



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS: EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA

TESIS

EFFECTO DE FLUOPSINA C PRODUCIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* LV EN  
EL CONTROL DE HONGOS PATÓGENOS DE SOYA (*Glycine max*)

PRESENTA

Ingeniera en alimentos Martha Patricia Palacio Mojica

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS: EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TUTORES

Dr. José Francisco Morales Domínguez

Dr. Galdino Andrade Filho

COMITÉ TUTORAL

Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

Aguascalientes, Aguascalientes. México Junio del 2024



Departamento  
de Química

CARTA DE VOTO APROBATORIO  
INDIVIDUAL

**M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**PRESENTE**

Por medio del presente como tutor designado del estudiante **Martha Patricia Palacio Mojica** con ID 202211 quien realizó la tesis titulada: **EFFECTO DE FLUOPSINA C PRODUCIDO POR *pseudomona aeruginosa* LV EN EL CONTROL DE HONGOS PATÓGENOS DE SOYA (*Glycine max*)**, es un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 27 de agosto de 2024**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Morales Domínguez'.

**Dr. José Francisco Morales Domínguez**  
Tutor de tesis



CARTA DE VOTO APROBATORIO  
INDIVIDUAL

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como tutor designado del estudiante **Martha Patricia Palacio Mojica** con ID 202211 quien realizó la tesis titulada: **Efecto de fluopsina C producido por *pseudomona aeruginosa* LV en el control de hongos patógenos de soya (*Glycine max*)**, es un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 22 de septiembre de 2024

Dr. Galdino Andrade Filho  
CoTutor de tesis



Departamento  
de Química

Escuela de Posgrado en Maestría e Ingeniería

MTRO. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICA

PRESENTE

Por medio del presente como **ASESORA** designada de la estudiante **MARTHA PATRICIA PALACIO MOJICA** con ID 202211 quien realizó *la tesis* titulada **EFFECTO DE FLUOPSINA C PRODUCIDO POR *Pseudomona aeruginosa* LV EN EL CONTROL DE HONGOS PATÓGENOS DE SOYA (*Glycine max*)**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 3 de octubre de 2024

*Yenny Adriana Gómez A.*  
Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre  
Asesora de tesis

MARTHA PATRICIA PALACIO MOJICA  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA  
EN CIENCIAS AREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA  
P R E S E N T E.

Estimada Alumna:

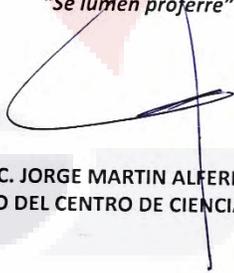
Por medio de la presente me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: "EFECTO DE FLUOPSINA C PRODUCIDO POR *Pseudomona aeruginosa* LV EN EL CONTROL DE HONGOS PATÓGENOS DE SOYA (*Glycine max*)", se autoriza la impresión de la tesis para continuar con el proceso de obtención del grado.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., 09 de octubre del 2024

*"Se lumen proferre"*



M. en C. JORGE MARTIN ALFEREZ CHAVEZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 28/10/2024

NOMBRE: Martha Patricia Palacio Mojica ID 202211
PROGRAMA: Maestría en ciencias área Biotecnología Vegetal o Toxicología LGAC (del posgrado): Biotecnología Vegetal
TIPO DE TRABAJO: ( x ) Tesis ( ) Trabajo práctico
TITULO: Efecto de fluoposina c producida por Pseudomonas aeruginosa lv en el control de hongos patógenos de soya (Glycine max).

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): La soya es una fuente importante de proteína y nutrientes a nivel mundial. Al proponer soluciones para controlar hongos patógenos que afectan este cultivo, la investigación podría ayudar a reducir pérdidas de producción, contribuyendo así a una mayor disponibilidad de alimentos. Evidenciar la efectividad de la fluoposina C u otros metabolitos naturales contra hongos para abrir el camino a alternativas sostenibles a los fungicidas químicos, que suelen ser costosos y pueden tener efectos nocivos en el medio ambiente y la salud humana.

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NA Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
NA Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
El estudiante es el primer autor
El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

SI X
No

FIRMAS

Elaboró: \* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN: Yenny Adriana Gómez A. Dra. en C. Yenny Adriana Gómez Aguirre
NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: Elsa Marcela Ramírez López Dra. en C. Elsa Marcela Ramírez López
Revisó: NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Dr. en C. Alejandro Padilla Díaz
Autorizó: NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO: M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) y a la Universidad Estadual de Londrina (UEL) por aceptarme en sus programas de estudio y brindarme siempre su apoyo incondicional. Agradezco también al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico que me permitió desarrollar mi investigación.

A mis tutores de tesis, el Dr. José Francisco Morales Domínguez, por su constante guía, apoyo y tutela, que fueron fundamentales para la satisfactoria conclusión de este trabajo, y al Dr. Galdino Andrade Filho, por permitirme utilizar las instalaciones del laboratorio y brindarme su asesoría tanto en la fase experimental como en la redacción del escrito.

A mi asesora, Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre, por sus valiosos consejos que me ayudaron a alcanzar los objetivos de este trabajo.

Agradezco al personal de investigadores de la Universidad Estadual de Londrina por su constante dedicación y enseñanzas, que me proporcionaron las herramientas necesarias para concluir esta investigación.

A mi familia, que estuvo conmigo incondicionalmente, me inspiró a creer en mi potencial y me inculcó los valores y la educación necesarios para llegar hasta aquí. En especial, a mis padres, por acompañarme en esta experiencia de aprendizaje y enseñarme a superarme a mí misma.

Finalmente, a todos mis amigos y colegas que cursaron conmigo la maestría, por su compañía y motivación.

**ÍNDICE GENERAL**

INTRODUCCIÓN..... 8

1. ANTECEDENTES ..... 9

    1.1. Metabolitos secundarios.....9

        1.1.1. Metabolitos secundarios de plantas.....11

        1.1.2. Metabolitos secundarios de algas .....12

        1.1.3. Metabolitos secundarios de hongos.....14

        1.1.4. Metabolitos secundarios de bacterias.....15

    1.2. La soya.....18

        1.2.1. Enfermedades de la soya.....21

            1.2.1.1. *Pythium sp.* .....25

            1.2.1.2. *Rhizoctonia solani*.....25

        1.2.2. Estrategias de control de enfermedades de soya .....26

            1.2.2.1. *Pseudomona aeruginosa* cepa LV .....28

                1.2.2.1.1. Fluopsina C.....30

                1.2.2.2. El efecto del cobre como antibiótico microbiano.....33

2. JUSTIFICACIÓN..... 36

3. HIPÓTESIS ..... 37

4. OBJETIVOS ..... 37

    4.1. OBJETIVO GENERAL.....37

    4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....37

5. INCIDENCIA, IMPACTO SOCIAL O AMBIENTAL ESPERADO ..... 37

6. METODOLOGÍA..... 38

    6.1. Localización del estudio .....38

    6.2. Origen de los microorganismos .....38

6.3.	Producción de fluopsina C.....	38
6.4.	Purificación de fluopsina C.....	39
6.5.	Observación del efecto antifúngico de FLC.....	40
6.6.	Determinación de hongos patógenos viables para el estudio.....	41
6.7.	Porcentaje de inhibición .....	43
6.8.	Concentración mínima inhibitoria .....	43
6.9.	Evaluación de efecto antifúngico de FLC en semillas infectadas.....	44
6.10.	Evaluación de efecto antifúngico de FLC en semillas modificado.....	45
6.11.	Análisis estadísticos.....	47
7.	RESULTADOS.....	47
7.1.	Producción y purificación de FLC .....	47
7.2.	Observación del efecto antifúngico de FLC.....	49
7.3.	Determinación de hongos patógenos viables para el estudio.....	53
7.4.	Porcentaje de inhibición de los patógenos <i>R. solani</i> y <i>Pythium sp</i> .....	56
	Las diferencias significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por la prueba Tukey estan representadas por letras diferentes.....	56
7.5.	Concentración mínima inhibitoria de <i>R. solani</i> y <i>Pythium sp</i> .....	57
7.6.	Evaluación de efecto antifúngico de FLC en semillas infectadas.....	59
8.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	71
	Producción de FLC.....	72
	Efecto de FLC en la inhibición de los patógenos <i>R. solani</i> y <i>Pythium sp</i> .....	75
	Concentración mínima inhibitoria de <i>R. solani</i> y <i>Pythium sp</i> .....	76
	Efecto antifúngico de FLC en semillas de soya infectadas con <i>R. solani</i> y <i>Pythium sp</i> .....	77
9.	CONCLUSIONES .....	80
10.	REFERENCIAS.....	81

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Bacterias productoras de metabolitos secundarios. ....18

Tabla 2. Enfermedades de la soya. ....24

Tabla 3. Estrategias de control de enfermedades de soya.....27

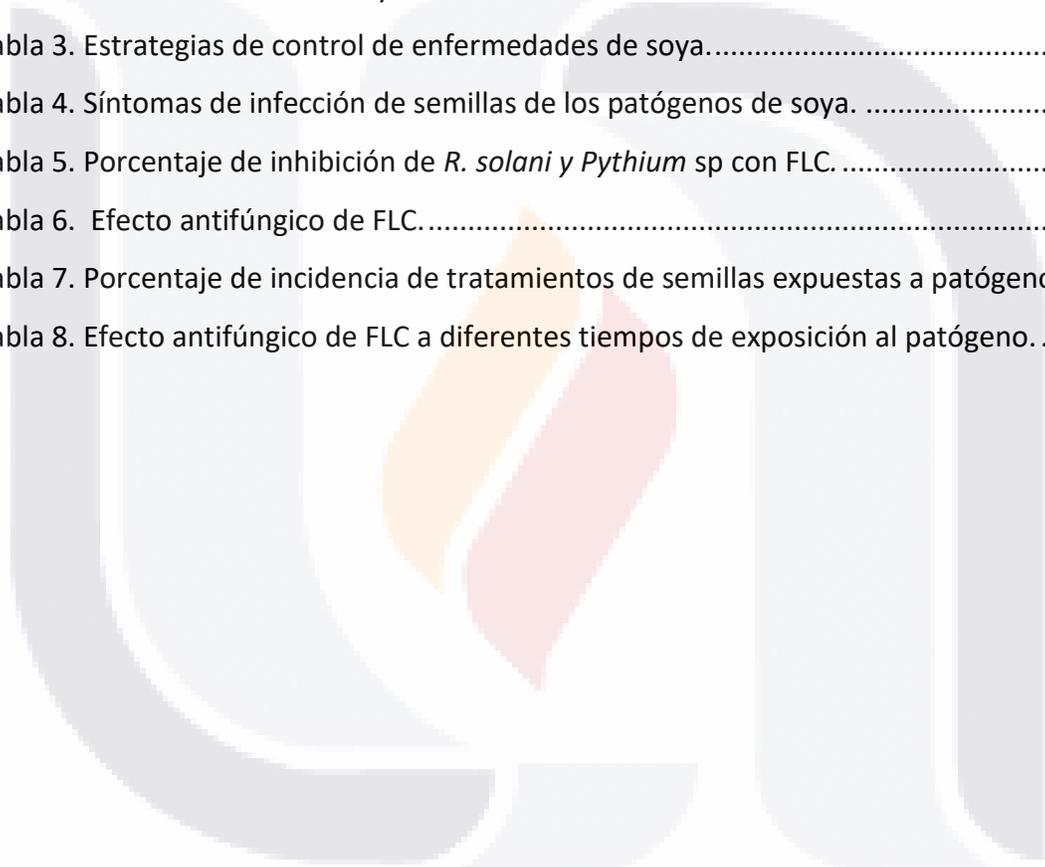
Tabla 4. Síntomas de infección de semillas de los patógenos de soya. ....47

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de *R. solani* y *Pythium* sp con FLC. ....56

Tabla 6. Efecto antifúngico de FLC.....62

Tabla 7. Porcentaje de incidencia de tratamientos de semillas expuestas a patógenos. ....69

Tabla 8. Efecto antifúngico de FLC a diferentes tiempos de exposición al patógeno. ....70



**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Ciclo de síntesis de metabolitos secundarios. ....10

Figura 2. Biosíntesis de termospermina. ....12

Figura 3 Metabolitos secundarios sintetizados por algas. ....13

Figura 4. Biosíntesis de metabolitos secundarios de hongos.....15

Figura 5. Producción de metabolitos secundarios bacterianos.....16

Figura 6. Plantas de soya. ....19

Figura 7. Producción mundial de soya.....20

Figura 8. Estructura de fluopsina C y mecanismo molecular. ....31

Figura 9. Adquisición de cobre en hongos. ....**34**

Figura 10. Efecto antifúngico del cobre.....35

Figura 11. Pruebas de confrontación directa. ....40

Figura 12. Tratamientos para concentración mínima inhibitoria.....44

Figura 13. Fases de proceso de obtención de fluopsina C.....48

Figura 14. Cromatografía en capa fina de FLC.....49

Figura 15. Inhibición de hongos patógenos.....50

Figura 16. Porcentaje de inhibición de los hongos expuestos a FLC a concentración de 1 mg/mL.....51

Figura 17. Efecto antifúngico de FLC. ....52

Figura 18. Plantas de soya con síntomas de infección. ....53

Figura 19. Semillas con síntomas de infección. ....54

Figura 20. Hongos patógenos aislados de tejidos infectados.....55

Figura 21. Zona de inhibición de *R. solani*. ....57

Figura 22. Zona de inhibición de *Pythium* sp.....57

Figura 23. Concentración mínima inhibitoria de solventes.....58

Figura 24. Concentración mínima inhibitoria.....59

Figura 25. Evaluación del efecto antifúngico de FLC en semillas de soya infectadas con *R. solani* y *Pythium sp.* .....61

Figura 26. Germinación semillas de soya infectadas con *Pythium sp* tratadas con FLC. ....63

Figura 27 Germinación semillas de soya infectadas con *R. solani* tratadas con FLC.....65

Figura 28. Semillas de soya infectadas tratadas con FLC.....67

Figura 29. Síntomas de infección en semillas.....68



## RESUMEN

La soya es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, pero es muy susceptible a ataques de microorganismos, los cuales se pueden controlar con fungicidas químicos. El uso excesivo de agentes químicos para controlar enfermedades causadas por microorganismos en los cultivos es un problema mundial que causa intoxicación, contaminación y resistencia a patógenos. Una alternativa para disminuir su exceso, es el uso de metabolitos secundarios de origen bacteriano con actividad antifúngica, como fluopsina C (FLC). En el presente estudio, se determinó el efecto inhibitorio de FLC frente a diferentes hongos patógenos de soya. La FLC fue producida por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV. Los daños provocados por la FLC en el hongo *Phomopsis sojae* se observaron con microscopía electrónica de barrido. Se realizaron pruebas de patogenicidad siguiendo los postulados de Koch y se aislaron los patógenos *Pythium sp.* y *Rhizoctonia solani* de tejidos de plantas de soya infectados. Se realizaron pruebas de difusión de discos a diferentes concentraciones de FLC frente a los patógenos y se observó que se puede inhibir hasta el 60 % de *R. solani* y 41 % de *Pythium sp.* Se determinó la concentración mínima inhibitoria de FLC para *R. solani* de 18 µg/mL y de 9 µg/mL para *Pythium sp.* Además, se realizaron pruebas con FLC en semillas de soya infectadas con patógenos y se observó que FLC no afecta la germinación ni la longitud de raíz de las semillas, reduce los síntomas de infección y disminuye la incidencia de enfermedad.

## ABSTRACT

Soybean is one of the most important crops worldwide, but it is highly susceptible to attacks by microorganisms, which can be controlled with chemical fungicides. The excessive use of chemical agents to control diseases caused by microorganisms in crops is a global problem that leads to poisoning, contamination, and pathogen resistance. An alternative to reduce their excess is using secondary metabolites of bacterial origin with antifungal activity such as fluopsin C (FLC). In the present study, the inhibitory effect of FLC against different soybean pathogenic fungi was determined. FLC was produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain LV. The damage caused by FLC on the fungus *Phomopsis sojae* was observed using scanning electron microscopy. Pathogenicity tests were conducted following Koch's postulates, and the pathogens *Pythium sp.* and *Rhizoctonia solani* were isolated from infected soybean plant tissues. Disc diffusion tests at different concentrations of FLC were carried out against the pathogens, and it was observed that up to 60 % inhibition of *R. solani* and 41 % of *Pythium sp.* could be achieved. The minimum inhibitory concentration of FLC was determined to be 18 µg/mL for *R. solani* and 9 µg/mL for *Pythium sp.* Furthermore, FLC was tested on pathogen-infected soybean seeds, and it was observed that FLC does not affect seed germination or root length, reduces infection symptoms, and decreases disease incidence.

## INTRODUCCIÓN

La producción agrícola es crucial para la seguridad alimentaria global, por lo que la protección de cultivos contra patógenos se convierte en una prioridad ineludible. Entre los cultivos fundamentales para la alimentación humana y animal se encuentra la soya (*Glycine max*), cuya susceptibilidad a diversas enfermedades, especialmente aquellas causadas por hongos patógenos, plantea desafíos significativos para su cultivo y rendimiento (Patiño-Moscoso, *et al.*, 2023). En este contexto, el uso extensivo de fungicidas químicos ha sido una práctica común para controlar las enfermedades fúngicas en los cultivos de soya. Sin embargo, este enfoque presenta serias preocupaciones ambientales y de salud pública debido a la contaminación del suelo, agua y aire, así como la generación de resistencia a los patógenos (Montoya *et al.*, 2024). En busca de alternativas más sostenibles y eficaces, la investigación se ha dirigido hacia el uso de metabolitos antifúngicos naturales producidos por microorganismos beneficiosos. Entre estos metabolitos, la fluopsina C (FLC), producida por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV, ha emergido como un candidato prometedor para el control de hongos patógenos en la soya. La FLC ha demostrado poseer propiedades antimicrobianas, lo que sugiere su potencial aplicación en la protección de cultivos contra enfermedades fúngicas (Afonso *et al.*, 2022). Con el objetivo general de evaluar la actividad antifúngica de la FLC producida por *Pseudomonas aeruginosa* LV frente a los hongos patógenos de la soya en condiciones de laboratorio, este estudio se propuso investigar el efecto de este metabolito en la fase crítica de germinación de las semillas de soya. Mediante un enfoque metodológico riguroso y análisis detallados, se examinaron los efectos de la FLC en la inhibición del crecimiento fúngico y su capacidad para prevenir la infección en las plántulas de soya. Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan información crucial sobre el potencial de la FLC como una alternativa viable a los fungicidas químicos en el control de enfermedades fúngicas en los cultivos de soya. Además, destacan la importancia de explorar y aprovechar los recursos naturales, como los metabolitos microbianos, para promover prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Metabolitos secundarios

Los metabolitos son sustancias de bajo peso molecular resultado de la actividad metabólica de los organismos (Canuto *et al.*, 2018). Estos se clasifican en dos categorías: metabolitos primarios y metabolitos secundarios, los metabolitos primarios son esenciales en los procesos de crecimiento, desarrollo y reproducción, en contraste, los metabolitos secundarios cumplen una función esencial en la respuesta a situaciones de estrés ambiental y en la protección contra depredadores y agentes patógenos (Sánchez, 2022). Los metabolitos secundarios son producidos por plantas, algas, hongos y bacterias como resultado de la evolución y las interacciones entre seres vivos, se pueden identificar diversos metabolitos secundarios, los cuales, según sus vías biosintéticas, se dividen en diferentes familias moleculares, entre las que se incluyen los fenólicos, terpenos, esteroides, alcaloides y flavonoides (Pang *et al.*, 2021). En la figura 1 se observa la síntesis de las diferentes familias de metabolitos secundarios. En la figura 1, una molécula central en el metabolismo energético, como la glucosa, se utiliza como fuente de energía en forma de ATP. A partir del metabolismo de la glucosa, se forman las vías del ácido shikímico y del acetil-CoA. Los terpenos se derivan de la ruta del acetato a través del intermediario del mevalonato, que proviene del 2-etil-1,3-butaldehído conocido como isopreno. Los compuestos fenólicos se sintetizan a partir de dos rutas metabólicas principales: la vía del ácido shikímico y la vía del ácido malónico. De la ruta del acetil-CoA, que se origina a partir de la glucosa, puede resultar el ciclo de Krebs, el cual produce ornitina y lisina, que a su vez generan alcaloides como la putrescina. Del acetil-CoA también se produce el mevalonato, que luego puede convertirse en isoprenoides que producen terpenoides como el mentol y esteroides como el cortisol. Al combinar las rutas del acetil-CoA y del ácido shikímico, pueden producirse flavonoides como la quercetina. Del ácido shikímico se deriva el ácido gálico, del cual se forman los taninos. También del ácido shikímico se obtienen la fenilalanina y la tirosina, que posteriormente generan alcaloides como la morfina. Además, el ácido shikímico puede generar fenoles como el ácido cafeico.

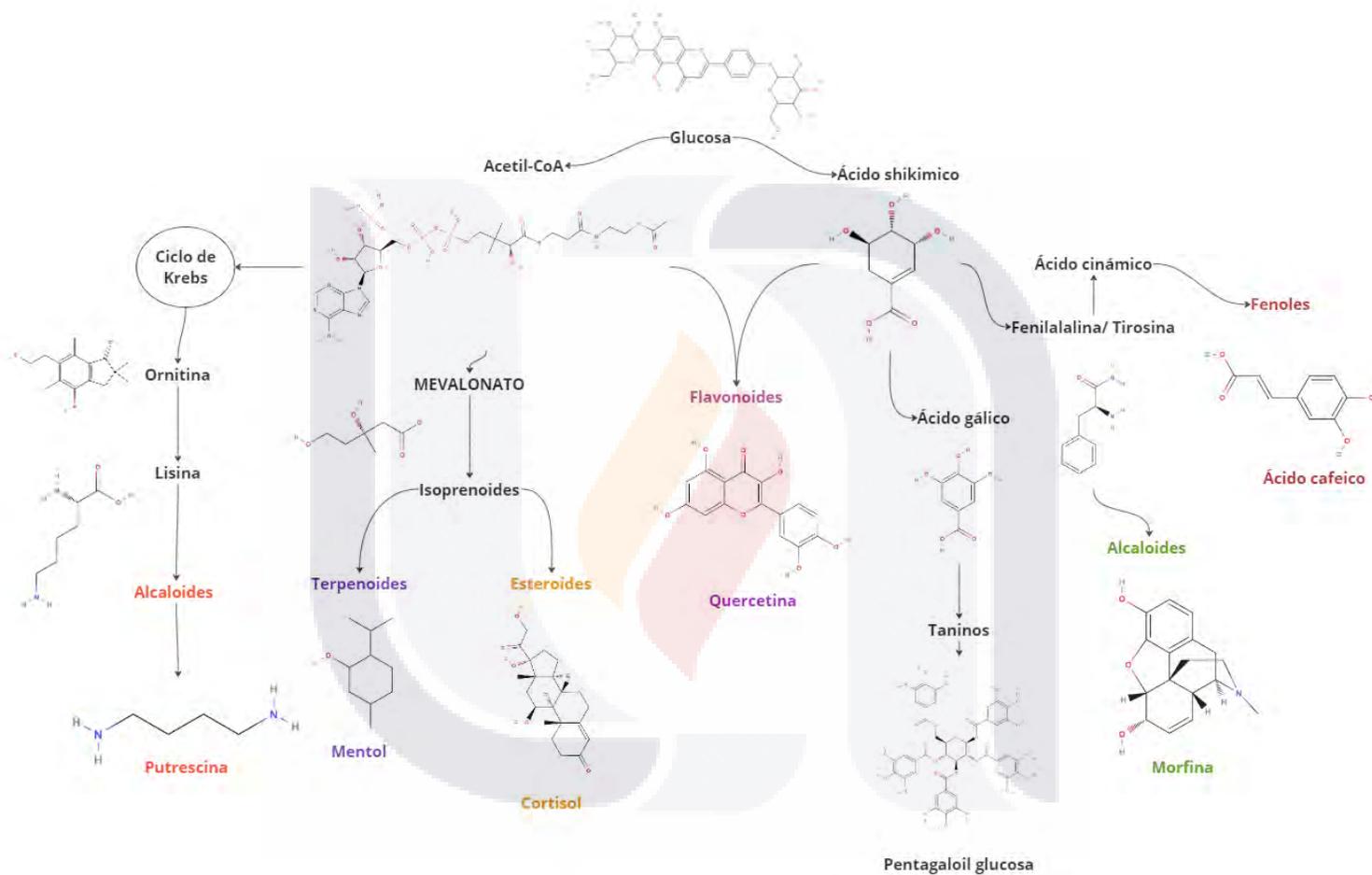
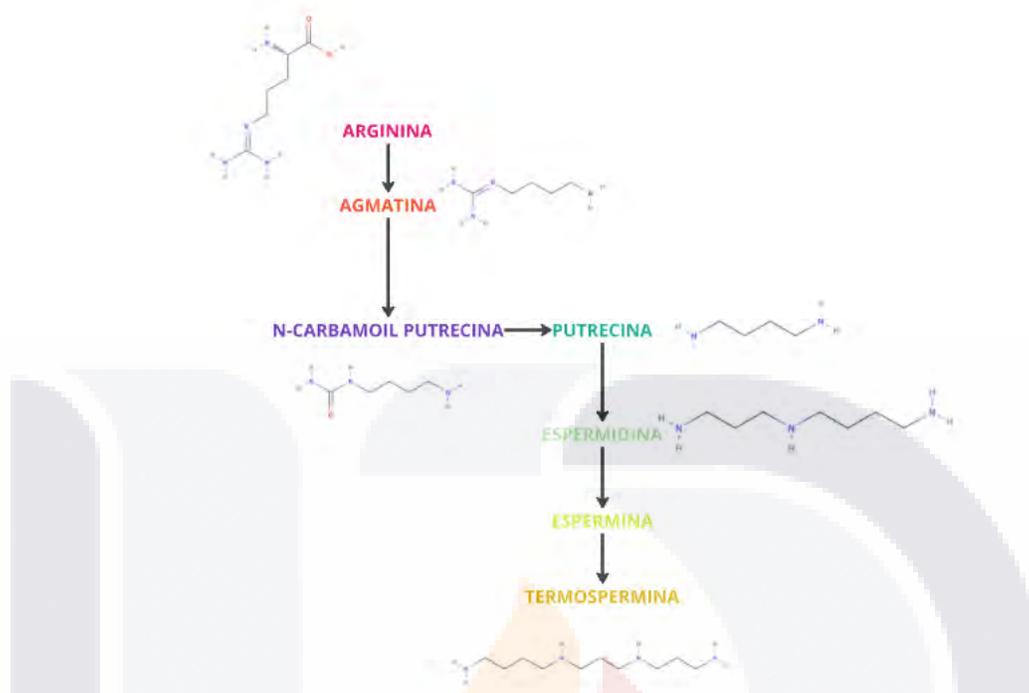


Figura 1. Ciclo de síntesis de metabolitos secundarios. Modificada de Barreto *et al.* (2020).

