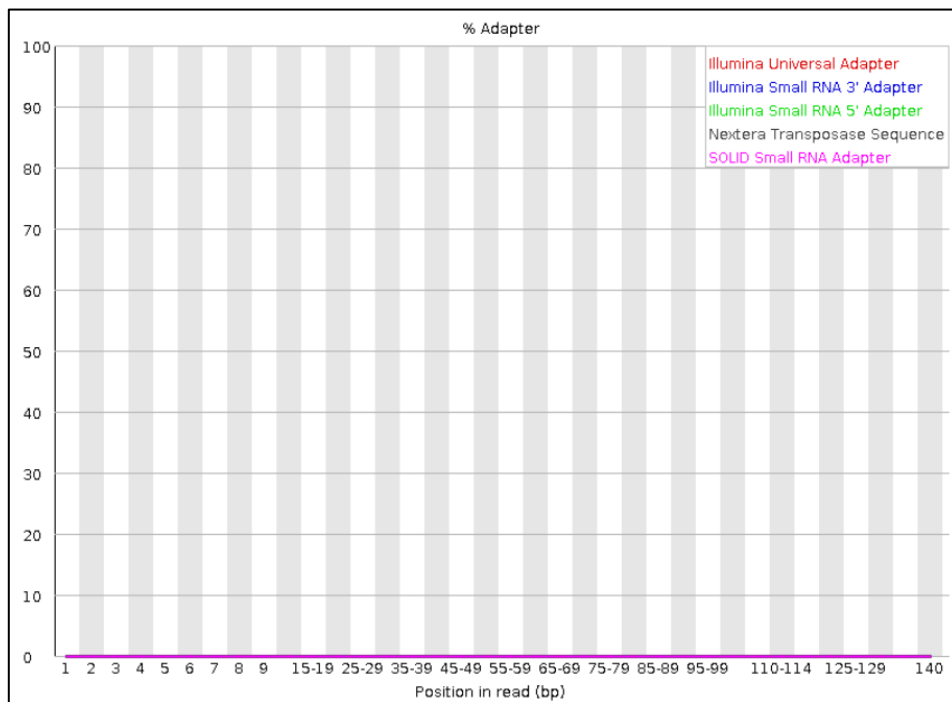
6. Distribución de tamaño de fragmentos de secuenciación.