### 1.1.1. Metabolitos secundarios de plantas

El metabolismo secundario de las plantas incluye vías y procesos de síntesis que generan moléculas de bajo peso molecular, que no son esenciales para la supervivencia inmediata de la planta. Estas sustancias desempeñan un papel crucial en la respuesta defensiva contra herbívoros, patógenos como bacterias, hongos y virus, así como en la interacción con otras plantas. También pueden servir como señales para comunicarse plantas y sus simbiontes microbianos, y para atraer polinizadores y facilitar la dispersión de semillas (Yang *et al.*, 2018). Estos compuestos secundarios son el producto de mutaciones hereditarias en las vías metabólicas primarias. Entre ellos se encuentran alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, alcaloides, terpenos, compuestos fenólicos y saponinas (Bhat *et al.*, 2020). Es importante destacar que estos compuestos poseen un gran interés económico, dado que presentan propiedades de relevancia en áreas como la farmacología, la agricultura y la medicina (Robles-García *et al.*, 2016). Ejemplos de MS sintetizados por plantas son los capsaicinoides como se muestra en la figura 2 donde primero se elimina el carbono 8 de la arginina, lo que genera agmatina, a partir de la cual se forma putrescina y otros compuestos. La putrescina se transforma en espermidina mediante la adición de grupos aminopropilo, y posteriormente, la espermidina se convierte en espermina por la transferencia de grupos aminopropilo, lo que finalmente da lugar a la síntesis de termospermina.

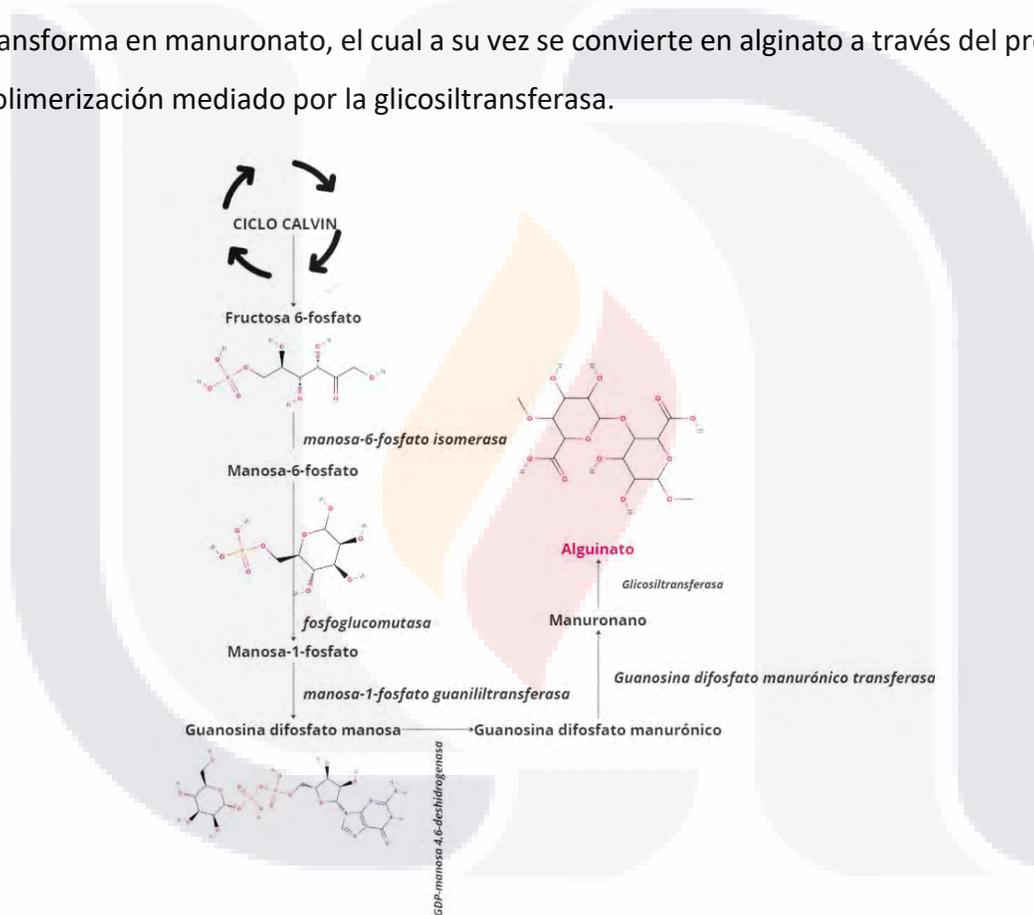


**Figura 2. Biosíntesis de termospermina.** Modificado de Bajguz y Piotrowska, 2023.

### 1.1.2. Metabolitos secundarios de algas

Las algas, organismos fotosintéticos eucariotas, prosperan en diversos entornos, desde suelos húmedos y cuerpos de agua dulce hasta nieve, desempeñando un papel esencial en los ecosistemas que habitan, por su abundancia y diversidad, las algas se dividen principalmente en dos grupos según su organización y tamaño: las microalgas y las macroalgas, aunque se encuentran predominantemente en los océanos, su presencia se extiende por una amplia variedad de hábitats (Alves de Aguilar *et al.*, 2022). Estos organismos, como las plantas, pueden producir su propio alimento; sus pigmentos fotosintéticos, como la clorofila, capturan la energía lumínica y la utilizan para sintetizar moléculas orgánicas (Manjarrez *et al.*, 2020). Las algas son una fuente rica y diversa de metabolitos, con más de 1,140 metabolitos secundarios identificados en algas marinas de géneros como *Dictyota*, *Padina* y *Sargassum*, estas sustancias son de gran interés en la industria debido a sus aplicaciones medicinales, ya que contienen aminoácidos, terpenos, florotaninos, esteroides, compuestos fenólicos, cetonas, alcanos halogenados y polisulfuros

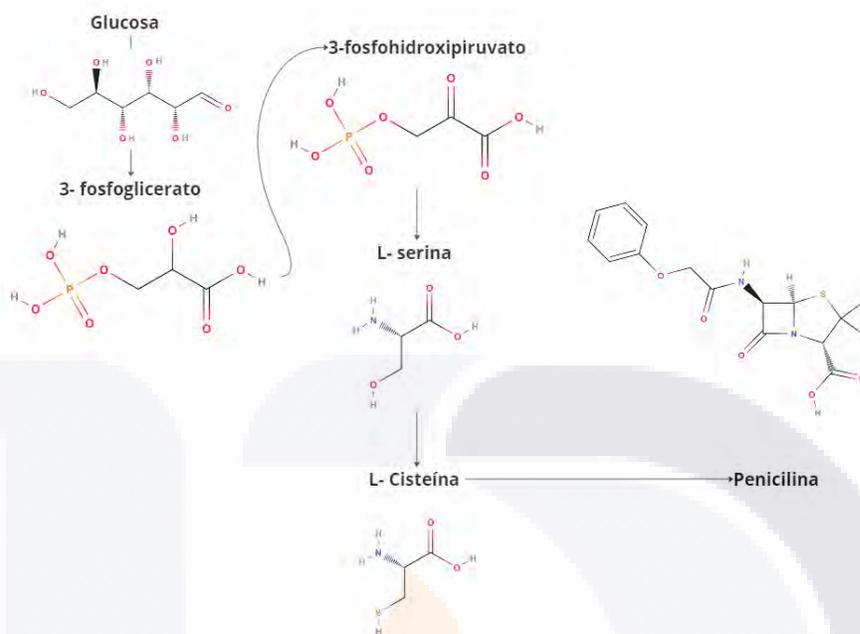
cíclicos (Lozano, 2018). Otro jemplo muy conocido de MS de algas es el alginato, como se observa en la figura 3, su biosíntesis inicia con el ciclo de Calvin en algas pardas, del cual se produce fructosa, la cual es transformada en manosa mediante la acción de una enzima conocida como manosa-6-fosfato isomerasa. Luego, la manosa se convierte en guanosina difosfato (GDP) a través de la enzima manosa 1 fosfato guanililtransferasa. A continuación, el GDP se convierte en guanosina difosfato manurónico mediante la acción de la enzima GDP-manosa 4,6 deshidrogrenasa. Posteriormente, la guanosina difosfato manurónico se transforma en manuronato, el cual a su vez se convierte en alginato a través del proceso de polimerización mediado por la glicosiltransferasa.



**Figura 3 Metabolitos secundarios sintetizados por algas.** Modificado de Shao y Duan (2022).

### 1.1.3. Metabolitos secundarios de hongos

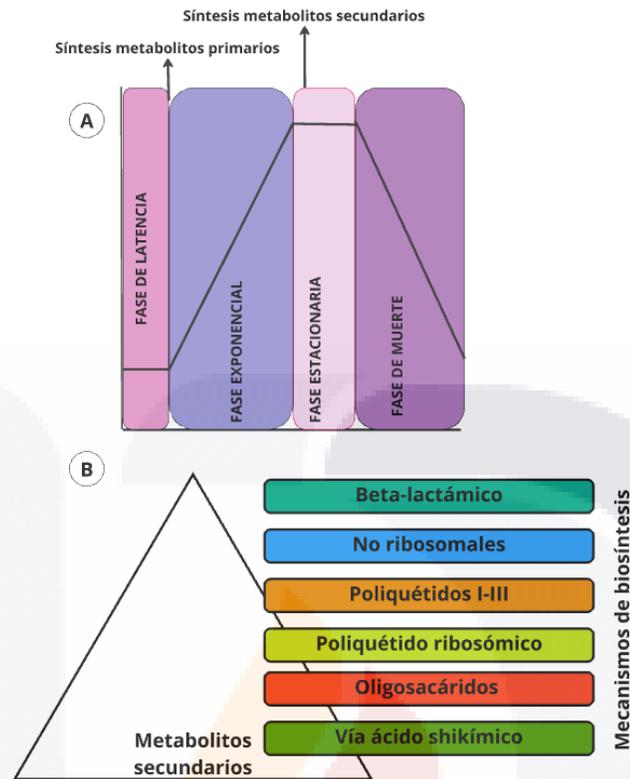
Muchos hongos tienen un metabolismo secundario bien desarrollado. La diversidad de especies de hongos y la diversificación de grupos de genes biosintéticos subraya un potencial casi ilimitado de variación metabólica y un recurso sin explotar para el descubrimiento de compuestos, los hongos sintetizan metabolitos secundarios para conquistar diversos hábitats y sostener su existencia (Bills *et al.*, 2016). También cumplen funciones muy diversas, como mediar en la comunicación dentro de una especie o entre especies diferentes, defenderse contra competidores, adquirir nutrientes e incluso participar en interacciones simbióticas (Macheleidt *et al.*, 2016). Entre los hongos productores, el género *Pycnoporus spp.* son productores de cinnabarina, según señala el estudio de Pineda-Insuasti *et al.* (2017). Especies pertenecientes al género *Pleurotus* tienen la capacidad de sintetizar esteroides y compuestos triterpenoides, como ha sido destacado por Vega (2016). Los hongos endófitos, por su parte, son reconocidos por su notable producción de fenoles, entre los cuales se incluyen las cumarinas, como indican los hallazgos de De Almeida Ribeiro *et al.* (2020). Un ejemplo adicional es el género *Diaporthe sp.*, que se destaca por la producción de metabolitos como la carboxamida, demostrando propiedades antibacterianas según la investigación de Tonial *et al.* (2023). Uno de los metabolitos secundarios más producidos por hongos por su importancia medicinal es la penicilina, como se presenta en la figura 4. La biosíntesis de la penicilina en *Penicillium chrysogenum* involucra la conversión de sustratos simples como el 3-fosfoglicerato en precursores clave. El 3-fosfoglicerato se convierte en 3-fosfohidroxipiruvato, el cual es un punto de partida en la síntesis de serina, un aminoácido esencial. La serina, a su vez, puede contribuir a la formación de cisteína, otro aminoácido crucial en la producción de penicilina. Esta ruta metabólica demuestra la complejidad y la interconexión de los procesos bioquímicos involucrados en la síntesis de este importante antibiótico.



**Figura 4. Biosíntesis de metabolitos secundarios de hongos.** Modificado de Azizan *et al.* (2016).

#### 1.1.4. Metabolitos secundarios de bacterias

Las bacterias, como una de las formas de vida más antiguas de la Tierra, han demostrado una notable capacidad para colonizar diversos hábitats, desde ambientes extremos hasta organismos vivos como animales y plantas, esta adaptabilidad ha sido posible gracias a su evolución a lo largo de 3.200 millones de años, durante los cuales han desarrollado complejas capacidades biosintéticas (D'Souza *et al.*, 2018). Una de las habilidades adquiridas debido a su gran capacidad de adaptación es la producción de una amplia gama de metabolitos secundarios, generados a partir de vías biosintéticas bien definidas y compuestos precursores en la etapa estacionaria de su crecimiento, la cual se observa en la figura 5 (Tyc *et al.*, 2017; Kumari *et al.*, 2021).



**Figura 5. Producción de metabolitos secundarios bacterianos.** La producción de metabolitos secundarios ocurre al final de la fase exponencial y al comienzo de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano(A). Diversos mecanismos de biosíntesis de metabolitos secundarios en bacterias (B). Modificado de Andryukov, *et al.* (2019).

Los metabolitos secundarios pueden encontrarse dentro de la célula, en el medio extracelular o en el espacio de cabeza del cultivo, estos compuestos son absorbidos, producidos, degradados o excretados por las bacterias (Kumari *et al.*, 2021). La producción de metabolitos secundarios suele estar asociada con una baja tasa de crecimiento y una respuesta a condiciones de estrés (Gokulan *et al.*, 2014). Estos metabolitos son el resultado de vías biosintéticas específicas, reguladas por grupos de genes biosintéticos (BGCs) que codifican megasintetasas, como las sintetasas de poliquétidos y las sintetasas de péptidos no ribosomales, estos genes producen compuestos con múltiples funciones, tales como protección contra factores de estrés, captura de hierro y actividad antimicrobiana (Dilshad *et al.*, 2022).

Estos conjuntos de genes trabajan en coordinación para codificar vías biosintéticas específicas para metabolitos secundarios y están regulados por procesos de desarrollo bacteriano, esporulación y respuestas a antibióticos y otros factores estresantes (Chevrette *et al.*, 2022). Por ello, para optimizar la producción de estos compuestos, es crucial controlar las condiciones de crecimiento bacteriano, como la temperatura, el pH y los requisitos nutricionales (Dror *et al.*, 2020). Para las bacterias, los metabolitos secundarios juegan un papel fundamental en las interacciones microbianas, que pueden ser competitivas o cooperativas, así como en la mediación de señales específicas (Chevrette *et al.*, 2022).

Los metabolitos secundarios bacterianos tienen aplicaciones significativas en diversas industrias, incluyendo la medicina y la agricultura como se muestra en la tabla 1 (Keswani *et al.*, 2020). En el ámbito agrícola, los metabolitos secundarios bacterianos se utilizan para reducir el uso de pesticidas químicos, mitigando problemas como la resistencia de plagas, residuos en alimentos, degradación del ecosistema y efectos adversos en la salud humana (Keswani *et al.*, 2020). En la medicina, estos compuestos desempeñan un papel crucial en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos, un problema creciente debido al uso excesivo de antibióticos (Qadri *et al.*, 2020). Además, también se utilizan para promover el crecimiento de plantas y tienen aplicaciones emergentes en campos como la farmacéutica, la cosmética y la química (DeBritto *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2020).

**Tabla 1. Bacterias productoras de metabolitos secundarios.**

Bacteria	Metabolito secundario	Aplicación industrial	Referencias
<i>Actinomicetos</i>	Tetraciclinas	Antibiótico inhibe síntesis de proteínas	Quiñones-Aguilar <i>et al.</i> (2016).
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactinas	Desestabilizantes de membranas biológicas	De França <i>et al.</i> (2021)
<i>Pseudomonas spp.</i>	Pocianina Sideróforos	Antibióticos agente quelante	Tirado y Duran (2017).
<i>Brevibacillus sp</i>	Brevilaterin B	Anticancerígeno	Zayed <i>et al.</i> (2021).
<i>Burkholderia thailandensis</i>	Bactobolin	Antibiótico	Klaus <i>et al.</i> (2020).
<i>Streptomyces sp.</i>	Valinomicina	Antifúngico	Wei, <i>et al.</i> (2021).
<i>Burkholderia lata</i>	Pirrolnitrina	Hongos oomicetos bacterias grampositivas	Petrova y Mahenthiralingam (2022).

### 1.2. La soya

La soya cultivada (*Glycine max* (L.) Merr., es de origen asiático (Mederos-Ramírez *et al.*, 2021). Es una planta que pertenece a la familia *Fabaceae*, conocida como la familia de las leguminosas, prospera en regiones subtropicales caracterizadas por climas permanentemente húmedos, por lo general, alcanza una altura máxima de 80 cm, con sus semillas desarrollándose dentro de vainas que suelen medir entre 4 y 6 cm de largo, conteniendo cada una de 2 a 3 granos de soya (Boldrini *et al.*, 2022). Su ciclo de vida abarca entre 80 y 200 días (Chipana y Calle, 2017). La forma y el color de las semillas varían según la diversidad genética de la especie, presentándose en tonalidades principalmente amarillas, negras o verdes (Boldrini *et al.*, 2022). El tallo de la planta se desarrolla de manera vertical y erguida como se observa en la figura 6, donde las plantas de soya fueron cultivadas por 21 días para observar su crecimiento, mientras que su sistema radicular está fundamentado en una raíz pivotante de la cual surgen raíces secundarias y terciarias, así como raíces adventicias con pelos radiculares, las hojas son alternas y trifoliadas, con

folíolos de forma ovalada. Las flores emergen de la axila de la hoja y pueden presentar un color blanco o púrpura (Gómez *et al.*, 2021).

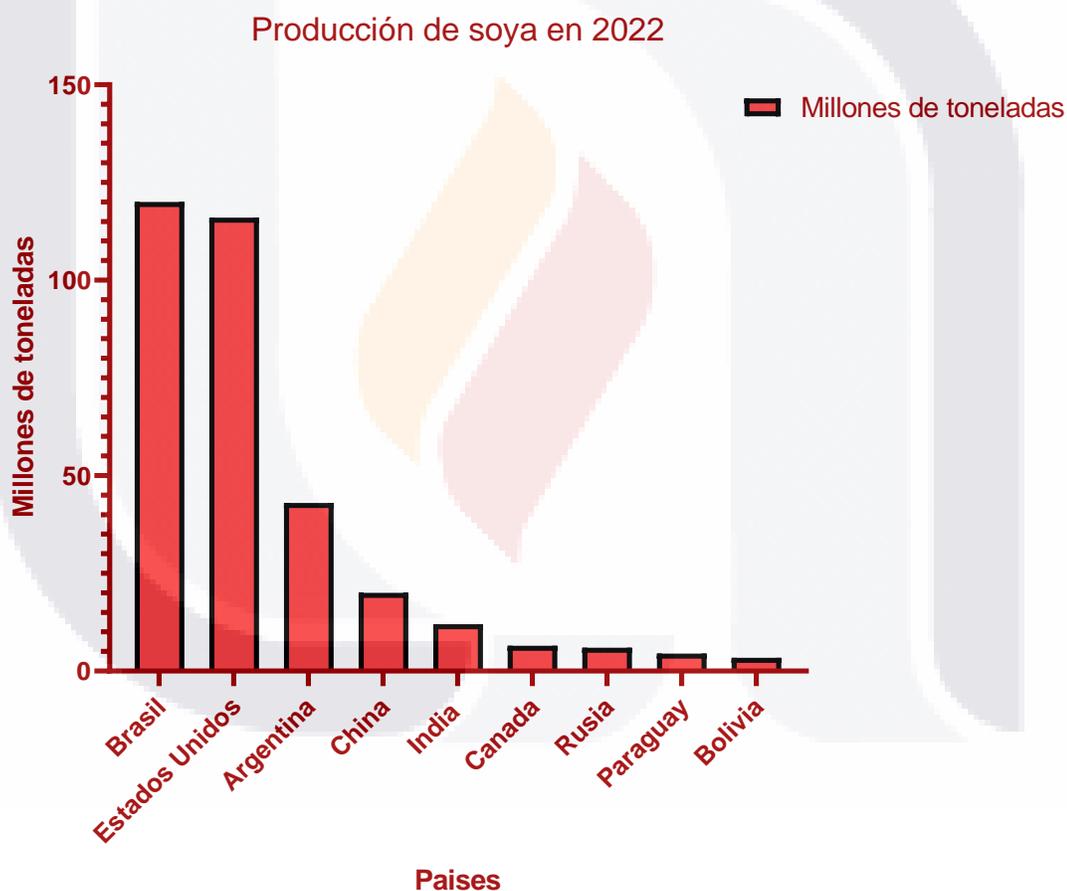


**Figura 6. Plantas de soya cultivadas en invernadero en Londrina, Parana. Elaboración propia.**

En la actualidad, la soya ha ganado reconocimiento como una fuente crucial de aceite y proteína vegetal, con un contenido que oscila entre el 40 % y el 42 %. Su versatilidad la ha convertido en un recurso ampliamente utilizado en la acuicultura, la alimentación animal y la dieta humana (Pagano & Miransari, 2016). En México, la importancia de la soya se refleja en la amplia demanda de los subproductos en la industria alimentaria, especialmente en la producción de harinas y aceites comestibles (González-Molotla *et al.*, 2021).

Según el informe del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) de 2023, la producción mundial de soya alcanzó 396.95 millones de toneladas, con Brasil a la cabeza con 163 millones de toneladas, seguido de Estados Unidos (113 millones) y Argentina con 48 millones (Servicio de información agroalimentaria y pesquera [SIAP], 2023).

En México, se cultiva en una extensa área que abarca tanto los estados del norte como del sur del país. Se siembran 1,512 hectáreas con una producción total de 288,202.57 toneladas. Los principales estados productores son Campeche, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Yucatán, Chiapas, Quintana Roo, Sonora y otros (SIAP, 2023). En la figura 7, se observa la producción de soya a nivel mundial en millones de toneladas en 2022, donde el principal productor de soya fue Brasil con más de 120 millones de toneladas, seguido de Estados Unidos con más de 116 toneladas.



**Figura 7. Producción mundial de soya.** Elaboración propia sobre información proveniente de Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2022.

### 1.2.1. Enfermedades de la soya

Al igual que la producción de otros cultivos de importancia económica, la producción de soya enfrenta constantemente diversos factores abióticos y bióticos (Bandara *et al.*, 2020). La soya es susceptible a muchas enfermedades y plagas (Roth *et al.*, 2020). Dichas enfermedades son una preocupación significativa y difícil de controlar, ocasionando pérdidas de rendimiento (entre 10 y 15 %) del grano cultivado para la producción de alimentos, alimento para animal y combustible (Allen *et al.*, 2017; Lavilla *et al.*, 2021). Existen más de 200 patógenos que infectan a la soya, de los cuales 35 son económicamente importantes (Lin *et al.*, 2022).

Uno de estos patógenos *Colletotrichum spp.*, un hongo que induce la antracnosis. Esta patología se sitúa entre las más comunes y perjudiciales que afectan a la soya desde su etapa de semilla hasta su madurez (Júnior *et al.*, 2020). Produce lesiones oscuras, deprimidas e irregulares en cotiledones, vainas, tallos y peciolos; además, puede manifestarse mediante la aparición de patrones necróticos en las venas abaxiales de las hojas (Dias *et al.*, 2019). Los hongos pueden infectar la semilla, comenzando por su cubierta, los cotiledones y los ejes embrionarios, sin que se manifiesten síntomas visibles, lo que afecta el vigor y la viabilidad debido al deterioro (Pérez *et al.*, 2023). La antracnosis se transmite a través de las semillas o mediante lesiones en las plantas, como los daños causados por insectos; este patógeno puede incluso ocasionar el marchitamiento de las plántulas de soya. Las condiciones ambientales de alta humedad relativa y lluvias frecuentes favorecen el desarrollo de esta enfermedad (Reis *et al.*, 2023).

Otra enfermedad es la roya asiática de la soya, causada por el hongo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*, representa una enfermedad foliar devastadora que supone un desafío significativo para el sector mundial de la soya (Hossain *et al.*, 2024). Esta enfermedad no solo afecta la salud de las plantas, sino que también disminuye el tamaño y el peso de las semillas, así como el contenido de aceite y el rendimiento total (Childs *et al.*, 2018). Los primeros síntomas de la infección suelen aparecer en el lado adaxial de las hojas y se propagan a todos los órganos, manifestándose como pequeñas lesiones de color marrón

que evolucionan hacia tonos más oscuros con la producción de urediniosporas (Hossain *et al.*, 2024; Reis *et al.*, 2016). Como consecuencia, las plantas envejecen prematuramente y experimentan defoliación anticipada debido a la disminución de la fotosíntesis durante la etapa de floración (Hossain *et al.*, 2024). En México, esta enfermedad ha provocado pérdidas que oscilan entre el 25 % y el 80 % en la producción de soya (García-Rodríguez *et al.*, 2017).

*Pythium sp* es un oomiceto patógeno del suelo que afecta a la soya principalmente a través de la raíz. Inicia su infección mediante zoosporas flageladas que, en suelos con suficiente humedad, encuentran la raíz y la penetran (Zitnick-Anderson *et al.*, 2017). Los síntomas generales de la infección por *Pythium sp* incluyen la pudrición de la semilla, un menor crecimiento de las plántulas y la presencia de lesiones marrones en la radícula (De Souza Feitosa *et al.*, 2023).

*Phytophthora sojae* es otro patógeno que se propaga a través del suelo y puede infectar la soya en cualquier etapa, desde la siembra hasta la cosecha, desencadenando la enfermedad de pudrición de raíz y resultando en una pérdida de rendimiento que puede alcanzar del 10 % al 40 % (Zhao *et al.*, 2017; Dorrance, 2018). Los síntomas principales de esta infección incluyen el marchitamiento de las plántulas, la pudrición de las semillas, la aparición de lesiones amarillentas en las hojas, manchas marrones en los tallos, marchitez de las hojas y la progresión del tejido infectado hasta la muerte prematura de la planta (Zhu *et al.*, 2018). Este patógeno tiene la capacidad de sobrevivir mediante oosporas en el tejido y puede persistir en el suelo durante períodos prolongados (Giachero *et al.*, 2022). En suelos con alta humedad, desarrolla esporangios de los cuales emergen zoosporas que se liberan en medios acuosos y encuentran las raíces de la soya para iniciar su invasión (McCoy *et al.*, 2023).

La enfermedad de la mancha púrpura de la semilla o de tizón foliar, causada por *Cercospora kikuchii*, se distingue principalmente por la coloración púrpura rojiza de las semillas, que pueden manifestarse como pequeñas manchas hasta cubrir por completo las semillas, afectando su capacidad germinativa (Sautua *et al.*, 2019; Lavilla *et al.*, 2022). Este hongo coloniza la testa de la semilla de soya, donde provoca necrosis en las células y los elementos vasculares, se manifiesta con lesiones rojizas en las hojas y necrosis de color parduzco en tallos, peciolo y folíolos (Lavilla *et al.*, 2022). Este hongo produce un gran número de conidios dentro de la planta, los cuales son dispersados por el aire hacia nuevos hospederos, especialmente en condiciones de alta humedad relativa, superiores al 80 %, y temperaturas entre 23 °C y 27 °C (Maldonado *et al.*, 2021; Lavilla *et al.*, 2022).

Otra enfermedad es la mancha marrón, causada por el hongo *Septoria glycines*, tiene la capacidad de infectar a la planta de soya en todas sus etapas de crecimiento y puede resultar en pérdidas de rendimiento de hasta el 30 %. Sus síntomas característicos incluyen la aparición de lesiones de color marrón, tejido amarillento y la caída prematura de las hojas (Martinenko *et al.*, 2021; Neves *et al.*, 2022).

*Rhizoctonia solani* es un patógeno necrotrófico que se encuentra en el suelo y causa la enfermedad de pudrición de raíces. Sus síntomas característicos incluyen la formación de lesiones marrones en peciolo y tallos, la presencia de hifas en el tejido infectado, el desprendimiento de hojas afectadas y la pudrición de raíces, especialmente en condiciones de alta humedad (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2017; Melzer *et al.*, 2016).

El impacto económico de estas enfermedades ha estimulado la investigación sobre su biología, epidemiología y manejo (Roth *et al.*, 2020). En la tabla 2 se muestran algunas enfermedades de soya y sus síntomas característicos.

**Tabla 2. Enfermedades de la soya.**

Enfermedad	Microorganismo	Síntomas	Referencia
Tizón de plántulas	<i>Phytophthora sojae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tallos de plántulas blandos y húmedos.</li> <li>Marchitamiento.</li> <li>Pudrición de raíces secundarias.</li> <li>Hojas amarillentas que finalmente mueren.</li> </ul>	Rojas <i>et al.</i> (2017).
Síndrome de muerte súbita (SDS)	<i>Fusarium solani</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pudrición de las raíces</li> <li>Manchas amarillas y secas en las hojas inferiores.</li> </ul>	Sjarpe <i>et al.</i> (2019). Bajwa <i>et al.</i> (2017).
Antracnosis	<i>Colletotrichum spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Manchas oscuras, deprimidas e irregulares en la planta.</li> <li>Venas laminares necrosadas.</li> <li>Defoliación de hojas.</li> <li>Pudrición de vainas.</li> <li>Germinación prematura.</li> </ul>	Bouffleur <i>et al.</i> (2021)
Pudrición parda del tallo	<i>Cadophora gregata</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oscurecimiento de la médula y el tejido vascular.</li> <li>Necrosis foliar.</li> <li>Clorosis foliar.</li> </ul>	McCabe y Graham (2020).
Cancro del tallo de Diaporthe	<i>Diaporthe spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hojas marrones y marchitas.</li> <li>Decoloración.</li> <li>Necrosis marrón rojiza en el tallo.</li> <li>Lesiones de cancro.</li> </ul>	Mena <i>et al.</i> (2020)
Pústula bacteriana	<i>Xanthomonas axonopodis pv. glicinas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hojas con pequeñas manchas verde amarillento con centro amarillo.</li> <li>Pústulas en la parte inferior de las hojas.</li> </ul>	Bertoglio <i>et al.</i> (2023)
Pudrición carbónica	<i>Macrophomina Phaseolina</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Marchitamiento prematuro.</li> <li>Oscurecimiento de raíces y tallo.</li> </ul>	Deshmukh y Tiwari (2021)
Deterioro de la raíz primaria	<i>Xylaria sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disminución de la raíz principal.</li> <li>Clorosis y necrosis intervenal.</li> <li>Crecimiento micelial algodonoso blanco</li> </ul>	Allen, Bluhm, <i>et al.</i> (2017).
Tizón foliar Mancha morada de las semillas	<i>Cercospora kikuchii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Manchas teñidas de color púrpura</li> <li>Decoloración púrpura</li> </ul>	Gomzhina <i>et al.</i> (2024)
Mancha foliar ojo de rana	<i>Cercospora sojina</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Manchas redondeadas de color marrón a gris en las hojas</li> </ul>	
Mancha marrón de Septoria	<i>Septoria glycines</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Manchas marrones.</li> <li>Lesiones en las hojas.</li> </ul>	Hosseini <i>et al.</i> (2023). Batzler <i>et al.</i> (2016)
Roya de la soya	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lesiones de color canela a rojo</li> </ul>	Okello <i>et al.</i> (2020).
Enfermedad de las plántulas de soya	<i>Rhizoctonia spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pudrición de la raíz en soya</li> </ul>	Ajayi-Oyetunde y Bradley (2017).

En la tabla 2, se presentan algunas de las principales enfermedades que afectan a la soya. Como se puede observar, estos patógenos comparten síntomas comunes que pueden comprometer significativamente el rendimiento de las plantas. La severidad y tipo de

enfermedad están influenciados por diversos factores, entre ellos, el manejo efectivo de los patógenos. Por ello, es fundamental no solo conocer los síntomas, sino también identificar los agentes causantes de las enfermedades para aplicar controles adecuados (Lin *et al.*, 2022).

#### **1.2.1.1. *Pythium sp.***

El oomiceto *Pythium sp.* es el principal agente causante de enfermedades como el mal de talluelo y la pudrición de semillas y plántulas de soya (Radmer *et al.*, 2017). *Pythium*, un género de oomicetos patógenos, tiene la capacidad de infectar una amplia variedad de plantas, entre ellas la soya, ocasionando enfermedades como la marchitez y la podredumbre de raíz, lo que puede resultar en pérdidas significativas de rendimiento, llegando hasta un 20 % según investigaciones recientes (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2022). Los síntomas asociados con las enfermedades causadas por *Pythium sp.* incluyen estrangulamiento, marchitez, disminución del crecimiento y muerte repentina de las plantas, así como la pudrición de semillas, necrosis de raíces y la marchitez y muerte de plántulas (Jiménez-Pérez *et al.*, 2022; Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2022). A diferencia de los hongos, *Pythium sp.* es un oomiceto homotálico que presenta celulosa y betaglucanos en su pared celular. Su reproducción se lleva a cabo mediante mecanismos asexuales, a través de zoosporas, y sexuales, mediante la producción de oosporas. Su micelio se caracteriza por ser hialino, con hifas cenocíticas de crecimiento apical. Los esporangios, globosos en su estructura, liberan zoosporas que actúan como inóculo para la infección y se desplazan a través de flagelos en medios líquidos hasta alcanzar las raíces jóvenes, donde ingresan por lesiones o mediante presión mecánica y degradación enzimática de tejidos vegetales. Este microorganismo puede sobrevivir tanto como saprofito como parásito (Ho, 2018; Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2022; Jiménez-Pérez *et al.*, 2022; Cruz *et al.*, 2022).

#### **1.2.1.2. *Rhizoctonia solani***

*Rhizoctonia solani* perteneciente a la familia *Ceratobasidiaceae* y al género *Rhizoctonia*, se encuentra taxonómicamente clasificado en 14 grupos con base en su considerable

diversidad morfológica, marcadores bioquímicos y capacidad patogénica. Sus hifas, de naturaleza multinucleada y septada, manifiestan una pigmentación marrón, careciendo de la presencia de conidios o de pigmentaciones divergentes del matiz antes mencionado (Bradley *et al.*, 2018). Este hongo basidiomiceto se encuentra naturalmente en el suelo y subsiste como saprófito al colonizar materia orgánica o mediante la formación de esclerocios. La infección en plantas de soya se desencadena a través de heridas o por una capa de micelio que daña la cutícula y penetra en la epidermis de la planta. Este patógeno exhibe una mayor agresividad en temperaturas comprendidas entre 15 °C y 18 °C en suelos húmedos. En la fase inicial, la infección genera canchales profundos en las plántulas, los cuales pueden estrangular y provocar daños tanto antes como después de la emergencia. Como consecuencia, se observa una disminución en el desarrollo del rodal, la vitalidad y la productividad del cultivo (Les *et al.*, 2020). La transmisión de este hongo se produce a través de semillas y suelo, manteniéndose en forma de esclerocios y micelios en semillas y suelos infectados con restos de plantas afectadas, con la presencia de agua, los esclerocios se propagan a través del suelo y los residuos de cultivo, posteriormente, los esclerocios germinan y forman micelios que, al entrar en contacto con la planta, crecen y generan estructuras de infección que facilitan la penetración del micelio en los tejidos de la planta, además, la planta puede infectarse a través de las estomas (Senapati *et al.*, 2022). Se emplean diversas estrategias de control contra *R. solani*, incluyendo el tratamiento de semillas, prácticas de labranza para disminuir la carga de inoculación, rotación de cultivos con especies no hospedantes, aplicación de fungicidas y la utilización de cultivos resistentes. La complejidad en el control de este patógeno radica en su habilidad para resistir el invierno, ya sea en forma de esclerocios de larga duración o como micelios presentes en restos de diversos cultivos (Bradley *et al.*, 2018).

### **1.2.2. Estrategias de control de enfermedades de soya**

Se pueden emplear una variedad de prácticas de forma individual o en combinación para mitigar el impacto negativo de las enfermedades, que incluyen la aplicación de pesticidas,

la sanidad de semillas, técnicas culturales y el despliegue de resistencia (Bandara *et al.*, 2020). En la tabla 3, se muestran algunas estrategias implementadas para controlar enfermedades de soya.

**Tabla 3. Estrategias de control de enfermedades de soya.**

Enfermedad	Causa	Control	Referencia
<b>Roya asiática</b>	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fungicidas con triazoles y estrobilurinas</li> <li>Variedades de soya resistentes</li> </ul>	Enciso-Maldonado <i>et al.</i> (2021). Dávila <i>et al.</i> (2021). García-Rodríguez <i>et al.</i> (2017).
<b>Mancha marrón</b>	<i>Septoria glycines</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fungicidas con triazoles, estrobilurinas y carboxamidas</li> </ul>	Couretot <i>et al.</i> (2018). Lavilla <i>et al.</i> (2024).
<b>Pudrición de raíces y tallos</b>	<i>Phytophthora sojae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semillas con etaboxam y oxatiapiprolina, fungicidas con metalaxil.</li> <li>Variedades de soya con genes resistentes</li> </ul>	López-Cardona <i>et al.</i> (2018). Dorrance (2018). Ahmad (2018). McCoy <i>et al.</i> (2023).
<b>Tizón foliar</b> <b>Mancha púrpura</b>	<i>Cercospora kikuchii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fungicidas inhibidores externos de quinona (QoI) y tiofanato metílico</li> </ul>	Lavilla <i>et al.</i> (2016). Maldonado <i>et al.</i> (2021).
<b>Antracnosis</b>	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fungicidas con carbendazim</li> <li>Rotación de cultivo</li> <li>Semillas libres de patógenos</li> </ul>	Esquivel <i>et al.</i> (2019). Vargas-González <i>et al.</i> (2019). Reis <i>et al.</i> , (2023)
<b>Podredumbre de raíz</b>	<i>Pythium sp</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semillas tratadas con metalaxil, mefenoxam y estrobilurinas</li> </ul>	McCoy <i>et al.</i> (2021).
<b>Mancha foliar y podredumbre de raíz</b>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Carbendazim, fludioxonil, thiabendazole</li> </ul>	Goulard (2022).

La aplicación de pesticidas se considera una estrategia efectiva para controlar microorganismos patógenos y satisfacer la creciente demanda de producción de alimentos.

La falta de plaguicidas podría ocasionar una pérdida del 74 % en la producción de frutas y del 32 % en la producción de cereales (Carranza-Patiño *et al.*, 2023; Rangel-Ortiz *et al.*, 2023). México, como importante productor agrícola, ha incrementado el uso de fungicidas y bactericidas de 14.1 mil toneladas a 28.6 mil toneladas para satisfacer la creciente demanda de alimentos (Rangel *et al.*, 2023). Sin embargo, el uso masivo y descuidado de plaguicidas en la agricultura ha desencadenado una serie de problemas ambientales y de salud pública, tales como intoxicaciones, presencia de residuos de plaguicidas en alimentos y en el ambiente, ruptura de mecanismos de control biológico y desarrollo de resistencia en las poblaciones de plagas (Mu *et al.*, 2022; Patel *et al.*, 2019; Kalantary *et al.*, 2022).

Existen diversas alternativas para reducir el uso de fungicidas en la agricultura. Una de ellas consiste en emplear variedades mejoradas seleccionadas para aumentar los rendimientos. Sin embargo, esto puede resultar en cultivos con deficiencias nutricionales, la desaparición de especies vegetales nativas y una reducción en el tamaño de los cultivos (Pazos *et al.*, 2016). Otra estrategia prometedora es el uso de microorganismos beneficiosos, los cuales poseen mecanismos tanto directos, que mejoran la nutrición de las plantas, como indirectos, que protegen a las plantas contra patógenos. Estos mecanismos favorecen el crecimiento de los cultivos y representan una alternativa tecnológica para una agricultura sustentable (Rezende *et al.*, 2021; Alonso-Torres *et al.*, 2022). Estos microorganismos pueden estimular el crecimiento de las plantas, degradar compuestos tóxicos mediante biorremediación y producir sustancias tóxicas para microorganismos patógenos de los cultivos (Alonso-Torres *et al.*, 2022). El estudio y la aplicación de microorganismos en la agricultura contribuyen de diversas maneras, como la reducción del uso excesivo de plaguicidas, la disminución de la presencia de microorganismos patógenos y la reducción del uso de fertilizantes (Diaz *et al.*, 2019; Lahlali *et al.*, 2022).

#### **1.2.2.1. *Pseudomona aeruginosa* cepa LV**

El nombre *Pseudomonas* proviene del griego "*pseudo*" (falso) y "*monas*" (una sola unidad), y fue acuñado por el científico Walter Emil Friedrich en 1894 debido a la semejanza de estas bacterias con ciertos nanoflagelados conocidos como Monas. Las *Pseudomonas* son bacilos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aerobios gramnegativos que pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae*. Son no fermentadores de glucosa, catalasa positivos y poseen flagelos polares, aunque no forman esporas (Pinzón, 2019).

*Pseudomonas aeruginosa* posee un flagelo que le otorga movilidad y *pili* que le permiten adherirse a superficies, esta bacteria oportunista, demuestra una notable resistencia a diversos entornos. Se clasifica como aerobia facultativa debido a su capacidad para sobrevivir en condiciones anaerobias, utilizando nitrógeno o arginina como aceptores finales de protones, puede colonizar tanto ambientes acuáticos como terrestres, adaptándose a condiciones nutricionales mínimas. Puede prosperar en un amplio rango de temperaturas, desde los 20 °C hasta los 43 °C. A pesar de su incapacidad para fermentar lactosa, *P. aeruginosa* logra obtener energía a través de la oxidación de azúcares (Paz-Zarza *et al.*, 2019).

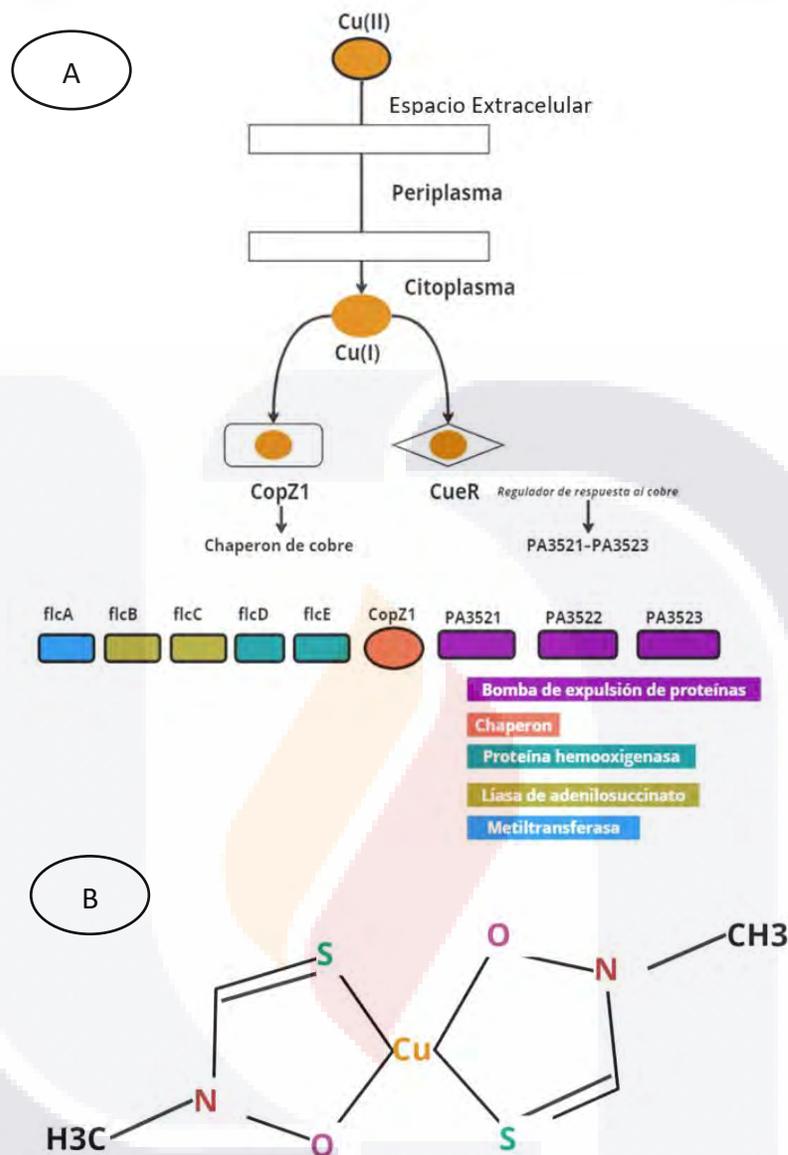
Estas bacterias han adquirido importancia debido a la influencia que ejercen en la promoción del crecimiento de las plantas, la inducción de resistencia sistémica en ellas y el control de fitopatógenos. Tienen la capacidad de producir una variedad de compuestos antimicrobianos, como el 2,4-diacetilfluoroglucinol, la mupirocina, la pioluteorina, enzimas celulolíticas, fitohormonas y sideróforos (Barraza-Roman *et al.*, 2017).

La cepa LV de *Pseudomonas aeruginosa* corresponde a un aislado obtenido de una antigua lesión (LV) en naranjas (*Citrus sinensis* cv. *Valencia*) en la ciudad de Astorga, Brasil. Dicha lesión fue causada por *Xanthomonas citri* pv. *citri* y fue recolectada con el propósito de investigar sus efectos antagonistas contra este fitopatógeno. En pruebas realizadas en plantas en condiciones de invernadero, las cepas LV y LN demostraron efectos positivos (Rampazo, 2004).

Uno de los principales agentes antimicrobianos producidos por la cepa LV de *Pseudomonas aeruginosa* es la fluopsina C (FLC).

#### 1.2.2.1.1. Fluopsina C

Las bacterias dependen de iones metálicos para llevar a cabo procesos biológicos esenciales y para defenderse contra el exceso de metales (Palmer *et al.*, 2016). Entre estas defensas, algunas bacterias han evolucionado la habilidad de producir productos naturales con afinidad por el cobre, lo que facilita su desintoxicación en situaciones de exceso de este metal (Ross *et al.*, 2019). La fluopsina C (FLC), un metabolito secundario organocúprico, es sintetizado por bacterias como *Pseudomonas spp.* en medios con elevada concentración de cobre mediante una compleja reacción entre iones de cobre y dos moléculas del sideróforo tioformina (ácido N-metiltioformohidroxámico), el cual juega un papel crucial en el transporte de iones de hierro a través de la membrana de bacterias, algas y hongos (Navarro *et al.*, 2020). Este metabolito de bajo peso molecular ( $243,786 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) fue identificado inicialmente en 1970 y se presenta en forma de cristales verde oscuros con potente actividad antimicrobiana. Desde su descubrimiento, numerosos estudios se han llevado a cabo para investigar su efectividad contra bacterias y hongos (Afonso *et al.*, 2022). En la figura 8 se presenta la estructura de FLC y su mecanismo molecular.



**Figura 8. Estructura de fluopsina C y mecanismo molecular.** En elevadas concentraciones de cobre, pero no tóxicas, hay hiperexpresión de 9 genes agrupados funcionalmente como transportadores de iones metálicos, reguladores transcripcionales, biosíntesis de fenazinas y proteínas hipotéticas como respuesta a la resistencia al cobre (A). La estructura de fluopsina C contiene cobre (II) al cual se le atribuye su función antimicrobiana (B). Adaptado de Patteson *et al.* (2021).

Investigaciones recientes han evidenciado la participación de un grupo de genes que codifican cinco proteínas, incluyendo una metiltransferasa, dos liasas de adenilosuccinato y dos enzimas responsables de sintetizar un metabolito natural que se une al cobre (Patteson *et al.*, 2021). La identificación de este conjunto de genes se basa en su sobreexpresión en concentraciones elevadas de cobre, pudiendo clasificarse en genes transportadores de iones metálicos (PA3574a; PA3920; PA3523; PA3251), reguladores transcripcionales (PA4878), biosíntesis de fenazinas (phzA2) y proteínas hipotéticas (PA2691; PA4141; PA4782). La sobreexpresión de genes asociados al transporte de iones metálicos sugiere que la biosíntesis de FLC se emplea como un mecanismo de biorremediación para proteger contra niveles elevados de cobre intracelular. El gen phA2 es responsable de la producción basal de ácido fenazin-1-carboxílico (PCA), que podría ser el precursor metabólico de la tioformina (Bartolomeu-Gonçalves *et al.*, 2022).

La FLC, que contiene cobre y dos ligandos de tiohidroxamato, inicia su síntesis con el acoplamiento de cisteína y fumarato, catalizado por la liasa C-S FlcB. Este proceso resulta en una S-succinilcisteína, la cual se oxida mediante la acción de dos enzimas similares a la hemooxigenasa dependiente de hierro (FlcE y FlcD), eliminando tanto el carboxilato como el carbono alfa de la cisteína. FlcE cataliza la descarboxilación y N-hidroxilación para formar una oxima, mientras que FlcD cataliza una escisión de metino, liberando el carbono de la oxima en forma de ácido fórmico. Finalmente, el tiohidroxamato se escinde del succinato mediante otra liasa C-S FlcB y se metila mediante la acción de FlcA para formar un ligando de cobre en la fluopsina (Chen *et al.*, 2023). Este compuesto exhibe una notable actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos, lo que lo convierte en una opción prometedora para el desarrollo de nuevas moléculas destinadas al control de microorganismos que afectan a diversos cultivos. Se ha observado que las bacterias patógenas expuestas a FLC presentan una disrupción completa de la membrana celular y una frecuente presencia de células con septación (De Oliveira *et al.*, 2016). Estudios destinados a determinar el efecto de FLC sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas han reportado que este compuesto altera la membrana celular, incrementando su permeabilidad, así como la pared celular en

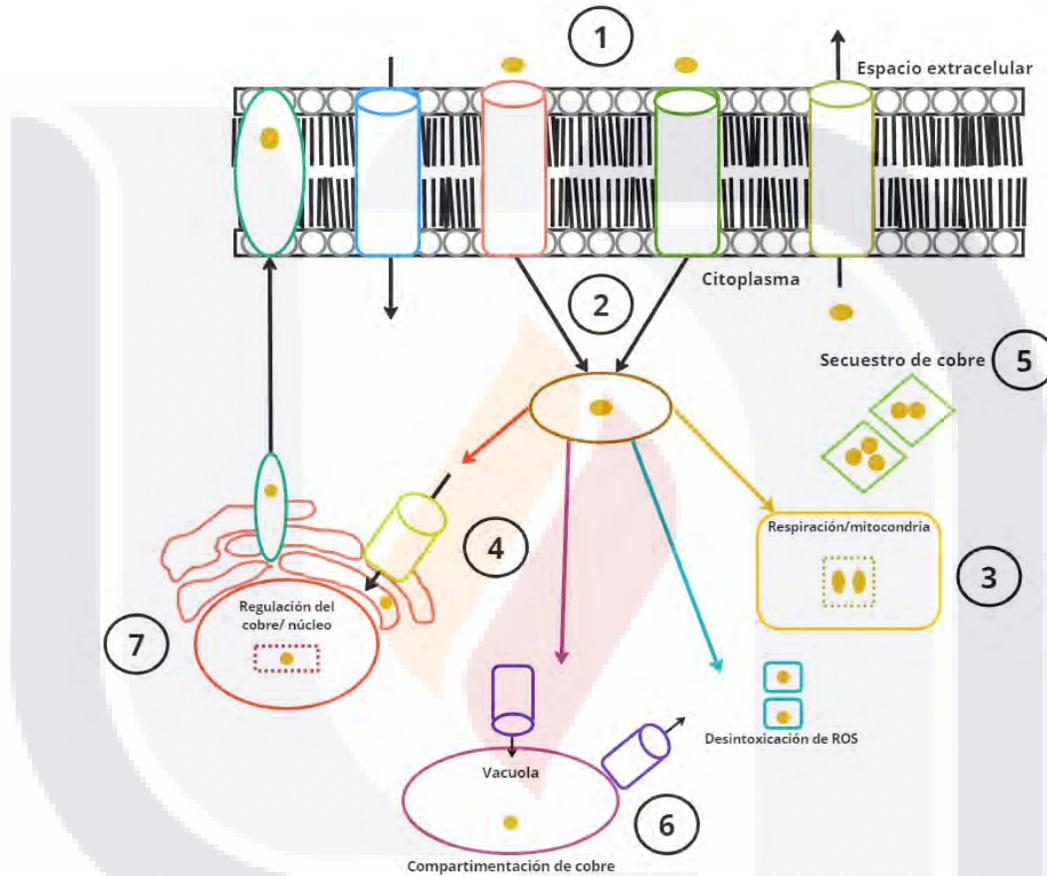
diversos géneros de bacterias Gram negativas. Se ha observado una disminución drástica en el número de células en bacterias Gram positivas expuestas a la FLC, junto con una alteración en la estructura de la membrana celular que induce la muerte de las bacterias (Navarro *et al.*, 2020). Su potencial radica en la capacidad de prevenir pérdidas masivas y reducir el impacto ambiental derivado del uso excesivo de pesticidas químicos (Kerbaudy *et al.*, 2016).