7. Niveles de secuencias duplicadas



8. Contenido de adaptadores



Anexo 2: Extensión producto de Prokka y RAST

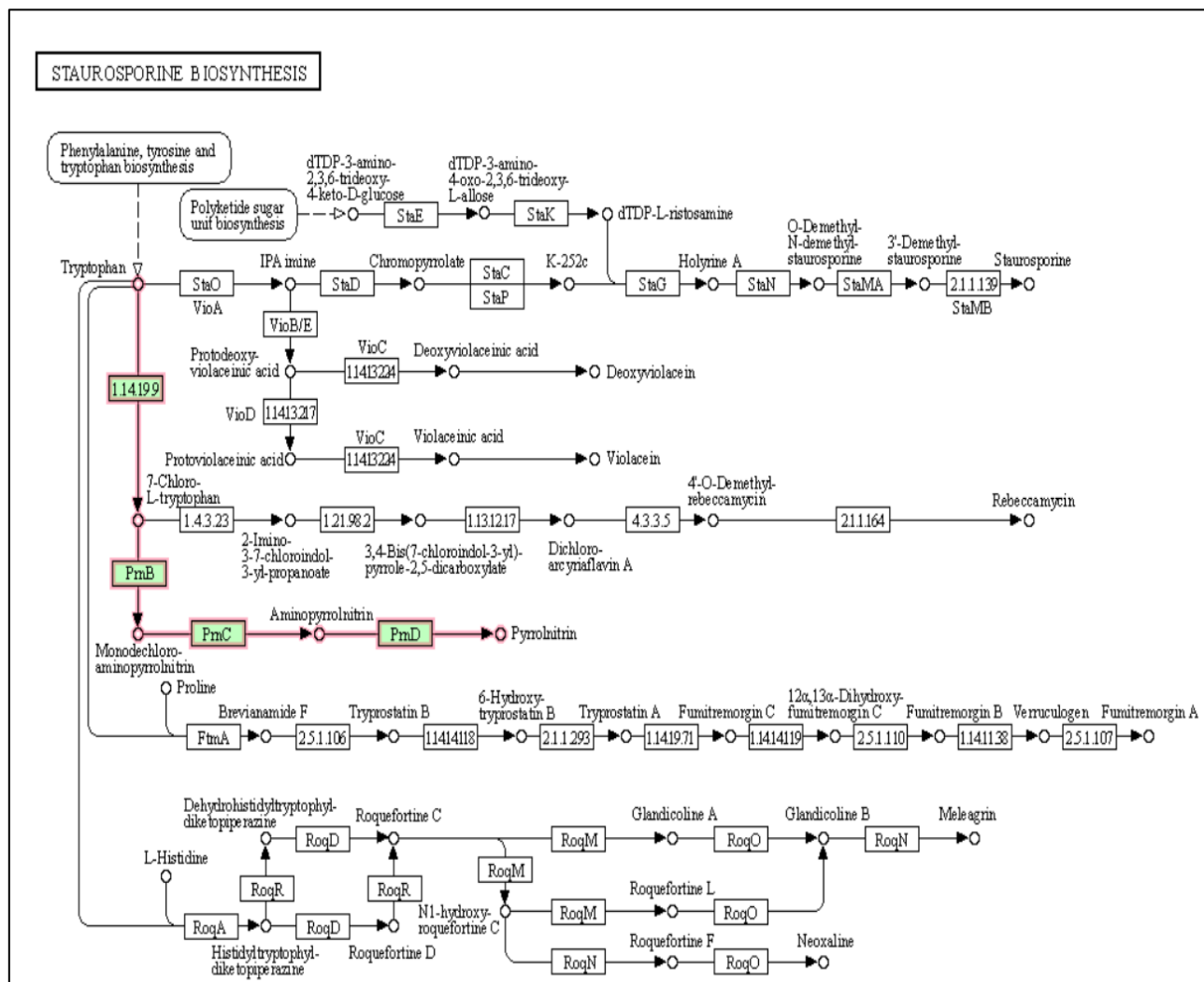
Extensión	Descripción
.gff	Anotación maestra en formato GFF3, contiene las secuencias y anotaciones.
.gbk	Es el archivo estándar en Genbank, deriva de .gff.
.fna	Archivo FASTA de nucleótidos de las secuencias contigs de entrada.
.faa	Archivo FASTA de proteínas de las secuencias CDS traducidas.
.ffn	Archivo FASTA de nucleótidos de todas las transcripciones predichas.
.sqn	Archivo ASN1 con formato “Sequin” para enviar a Genbank. Necesita ser editado para establecer la taxonomía, autores, publicaciones relacionadas, etc. correctas.
.fsa	Archivo FASTA de nucleótido de las secuencias contigs, usadas por “tbl2asn” para crear el archivo .sqn. Muy similar al archivo .fna pero con las etiquetas Sequin en las líneas de descripción de la secuencia.

FUENTE: Pizano-Sosa, 2023.

Anexo 3: ruta metabólica de los antifúngicos: A) Pirrolnitrina, B) Occidiofungina

A) Ruta metabólica de pirrolnitrina.