#### **1.2.2.2. El efecto del cobre como antibiótico microbiano**

Para los organismos vivos, el cobre representa un micronutriente esencial (Capinera *et al.*, 2016). En el caso de los hongos, estos organismos requieren metales de transición como el cobre, el cual posee características de potencial redox específicas necesarias para sus procesos biológicos (Antsotegi-Uskola *et al.*, 2019). Sin embargo, debido a su pared celular rica en carbohidratos y su membrana plasmática casi impermeable al cobre, se ven obligados a desarrollar un sistema de captación de este metal (Smith *et al.*, 2017). Los hongos han evolucionado un sistema de programación génica que codifica componentes para la absorción y desintoxicación del cobre en respuesta a las fluctuaciones en su disponibilidad (Moraes *et al.*, 2023). Inicialmente, las hifas fúngicas captan el cobre, el cual puede encontrarse en el ambiente en dos formas de oxidación:  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  (Raffa *et al.*, 2019). Sin embargo, solo el  $\text{Cu}^+$  es aprovechable por los hongos. Cuando se encuentra en estado  $\text{Cu}^{2+}$ , una ferrirreductasa de la membrana plasmática reduce  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  para su captación (Raffa *et al.*, 2019). Una vez dentro de la célula, el  $\text{Cu}^+$  es transportado por proteínas especializadas llamadas Ctr, que exhiben una alta especificidad por este metal. Estas proteínas se localizan en la membrana plasmática y en vesículas endosómicas, lo que facilita el transporte del cobre hacia el citoplasma (Ren *et al.*, 2019).

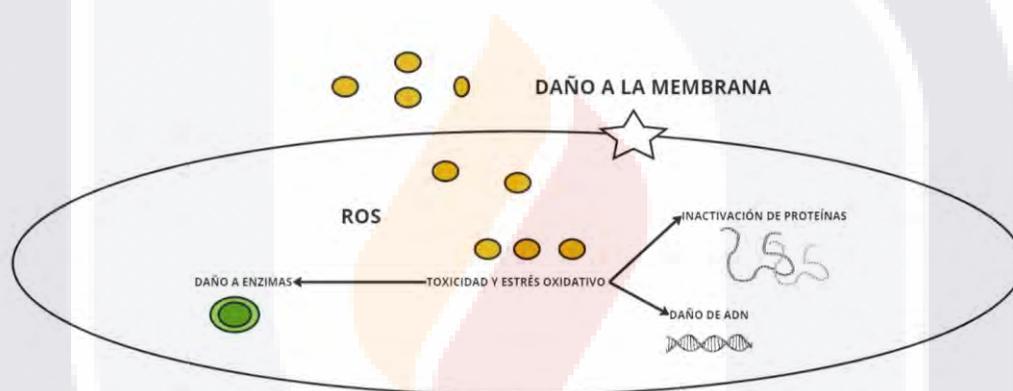
Posteriormente, el cobre se une a chaperonas u otros componentes celulares que facilitan su entrega a enzimas dependientes de cobre o su almacenamiento (Moraes *et al.*, 2023). Para regular la concentración de cobre, los hongos cuentan con factores de transcripción sensibles a este metal, los cuales detectan los bajos niveles de  $\text{Cu}^+$  intracelular y activan genes que codifican transportadores de cobre y la ferrirreductasa (Ballou & Wilson, 2016).

Los altos niveles de  $\text{Cu}^+$  intracelular son detectados por el factor de transcripción Ace1, el cual activa genes que codifican metalotioneínas, proteínas de almacenamiento de metales que se unen al ion, evitando la formación de especies reactivas de oxígeno EROS (Llases *et al.*, 2019). La figura 9 ilustra el proceso de adquisición de cobre por los hongos.



**Figura 9. Adquisición de cobre en hongos.** Pasos: 1 transportadores de alta afinidad dedicados en la membrana plasmática facilitan la importación unidireccional de cobre desde el espacio extracelular al citoplasma. 2 el cobre es unido por chaperonas de cobre u otros componentes amortiguadores, 3 entrega de cobre a enzimas citoplásmicas y mitocondriales, 4 activación dependiente de cobre o a compartimentos subcelulares para almacenamiento o carga en enzimas secretoras dependientes de cobre, 5 el cobre se acumula más allá de las capacidades homeostáticas, los hongos emplean mecanismos de desintoxicación del cobre como la sequestración o la expulsión de cobre. Bajo condiciones de deficiencia de cobre extracelular, las células movilizan las reservas de cobre vacuolar como se presenta en los pasos 6 y 7. Adaptado de Smith *et al.* (2017).

A pesar de que se trata de un elemento esencial para la sobrevivencia de los organismos, el cobre exhibe propiedades biocidas de amplio espectro, tiene propiedades para actuar como agente fungicida o fungistático (Robinson *et al.*, 2021). Se utiliza como materia prima en el desarrollo de formulaciones de cobre inorgánico para combatir bacterias, hongos y oomicetos (Capinera *et al.*, 2016). El cobre posee la capacidad de interactuar con los ácidos nucleicos, perturbar los sitios activos de las enzimas, interferir con el sistema de transporte de energía y alterar la integridad de las membranas celulares (Lamichhane *et al.*, 2018). En el caso de los hongos, se sugiere que el daño causado por el contacto directo comienza con un extenso deterioro de la membrana fúngica, seguido de un agrandamiento y desaparición de las vacuolas celulares. En la figura 10 se observa el efecto antifúngico del cobre.



**Figura 10. Efecto antifúngico del cobre.** El cobre daña al hongo principalmente mediante el estrés oxidativo, provocado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El cobre desestabiliza la pared y la membrana celular, alterando su permeabilidad y facilitando su entrada más rápida en la célula como lo menciona Salah *et al.* (2021). Los iones de cobre inducen toxicidad y estrés oxidativo, lo que resulta en la degradación de compuestos, la inactivación de proteínas y el daño a enzimas, así como al ADN en base a la información de Long *et al.* (2017). Adaptado de Shende *et al.* (2021).

Los productos elaborados a partir de cobre se aplican como agentes protectores en los cultivos, con el fin de reducir la cantidad de inóculo que podría infectar a las plantas (Oussou-Azo *et al.*, 2020). De esta forma, se ha utilizado como estrategia de control de diversas enfermedades, como el tratamiento de la enfermedad del cancro cítrico, ocasionada por *X. citri* subsp. *citri* (Behlau *et al.*, 2017), así como en la lucha contra el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Oussou-Azo *et al.*, 2020). Asimismo, se ha informado de su eficacia en el control de *Poria hypolateritia*, agente causal de la pudrición roja de la raíz en plantas de té (Ponmurugan *et al.*, 2016), y su utilidad en la protección contra *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* (Pham *et al.*, 2019).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El aumento de la población humana ha motivado a los países a implementar estrategias para producir alimentos y satisfacer las demandas globales. La soya es uno de los cultivos más críticos a nivel mundial; enfrenta una vulnerabilidad considerable ante enfermedades causadas por insectos, bacterias y hongos, siendo un reto significativo por sus efectos devastadores en el rendimiento y calidad de los cultivos. El control químico es un método eficaz para combatir estas enfermedades. Sin embargo, su uso excesivo de estos productos en la agricultura moderna ha provocado la disminución de la fertilidad del suelo y la resistencia emergente en microorganismos fitopatógenos en todo el mundo. Dada la creciente necesidad de producir alimentos seguros y preservar la salud de los cultivos, el desarrollo de métodos de control de enfermedades que sean respetuosos con el medio ambiente y reduzcan la dependencia de agroquímicos se ha convertido en una prioridad para fomentar la sostenibilidad en la agricultura. Una solución viable radica en la explotación de compuestos generados por bacterias como agentes de control biológico. En este sentido, se ha destacado recientemente la capacidad de *Pseudomona aeruginosa* cepa LV para sintetizar metabolitos secundarios, entre ellos la FLC, la cual tiene propiedades fungicidas que podrían inhibir el crecimiento de hongos patógenos en la soya. Por lo tanto, es importante realizar estudio en *P. aeruginosa* cepa LV sobre la producción de FLC para evaluar su actividad en el control de diversos hongos patógenos de la soya.

### 3. HIPÓTESIS

Si la bacteria *Pseudomona aeruginosa* cepa LV produce FLC que presenta actividad antifúngica, esta podrá inhibir el crecimiento de algunos hongos patógenos en plantas de soya.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica de Fluopsina C producida por *Pseudomona aeruginosa* LV frente a los hongos patógenos de soya en condiciones de laboratorio e invernadero.

#### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el metabolito secundario Fluopsina C de *Pseudomona aeruginosa* LV
- Analizar el efecto antifúngico de fluopsina C frente a hongos patógenos de soya
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de fluopsina C para *Pythium sp* y *R. solani*
- Evaluar la fitotoxicidad en semillas de soya expuestas a fluopsina C.
- Evaluar la capacidad protectante de fluopsina C en semillas de soya infectadas por hongos *Pythium sp* y *R. solani*.

### 5. INCIDENCIA, IMPACTO SOCIAL O AMBIENTAL ESPERADO

El presente trabajo aportará conocimientos en el área de biotecnología vegetal sobre nuevas estrategias de control biológico de hongos fitopatógenos. Del mismo modo, se espera que este proyecto contribuya a los objetivos de la Organización de las Naciones Unidas correspondientes a la disminución de hambruna y pobreza causadas por la pérdida económica y material como consecuencia de la pudrición de cultivos, aumentando la productividad agrícola del cultivo de soya. Este proyecto es una alternativa para reducir el uso de fungicidas y aminorar la degradación de suelos fértiles y la afectación al medio ambiente por el abuso de estos compuestos. Además, se busca impulsar nuevas biotecnologías que promueven la innovación y favorezcan con el desarrollo industrial sustentable, impidiendo el desperdicio de los recursos naturales gastados en el cultivo de

soya. Con este trabajo se busca contribuir al programa nacional estratégico de soberanía alimentaria al producir alimentos sanos cuidando el suelo del uso indebido de agroquímicos propuesto por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) así como favorecer el programa de sistemas socioambientales y sustentabilidad el cual tiene como objetivo la producción sustentable que implica la disminución de emisiones contaminantes como los residuos de agroquímicos en el agua y aire.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Localización del estudio**

La parte experimental del estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Ecológica Microbiana a cargo del Dr. Galdino Andrade Filho, dentro de la Universidad Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil.

### **6.2. Origen de los microorganismos**

La bacteria *P. aeruginosa* cepa LV se obtuvo a partir de una lesión de cancro cítrico en plantas de naranja recolectadas en Astorga, Brasil (Rampazo, 2004). Tanto *P. aeruginosa* cepa LV como los hongos patógenos de la soya (*Phomopsis sojae*, *Collectotrichum truncatum*, *Pythium sp*, *Rhizoctonia solani* y *Cercospora kikuchii*) forman parte de la colección del Laboratorio de Ecología Microbiana, gentilmente cedidos por el doctor Galdino Andrade Filho del Departamento de Ciencias Biológicas de UEL para fines de investigación.

### **6.3. Producción de fluopsina C**

*P. aeruginosa* cepa LV se conservó en agar nutritivo (AN: extracto de carne 3 g; peptona 5 g; agar 15 g) con un 30 % de glicerol a una temperatura de -20 °C. Para la producción de fluopsina C, se cultivó *P. aeruginosa* cepa LV en placas Petri con 20 ml de AN suplementado con un 0.01 % de cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a pH de 6.8 a 28 °C durante 24 h, siguiendo el protocolo de Munhoz *et al.* (2017). Una vez que el cultivo alcanzó la fase logarítmica ( $10^8$  UFC/mL, OD 0,09,  $\lambda = 590$  nm), se inoculó una suspensión celular de 100  $\mu\text{L}$  en un litro de caldo nutritivo (CN: extracto de carne 3 g; peptona 5 g) suplementado con una

concentración de 100 mg/L de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Posteriormente, se cultivaron en agitación a 100 rpm durante 10 días a 28 °C y pH de 6.8. Los residuos se separaron mediante centrifugación a 9,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, siguiendo el procedimiento descrito por Simionato *et al.* (2017). Posteriormente, se eliminó el sedimento y el sobrenadante libre de células se concentró en una estufa de secado durante 48 h a 40 °C y se resuspendió en agua destilada. Los metabolitos fueron extraídos tres veces utilizando dos volúmenes de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) en cada extracción para obtener la fase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (FD). Posteriormente, FD se concentró en un rotavapor a 45 °C, adaptando la técnica descrita por Bedoya *et al.* (2019).

#### **6.4. Purificación de fluopsina C**

Los metabolitos de FD se extrajeron mediante la técnica de cromatografía en columna abierta (CC), utilizando una serie de solventes orgánicos de polaridad creciente. Una fracción semipurificada, denominada F4A, se obtuvo mediante cromatografía líquida al vacío de FD utilizando una columna de vidrio (20 mm de diámetro, 350 mm de altura) rellena con gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm) y aplicando un vacío de aproximadamente 150 mm Hg. Cada fase móvil se dividió en dos alícuotas cada una (A y B). La columna se eluyó con 200 mL de hexano (F1A y F1B), 200 mL de hexano/diclorometano (1:1; F2A y F2B), 200 mL de diclorometano (F3A y F3B), 200 mL de diclorometano/acetato de etilo (1:1; F4A y F4B), y 200 mL de acetato de etilo, siguiendo el método descrito por Munhoz *et al.* (2017) adaptado al estudio. Se concentró la fracción F4A y se realizó una purificación de los compuestos mediante cromatografía flash (CF), utilizando una columna de 100 mm de altura y 8 mm de diámetro, rellena con gel de sílice 60 (0.04-0.063 mm). El compuesto organometálico FLC fue extraído empleando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y éter etílico en proporción de 90:10 (v/v) conforme a lo descrito por dos Santos *et al.* (2021) con algunas modificaciones. Para evaluar cualitativamente la producción de FLC en las fracciones obtenidas en procesos de separación se prepararon cromatografías en capas finas utilizando placas de gel de sílice de dimensiones 5 cm x 5 cm (Merck 60 F254) en soporte de aluminio. El sistema eluyente utilizado para el desarrollo de las placas fue una mezcla de cloroformo, diclorometano y

acetato de etilo en una proporción de 1:1:1. Las manchas se identificaron bajo luz ultravioleta a 254 nm y 366 nm y se determinó el valor de Rf (factor de retención) FLC mediante la ecuación:

$$RF = ds/dm$$

Donde ds es la distancia, en mm, recorrida por la sustancia sobre la placa de sílice, y dm es la distancia total entre el inicio y el final de la fase móvil.

### 6.5. Observación del efecto antifúngico de FLC

El efecto antifúngico de FLC se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido, analizando el hongo más sensible a este compuesto. Para identificar el hongo más sensible, se realizaron pruebas de confrontación directa con *Phomopsis sojae*, *Colletotrichum truncatum*, *Pythium sp.*, *Rhizoctonia solani* y *Cercospora kikuchii*. En estas pruebas, se colocaron discos de 5 mm de micelio de cada patógeno en el centro de placas de Petri con APD, en un extremo de cada placa, se ubicó un disco impregnado con 20 µL de FLC a concentraciones de 10, 5 y 1 mg/mL, mientras que en el extremo opuesto se colocó un disco impregnado con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) como control negativo (Figura 11). Las placas se incubaron a 28 °C durante 4 días a 28 °C. Posteriormente, se midió el crecimiento radial de los hongos para determinar el porcentaje de inhibición, con tres repeticiones por tratamiento, siguiendo la metodología adaptada de Cubilla-Ríos *et al.* (2019).



**Figura 11. Pruebas de confrontación directa.**

Los puntos marrones representan los discos fúngicos, el punto celeste representa el disco con FLC mientras que el punto blanco representa el disco con solvente.

Las muestras se prepararon para su observación en microscopía electrónica de barrido. La fijación de muestras se llevó a cabo utilizando una solución de glutaraldehído al 2.5 %, paraformaldehído al 2 %, y un tampón de cacodilato de sodio al 0.1M con pH de 7.2, durante un período de 12 horas a 4 °C, empleando la técnica descrita por Oliveira *et al.* (2016), con algunas modificaciones. El proceso de post-fijación se llevó a cabo mediante tres lavados con tampón de cacodilato de sodio al 0.1M, cada uno durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con tetroxido de osmio al 1 % y almacenadas en oscuridad durante 30 minutos. Además, se realizaron tres lavados adicionales con tampón de cacodilato de sodio al 0.1M, siguiendo una modificación de la técnica de Abdullah (2022). Seguidamente, las muestras fueron deshidratadas mediante una serie de lavados con etanol a diferentes concentraciones (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %), cada uno durante 10 minutos, repitiendo el último lavado tres veces, según la técnica descrita por Gibbons y Geetha-Loganathan (2019), adaptada para este estudio. Posteriormente, las muestras se secaron en un desecador por punto crítico de dióxido de carbono (Bal-Tec CPD 030 Critical Point Dryer) y fueron recubiertas con oro siguiendo el método descrito por González-Ramírez *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Finalmente, las muestras se observaron mediante microscopía electrónica de barrido y se analizaron para identificar los cambios estructurales en el hongo más sensible al FLC.

#### **6.6. Determinación de hongos patógenos viables para el estudio**

Para determinar los hongos patógenos viables para los siguientes estudios, se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas y semillas de soya. Para la preparación de los inóculos los hongos *P. sojae*, *C. truncatum*, *Pythium sp.*, *R. solani* y *C. kikuchii* se cultivaron en cajas Petri con medio APD por 3 días a 28 °C. Para las pruebas de patogenicidad en semillas, se siguió el método descrito por Grijalba *et al.* (2017), con adaptaciones específicas. Se recolectaron discos de crecimiento fúngico y se colocaron en una superficie de papel filtro humedecido con agua estéril dentro de placas Petri. Sobre cada disco de hongo se colocó una semilla de soya previamente desinfectada con una solución de hipoclorito al 1.5 % durante 30 segundos. Las placas se almacenaron durante 7 días a 28 °C. Posteriormente, las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

semillas fueron desinfectadas nuevamente y se realizaron cortes en las raíces que presentaban posibles síntomas de infección. Los cortes de las raíces se colocaron en medio de APD con 200 µg/mL de ampicilina, y las placas se incubaron a 28 °C durante 2 días. Finalmente, se efectuaron cortes en el crecimiento fúngico observado en las placas, los cuales fueron transferidos a nuevas placas con medio de APD, también adicionado con 200 µg/mL de ampicilina, manteniendo la incubación a 28 °C durante 4 días. Las pruebas de patogenicidad en plantas se evaluaron observando los síntomas de infección de tejidos en plantas de soya de 21 días de crecimiento.

Para el cultivo de la planta, se desinfectaron las macetas con hipoclorito de sodio al 1.5 % y se llenaron con una mezcla tinalizada de tierra de Paraná y sustrato comercial en proporción 1:1, aproximadamente 200 g por maceta. En cada maceta se sembró una semilla de soya previamente desinfectada con hipoclorito al 1.5 % por 30 segundos. Tras un período de 21 días, las plantas fueron extraídas y desinfectadas. Luego, se colocaron en frascos estériles conteniendo agua estéril, a la cual se añadió el contenido fúngico de una placa Petri de cada hongo. Tras 7 días de incubación, se procedió a la observación de los síntomas presentes en las plantas. Para cada patógeno se utilizaron 4 plantas y se incluyeron también 4 plantas no infectadas como control.

Se realizaron comparaciones macroscópicas y microscópicas del crecimiento del cultivo fúngico obtenido en estos ensayos. Una semana después de la incubación, se prepararon portaobjetos a partir de las colonias puras de los hongos aislados. Estas preparaciones se usaron para observaciones microscópicas con un microscopio compuesto con un objetivo de 40X, para examinar las características morfológicas de los hongos la identificación se llevó a cabo mediante la comparación con imágenes y descripciones disponibles en la colección de microorganismos del laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad Estadual de Londrina, siguiendo la metodología descrita por Ttacca y Calderón (2016).

### **6.7. Porcentaje de inhibición**

Siguiendo la técnica descrita por Reverchon *et al.* (2020), se dispusieron discos de micelio de 5 mm de diámetro en el centro de cajas Petri con medio de APD. En un extremo de la placa se colocó un disco impregnado con FLC disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a diferentes concentraciones: 25, 50, 100, 200 y 400 µg/mL, mientras que en el otro extremo se colocó un disco con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se midió el crecimiento radial de los tratamientos con y sin FLC cada 24 h. Los porcentajes de inhibición del crecimiento fúngico se calcularon para cada tratamiento utilizando la siguiente fórmula: % inhibición =  $[(R - r) / R] \times 100$ , donde "R" representa el crecimiento radial en ausencia de FLC y "r" representa el crecimiento radial en presencia de FLC. La zona de inhibición se determinó midiendo en milímetros la zona sin crecimiento micelial del hongo. Para analizar los datos del porcentaje de inhibición, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, utilizando como variables independientes los patógenos y la concentración de FLC, con un nivel de significancia del 0.05. Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de Tukey para identificar los tratamientos con diferencias significativas. Ambas pruebas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (versión 8).

### **6.8. Concentración mínima inhibitoria**

Antes de determinar la concentración mínima inhibitoria de FLC, se realizaron pruebas para determinar la concentración a la que los solventes no inhiben el crecimiento de los patógenos. Estas pruebas consistieron en determinar la concentración mínima inhibitoria de los solventes metanol, cloroformo y dimetilsulfóxido. En placas de 24 pozos, se dispuso medio APD, en el cual se agregaron concentraciones de 3.5 %, 3 %, 2.5 %, 2 %, 1.5 % y 1 % de cada solvente. Posteriormente, se colocaron fragmentos de crecimiento micelial de 0.5 cm de cada hongo en los pozos. Cada experimento se realizó con dos repeticiones, además se prepararon controles de medio y controles de hongo. Transcurridos 3 días, se observaron las placas para evaluar el crecimiento fúngico y determinar la concentración adecuada de solvente que no inhibe el crecimiento de los patógenos.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de FLC, se utilizó el método de dilución siguiendo la técnica descrita por Kowalska-Krochmal y Dudek-Wicher (2021), adaptada a las características específicas del estudio. En placas de 24 pozos, se dispuso FLC diluida en 1.5 % de DMSO a concentraciones de 7.5 %, 3.75 %, 1.85 %, 0.9 %, 0.2 % y 0.05 %. Posteriormente, se añadieron los inóculos a los pozos. Para el inóculo de *R. solani*, se preparó cortando un cuadrado del crecimiento micelial de 0.5 centímetros. Por otro lado, para el inóculo de *Pythium sp*, se preparó una suspensión de 20 µL de oosporas ( $1 \times 10^6$  oosporas/mL). El crecimiento se determinó mediante su medición después de la inoculación durante 3 días a 28 °C. Los tratamientos de cada pozo se observan en la figura 12.

150 µg/mL FLC	75 µg/mL FLC	37 µg/mL FLC	18 µg/mL FLC	9 µg/mL FLC	4 µg/mL FLC
2 µg/mL FLC	1 µg/mL FLC	Control Medio	Control Medio	Control Hongo	Control Hongo
150 µg/mL FLC	75 µg/mL FLC	37 µg/mL FLC	18 µg/mL FLC	9 µg/mL FLC	4 µg/mL FLC
2 µg/mL FLC	1 µg/mL FLC	Control Medio	Control Medio	Control Hongo	Control Hongo

**Figura 12. Tratamientos para concentración mínima inhibitoria.**

Preparación de concentración mínima inhibitoria de FLC en placa de 24 pozos, se especifica la preparación de cada pozo.

### 6.9. Evaluación de efecto antifúngico de FLC en semillas infectadas

Antes de llevar a cabo el experimento, las semillas de soya fueron sometidas a un proceso de desinfección mediante tres lavados con hipoclorito de sodio al 1.5 %, seguido de cinco enjuagues con agua destilada estéril, siguiendo el procedimiento descrito por Prakash *et al.* (2015), con algunas adaptaciones menores. Se prepararon inóculos de *Pythium sp* utilizando 20 µL de oosporas ( $2 \times 10^4$  oosporas/mL) en solución salina (0.85 %), conforme al método descrito por Yacoub *et al.* (2016). Para los inóculos de *R. solani*, se colocaron 5 discos de crecimiento micelial (de 5 mm de diámetro) en solución salina (0.85 %), adaptando el protocolo de Porto *et al.* (2019) a las condiciones específicas del presente estudio. Para la

prueba se empleó un diseño completamente al azar con siete tratamientos, cada uno con cuatro repeticiones. La unidad experimental consistió en lotes de 10 semillas desinfectadas de soya. Cada tratamiento requirió 40 semillas, sumando 280 utilizadas en el estudio. El recubrimiento de las semillas se llevó a cabo mediante inmersión en una solución de alginato al 1 %. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

- T1 semillas de soya sin tratamiento
- T2 semillas de soya infectadas con *Pythium sp*
- T3 semillas de soya infectadas con *R. solani*.
- T4 semillas de soya con 9 µg/mL de FLC.
- T5 semillas de soya con 18 µg/mL de FLC.
- T6 semillas de soya con 9 µg/ mL de FLC infectadas con *Pythium sp*
- T7 semillas de soya con 18 µg/mL de FLC infectadas con *R. solani*

El proceso se llevó a cabo bajo condiciones de asepsia, utilizando una campana de flujo laminar para prevenir la contaminación. Después de un periodo de 30 minutos, se colocaron 10 semillas en cada placa Petri de 200 mm de diámetro, previamente preparadas con un papel filtro humedecido con agua estéril. Posteriormente, se añadieron 25 µL de inoculante según el tratamiento correspondiente, y las placas se sellaron herméticamente con parafilm estéril. Finalmente, las placas se incubaron a 28 °C durante 4 días, siguiendo el protocolo adaptado de Da Ros Zanette *et al.* (2018) a las condiciones específicas del presente estudio.

#### **6.10. Evaluación de efecto antifúngico de FLC en semillas modificado**

El experimento se llevó a cabo bajo condiciones similares al anterior. Sin embargo, en este caso, la infección de las semillas de soya se promovió mediante el tiempo de contacto con los patógenos. Para ello, se colocaron semillas desinfectadas en placas Petri junto con los patógenos *R. solani* y *Pythium sp.* durante períodos de 6, 12 y 24 horas, respectivamente. Posteriormente, estas semillas fueron transferidas a placas Petri de 200 mm de diámetro, selladas y luego incubadas a 28 °C durante 7 días. Para este experimento se prepararon 600 semillas de soya.

Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

- Tra 1: Semillas control
- Tra 2: Semillas con 9 µg de FLC
- Tra 3: Semillas con 18 µg de FLC
- Tra 4: Semillas con 9 µg de FLC infectadas con *Pythium* sp durante 6 horas
- Tra 5: Semillas con 9 µg de FLC infectadas con *Pythium* sp durante 12 horas
- Tra 6: Semillas con 9 µg de FLC infectadas con *Pythium* sp durante 24 horas
- Tra 7: Semillas con 18 µg de FLC infectadas con *R. solani* durante 6 horas
- Tra 8: Semillas con 18 µg de FLC infectadas con *R. solani* durante 12 horas
- Tra 9: Semillas con 18 µg de FLC infectadas con *R. solani* durante 24 horas
- Tra 10: Semillas infectadas con *Pythium* sp durante 6 horas
- Tra 11: Semillas infectadas con *Pythium* sp durante 12 horas
- Tra 12: Semillas infectadas con *Pythium* sp durante 24 horas
- Tra 13: Semillas infectadas con *R. solani* durante 6 horas
- Tra 14: Semillas infectadas con *R. solani* durante 12 horas
- Tra 15: Semillas infectadas con *R. solani* durante 24 horas

Este procedimiento se realizó adaptando la metodología descrita a las condiciones específicas de este estudio siguiendo el planteamiento propuesto por Castillo *et al.* (2022).