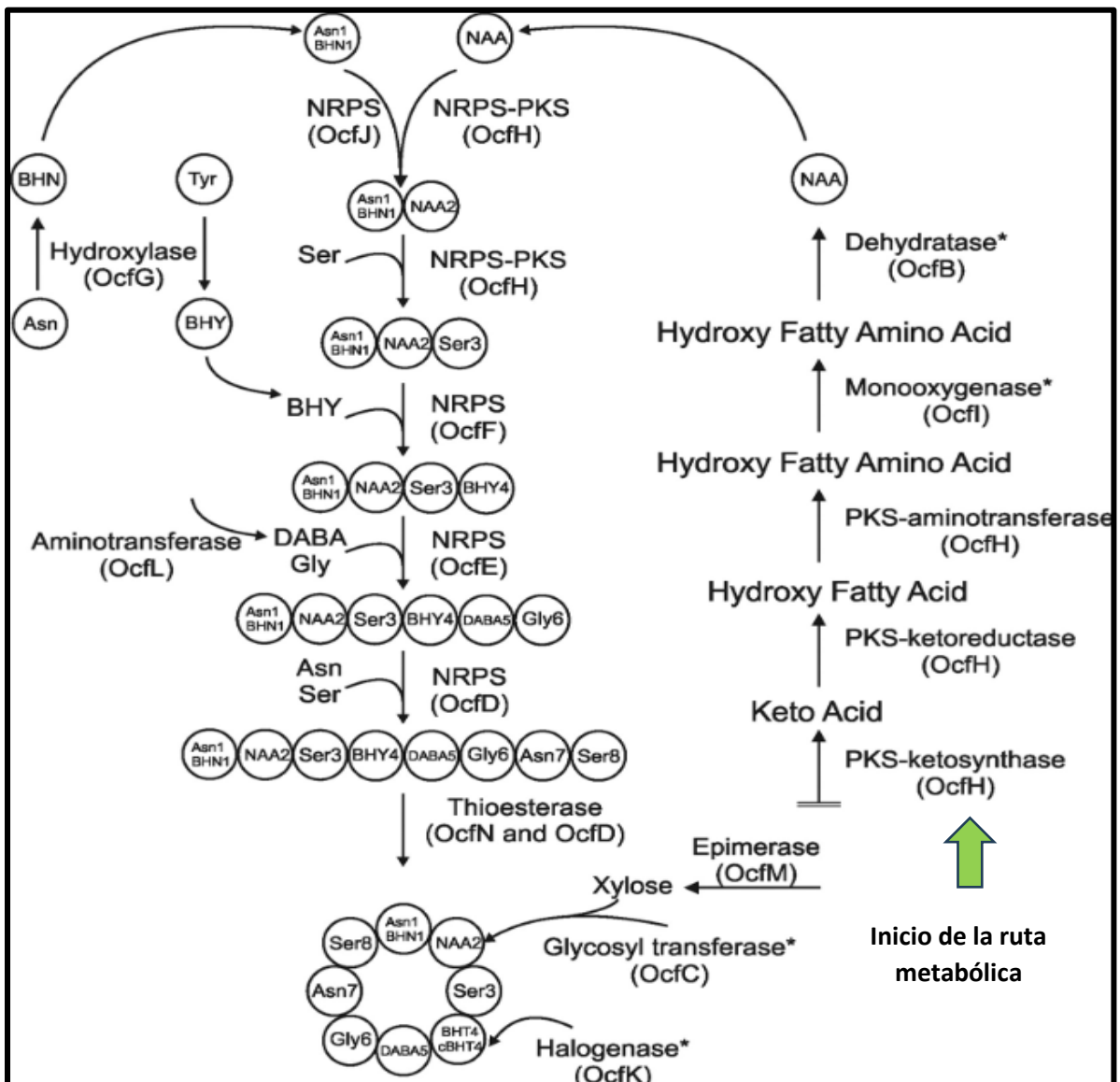
La ruta inicia en la biosíntesis del triptófano, en la cual participan cuatro genes denominados *prnA*: tryptophan 7-halogenase, *prnB*: monodechloroaminopyrrolnitrin synthase, *prnC*: monodechloroaminopyrrolnitrin halogenase y *PrnD*: aminopyrrolnitrin oxigenase, para la síntesis de la pirrolnitrina.



FUENTE: Plataforma KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes sitio web:<https://www.kegg.jp>).

B) Ruta metabólica de occidiofungina

La ruta comienza con la acción de los genes que codifican las policétido sintasas (PKS), cetoreductasa, aminotransferasa, monooxigenasa y deshidratasa, los cuales participan en la formación de una cadena de ácido graso denominada NAA, que actúa como precursor para la síntesis del anillo de aminoácidos. Para la formación de este anillo intervienen los genes que codifican las sintetetasas peptídicas no ribosomales (NRPS), encargadas de sintetizar cada uno de los aminoácidos, formar una cadena y, posteriormente, permitir la acción de la tioesterasa, que corta y cicla la cadena. Finalmente, la xilosa se añade mediante la acción de la glicosiltransferasa. Es importante señalar que para la incorporación de los diferentes grupos hidroxilo, hidrógeno y cloro en la occidiofungina, participan los genes halogenasa e hidrolasa.



Anexo 4: resultados de la búsqueda Tblastp del cluster biosintético del antifúngico pirrolnitrina a partir de query *B. cepacia* y *B. pyrrocinia*. Búsqueda a partir de secuencias de proteína.

QUERY <i>B. cepacia</i>	SUBJECT	% IDENT	% cobertura	Tamaño de la proteína	EVALUE	BIT-SCORE
PrnA	NODE_2	45.455	6.1	537	0.046	34.7
PrnB	CERO RESULTADOS DE BUSQUEDA					
PrnC	NODE_6	25	34.6	566	0.014	36.6
PrnD	NODE_5	23.822	97.6	373	2.29e-16	79.3

QUERY <i>B. pyrrocinia</i>	SUBJECT	% IDENT	% cobertura	Tamaño de la proteína	EVALUE	BIT-SCORE
PrnA	NODE_2	48.148	5	538	0.080	33.9
PrnB	CERO RESULTADOS DE BUSQUEDA					
PrnC	NODE_4	24.599	33	566	0.043	35
PrnD	NODE_5	25.348	97	370	2.57e-18	85.1

**Anexo 5: resultados de la búsqueda blastn del cluster biosintético del antifúngico occidiofungina.
Búsqueda a partir de secuencias de proteínas.**

A) Query *B. contaminans*

QUERY	SUBJECT	% IDENT	% cobertura	Tamaño de la proteína	EVALUE	BIT-SCORE
Gen 01	NODE_9	93.590	99,7	391	0.0	672
Gen 02	NODE_9	88.603	99,6	273	1.83e-137	426
Occi03	NODE_9	85.135	100,0	296	5.48e-138	428
Gen 04	NODE_9	91.711	100,0	567	0.0	1033
Gen 05	NODE_9	85.625	100,0	160	1.49e-87	277
Gen 06	NODE_9	94.037	100,0	218	1.53-e123	383
Gen 07	NODE_9	89.585	99,6	3164	0.0	5378
Gen 08	NODE_9	89.355	99,9	3021	0.0	5025
Gen 09	NODE_9	92.337	99,9	1306	0.0	2303
Gen 10	NODE_9	94.238	100,0	538	0.0	1066
Gen 11	NODE_9	91.747	100,0	4469	0.0	7675
Gen 12	NODE_9	93.496	100,0	1107	0.0	1889
Gen 13	NODE_9	91.051	100,0	1475	0.0	2565
Gen 14	NODE_9	89.881	97,6	328	0.0	598
Gen 15	NODE_9	91.886	100,0	456	0.0	864
Gen 16	NODE_9	96.519	100,0	316	0.0	637
Gen 17	NODE_9	87.029	100,0	239	4.75e-124	385

B) Query *B. ambifaria*

QUERY	SUBJECT	% IDENT	% cobertura	Tamaño de la proteína	EVALUE	BIT-SCORE
Gen 01	NODE_9	96.564	100,0	582	0.0	1085
Gen 02	NODE_9	91.815	98,9	284	6.02e-149	459
Occi03	NODE_9	84.797	100,0	296	3.5e-156	480
Gen 04	NODE_9	94.533	100,0	567	0.0	979
Gen 05	NODE_9	85.795	99,4	177	2.26e-100	315
Gen 06	NODE_9	95.413	100,0	218	7.00e-126	390
Gen 07	NODE_9	93.593	99,7	3176	0.0	5575
Gen 08	NODE_9	94.069	100,0	3018	0.0	5292
Gen 09	NODE_9	94.244	99,9	1304	00	2411
Gen 10	NODE_9	95.725	100,0	538	0.0	1075
Gen 11	NODE_9	94.351	100,0	4478	0.0	7727
Gen 12	NODE_9	96.477	100,0	1107	0.0	1931
Gen 13	NODE_9	94.166	100,0	1474	0.0	2683
Gen 14	NODE_9	93.750	98,8	332	0.0	621
Gen 15	NODE_9	95.175	100,0	456	0.0	892
Gen 16	NODE_9	97.368	100,0	342	0.0	697
Gen 17	NODE_9	91.103	100,0	281	1.21e-157	484