Para evaluar el efecto antifúngico de los tratamientos, se determinó la incidencia de patógenos en las semillas de soya en los diferentes tratamientos mediante el cálculo del porcentaje de incidencia (PI) empleando la fórmula:

$$(Si)/ Ts \times 100$$

PI representa el porcentaje de incidencia, Ts el total de semillas y Si las semillas infectadas, en la tabla 4 se muestran los síntomas de infección a considerar de los patógenos.

**Tabla 4. Síntomas de infección de semillas de los patógenos de soya.**

Patógeno	Síntoma	Referencia
<i>Pythium</i> sp.	Necrosis	Grijalba y Ridao (2017).
<i>R. solani</i>	Menor crecimiento	Valle y Torres (2018)
<i>Pythium</i> sp.	Pudrición de semilla	Arora <i>et al.</i> (2021).
<i>Pythium</i> sp	Tejidos vasculares oscuros	Van Der Heyden <i>et al.</i> (2019).
<i>R. solani</i>	Necrosis en raíces o pequeñas lesiones marrones	Ajayi-Oyetunde y Bradley (2017).
<i>Pythium</i> sp	Lesiones marrones en las puntas de las raíces	Raudales <i>et al.</i> (2016).
<i>Pythium</i> sp	Pudrición de raíz	Wu <i>et al.</i> (2020).
<i>Pythium</i> sp	Raíz principal descolorida, sin raíces secundarias.	Van Der Heyden <i>et al.</i> (2019).

Asimismo, se calculó el porcentaje de germinación (PG) utilizando la siguiente fórmula:

$$(Sg / Ts) \times 100$$

PG es el porcentaje de germinación, Sg el número de semillas germinadas y Ts el número total de semillas siguiendo el procedimiento descrito por Da Ros Zanette *et al.* (2018).

#### **6.11. Análisis estadísticos**

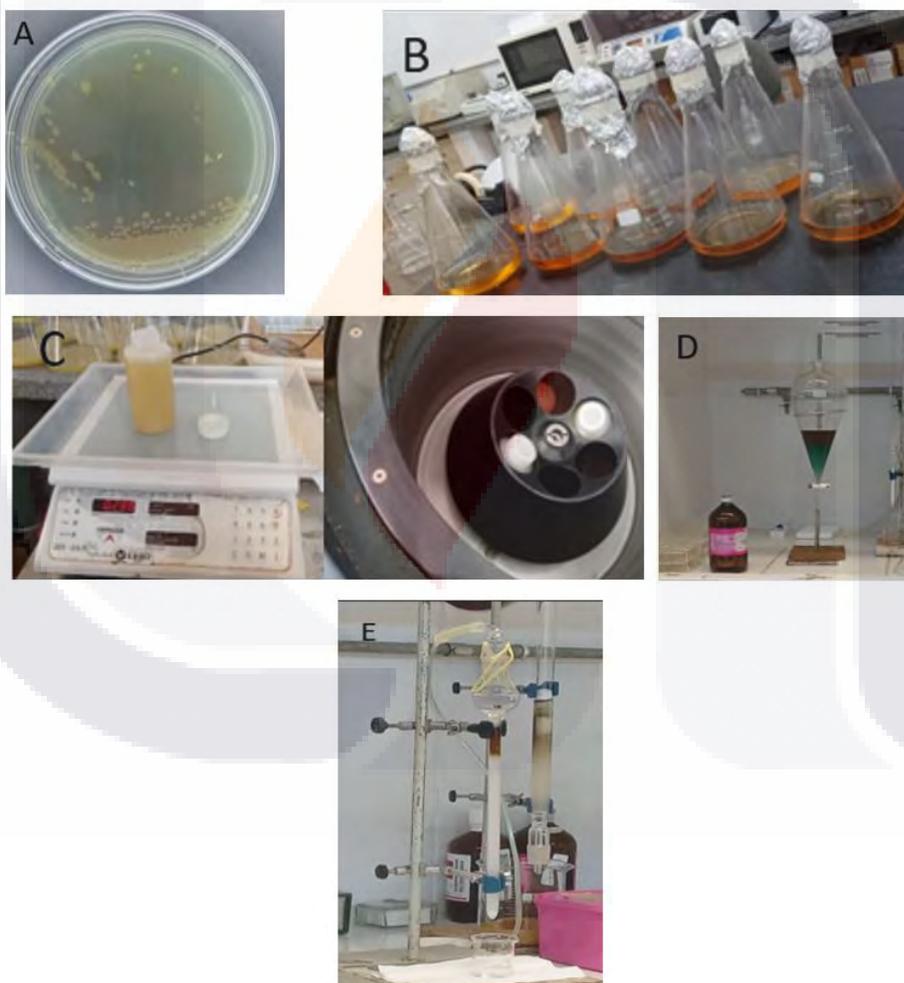
Se empleó el software GraphPad Prism versión 8 para realizar el análisis estadístico de los datos. Los datos registrados fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey con significancia de 0.05.

### **7. RESULTADOS**

#### **7.1. Producción y purificación de FLC**

Para la producción de FLC, se reactivó la bacteria *P. aeruginosa* cepa LV de su estado de crioconservación. En medio de agar nutritivo, se observó el crecimiento de pequeñas colonias redondas con bordes ondulados, de color amarillo verdoso, superficie lisa y consistencia mucoide (figura 13A). La obtención de FLC se realizó mediante fermentación

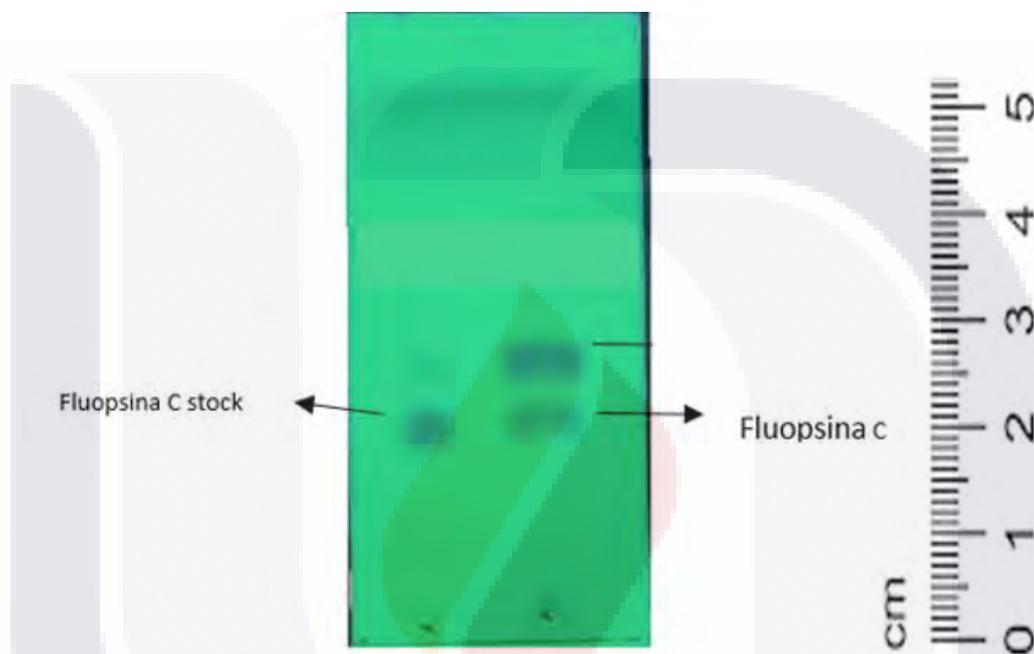
líquida en matraces Erlenmeyer de un litro. Después de una incubación a 28 °C con agitación constante durante 10 días, se observó un cambio en la turbidez y el color del medio como resultado de la fermentación, como se muestra en la figura 13B. El medio fue centrifugado para separar las bacterias del sobrenadante, como se muestra en la figura 14C. Posteriormente, el sobrenadante se concentró y se resuspendió en agua estéril. Para la extracción de FLC, se preparó el medio concentrado con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, tal como se observa en la figura 13D. La coloración azul se atribuye a la presencia de FLC. Finalmente, FLC se purificó mediante cromatografía en columna abierta.



**Figura 13. Fases de proceso de obtención de fluopsina C.**

A) Cultivo de *P. aeruginosa* LV. B) Preparación para fermentación bacteriana. C) Proceso de separación de células bacterianas. D) Preparación para extracción de metabolitos. E) Separación de metabolitos secundarios por Cromatografía en columna abierta.

Para monitorear la presencia de FLC, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina. Al detectar la presencia de FLC, se calculó su factor de retención ( $R_f$ ), el cual fue de 0.4 (figura 14).



**Figura 14. Cromatografía en capa fina de FLC.**

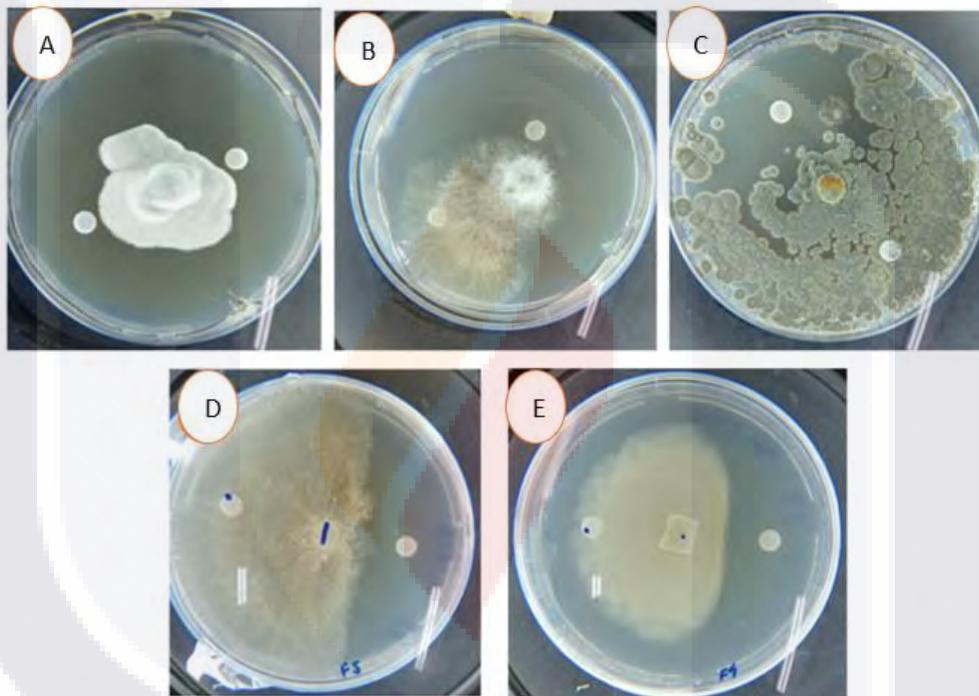
La cromatografía en capa fina, visualizada bajo luz UV a longitud de onda de 254 nm, reveló la presencia de FLC y fenazina. Se determinó un factor de retención de 0.4 para FLC.

Las fracciones obtenidas utilizando una fase móvil de diclorometano y éter etílico en una proporción de 90:10 (v/v) fueron almacenadas para experimentos posteriores.

## **7.2. Observación del efecto antifúngico de FLC**

Se llevó a cabo la prueba de difusión en disco con confrontación directa de los hongos *P. sojae*, *C. truncatum*, *Pythium* sp, *R. solani* y *C. kikuchii*, expuestos a FLC como se muestra en la figura 15. En la figura 15A se observa el crecimiento de *C. kikuchii*, que presenta un micelio denso de color blanco que se desarrolla de manera radial. La figura 15B ilustra el crecimiento de *P. sojae*, cuyo micelio blanco se extiende y se mezcla con tonos gris claro o

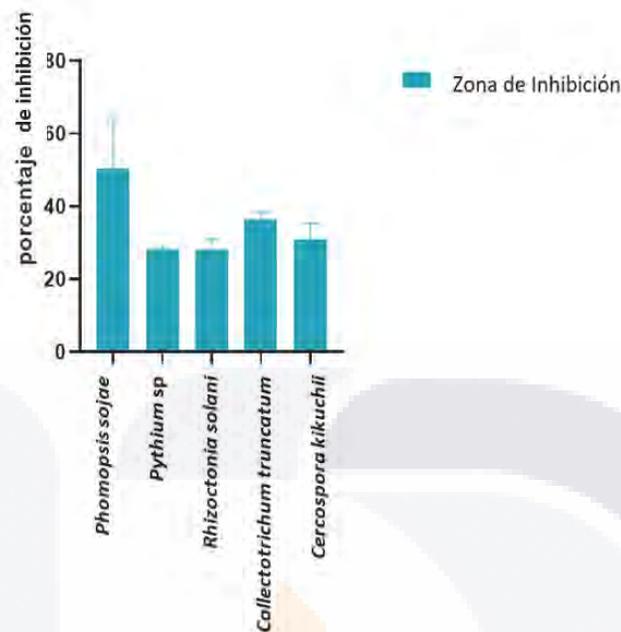
marrón, formando una apariencia algodonosa. En la figura 15C se muestra el crecimiento de *C. truncatum*, caracterizado por un micelio filamentososo y poroso de color verde oscuro, similar al musgo, con manchas anaranjadas que se asemejan al óxido en la parte inferior. La figura 15D representa el crecimiento de *R. solani*, cuyo micelio marrón claro está formado por una red densa y algodonosa con una textura sedosa, mostrando variaciones en tonos marrones claros y oscuros. Por último, la figura 15E muestra el crecimiento de *Pythium sp.*, que presenta un color crema y una textura algodonosa.



**Figura 15. Inhibición de hongos patógenos.**

Ensayo de confrontación directa de los patógenos *C. kikuchii* (A), *P. sojae*. (B), *C. truncatum* (C), *R. solani* (D) y *Pythium sp* (D). *P. sojae* (E) exhibió un crecimiento notablemente menor en comparación con los otros microorganismos al ser expuesto a la FLC.

La capacidad antifúngica de la FLC sobre *P. sojae* mostró el mayor porcentaje de inhibición, alcanzando hasta un 60 % de inhibición del crecimiento micelial (figura 16).

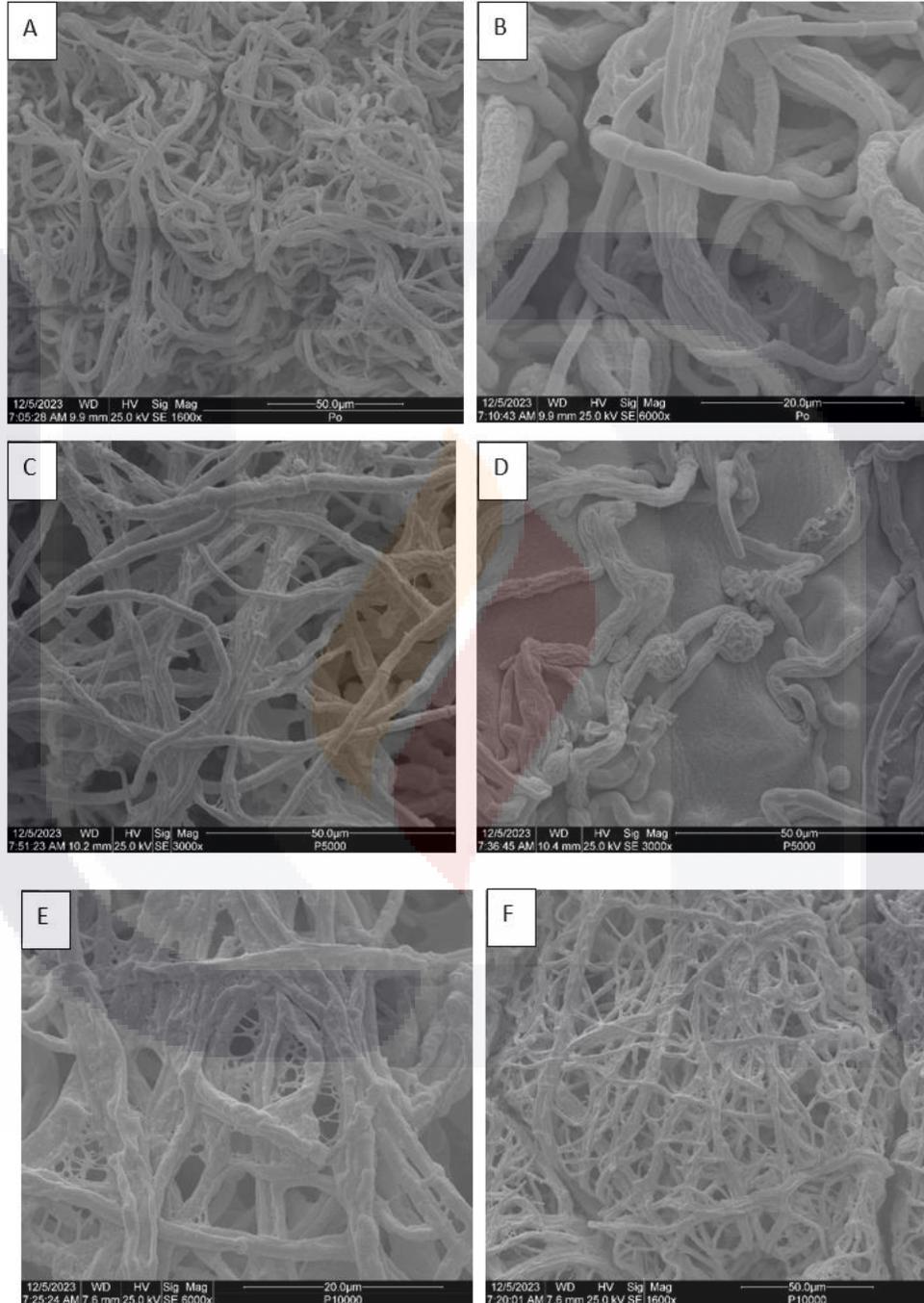


**Figura 16. Porcentaje de inhibición de los hongos expuestos a FLC a concentración de 1 mg/mL.**

La FLC demostró capacidad para inhibir el crecimiento micelial de los hongos *P. sojae*. (60 %), *C. truncatum* (38 %), *C. kikuchii* (35 %), *R. solani* (34 %) y *Pythium sp* (32 %). Las barras de error indican la desviación estándar (n=3).

El hongo *P. sojae* presentó mayor sensibilidad a la FLC y fue seleccionado para su análisis en microscopía electrónica de barrido. Mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB), se pudo observar que en concentraciones de 5 y 10 mg/mL de FLC se produjeron deformaciones en las estructuras de las hifas, presentando agrandamientos irregulares, formación de biopelícula y la aparición de grandes vesículas similares a tumores, así como la fuga citoplasmática en los micelios, en comparación con el grupo control. Este último mostró hifas sin deformaciones, así como ausencia de biopelícula y vesículas como se presenta en la figura 17. En el grupo de control (figura17A y figura17B), se observaron las hifas características del hongo sin alteraciones aparentes. En el grupo tratado con 5 mg/mL de FLC (figura 17C y figura 17D), la densidad micelial fue similar al control, pero se evidenció la aparición de vesículas deshidratadas y una ligera formación de biopelícula. Por otro lado, en el grupo tratado con 10 mg/mL µg, se observó una fuga del contenido de membrana y

una abundante formación de biopelícula, además de hifas completamente deformadas y más alargadas de lo normal (figura 17E y figura 17F).

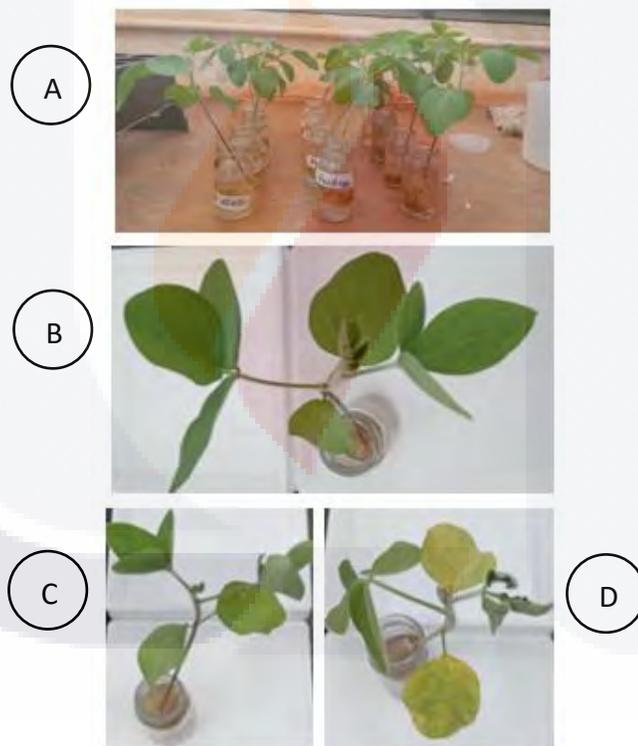


**Figura 17. Efecto antifúngico de FLC.**

Microscopia electrónica de barrido del efecto antifúngico de FLC en *P. sojae*.

### 7.3. Determinación de hongos patógenos viables para el estudio

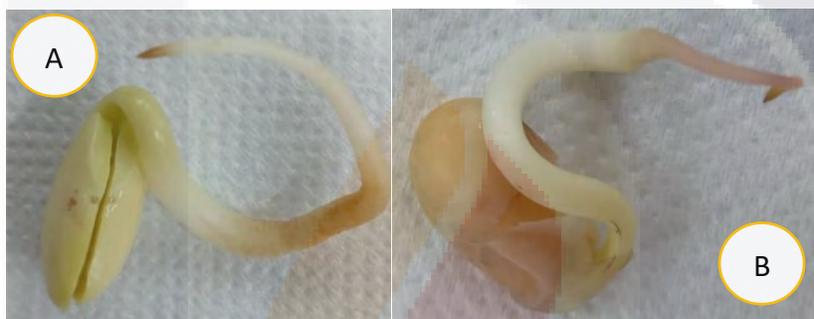
En la figura 18, se presentan las etapas del proceso de patogenicidad de los hongos en estudio. Inicialmente, se infectaron plantas de soya con *P. sojae*, *C. truncatum*, *Pythium sp*, *R. solani* y *C. kikuchii* (figura 18A). Se seleccionaron las plantas con síntomas de infección como disminución del vigor, clorosis foliar, marchitamiento descendente y enroscamiento de las hojas, en la figura 18B se observan plantas de soya sin infección de los hongos patógenos, sus hojas son verdes sin presencia de síntomas, en la figura 18C se observan síntomas de infección como puntos amarillos en las hojas y marchitamiento de hojas en la planta infectada con *R. solani*. En la figura 18D se observan síntomas de marchitamiento de hojas y clorosis en la planta infectada con *Pythium sp*.



**Figura 18. Plantas de soya con síntomas de infección.**

Pruebas de patogenicidad en plantas de soya (A), las plantas de soya fueron cultivadas e infectadas por los hongos patógenos. Los síntomas se determinaron por control visual de cambios observados (B-C, D) al comparar plantas control.

Por otra parte, se infectaron semillas de soya con los hongos *P. sojae*, *C. truncatum*, *Pythium sp.*, *R. solani* y *C. kikuchii*. Después de 7 días de incubación, se recolectaron las semillas de soya infectadas que presentaron síntomas como tejido necrosado, manchas moradas, puntas de raíces negras, así como pudrición de raíces y semillas (figura 19). En la figura 19A, se observan partes con lesiones marrones en la raíz de la semilla indicando daño en el tejido radicular y punta negra como síntomas característicos de semillas infectadas con *Pythium sp.* En la figura 19B los síntomas de infección por *R. solani* son manchas marrones claro y punta negra de la raíz así como color marron claro del cuello que puede indicar el inicio de pudrición del cuello.

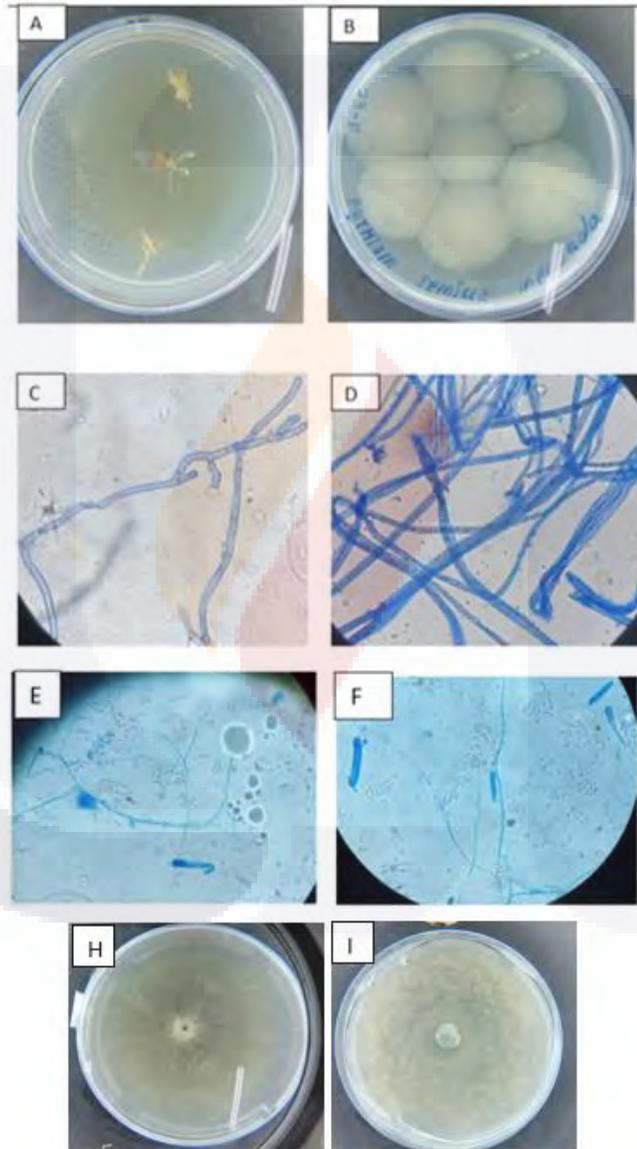


**Figura 19. Semillas con síntomas de infección.**

En las semillas de soya con síntomas de infección fúngica, se pueden apreciar zonas necrosadas, así como pudrición de la semilla.