C) Query *B. pyrocinia*

QUERY	SUBJECT	Tamaño de la proteína	% IDENT	% cobertura	EVALUE	BIT-SCORE
Gen 01						
Gen 02	NODE_9	301	89.86	99,6	2.75e-150	462
Occi03	NODE_9	566	85.570	99,0	1.65e-137	427
Gen 04	NODE_9	159	92.240	99,8	0.0	1019
Gen 05	NODE_9	218	82.390	100,0	2.43e-86	273
Gen 06	NODE_9	3165	94.037	100,0	4.66e-118	367
Gen 07	NODE_9	3022	91.693	99,6	0.0	5494
Gen 08	NODE_9	1304	91.113	99,8	0.0	5233
Gen 09	NODE_9	538	93.707	99,9	00	2371
Gen 10	NODE_9	4467	96.468	100,0	0.0	1082
Gen 11	NODE_9	1107	92.995	100,0	0.0	7874
Gen 12	NODE_9	1467	96.296	100,0	0.0	1968
Gen 13	NODE_9	328	94.233	99,5	0.0	2674
Gen 14	NODE_9	436	94.940	97,6	0.0	625
Gen 15	NODE_9	316	93.807	100,0	0.0	843
Gen 16	NODE_9	239	98.101	100,0	0.0	647
Gen 17	NODE_9	270	92.887	100,0	6.77e-145	445

Búsqueda a partir de secuencias de ADN

A) Query *B. contaminans*

QUERY	SUBJECT	TAMAÑO DEL GEN	% IDENT	% COBERTURA	E-VALUE	BIT-SCORE
Gen 01	CONTING 9	1175	93.590	99.6	0.0	1170
Gen 02	CONTING 9	825	94.061	100.0	0.0	1263
Occi03	CONTING 9	891	90.909	100.0	0.0	1242
Gen 04	CONTING 9	1704	90.317	100.0	0.0	2329
Gen 05	CONTING 9	483	91.511	100.0	0.0	687
Gen 06	CONTING 9	657	92.998	100.0	0.0	978
Gen 07	CONTING 9	9537	90.731	100.0	0.0	13243
Gen 08	CONTING 9	9136	91.055	99.4	0.0	12689
Gen 09	CONTING 9	3921	92.910	100.0	0.0	5818
Gen 10	CONTING 9	1617	94.929	100.0	0.0	2547
Gen 11	CONTING 9	13418	92.346	100.0	0.0	19560
Gen 12	CONTING 9	3324	92.629	100.0	0.0	4890
Gen 13	CONTING 9	4432	92.193	100.0	0.0	6430
Gen 14	CONTING 9	1011	89.911	100.0	0.0	1377
Gen 15	CONTING 9	1371	91.758	100.0	0.0	1963
Gen 16	CONTING 9	951	95.324	98.9	0.0	1499
Gen 17	CONTING 9	720	91.528	100.0	0.0	1023

B) Query *B. ambifaria*

QUERY	SUBJECT	TAMAÑO DEL GEN	% IDENTIDAD	% COBERTURA	E-VALUE	BIT-SCORE
Gen 01	CONTING 9	1819	96.569	96,2	0.0	2884
Gen 02	CONTING 9	855	94.842	99,8	0.0	1342
Occi03	CONTING 9	891	91.246	100.0	0.0	1256
Gen 04	CONTING 9	1704	92.723	100.0	0.0	2515

Gen 05	CONTING 9	534	90.038	99.6	0.0	720
Gen 06	CONTING 9	657	96.651	100.0	0.0	1086
Gen 07	CONTING 9	9555	94.736	100.0	0.0	14989
Gen 08	CONTING 9	9057	94.954	100.0	0.0	14282
Gen 09	CONTING 9	3915	94.762	100.0	00	6134
Gen 10	CONTING 9	1617	95.795	100.0	0.0	2610
Gen 11	CONTING 9	13437	95.052	100.0	0.0	21264
Gen 12	CONTING 9	3324	96.450	100.0	0.0	5463
Gen 13	CONTING 9	4425	95.232	100.0	0.0	7029
Gen 14	CONTING 9	1011	93.571	100.0	0.0	1537
Gen 15	CONTING 9	1371	94.311	100.0	0.0	2122
Gen 16	CONTING 9	1029	96.307	100.0	0.0	1685
Gen 17	CONTING 9	846	93.609	99.9	0.0	1281