Una vez recolectadas las plantas y semillas que presentaron síntomas de infección fúngica, se prepararon las raíces y se desinfectaron antes de cultivarlos en placas de Petri con medio de agar papa dextrosa enriquecido con ampicilina. Después de 4 días de incubación, se recolectó el crecimiento micelial de las placas y se cultivó nuevamente para obtener microorganismos puros según los postulados de Koch. Posteriormente, se observó su crecimiento bajo un microscopio para comparar sus características con los hongos de referencia del laboratorio. En la figura 20A, se observan raíces infectadas por *R. solani* en medio APD. A partir de estas raíces infectadas, se desarrolló micelio, que fue recolectado para cultivarlo en placas de APG. La figura 20B muestra el crecimiento de micelio originado de *Pythium sp.* a partir de fragmentos de raíces infectadas por el patógeno. De estas dos figuras, se recolectaron muestras para su observación al microscopio a una magnificación

de 40x, donde se identificaron hifas (figura20C) y esporangios (figura20D). También se pudieron visualizar estructuras similares a zoosporangios (figura20E) y zoosporas (figura20F). Finalmente, el micelio observado en las placas con raíces fue cultivado nuevamente para obtener colonias puras de *R. solani* (figura20H) y *Pythium sp* (figura20I), las cuales presentan sus características distintivas.



**Figura 20. Hongos patógenos aislados de tejidos infectados.**

En la imagen se muestra el proceso de identificación de patógenos aislados.

#### 7.4. Porcentaje de inhibición de los patógenos *R. solani* y *Pythium sp*

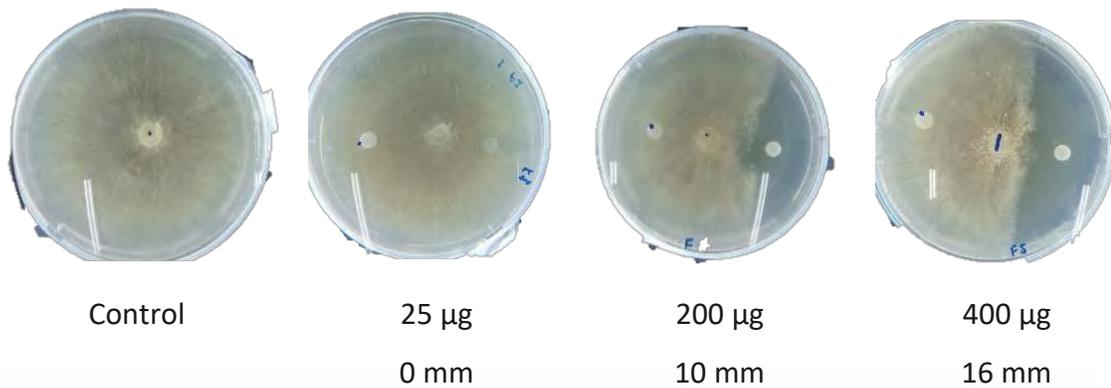
FLC inhibió el crecimiento de *R. solani* y *Pythium sp* estudiados como se observa en la tabla 5. En el caso de *R. solani*, el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial varió entre un 54 % y un 60 %. Por otro lado, *Pythium sp* mostró una inhibición del 38 % al 41 %. Los tratamientos con diferentes concentraciones de FLC presentaron diferencias significativas, evidenciando que a mayor concentración de FLC, mayor es la inhibición del crecimiento micelial de ambos patógenos.

**Tabla 5. Porcentaje de inhibición de *R. solani* y *Pythium sp* con FLC.**

Concentración FLC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Porcentaje de inhibición	
	<i>R. solani</i>	<i>Pythium sp</i>
0	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
25	9 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>
50	12 <sup>bc</sup>	15 <sup>b</sup>
100	20 <sup>c</sup>	19 <sup>b</sup>
200	35 <sup>d</sup>	29 <sup>c</sup>
400	60 <sup>e</sup>	41 <sup>d</sup>

Las diferencias significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por la prueba Tukey están representadas por letras diferentes.

En la Figura 21, se muestra la acción antifúngica de FLC a concentraciones de 25, 200 y 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra el patógeno *R. solani*. Se observa que el antifúngico generó una zona de inhibición de hasta 16 milímetros.



**Figura 21. Zona de inhibición de *R. solani*.**

Inhibición de *R. solani* a diferentes concentraciones de FLC.

En la Figura 22, se muestra la zona de inhibición del patógeno *Pythium* sp expuesto a concentraciones de 25, 200 y 400 µg/mL. Se observa que el antifúngico generó una zona de inhibición de hasta 24 milímetros.



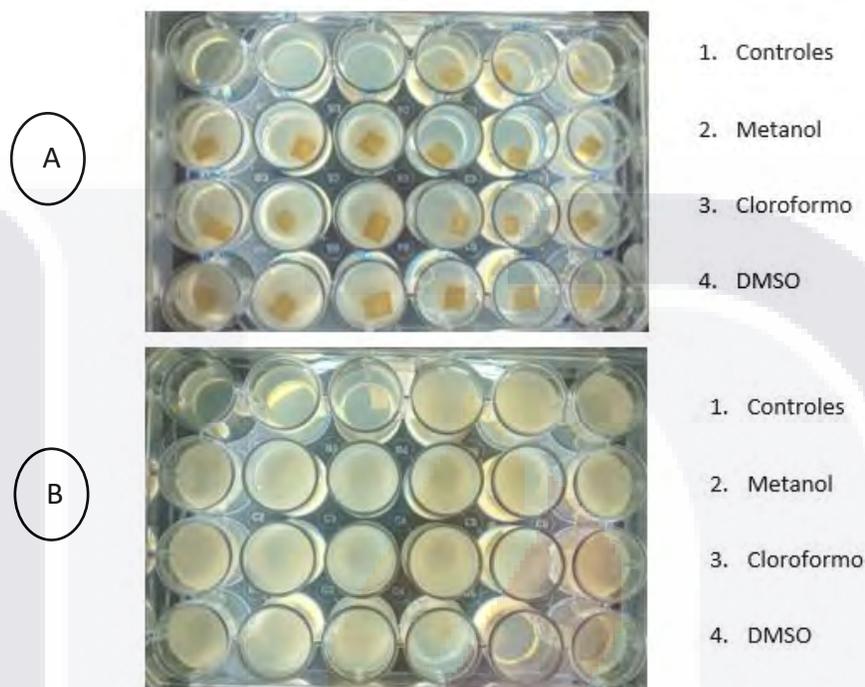
**Figura 22. Zona de inhibición de *Pythium* sp.**

Zona de inhibición a diferentes concentraciones de FLC.

### 7.5. Concentración mínima inhibitoria de *R. solani* y *Pythium* sp

Para seleccionar la concentración adecuada de solvente para disolver FLC sin inhibir el crecimiento de los hongos patógenos, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los solventes metanol, cloroformo y DMSO como se muestra en la figura 23, en medios líquidos y sólidos. En la figura 23A se observa la concentración mínima inhibitoria de los

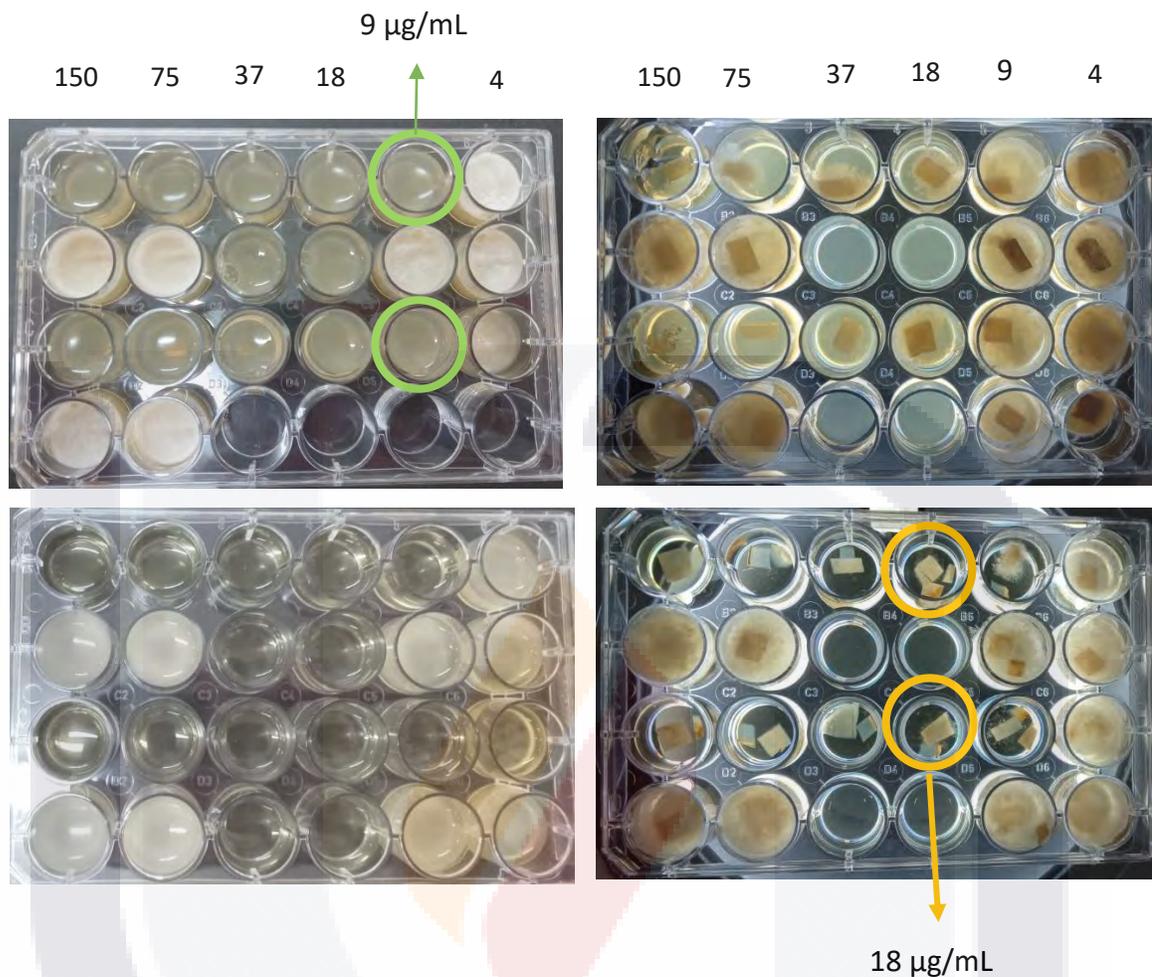
solventes en *R. solani*, en todos los solventes se observó que a 1.5 % no se inhibe su crecimiento, esto se observó también en *Pythium sp* en la figura 23B. Por lo tanto, esta concentración fue seleccionada para estudios posteriores.



**Figura 23. Concentración mínima inhibitoria de solventes.**

Los solventes metanol, cloroformo y DMSO se añadieron a concentraciones de 3.5 %, 3 %, 2.5 %, 2 %, 1.5 % y 1 % en medios de agar papa dextrosa, y se inocularon con *R. solani*. (A) y *Pythium sp*. (B). A la concentración del 1.5 %, ninguno de los solventes inhibió el crecimiento de los patógenos.

Posteriormente, FLC fue disuelta en DMSO al 1.5 % mostró actividad antifúngica frente a *R. solani* y *Pythium sp* a las concentraciones evaluadas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 18 µg/mL para *R. solani* y de 9 µg/mL para *Pythium sp*, como se muestra en la figura 24, siguiendo los tratamientos para concentración mínima inhibitoria expuestos en la figura 13.



**Figura 24. Concentración mínima inhibitoria.**

Prueba de concentración mínima inhibitoria por dilución en pozos, siguiendo los tratamientos planteados en la figura 13, se determinó la concentración mínima inhibitoria a concentración de 9  $\mu\text{g/mL}$  para *Pythium* sp donde se muestra que a esta concentración no afecta el crecimiento del patógeno, mientras que de *R. solani* la concentración mínima inhibitoria fue de 18  $\mu\text{g/mL}$ .

### **7.6. Evaluación de efecto antifúngico de FLC en semillas infectadas**

Para evaluar el efecto antifúngico de la FLC contra los patógenos de la soya *R. solani* y *Pythium* sp, se infectaron semillas de soya y se les aplicó un tratamiento con FLC a concentraciones mínimas inhibitorias. Estas concentraciones fueron de 18  $\mu\text{g/mL}$  para *R. solani* y 9  $\mu\text{g/mL}$  para *Pythium* sp. Para evaluar la fitotoxicidad de FLC se prepararon tratamientos con semillas expuestas a las mismas concentraciones utilizadas para inhibir

los patógenos. Las semillas infectadas con *R. solani* y *Pythium* sp exhibieron una mayor incidencia de síntomas como pudrición de semillas, tejidos necróticos y manchas marrones en las raíces. Se observó un crecimiento más pronunciado de las raíces en las semillas tratadas con *R. solani* y expuestas a 18 µg/mL de FLC. Además, se notó un menor desarrollo de raíces en las semillas tratadas con la misma concentración de FLC. Estos resultados indican que la FLC tiene un efecto antifúngico notable contra *R. solani* y *Pythium* sp.

En la figura 25A se muestra la disposición de las semillas en la placa Petri, tal como se prepararon para todos los tratamientos del experimento. Después de 4 días, las semillas fueron retiradas de las placas Petri y dispuestas como se observa en las figuras 25B, 25C y 25D.

En la figura 25B, se observan las semillas infectadas con *Pythium* sp, presentando un porcentaje de germinación del 70 %, raíces necrosadas y lesiones marrones. La figura 25C muestra las semillas infectadas con *R. solani*, con un porcentaje de germinación del 50 %, raíces torcidas, manchas marrones y áreas necróticas. En contraste, la figura 25D presenta semillas de soya infectadas con *R. solani* tratadas con 18 µg/mL, donde se observa un mayor porcentaje de germinación (100 %) y un mayor crecimiento de las raíces en comparación con el tratamiento de la figura 25C.



**Figura 25. Evaluación del efecto antifúngico de FLC en semillas de soja infectadas con *R. solani* y *Pythium sp.*** Evaluación visual del efecto antifúngico de FLC en semillas. Las semillas del estudio fueron colocadas en cajas Petri como se observa en la imagen y analizadas mediante observación, se muestran síntomas de infección como pudrición de semilla y manchas marrones necrosadas en el tratamiento con *Pythium sp.*(B). En el tratamiento con *R. solani* se presentan síntomas de infección como pudrición de semillas y tejido necroso (C).

En la Tabla 6 se presenta el efecto de la FLC en semillas de soya. Se observó que los tratamientos con semillas expuestas a FLC no mostraron diferencias significativas, lo que sugiere que la FLC no presentó fitotoxicidad en las semillas de soya. Sin embargo, cuando las semillas fueron infectadas con patógenos, se observó una disminución en el porcentaje de germinación, llegando a ser hasta un 30 % menor con *R. solani* y un 28 % con *Pythium sp.* Las semillas infectadas con *Pythium sp.* y tratadas con FLC incrementaron su porcentaje de germinación en un 19 % en comparación con las semillas infectadas sin tratamiento con FLC. Además, las semillas tratadas con FLC e infectadas con *R. solani* aumentaron su longitud de raíz hasta en 1 cm a comparación de las semillas infectadas sin tratamiento de FLC.

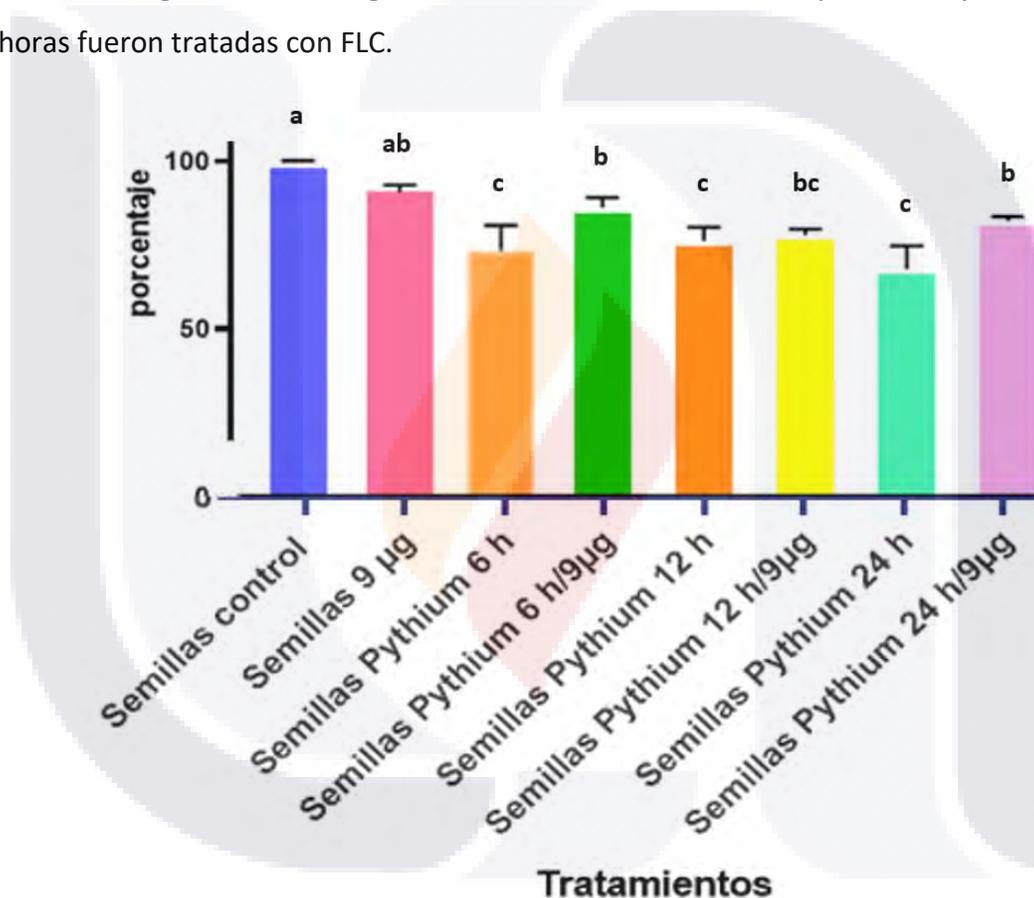
**Tabla 6.** Efecto antifúngico de FLC.

Tratamiento	% Germinación	Longitud Raíz (cm)
Semillas de soya sin tratamiento	98 <sup>a</sup>	5.6 <sup>a</sup>
Semillas de soya infectadas con <i>Pythium sp</i>	70 <sup>b</sup>	4.2 <sup>b</sup>
Semillas de soya infectadas con <i>R. solani</i> .	68 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>
Semillas de soya con 9 µg/mL de FLC.	91 <sup>a</sup>	4.9 <sup>a</sup>
Semillas de soya con 18 µg/mL de FLC.	89 <sup>a</sup>	4.7 <sup>a</sup>
Semillas de soya con 9 µg/ mL de FLC infectadas con <i>Pythium sp</i>	89 <sup>a</sup>	3.7 <sup>c</sup>
Semillas de soya con 18 µg/mL de FLC infectadas con <i>R. solani</i>	76 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>

Las diferencias significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por la prueba Tukey estan representadas por letras diferentes.

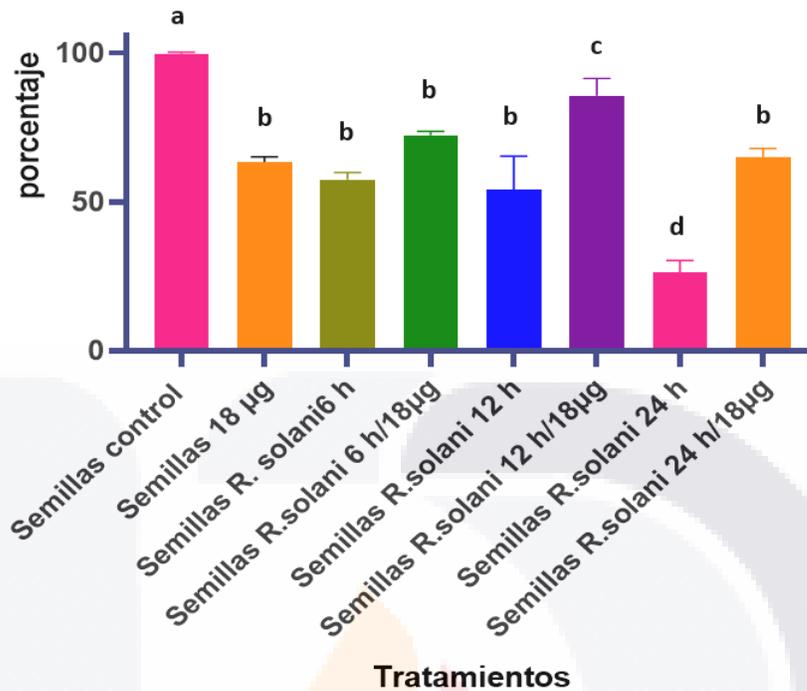
Para evaluar con mayor precisión la actividad de la FLC en semillas de soya, se realizó un experimento adicional modificando el tiempo de exposición de las semillas a los patógenos. Se expusieron las semillas tratadas con la concentración mínima inhibitoria de FLC para cada patógeno a *R. solani* y *Pythium sp* durante 6, 12 y 24 h antes de colocarlas en cajas Petri para su observación. Posteriormente, se evaluaron las características de las semillas, incluyendo el porcentaje de incidencia de enfermedad, la longitud de la raíz y el porcentaje de germinación.

El porcentaje de germinación de las semillas control alcanzó el 100 %, como se muestra en la Figura 26. Los tratamientos con semillas expuestas a 9 µg/mL de FLC lograron hasta un 89 % de germinación. Asimismo, en la Figura 26 se observa que las semillas expuestas al patógeno *Pythium sp.* durante 24 h redujeron su germinación a un 65 %. Sin embargo, en los tratamientos donde las semillas fueron expuestas a *Pythium sp.* durante 24 h y tratadas con FLC, el porcentaje de germinación aumentó hasta un 38 %. Del mismo modo, se observó un aumento significativo en la germinación cuando las semillas expuestas a *Pythium sp.* por 6 horas fueron tratadas con FLC.



**Figura 26. Germinación semillas de soya infectadas con *Pythium sp* tratadas con FLC.** Porcentaje de germinación de semillas de soya tratadas con 9 µg/ml de FLC expuestas a diferentes horas al patógeno *Pythium sp.* Las diferencias significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por la prueba Tukey están representadas por letras diferentes.

En la Figura 27 se observó una disminución del 38 % en el porcentaje de germinación cuando las semillas fueron tratadas con 18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FLC, lo que sugiere una posible toxicidad del compuesto. Además, la misma figura muestra una reducción de hasta un 77 % en la germinación de semillas expuestas a *R. solani* durante 24 h debido a la infección. Sin embargo, en los tratamientos donde las semillas fueron expuestas a *R. solani* durante 12 h y luego tratadas con 18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FLC, se observó un aumento significativo en el porcentaje de germinación en comparación con las semillas infectadas que no recibieron tratamiento con FLC. Un patrón similar se observó en las semillas tratadas con 18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FLC, donde el porcentaje de germinación también aumentó al ser expuestas a *R. solani* durante 12 h. Estos resultados refuerzan la teoría de que la FLC activa algún mecanismo de defensa en las semillas contra los patógenos. Por otro lado, las semillas expuestas durante 24 h a *R. solani* y tratadas con FLC mostraron un aumento en el porcentaje de germinación de hasta un 29 % en comparación con aquellas no tratadas con FLC y expuestas al patógeno por el mismo tiempo.



**Figura 27 Germinación semillas de soja infectadas con *R. solani* tratadas con FLC.**

Porcentaje de germinación de semillas de soja tratadas con 18 µg/ml de FLC expuestas a diferentes horas al patógeno *R. solani*. Las diferencias significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por la prueba Tukey están representadas por letras diferentes.

En la Figura 28 se presentan semillas infectadas tratadas con FLC. En los tratamientos con semillas infectadas con *R. solani*, se observaron síntomas como pudrición y lesiones marrones en las raíces. Estos síntomas aumentaron su incidencia con tiempos de exposición más prolongados al patógeno, como se muestra en la Figura 28A. En la Figura 28B se observa la incidencia de síntomas de infección por *R. solani* en semillas tratadas con FLC como necrosis, menor crecimiento de raíces, pudrición de raíces y semillas, tejidos vasculares oscuros y lesiones marrones en las raíces expuestas al patógeno por 24 h; en comparación con la Figura 28A, se observa un mayor crecimiento de la raíz después de medir los centímetros de crecimiento de raíces de las semillas de los tratamientos. En los tratamientos expuestos por 12 horas a *R. solani* y tratados con FLC (Figura 28C), se observó

un notable crecimiento de raíces (mas centímetros de crecimiento), una disminución de los síntomas de infección (menor aparición de semillas con síntomas de infección) y la aparición de raíces secundarias.

En los tratamientos expuestos por 24 h a *Pythium sp* se observaron síntomas como pudrición de semillas, raíces decoloradas y lesiones marrones en las puntas de las raíces (Figura 28E). Sin embargo, en las semillas expuestas por el mismo periodo, pero tratadas con FLC, se observó un mayor crecimiento de raíces y menos síntomas de infección (Figura 28D). En los tratamientos con semillas expuestas a 12 horas a *Pythium sp* (Figura 28F), se observó una menor incidencia de síntomas (menos semillas infectadas), aunque también un menor crecimiento de raíces, con lesiones marrones y enroscamiento de las raíces. Estos resultados indican que la FLC puede mitigar algunos de los efectos negativos de los patógenos en las semillas de soya, mejorando el crecimiento de las raíces y reduciendo los síntomas de infección, especialmente con tiempos de exposición moderados.



**Figura 28. Semillas de soya infectadas tratadas con FLC.** Análisis Visual de los Tratamientos con FLC: Evaluación de presencia de síntomas de infección. Se observa mayor incidencia de síntomas en tratamientos sin FLC.

En la Figura 29 se presentan síntomas de infección como pudrición de semillas, raíces con heridas marrones (figura29A y figura29B), puntas de raíces negras (figura29E) o violetas (figura29C) observados en semillas infectadas con *R. solani* y *Pythium sp.* La presencia de síntomas disminuyó en todos los tratamientos con FLC en comparación con las semillas infectadas sin tratamiento, según se determinó por control visual.



**Figura 29. Síntomas de infección en semillas.** Se observan síntomas como lesiones marrones y crecimiento de micelio (A-E) en semillas infectadas por *R. solani*. Se observa lesiones negras en las raíces, así como tejido necroso en semillas infectadas con *Pythium sp.*

En la Tabla 7 se observó que los tratamientos con semillas de soya expuestas a *Pythium sp* durante 6 y 12 h, pero tratadas con FLC, mostraron menos síntomas de infección. La incidencia de síntomas disminuyó hasta un 28 % en semillas expuestas por 6 h y hasta un 43 % en semillas expuestas por 12 h calculado por la formula 1. Además, se observó que las semillas expuestas durante 12 y 24 h a *R. solani* y tratadas con FLC presentaron una reducción en la incidencia de infección, con disminuciones de hasta un 18 % en 12 h y un 15 % en 24 h.

**Tabla 7.** Porcentaje de incidencia de tratamientos de semillas expuestas a patógenos.

Tratamiento	% incidencia
Semillas con 9 µg de FLC infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 6 horas	17 <sup>a</sup>
Semillas infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 6 horas	45 <sup>b</sup>
Semillas con 9 µg de FLC infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 12 horas	18 <sup>a</sup>
Semillas infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 12 horas	61 <sup>c</sup>
Semillas con 9 µg de FLC infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 24 horas	71 <sup>d</sup>
Semillas infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 24 horas	78 <sup>d</sup>
Semillas con 18 µg de FLC infectadas con <i>R. solani</i> durante 6 horas	25 <sup>ae</sup>
Semillas infectadas con <i>R. solani</i> durante 6 horas	34 <sup>e</sup>
Semillas con 18 µg de FLC infectadas con <i>R. solani</i> durante 12 horas	44 <sup>b</sup>
Semillas infectadas con <i>R. solani</i> durante 12 horas	62 <sup>c</sup>
Semillas con 18 µg de FLC infectadas con <i>R. solani</i> durante 24 horas	73 <sup>d</sup>
Semillas infectadas con <i>R. solani</i> durante 24 horas	88 <sup>f</sup>

Las diferencias significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por la prueba Tukey estan representadas por letras diferentes.

El análisis revela que existe un mayor porcentaje de incidencia cuando las semillas se exponen durante un tiempo prolongado a los patógenos, lo que sugiere su infección. En la Tabla 8, se detallan las mediciones de longitud de raíz en centímetros. Se observó que en semillas tratadas con FLC a una concentración de 9 µg/mL, la longitud de la raíz aumentó significativamente hasta 1.2 centímetros. Además, en los tratamientos con semillas expuestas durante 6 y 12 horas a *Pythium sp* y tratadas con FLC, la raíz creció en comparación con las semillas expuestas el mismo tiempo, pero no tratadas, alcanzando

hasta 1.2 cm en semillas expuestas por 6 horas a *Pythium sp* y tratadas con 9 µg/mL de FLC. Las semillas tratadas con FLC y expuestas por 12 horas a *Pythium sp*. crecieron 1 centímetro. En los tratamientos expuestos a *R. solani* por 12 y 24 horas y tratadas con FLC, la raíz creció hasta 2 centímetros en semillas expuestas por 12 horas y tratadas con FLC, mientras que las semillas expuestas por 24 h y tratadas con FLC crecieron hasta 2.2 cm en comparación con las semillas no tratadas con 18 µg/mL de FLC.

**Tabla 8.** Efecto antifúngico de FLC a diferentes tiempos de exposición al patógeno.

Tratamiento	Longitud Raíz (cm)
Semillas control	4.8 <sup>a</sup>
Semillas con 9 µg de FLC	6 <sup>b</sup>
Semillas con 18 µg de FLC	3 <sup>c</sup>
Semillas con 9 µg de FLC infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 6 horas	5.8 <sup>bd</sup>
Semillas infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 6 horas	4.6 <sup>a</sup>
Semillas con 9 µg de FLC infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 12 horas	6.3 <sup>b</sup>
Semillas infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 12 horas	5.3 <sup>a</sup>
Semillas con 9 µg de FLC infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 24 horas	3.7 <sup>c</sup>
Semillas infectadas con <i>Pythium sp</i> durante 24 horas	4.4 <sup>a</sup>
Semillas con 18 µg de FLC infectadas con <i>R. solani</i> durante 6 horas	4.5 <sup>a</sup>
Semillas infectadas con <i>R. solani</i> durante 6 horas	4.1 <sup>a</sup>
Semillas con 18 µg de FLC infectadas con <i>R. solani</i> durante 12 horas	6 <sup>b</sup>
Semillas infectadas con <i>R. solani</i> durante 12 horas	4 <sup>a</sup>
Semillas con 18 µg de FLC infectadas con <i>R. solani</i> durante 24 horas	7.48 <sup>e</sup>
Semillas infectadas con <i>R. solani</i> durante 24 horas	5.2 <sup>ad</sup>

Las diferencias significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por la prueba Tukey estan representadas por letras diferentes.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Dos de los hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de la soya son *R. solani* y *Pythium* sp. *R. solani* es un patógeno que provoca tizón de plántulas y pudrición de raíces en soya, manifestando síntomas como pudrición de raíz, marchitez y lesiones (Chang *et al.*, 2017). Este patógeno puede causar pérdidas de hasta el 60 % en el rendimiento del cultivo (Akber *et al.*, 2023). Las estrategias de manejo para controlar este patógeno incluyen el uso de semillas limpias, prácticas de labranza y fungicidas, aunque estos últimos pueden conducir a la resistencia del patógeno (Lin *et al.*, 2022). *Pythium* sp, provoca pudrición de raíz, además de reducir el crecimiento y rendimiento de las plantas de soya (Li *et al.*, 2019). Debido a las pérdidas ocasionadas por estas enfermedades y los problemas de contaminación y resistencia derivados del uso excesivo de fungicidas químicos, es necesario investigar alternativas para el control de estos patógenos. Entre estas alternativas, los metabolitos secundarios antifúngicos, como FLC, presentan un potencial prometedor para el control de enfermedades en la soya.

*P. aeruginosa* es una especie de bacterias gramnegativas en forma de bacilos, capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios. En 2004 Rampazo aisló la cepa LV de *P. aeruginosa* de una lesión en naranjo causada por *Xanthomonas citri subsp. citri* en Brasil. Desde entonces, se ha estudiado su producción de metabolitos secundarios, entre ellos la FLC, un compuesto organocúprico sintetizado por la bacteria como mecanismo de resistencia a elevadas concentraciones de cobre. Este metabolito resulta de la reacción entre dos sideróforos tioformina e iones de cobre, y ha mostrado actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y oomicetos patógenos que afectan cultivos susceptibles a enfermedades, como la soya, uno de los cultivos más importantes y nutritivos a nivel mundial (Oyarvide *et al.*, 2023). En este trabajo se evaluó la capacidad antifúngica del metabolito FLC contra hongos patógenos de la soya.

### Producción de FLC

Se sintetizó el metabolito FLC de la bacteria *P. aeruginosa* cepa LV agregando  $\text{CuCl}_2$  al 1 % en los medios de cultivo. Estas bacterias son ampliamente estudiadas por su capacidad para producir diferentes metabolitos secundarios. Según Depke *et al.* (2017), esta bacteria puede producir fenazinas, ramnolípidos, lactonas de homoserina y alquilquinolonas; que tienen propiedades antibióticas de amplio espectro contra muchos patógenos vegetales fúngicos, bacterianos y oomicetos (Biessy *et al.*, 2018). Hafeez *et al.* (2017) también estudiaron los metabolitos secundarios producidos por la cepa BRp3 de *P. aeruginosa* como estrategia de biocontrol del tizón bacteriano de las hojas de arroz y mencionaron que estos metabolitos poseen diversas propiedades biológicas significativas, incluyendo su función como factores de virulencia, sideróforos, biosurfactantes y agentes antimicrobianos.

FLC es un compuesto organocúprico que tiene en su estructura iones de cobre y es producido como estrategia de resistencia a elevadas concentraciones de cobre. Algunos autores han mencionado esta estrategia de supervivencia de algunos microorganismos, Kenney y Rosenzweig (2018) afirman que algunas bacterias tienen la capacidad de producir compuestos aglutinantes de cobre para facilitar la importación de este metal cuando es limitado o para desintoxicarlo como un mecanismo de resistencia, según su estudio sobre metalóforos que se unen al cobre. Patteson *et al.* (2021) reportan que, como respuesta al estrés por cobre, *P. aeruginosa* desarrolló una vía biosintética que integra el cobre en un antibiótico de amplio espectro.

El  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  es responsable de inducir la producción del metabolito FLC como respuesta al estrés. Nuestros resultados son similares a los de Gionco *et al.* (2017), ya que en el cultivo de *P. aeruginosa* cepa lv ellos mostraron que en ausencia de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  no se detecta actividad antimicrobiana. Kerbauy *et al.* (2016) también destacan el papel del  $\text{CuCl}_2$  en el medio de cultivo para inducir la producción de componentes antibióticos de *Pseudomonas sp.*, reportando la ausencia de inhibición en cepas cultivadas sin cobre.

### **Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos de la soya**

Con la finalidad de comprobar la patogenicidad de los hongos patógenos de soya, estos se propagaron en plantas y semillas y posteriormente los tejidos infectados fueron sembrados en medio de cultivo. Al analizar sus estructuras con el microscopio, se observaron hifas septadas ramificadas en ángulo recto. Estas características coinciden con las reportadas por varios autores del hongo *R. solani*. Betancourth *et al.* (2021) analizaron la morfología y patogenicidad de *R. solani* y mencionaron diferentes características como colonias blancas o marrones, con o sin presencia de esclerocios. También reportaron síntomas en plantas infectadas como amarillamiento, reducción de raíces, lesiones necróticas en las puntas de las raíces y marchitez. Estos resultados son muy similares a los nuestros cuando se infectaron las plantas de soya con *R. solani*. Otros estudios con resultados similares a los nuestros son los de Aydin (2022) quien infectó plantas de trigo con *R. solani* y reportó la presencia de hifas segmentadas y colonias de color marrón claro. Jaaffar *et al.* (2016) describieron el crecimiento de colonias de color marrón claro con micelio aéreo algodonoso en cepas de *R. solani*, y reportaron daños a las raíces con lesiones marrones y pudrición, así como reducción del tamaño radicular. Datta *et al.* (2021) estudiaron la biología de *R. solani* como causante de la enfermedad de la vaina del arroz y reportaron la presencia de hifas maduras con pigmentación marrón y septadas. Dutta y Deb (2020) investigaron la inoculación artificial de *R. solani* y mencionaron el crecimiento de micelio esponjoso de color marrón claro con hifas septadas y hialinas. Finalmente, Gondal *et al.* (2019) estudiaron los grupos de *R. solani* asociados a anastomosis en tomate y reportaron características morfológicas del hongo, como hifas ramificadas en ángulo recto y colonias de color marrón claro a oscuro, además de marchitamiento en plantas infectadas.

El patógeno *Pythium sp* fue aislado de tejidos que presentaban pudrición de raíces, lesiones necróticas y marchitamiento de hojas en placas de agar papa dextrosa. Se observó un crecimiento de micelio blanco con apariencia algodonosa y pelos esponjosos. Al analizarlo con el microscopio, se identificaron esporangios y zoosporangios alargados. Los síntomas de infección y las características encontradas coinciden con las reportadas por otros

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

autores. Ashwathi *et al.* (2017) reportaron que algunos síntomas de infección por *Pythium*, como el marchitamiento y la pudrición de raíces, son comunes en su estudio de la morfología y patogenicidad de *Pythium aphanidermatum*. Talubnak *et al.* (2022) estudiaron la identificación morfológica y molecular de *Pythium sp* en lechuga, reportando un crecimiento de micelio algodonoso aéreo en medios de APD, además de provocar pudrición de semillas y raíces. Almohammedy *et al.* (2020) estudiaron la morfología y patogenicidad de *Pythium sp* aislado de plantas en Irak, mencionando la formación de micelio blanco, algodonoso y esponjoso, similar a lo observado en nuestro estudio, y la presencia de esporangios.

### **Efecto antifúngico de FLC contra hongos patógenos de soya**

De las pruebas de susceptibilidad frente a los hongos patógenos de soya, el hongo más sensible fue *Phomopsis sojae* mostrando mayor porcentaje de inhibición y fue seleccionado para su observación en microscopía electrónica de barrido. Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido revelan el efecto antifúngico de FLC (figura 18) que fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo *Phomopsis sojae* induciendo cambios en su estructura como deformación de hifas, formación de vesículas similares a tumores rugosos y fuga citoplasmática. Nuestros resultados son muy similares a los reportados por otros autores, por ejemplo, Afonso *et al.* (2022) destacan la capacidad de FLC para controlar patógenos como *Xanthomonas citri*, *Pectobacterium carotovorum*, *Bipolaris sorokiniana* y *Pythium ultimum* subrayando su potencial en el manejo de enfermedades agrícolas. En algunos de nuestros resultados, se observó que FLC, a una concentración de 5,000 µg/ml, provocó deformaciones en las hifas de *P. sojae*, causando agrandamientos irregulares, apariencia arrugada y protuberancias superficiales inusuales. Estos daños son similares a los reportados en otros estudios de microorganismos tratados con FLC, por ejemplo; Navarro *et al.* (2020) reportaron la alteración de la membrana y la pared celular en las bacterias *Xanthomonas citri subsp. citri* y *Klebsiella pneumoniae*, donde observaron que FLC actúa de manera similar en diferentes géneros gramnegativos. En ese mismo estudio observaron la acción de FLC en bacterias gramnegativas y grampositivas, teniendo efectos

distintos en las bacterias grampositivas *E. faecium* ATCC 6569 y MRSA N315. Observaron que con *E. faecium* ATCC 6569, hubo una disminución en el número de células sin daño a la membrana ni a la pared celular., sin embargo, con las bacterias de la cepa MRSA N315 presentaron daños en la membrana, la pared celular y cambios en el citoplasma. Anteriormente, Navarro *et al.* (2019) reportaron la eficacia antibiótica de FLC contra bacterias grampositivas y gramnegativas, observando que FLC provoca lisis celular y degradación de la matriz celular contra *Klebsiella pneumoniae*.

#### **Efecto de FLC en la inhibición de los patógenos *R. solani* y *Pythium sp***

La zona de inhibición de *R. solani* expuesto a 400 µg/ml de FLC es de 16 mm. Sin embargo, otros autores han reportado halos de inhibición mayores utilizando diferentes compuestos. Pineda-Mendoza *et al.* (2019) caracterizaron la actividad antifúngica de rizobacterias y reportaron que *Pseudomonas tolaasii* produjo un halo de inhibición de 26 mm, mientras que *Rhizobium aquatilis* mostró un halo de inhibición de 34 mm, atribuyendo esta actividad a la producción de metabolitos antibióticos. En el caso de *Pythium sp*, el halo de inhibición observado es de 24 mm. Gade (2023) estudiaron la actividad antifúngica in vitro utilizando el método de difusión en disco y observaron un halo de inhibición de 12 mm con sulfato de cobre, 20 mm con el fungicida Mancozeb, y un halo de inhibición mayor de 25 mm con nanopartículas de cobre.

Los resultados obtenidos con FLC muestran una efectividad moderada en comparación con otros compuestos y métodos estudiados por diversos autores. La diferencia en los tamaños de las zonas de inhibición puede atribuirse a la naturaleza y concentración de los compuestos antifúngicos utilizados, así como a los mecanismos específicos de acción estudiados por otros autores. Por ejemplo, los metabolitos antibióticos producidos por rizobacterias como *Pseudomonas tolaasii* y *Rhizobium aquatilis* son altamente eficaces contra *R. solani*.

En comparación, los fungicidas comerciales como Metalaxyl M y Azoxystrobin muestran una alta eficacia contra *Pythium aphanidermatum*, lo que resalta la potencia de los fungicidas sintéticos frente a los patógenos específicos. Sin embargo, la variabilidad en los resultados

de diferentes estudios subraya la necesidad de una evaluación exhaustiva de los agentes antifúngicos en condiciones específicas de cada patógeno y entorno.

#### **Concentración mínima inhibitoria de *R. solani* y *Pythium sp***

Al estudiar la eficacia de FLC contra *R. solani*, se determinó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 18 µg/mL. Este resultado posiciona a FLC como una prometedora alternativa frente a los fungicidas químicos convencionales, que comúnmente inducen resistencia en los patógenos. Investigaciones previas han demostrado la efectividad de varios fungicidas químicos contra *R. solani*. Chauhan *et al.* (2022) reportaron una inhibición del 100 % de *R. solani* utilizando Carbendazim 50 % WP a una concentración de 6 ppm, así como combinaciones de Azoxystrobin 11 % con Tebuconazole y Tebuconazole 50 % con Trifloxystrobin 25 % WG a 10 ppm, logrando la misma inhibición en menos de 24 horas. Estos fungicidas actúan inhibiendo procesos cruciales como la mitosis en las hifas de los hongos y la producción de ATP en las mitocondrias. Asimismo, Karkee y Mandal (2020) informaron que los fungicidas Nativo y Dhanucop inhibieron el 100% de *R. solani* a 10 ppm después de 10 días de aplicación. Otros fungicidas como Folicure, Titan y Saaf lograron la misma eficacia a 100 ppm en el mismo periodo. Aunque los fungicidas químicos son ampliamente utilizados, su aplicación excesiva ha provocado problemas de contaminación, intoxicaciones y resistencia de los patógenos. En este contexto, el uso de metabolitos como Fluopsina C surge como una alternativa prometedora, buscando mitigar los problemas asociados al uso excesivo de químicos. Zhao *et al.* (2022) exploraron sustancias de plantas con propiedades fungistáticas para controlar *R. solani* y encontraron que extractos de corteza de Moutan a una concentración de 1,000 µg/mL inhibieron completamente el patógeno, atribuible a metabolitos secundarios como paeonol y quercetina que dañan la membrana celular. De manera similar, Wang *et al.* (2021) reportaron que extractos etanólicos de frutas de *Syzygium aromaticum* inhibieron el 100 % de *R. solani* a 10,000 µg/mL, debido al ácido láurico y eugenol presentes en la planta.

Para *Pythium sp*, la CMI de FLC fue de 9 µg/mL. Esta diferencia con respecto a *R. solani* puede deberse a variaciones en los componentes estructurales de la pared y membrana celular entre oomicetos y hongos. Dubey *et al.* (2022) evaluaron la eficiencia de tratamientos químicos contra *Pythium*, reportando que 91 µg/mL de Etridiazole, 384 µg/mL de Fosetyl-Al y 341 µg/mL de fosfato de potasio inhibieron completamente el patógeno. Feng *et al.* (2020) también investigaron fungicidas químicos, encontrando que concentraciones de 30-36 µg/mL de Mefenoxam y Metalaxyl fueron efectivas contra varias especies de *Pythium*.

#### **Efecto antifúngico de FLC en semillas de soya infectadas con *R. solani* y *Pythium sp***

Los tratamientos con semillas infectadas con *R. solani* y *Pythium sp* mostraron una mayor incidencia de síntomas de pudrición de semillas, tejidos necróticos y manchas marrones en las raíces. Estos síntomas son consecuencia de la presencia de *R. solani* y *Pythium sp* en las semillas y se pueden observar con mayor incidencia en los tratamientos con semillas expuestas a los patógenos de 6,12 y 24 h donde también se presentan raíces decoloradas (figura 28). Ajayi-Oyetunde y Bradley (2017) reportaron que *R. solani* causa síntomas como pequeñas lesiones en raíces, pudrición de raíces e hipocótilo, similares a los observados en este estudio. Paliwal *et al.* (2023) mencionan que *R. solani* provoca pudrición de raíces en soya, donde el hongo crece y obstruye el tejido del xilema produciendo esclerocios, responsables de síntomas como clorosis, pudrición de semillas y muerte de las plantas de soya. Serrano *et al.* (2018) describen síntomas de infección por *Pythium* en soya, incluyendo decoloración general, lesiones marrones en el hipocótilo, pudrición de raíz y pudrición de semillas, coincidiendo con los observados en las semillas infectadas con *Pythium sp*. Huzar-Novakowiski y Dorrance (2018) también reportaron que los síntomas de infección por *Pythium* en soya incluyen necrosis, oscurecimiento de raíces y lesiones en raíces, confirmando los síntomas visibles en las semillas infectadas en el estudio.

Se observó un mayor crecimiento de raíces en semillas tratadas con 18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FLC en presencia de *R. solani* y un aumento significativo en la longitud de raíces de semillas expuestas por 12 y 24 h, respectivamente (tabla 8). Esto podría deberse a que el cobre presente en la FLC fue aprovechado por la soya como micronutriente como lo han sugerido autores como Xion *et al.* (2017) en su estudio donde el cobre aumento el crecimiento de las plantas de lechuga, o a que la FLC activó un mecanismo de defensa contra *R. solani*, promoviendo un mayor crecimiento radicular similar a lo ocurrido en el estudio de Munhoz *et al.* (2017) donde las plantas de tomate presentaron mayor crecimiento con tratamientos con FLC.

Otros estudios han reportado efectos similares del cobre en las plantas. Los iones metálicos pueden conferir una fortificación inducida por metales y defender a la planta contra infecciones fúngicas, como lo señala Taiti *et al.* (2016). Prasad *et al.* (2017) estudiaron los nanomateriales en plantas y mencionaron que las nanopartículas metálicas, como las de cobre, generan un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que estimula las defensas de las plantas. Estas nanopartículas se acumulan en las células vegetales, aumentando la activación de enzimas antioxidantes. Smali *et al.* (2017) indicaron que, para evitar la toxicidad de ROS, las plantas activan diversos mecanismos de desintoxicación a través de vías enzimáticas y no enzimáticas, especialmente la actividad del polifenol oxidasa. Esta enzima participa en el refuerzo de la pared celular y la inhibición de patógenos, potenciando así las defensas de las plantas. Estos hallazgos sugieren que, en lugar de una actividad antifúngica directa, la presencia de EROS debido al cobre en la FLC podría estar induciendo respuestas de defensa en las plantas. Esta activación de los mecanismos de defensa podría explicar el mayor crecimiento de raíces observado en las semillas tratadas con FLC y expuestas a *R. solani*, destacando el potencial de este compuesto para mejorar la resistencia de las plantas a los patógenos. Xiong *et al.* (2017) reportaron un aumento en el crecimiento de plantas de lechuga expuestas al cobre, atribuido a la estimulación del crecimiento bajo un estrés ligeramente tóxico y al hecho de que el cobre es un

micronutriente esencial. De manera similar, en este estudio, el crecimiento de la soya se vio favorecido.

Sin embargo, también se observó un menor desarrollo de raíces en semillas tratadas con la misma concentración de FLC, lo que podría indicar fitotoxicidad. Ryzhenko *et al.* (2018) mencionaron que el cobre en las plantas es esencial para la emisión de CO<sub>2</sub>, la asimilación y síntesis de ATP, y como componente de proteínas como la plastocianina del sistema fotosintético. No obstante, el exceso de cobre en las plantas causa estrés y daño, lo cual puede manifestarse como un retraso en el crecimiento, similar a lo observado en el tratamiento con FLC. Mir *et al.* (2021) reportaron que la toxicidad del cobre afecta negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas, provocando la inhibición del crecimiento en diferentes etapas. Además, mencionaron que el exceso de cobre disminuye significativamente el porcentaje de germinación. Sin embargo, en los tratamientos con FLC no se observó una reducción en la germinación, lo que sugiere que los tratamientos con 18 µg/mL de FLC no exhiben respuestas típicas de toxicidad por cobre, y otros factores podrían estar influyendo en el desarrollo de las raíces.

La FLC mostró un efecto antifúngico significativo contra *R. solani* y *Pythium* sp. Afonso *et al.* (2022) destacaron sus efectos antifúngicos contra hongos como *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*, inhibiendo el 100 % de estos hongos a concentraciones de 5 a 7 µg/mL, y también reportaron la inhibición de *Pythium ultimum* a una concentración de 0.20 µg/mL. Navarro *et al.* (2019) también mencionaron el poder antifúngico de la FLC. De Lima *et al.* (2022) señalaron su capacidad antibiótica, efectiva contra bacterias y hongos. De Almeida *et al.* (2023) estudiaron la FLC contra *Candida auris*, reportando una concentración mínima inhibitoria de 1.56 µg/mL. Estos estudios confirman la eficacia de la FLC como agente antifúngico, respaldando los resultados observados en nuestro estudio, donde su aplicación inhibió significativamente el crecimiento de *R. solani* y *Pythium* sp.

El porcentaje de germinación de semillas infectadas con *Pythium* sp. mostró un aumento significativo del 11 %, alcanzando un 87 % en comparación con el 78 % de las semillas infectadas no tratadas. Además, se observó que *Pythium* sp. fue más sensible a FLC que *R. solani*, requiriendo una concentración mínima inhibitoria dos veces mayor para este último. Paul y Walker (2022) evaluaron la agresividad de varias especies de *Pythium* en los Estados Unidos contra semillas de soya, reportando porcentajes de germinación de aproximadamente 75 %, 80 % y 82 % para distintas especies de *Pythium*, valores que son comparables a los observados en este estudio. Feng *et al.* (2020) también reportaron que diferentes especies de *Pythium* causan variaciones en los porcentajes de germinación de semillas de soya infectadas, que van desde aproximadamente el 90 % hasta el 10 %. En este estudio, las semillas tratadas con FLC e infectadas con *Pythium* mostraron un aumento en la germinación del 11 %. Carmona *et al.* (2017) evaluaron el uso de fungicidas en semillas tratadas e infectadas con *Pythium* y reportaron que las semillas tratadas con fosfitos comerciales aumentaron su porcentaje de germinación de un 10 % a 200 ml/Kg hasta aproximadamente un 15 % con el doble de concentración, resultados que no difieren significativamente de los observados en nuestro estudio. Esto sugiere que la FLC podría ser una alternativa viable para mejorar la germinación de semillas de soya infectadas con *Pythium* sp.

Estos hallazgos sugieren que la FLC posee un potencial prometedor como alternativa para el control de hongos. Esta investigación podría allanar el camino hacia nuevas aplicaciones de la FLC, tanto como promotor de respuestas de defensa en plantas como para estudios adicionales que profundicen en la generación de moléculas con poder antimicrobiano a partir de metabolitos secundarios de *P. aeruginosa* cepa LV.

## 9. CONCLUSIONES

La FLC mostró capacidad para inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp. en la soya. FLC provoca la deformación las hifas de *P. sojae*, con agrandamientos irregulares y la formación de protuberancias inusuales e inhibiendo su desarrollo y crecimiento. Se demostró que el tratamiento de semillas de soya con FLC puede ser efectivo para controlar

la infección causada por *R. solani* y *Pythium* sp. FLC posee propiedades antifúngicas que podrían extenderse a otros patógenos de la soya, lo que la convierte en una alternativa prometedora para el control de enfermedades del cultivo y para reducir la dependencia de agentes químicos.

## 10. REFERENCIAS

Abdullah, M. S. S. (2022). Black fungi in arabian horses: scanning electron microscopy study of cutaneous equine mucormycosis caused by mucor indicus for the first time in eastern province, saudi arabia. *Alexandria journal of veterinary sciences*, 73(1), 36. <https://doi.org/10.5455/ajvs.98498>.

Afonso, L., andreato, M. F. D. L., chryssafidis, A. L., alarcon, S. F., Das neves, A. P., Da silva, J. V. F. R., ... & Andrade, g. (2022). Fluopsin c: a review of the antimicrobial activity against phytopathogens. *Agronomy*, 12(12), 2997.