C) Query B. pyrrocinia

QUERY	SUBJECT	TAMAÑO DEL GEN	% IDENTIDAD	% COBERTURA	E-VALUE	BIT-SCORE
Gen 01						
Gen 02	CONTING 9	891	89.956	98.3	0.0	1229
Occi03	CONTING 9	1704	91.138	100	0.0	2390
Gen 04	CONTING 9	480	90.417	100	0.0	659

Gen 05	CONTING 9	657	94.825	100	0.0	1032
Gen 06	CONTING 9	9537	93.279	100	0.0	14336
Gen 07	CONTING 9	9054	92.338	99.7	0.0	13272
Gen 08	CONTING 9	3915	94.738	100	0.0	6132
Gen 09	CONTING 9	1617	96.289	100	0.0	2646
Gen 10	CONTING 9	13395	94.482	99.9	0.0	20844
Gen 11	CONTING 9	3324	95.487	100	0.0	5319
Gen 12	CONTING 9	4425	95.458	100	0.0	7084
Gen 13	CONTING 9	1011	93.472	100	0.0	1543
Gen 14	CONTING 9	1307	94.644	100	0.0	2042
Gen 15	CONTING 9	951	97.371	100	0.0	1602
Gen 16	CONTING 9	720	95.000	100	0.0	1137

Anexo 6: Resultado de la secuenciación y análisis de calidad.

Raw Data Statistics

• The total number of bases, reads, GC (%), Q20 (%), and Q30 (%) are calculated for the 2 samples.
For example, in 2022GB94A sample, 22,485,980 reads are produced, and total read bases are 3.4 Gbp.
The GC content (%) is 66.7% and Q30 is 92.4%.

* Raw Data

Sample ID	Total bases(bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
2022GB94A	3,395,382,980	22,485,980	66.7	33.3	96.9	92.4
2022GB99A	3,313,550,342	21,944,042	66.9	33.1	96.9	92.5

- Sample ID : Sample name.
- Total bases(bp) : Total number of bases sequenced.
- Total reads : Total number of reads. For illumina paired-end sequencing, this value refers to the sum of read1 and read2.
- GC(%) : Ratio of GC content.
- AT(%) : Ratio of AT content.
- Q20(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 20.
- Q30(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 30.

Datos obtenidos de la secuenciación del genoma de la cepa GB99.

A)

B)

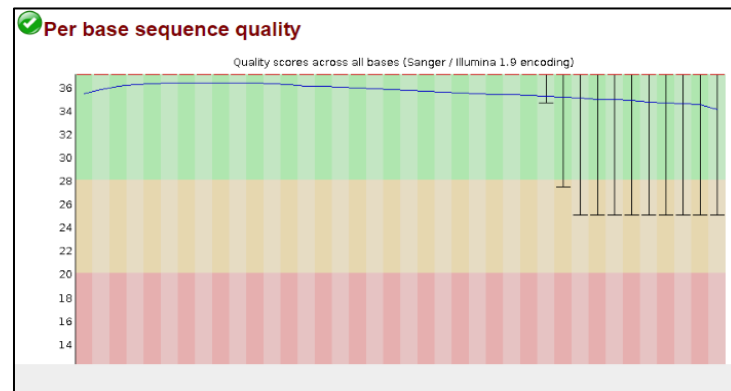
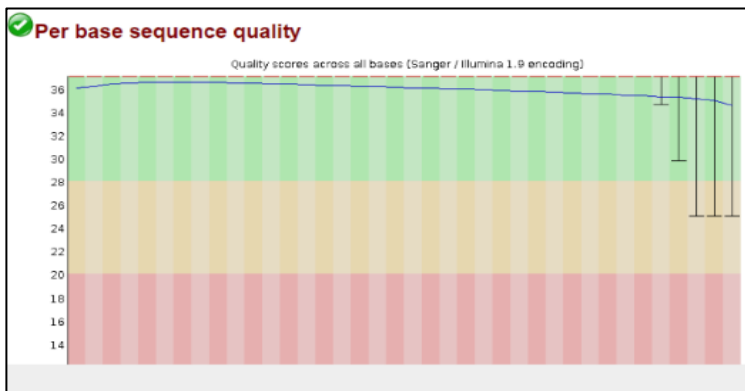


Gráfico de calidad de secuencia por base de la cepa GB99. Proporciona la distribución de las puntuaciones de calidad en cada posición a lo largo de todas las lecturas. El eje Y proporciona las puntuaciones de calidad, mientras que el eje X representa la posición en la lectura. El código de colores del gráfico denota los rangos de puntajes de calidad, diferenciando los valores considerados como altos. A) Secuencia FASTA1 y B) Secuencia FASTA 2.

Anexo 7: análisis de calidad de los diferentes ensamblajes realizados.

08 June 2023, Thursday, 13:16:12

[View in Icarus contig browser](#)

All statistics are based on contigs of size ≥ 500 bp, unless otherwise noted (e.g., "# contigs (≥ 0 bp)" and "Total length (≥ 0 bp)" include all contigs).

Show heatmap
 Worst Median Best

Statistics without reference	SPADES1	SPADES2	SPADES3	VELVETG	GB99_contigs
# contigs	91	97	70	410	82
# contigs (≥ 0 bp)	538	583	227	602	103
# contigs (≥ 1000 bp)	81	85	58	359	77
# contigs (≥ 5000 bp)	61	65	43	268	57
# contigs (≥ 10000 bp)	56	61	41	221	52
# contigs (≥ 25000 bp)	48	53	37	117	44
# contigs (≥ 50000 bp)	43	47	34	47	39
Largest contig	632 658	720 244	746 724	182 311	746 660
Total length	8 717 091	8 708 425	8 728 568	8 682 392	8 725 419
Total length (≥ 0 bp)	8 809 256	8 782 058	8 763 169	8 731 868	8 734 001
Total length (≥ 1000 bp)	8 710 709	8 700 190	8 720 858	8 649 785	8 721 249
Total length (≥ 5000 bp)	8 674 801	8 663 216	8 693 284	8 418 677	8 683 589
Total length (≥ 10000 bp)	8 637 735	8 635 951	8 679 905	8 073 551	8 649 625
Total length (≥ 25000 bp)	8 472 456	8 471 178	8 592 863	6 302 161	8 483 619
Total length (≥ 50000 bp)	8 299 727	8 269 787	8 476 066	3 829 681	8 320 547
N50	264 082	189 169	314 911	45 309	314 857
N90	72 024	71 981	89 325	13 107	73 438
auN	291 344	267 541	400 631	55 836	349 742
L50	11	13	8	58	9
L90	36	41	26	199	32
GC (%)	66.43	66.44	66.43	66.43	66.43
Mismatches					
# N's per 100 kbp	0	0	0	0	0
# N's	0	0	0	0	0

Resultados del análisis de calidad de los diferentes ensamblados realizados, destacando el ensamblado "SPADES 3". Los datos de mejor calidad se muestran en color morado, mientras que los de peor calidad están resaltados en rojo.

Anexo 8: Reconocimientos de la participación en cartel en el congreso y asistencia al



CONGRESO NACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
10 - 15 de SEPTIEMBRE 2023



40 Aniversario

LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

EXTIENDE LA CONSTANCIA A:

Ruiz Andrade Grisel, Marín Cevada Vianey, Jiménez Gómez Irma Indira, Miguel Castañeda Lucio

Por su participación en la sesión de carteles con el trabajo:

ANTAGONISMO IN VITRO POR MÉTODO DE MEDIO ENVENENADO A PARTIR DE ANTIFÚNGICOS OBTENIDOS DE PARABURKHOLDERIA SPP GB99. CONTRA FUSARIUM SOLANI

Ixtapa Zihuatanejo, Gro, a 11 - 15 de septiembre del 2023



DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
PRESIDENTA MDN 2022-2024



DR. LUIS FLORES COTERA
PRESIDENTE DEL CONGRESO



DRA. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN
SECRETARIA MDN 2022-2024

curso.



BUAP

Registro:
DGEC-BUAP-CQ-ICUAP - UNAM-P / Sem. - 045 / 2023
Folio: 15, Foja 219
Del libro de Registros 01/24

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través del Instituto de Ciencias (ICUAP)
otorga la presente

CONSTANCIA

A: **Grisel Ruiz Andrade**

Por haber concluido de manera satisfactoria el Seminario
Fundamentos de Espectrometría de Masas
Aplicadas a la Investigación e Industria Química 2023
Realizado del 04 al 08 de diciembre de 2023
Con una duración de 30 horas

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 19 de febrero de 2024



Dr. Carlos Contreras Cruz
Director General de Educación Continua