Aguilar, E. E. Q., martinez, Z. E., & Enriquez, G. R. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Revista elementos (ciencia y cultura)* 23 (101): 59-64.

Ahmad, K. S. (2018). Exploring the potential of juglans regia-derived activated carbon for the removal of adsorbed fungicide ethaboxam from soils. *Environmental monitoring and assessment*, 190(12). <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7119-z>.

Ajayi-oyetunde, O. O., & bradley, C. A. (2017). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant pathology*, 67(1), 3-17. <https://doi.org/10.1111/ppa.12733>.

Ajayi-oyetunde, O. O., butts-wilmsmeyer, C. J., & bradley, C. A. (2017). Sensitivity of *Rhizoctonia solani* to succinate dehydrogenase inhibitor and demethylation inhibitor fungicides. *Plant disease*, 101(3), 487-495. <https://doi.org/10.1094/pdis-07-16-1015-re>.

Akber, M. A., mubeen, M., Sohail, M. A., Khan, S. W., Solanki, M. K., Khalid, R., Abbas, A., Divvela, P. K., & Zhou, I. (2023). Global distribution, traditional and modern detection, diagnostic, and management approaches of *Rhizoctonia solani* associated with legume crops. *Frontiers in microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1091288>.

Ali, S., Syeda, T. A., Syeda, F. N., & Muneeba, S. (2018). Strategies and kinetics of industrial fermentation for the mass production of various primary and secondary metabolites from microbes. *Eur. J. Pharm. Med. Res*, 6, 595-606.

Childs, S. P., Buck, J. W., & Li, Z. (2018). Breeding soybeans with resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). *Plant breeding*, 137(3), 250-261. <https://doi.org/10.1111/pbr.12595>.

Allen, tT., Bluhm, B., Conner, K., Doyle, V., Price, T., Sikora, E., Singh, R., Spurlock, T., Tomaso-peterson, M., & Wilkerson, T. (2017). First description of the causal agent of taproot decline of soybean, an emerging disease in the southern united states. *Plant health progress*, 18(1), 35-40. <https://doi.org/10.1094/php-01-17-0004-rs>.

Almohammedy, M. A. B., & Al-maliky, B. S. A. (2020). Morphological, molecular and pathogenicity characterization of *Pythium spp.* On zucchini isolated from soil and diseased plants in iraq. *Plant. Arch*, 20, 767-775.

Alonso-Torres, E., PanecatI-Bernal, Y., Alvarado-pulido, J. J., Fuentes-Ramírez, I. E., Martínez-Morales, J., Muñoz-Rojas, J., & Morales-García, Y. E. (2022). Rumbo a la generación de inoculantes en polvo a base de *Pseudomonas putida* kt2440. *Zenodo (cern european organization for nuclear research)*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7099040>.

Al-Surhanee, A. A., Afzal, M., Bouqellah, N. A., Ouf, S. A., Muhammad, S., Jan, M., ... & Soliman, M. H. (2021). The antifungal activity of Ag/CHI NPs against *Rhizoctonia solani* linked with tomato plant health. *Plants*, 10(11), 2283. <https://doi.org/10.3390/plants10112283>

de Aguiar, B. A., de Oliveira Silva, J. K., dos Santos Bezerra, J. L., de Queiroz Rodrigues, A., Araújo, L. O., & Paulini, F. (2022). Composition, structure, isolation and antioxidant activity of secondary metabolites from brown algae. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 53(3), 268-287.

Andryukov, B., mikhailov, V., & besednova, n. (2019). The biotechnological potential of secondary metabolites from marine bacteria. *Journal of marine science and engineering*, 7(6), 176.

Antsotegi-Uskola, M., Markina-Iñarrairaegui, A., & Ugalde, U. (2020). New insights into copper homeostasis in filamentous fungi. *International Microbiology*, 23, 65-73. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00081-5>.

Arif, H., Sohail, A., Farhan, M., Rehman, A. A., Ahmad, A., & Hadi, S. M. (2018). Flavonoids-induced redox cycling of copper ions leads to generation of reactive oxygen species: A potential role in cancer chemoprevention. *International journal of biological macromolecules*, 106, 569-578. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.049>.

Arora, H., Sharma, A., Sharma, S., Haron, F. F., Gafur, A., Sayyed, R. Z., & Datta, R. (2021). *Pythium* damping-off and root rot of *Capsicum annum* L.: impacts, diagnosis, and management. *Microorganisms*, 9(4), 823. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040823>.

Ashwathi, S., Ushamalini, C., Parthasarathy, S., & Nakkeeran, S. (2017). Morphological, pathogenic and molecular characterisation of *Pythium aphanidermatum*: A causal pathogen of coriander damping-off in India. *The Pharma Innovation*, 6(11, Part A), 44.

Aydin, M. H. (2022). *Rhizoctonia solani* and its biological control. *Türkiye tarımsal arařtırmalar dergisi/türkiye tarımsal arařtırmalar dergisi*, 9(1), 118-135. <https://doi.org/10.19159/tutad.1004550>.

Azizan, M. S., zamani, a. I., stahmann, k. P., & ng, c. L. (2016). Fungal metabolites and their industrial importance: a brief review. *Malays j biochem mol biol*, 19, 15-23.

Bajguz, A., & piotrowska-niczyporuk, A. (2023). Biosynthetic pathways of hormones in plants. *Metabolites*, 13(8), 884.

Bajwa, S. G., Rupe, J. C., & Mason, J. (2017). Soybean disease monitoring with leaf reflectance. *Remote sensing*, 9(2), 127. <https://doi.org/10.3390/rs9020127>.

Baker, I. (2018). Copper. In: fifty materials that make the world. *Springer, cham*. [https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1007/978-3319-78766-4\\_9](https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1007/978-3319-78766-4_9).

Ballou, E. R., & Wilson, D. (2016). The roles of zinc and copper sensing in fungal pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, 32, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.013>.

Bandara, A. Y., Weerasooriya, D. K., Bradley, C. A., Allen, T., & Esker, P. D. (2020). Dissecting the economic impact of soybean diseases in the united states over two decades. *Plos one*, 15(4), e0231141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231141>.

Barraza-Roman, Z., Bravo, A., & Cordero, A. P. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* productora de metabolito con actividad antimicrobiana contra *Burkholderia glumae*. *Revista colombiana de ciencia animal*, 9(1), 31. <https://doi.org/10.24188/recia.v9.ns.2017.529>.

Barreto, S. F., de Gaspi, F. O. G., & de Oliveira, C. F. (2020). Estudo químico das principais vias do metabolismo secundário vegetal: uma revisão bibliográfica. *Revista científica da fho| uniararas*, 8(1), 60-72.

Bartolomeu-Gonçalves, G., Moreira, C. L., Andriani, G. M., Simionato, A. S., Nakamura, C. V., Andrade, G., Tavares, E. R., Yamauchi, I. M., & Yamada-ogatta, S. F. (2022). Secondary metabolite from *pseudomonas aeruginosa* lv strain exhibits antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Brazilian journal of development*, 8(10), 67414-67435. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n10-170>

Batzer, J. C., kandel, Y. R., Bradley, C. A., Chilvers, M. I., Tenuta, A U., Wise, K. A., Hernández, E., & Mueller, D. S. (2016). Effect of seed treatment on early season brown spot caused by *Septoria glycines* of soybean. *Plant health progress*, 17(4), 223-228. <https://doi.org/10.1094/php-rs-16-0035>.

Bedoya, J. C., Dealis, M. L., Silva, C., Niekawa, E. T. G., Navarro, M. O. P., Simionato, S. S., Modolon, F., Chryssafidis, A. L., & Andrade, G. (2019). Enhanced production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* lv strain. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 17, 653-664. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.025>.

Begani, J., Lakhani, J., & Harwani, D. (2018). Current strategies to induce secondary metabolites from microbial biosynthetic cryptic gene clusters. *Annals of microbiology*, *68*(7), 419-432.

Behlau, F., Scandelai, I. H. M., da Silva, G. J., & Lanza, F. (2017). Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. *Crop protection*, *94*, 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.003>.

Benfradj, N., Tounsi, S., & Boughalleb-Mhamdi, N. (2016). In-vitro evaluation of antagonists and fungicides in controlling citrus gummosis caused by *Phytophthora*, *Phytophthium* and *Pythium* species in tunisia. *British microbiology research journal*, *16*(1), 1-14. <https://doi.org/10.9734/bmrj/2016/27247>.

Bertoglio, C., Duin, I. M., de Matos, J. N., Ribeiro, N. R., Leite, R. P., & Balbi-Peña, M. I. (2023). Comparative study of inoculation methods to determine the aggressiveness of *Xanthomonas citri* pv. *Glycines* isolates and to evaluate the reaction of soybean cultivars to bacterial pustule. *Agronomy*, *13*(6), 1515. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061515>.

Betancourth-García, C. A., Castro-Cacedo, B. L., Quiroz-Ojeda, C., Sañudo-Sotelo, B., Florez-Casanova, C., & Salazar-González, C. (2021). Morphology and pathogenicity of *Rhizoctonia solanikühn* associated with potato black scurf in nariño (colombia). *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, *15*(1).

Bhat, B., Islam, S. T., Ali, A., Sheikh, B. A., Tariq, I., Islam, S. U., & Dar, T. U. H. (2020). Role of micronutrients in secondary metabolism of plants. *Springer ebooks* (pp. 311-329).

Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2016). Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiology spectrum*, *4*(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0009-2016>.

Boldrini, G. G., Molinero, G. D. M., Chaca, M. V. P., Gómez, N., & Álvarez, S. M. (2022). Soybean seed compounds as natural health protectors. *Intechopen ebooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99480>.

Bouffleur, T. R., Ciampi-Guillard, M., Tikami, Í., Rogério, F., Thon, M. R., Sukno, S. A., Júnior, N. S. M., & Baroncelli, R. (2021). Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: current status and future prospects. *Molecular plant pathology*, *22*(4), 393-409. <https://doi.org/10.1111/mpp.13036>.

Bouson, S., Krittayavathananon, A., Phattharasupakun, N., Siwayaprahm, P., & Sawangphruk, M. (2017). Antifungal activity of water-stable copper-containing metal-organic frameworks. *Royal society open science*, *4*(10), 170654. <https://doi.org/10.1098/rsos.170654>.

Canuto, G. A. B., Costa, J. L., da Cruz, P. L. R., de Souza, A. C. A. A., Faccio, A. T., Klassen, A., Rodrigues, K. T., & Tavares, M. F. M. (2017). Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Química nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>.

Capinera, J. L., & Dickens, K. (2016). Some effects of copper-based fungicides on plant-feeding terrestrial molluscs: a role for repellents in mollusc management. *Crop protection*, 83, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.01.018>.

Cárdenas-Rodríguez, J., Ayala-Tafoya, F., Yáñez-Juárez, M. G., López-Orona, C. A., & Romero-Gómez, S. D. J. (2022). Especies de *Pythium* aisladas de aguas de uso agrícola en Culiacán, Sinaloa. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 9(1). 2022.<https://doi.org/10.19136/era.a9n1.3117>.

Carmona, M. A., Sautua, F. J., Grijalba, P. E., Cassina, M., & Pérez-Hernández, O. (2017). Effect of potassium and manganese phosphites in the control of *Pythium* damping-off in soybean: a feasible alternative to fungicide seed treatments. *Pest management science*, 74(2), 366-374. <https://doi.org/10.1002/ps.4714>.

Carranza, M., Contreras-Mora, M., Macias-Leon, M. A., Pincay-Pin, P., Rendón-Margallón, E., & Herrera-Feijoo, R. J. (2023). Uso de los pesticidas y su efecto en el cultivo de *Zea mays*: una revisión de la literatura. *Código científico revista de investigación*, 4(e2), 1258-1286. <https://doi.org/10.55813/gaea/ccri/v4/ne2/219>.

Castillo, F. D. H., Quiroz, D. C., Ceja, J. E. S., Sánchez, A. R., & Reyes, J. T. S. (2022). Efectos del pretratamiento con trichoderma y bacillus en la germinación de semillas de agave *Victoriae-reginae* t. Moore. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 13(69), 56-72. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i69.844>

Chang, K., Hwang, S., Ahmed, H. U., Strelkov, S., Harding, M., Conner, R. L., McLaren, D., Gossen, B., & Turnbull, G. D. (2017). Disease reaction to *Rhizoctonia solani* and yield losses in soybean canadian journal of plant science. *Canadian journal of plant science*. <https://doi.org/10.1139/cjps-2017-0053>.

Chauhan, S., & Singh, R. P. (2022). In vitro evaluation of minimum inhibitory concentration (mic) of fungicides against *Rhizoctonia solani* f. Sp. Sasaki exner causing banded leaf and sheath blight disease in maize.

Chavan, P., Apet, K., & Borade, R. (2017). Efficacy of fungicides and bioagents against *pythium aphanidermatum* causing rhizome rot of turmeric. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 6(11), 4312-4320. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.507>.

Chen, X., & Li, B. (2023). How nature incorporates sulfur and selenium into bioactive natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*, 76, 102377. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102377>.

Chevrette, M. G., Thomas, C. S., Hurley, A., Rosario-Meléndez, N., Sankaran, K., Tu, Y., & Handelsman, J. (2022). Microbiome composition modulates secondary metabolism in a multispecies bacterial community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(42), e2212930119.

Choudhary, R., Kumaraswamy, R., kumari, S., Sharma, S., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P., & Saharan, V. (2017). Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* l.). *Scientific reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08571-0>.

Choudhury, D., Anand, Y. R., Kundu, S., Nath, R., Kole, R. K., & Saha, J. (2017). Effect of plant extracts against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Pharmacognosy and phytochemistry*, 6(4), 399-404.

Chowdhury, A. R., Kumar, R., Mahanty, A., Mukherjee, K., Kumar, S., Tribhuvan, K. U., ... & Sarkar, B. (2024). Inhibitory role of copper and silver nanocomposite on important bacterial and fungal pathogens in rice (*Oryza sativa*). *Scientific Reports*, 14(1), 1779. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49918-0>.

Couretot, I. A., Pastore, M., Curti, A., Angelotti, P., Samoiloff, A., Magnone, G., & Labatte, M. (2019). Fungicidas foliares en soja, eficacia en el control de enfermedades y respuesta al rendimiento en tres localidades, norte de bs as y sur de sta. Fe. Campaña 2018/19.

Cruz, M. E. C., Bustos, J. P. Q., Cabrera, W. G. M., & Sánchez, A. J. L. (2022). Caracterización molecular y morfológica del género *pythium* provenientes de especies forestales. *Reciamuc*, 6(2), 375-387. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.\(2\).mayo.2022.375-387](https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.(2).mayo.2022.375-387).

Cubilla-Ríos, A. A., Ruíz-Díaz-Mendoza, D. D., Romero-Rodríguez, M. C., Flores-Giubi, M. E., & Barúa-Chamorro, J. E. (2019). Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *macrophomina phaseolina*. *Agronomía mesoamericana* 63-77. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>.

Da Ros Zanette, C. C., Rasche, J. W. A., Trinidad, S. A., González, I., & Antúnez, C. C. C. (2018). Eficiencia de fungicidas frente a la incidencia de patógenos en semillas de trigo. *Revista agrogeoambiental*, 10(3). <https://doi.org/10.18406/2316-1817V10N320181215>.

Datta, S., Sarkar, M., Chowdhury, A., Rakwal, R., Agrawal, G. K., & Sarkar, A. (2021). A comprehensive insight into the biology of *Rhizoctonia solani* ag1-ia kühn, the causal organism of the sheath blight disease of rice. *Journal of plant pathology*, 104(1), 79-98. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00974-3>.

Dávila, E., Houbraken, M., de Rop, J., Laing, G., Romero, O., & Spanoghe, P. (2021). Evaluación de la presión toxicológica y ecotoxicológica del uso de plaguicidas sintéticos en sancti spíritus, Cuba. *Ciencia y tecnología agropecuaria*, 22(2), 3.

De Almeida Ribeiro, B., da Mata, T. B., Canuto, G. A. B., & de Oliveira Silva, E. (2020). Chemical diversity of secondary metabolites produced by brazilian endophytic fungi. *Current microbiology*, 78(1), 33-54. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02264-0>.

De Almeida Spoladori, I. F., Andriani, G. M., de Castro, I. M., Suzukawa, H. T., Gimenes, A. C. R., Bartolomeu-Gonçalves, G., Ishida, K., Nakazato, G., Pinge-Filho, P., Machado, R. R. B., Nakamura, C. V., Andrade, G., Tavares, E. R., Yamauchi, I. M., & Yamada-Ogatta, S. F. (2023). Synergistic antifungal interaction between *Pseudomonas aeruginosa* lv strain metabolites and biogenic silver nanoparticles against candida auris. *Antibiotics*, 12(5), 861. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050861>.

De França, Í. W. L., de Oliveira, D. W. F., Giro, M. E. A., Melo, V. M. M., & Gonçalves, I. R. B. (2021). Production of surfactin by *Bacillus subtilis* lami005 and evaluation of its potential as tensoactive and emulsifier. *Canadian journal of chemical engineering/the canadian journal of chemical engineering*, 100(7), 1502-1515. <https://doi.org/10.1002/cjce.24240>.

De Jesús Narváez-Montaña, M., Mendoza-López, M. R., Sánchez-Viveros, G., Almaraz-Suárez, J. J., & Argumedo-Delira, R. (2023). Actividad inhibitoria de extractos alcohólicos de hongos comestibles contra *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 14(4), 615-625. <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i4.3200>.

De Lima, L. V. A., da Silva, M. F., Concato, V. M., Rondina, D. B. L., Zanetti, T. A., Felicidade, I., Marques, I. A., Lepri, S. R., Simionato, A. S., Filho, G. A., Coatti, G. C., & Mantovani, M. S. (2022). Dna damage and reticular stress in cytotoxicity and oncotic cell death of mcf-7 cells treated with fluopsin c. *Journal of toxicology and environmental health*, 85(21), 896-911. <https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2108950>.

De Oliveira, A. G., Murate, I. S., Spago, F. R., Lopes, I. D. P., Beranger, J. P. D. O., Martin, J. A. B. S., Nogueira, M. A., Mello, J. C. P. D., Andrade, C. G. T. D. J., & Andrade, G. (2011). Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas strain* against the *xanthomonas citri* pv. Citri 306 strain. *Biological control*, 56(2), 125-131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.008>.

de Oliveira, A. G., Spago, F. R., Simionato, A. S., Navarro, M. O., da Silva, C. S., Barazetti, A. R., & Andrade, G. (2016). Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. citri. *Frontiers in Microbiology*, 7, 113. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00113>.

De Souza Feitosa, M. I., Amancio, I. C. S., Lopes, c. A., & Reis, A. (2023). Fitopatógenos do gênero *Pythium*: polífagos e destrutivos em ambientes úmidos. *Revisao anual de patologia de plantas*, 148-171. <https://doi.org/10.31976/0104-038321V290007>.

Debritto, S., Gajbar, T. D., Satapute, P., Sundaram, I., Lakshmikantha, R. Y., Jogaiah, S., & S, I. (2020). Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Scientific reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58335-6>.

Depke, T., Franke, R., & Brönstrup, M. (2017). Clustering of ms2 spectra using unsupervised methods to aid the identification of secondary metabolites from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of chromatography. B*, 1071, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.002>

Deshmukh, R., & Tiwari, S. (2021). Molecular interaction of charcoal rot pathogenesis in soybean: a complex interaction. *Plant cell reports*, 40(10), 1799-1812. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02747-9>.

Dhami, G., & Maharjan, D. (2023). In vitro evaluation of different chemical fungicides for the control of *Rhizoctonia solani* kuhn. *Journal of plant protection society*, 108-114. <https://doi.org/10.3126/jpps.v8i1.56452>

Dias, M. D., Dias-Neto, J. J., Santos, M. D. D. M. D., Formento, Á. N., Bizerra, I. V. A. S., Fonseca, M. E. N., Boiteux, I. S., & Filho, A. C. C. (2019). Current status of soybean anthracnose associated with *colletotrichum truncatum* in brazil and argentina. *Plants*, 8(11), 459. <https://doi.org/10.3390/plants8110459>.

Diaz, P. A. E., Baron, N. C., & Rigobelo, E. C. (2019). *Bacillus spp.* As plant growth-promoting bacteria in cotton under greenhouse conditions. *Australian journal of crop science*, 13(12):2019, 2003-2014. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.12.p2003>.

Dilshad, R., Jamil, N., & Batool, R. (2022). Biosynthetic gene clusters in bacteria: a review. *Proceedings of the pakistan academy of sciences: part b*, 58.

Dorjee, I., Gogoi, R., Kamil, D., Kumar, R., & Verma, A. (2023). Copper nanoparticles hold promise in the effective management of maize diseases without impairing environmental health. *Phytoparasitica*, 51(3), 593-619. <https://doi.org/10.1007/s12600-023-01060-3>.

Dorrance, (2018). Manejo de *Phytophthora sojae* de la soja: una revisión y perspectivas de futuro. *Revista canadiense de patologia vegetal*, 40 (2), 210–219. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1445127>.

Dror, B., Jurkevitch, E., & Cytryn, E. (2020). State-of-the-art methodologies to identify antimicrobial secondary metabolites in soil bacterial communities-a review. *Soil biology and biochemistry*, 147, 107838.

D'souza, G, Shitut, S., Preussger, D., Yousif, G., Waschina, S., & Kost, C. (2018). Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Natural product reports*, 35(5), 455-488.

Dubey, M. K., Aamir, M., Zehra, A., Yadav, M., Kumari, P., gajbhiye, M. H., & Upadhyay, R. S. (2022). Morpho-molecular identification, characterization and management of *Pythium catenulatum*, the causative agent of root rot disease in *Phaseolus vulgaris* (common bean). *Journal of phytopathology*, 171(2-3), 92-109. <https://doi.org/10.1111/jph.13156>.

Dutta, P., & Deb, I. (2020). An innovative technique for artificial inoculation of *Rhizoctonia solani* kuhn for field experiments. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 9(12), 1077-1085. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.912.129>.

El-Shewy, E. (2019). The efficacy of copper oxide, tri-calcium phosphate and silicon dioxide nanoparticles in controlling black scurf disease of potato. *Annals of agricultural science, moshtohor*, 57(1), 129-138. <https://doi.org/10.21608/assjm.2019.42223>.

Enciso-Maldonado, G. A., Sanabria-velázquez, A. D., Schlickmann-Tank, J. A., & Maidana-Ojeda, M. (2021). Una carrera contra la pérdida de la eficacia de fungicidas: 20 años de manejo de la roya asiática de la soja en paraguay. *Investigaciones y estudios-una, san lorenzo*, 12(2), 59-61.

Esquivel, G. L., Aranguré, A. B., Campos, O. C., Velasco, C. R., Crespo, E. C., & Ayón, C. C. (2019). Evaluación in vitro de microorganismos antagonistas y fungicidas contra *Colletotrichum theobromicola* delacr, causante de antracnosis en inflorescencias de guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista bio ciencias*, 6, 13-pág.

Feng, H., Chen, J., Yu, Z., Li, K., Li, Z., Li, Y., & Zheng, X. (2020). Pathogenicity and fungicide sensitivity of *Pythium* and *Phytophthora spp.* associated with soybean in the Huang-Huai region of China. *Plant Pathology*, 69(6), 1083-1092. <https://doi.org/10.1111/ppa.13187>.

Fitzgerald, S., Duffy, E., Holland, I., & Morrin, A. (2020). Multi-strain volatile profiling of pathogenic and commensal cutaneous bacteria. *Scientific reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74909-w>.

Flore, M. P. T., Martial, T. T. P., Ebenezer, F. T., Aristide, D., Annie, E. C., Désire, M. H., & Thaddée, B. (2023). Formulation of Biofungicides from *Cymbopogon citratus* and *Tithonia diversifolia*: Evaluating Its Antimicrobial Activities against *Pythium myriotylum*, the Causal Agent of Root Rot of *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. *American Journal of Plant Sciences*, 14(8), 896-914. <https://doi.org/10.4236/ajps.2023.148060>.

Food and agriculture organization of the united nations. Faostat: soybean production. 2024, [www.fao.org/faostat/en/#data](http://www.fao.org/faostat/en/#data). Accedido el 16 septiembre 2024.

Gade, A. (2023). Fungus mediated copper oxide nanoparticles against fungi isolated from soft-rot infected ginger. *Kavaka*, 59(4), 56-61. <https://doi.org/10.36460/kavaka/59/4/2023/56-61>.

Garcia-Marin, I. E., Juarez-Moreno, K., Vilchis-Nestor, A. R., & Castro-Longoria, E. (2022). Highly antifungal activity of biosynthesized copper oxide nanoparticles against *Candida albicans*. *Nanomaterials*, 12(21), 3856. <https://doi.org/10.3390/nano12213856>.

García-Rodríguez, J. C., Morishita, M., Kato, M., & Yamanaka, N. (2017). Características patogénicas de la roya asiática de la soya (*Phakopsora pachyrhizi*) en México. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(2). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1701-5>.

Giachero, M. L., Declerck, S., & Marquez, N. (2022). *Phytophthora* root rot: importance of the disease, current and novel methods of control. *Agronomy*, 12(3), 610. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030610>.

Gibbons, J., & Geetha-Loganathan, P. (2019). Processing embryo, eggshell, and fungal culture for scanning electron microscopy. *Journal of visualized experiments*, 150. <https://doi.org/10.3791/60018>.

Gionco, B., Tavares, E. R., de Oliveira, A. G., Yamada-Ogatta, S. F., Carmo, A. O. D., de Pádua Pereira, U., Chideroli, R. T., Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., Chryssafidis, A. L., & Andrade, g. (2017). New insights about antibiotic production by *Pseudomonas aeruginosa*: a gene expression analysis. *Frontiers in chemistry*, 5. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00066>

Gokulan, Kuppan & Khare, Sangeeta & Cerniglia, C. (2014). Metabolic pathways: production of secondary metabolites of bacteria. 10.1016/b978-0-12-384730-0.00203-2.

Gómez, D. L. F., Guerrero, K. V. O., Mérida, M. J. M., Bonilla, S. J., & Herrera, I. E. O. (2021). Manual de producción de semilla de calidad de soya en los valles interandinos de Colombia. En *corporación colombiana de investigación agropecuaria (agrosavia) ebooks*. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.manual.7404876>.

Gomzhina, M. M., Gasich, E. L., & Gannibal, P. B. (2024). *Cercospora* species associated with soybean diseases in Russia. *Mycological progress*, 23(1). <https://doi.org/10.1007/s11557-024-01960-6>.

Gondal, A. S., Rauf, A., & Naz, F. (2019). Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* associated with tomato foot rot in Pothohar region of Pakistan. *Scientific reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40043-5>.

González-Molotla, I. A., Félix-Gastélum, R., Leyva-Madriral, K. Y., Quiroz-Figueroa, F. R., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2021). Etiología de la mancha foliar en soya (*Glycine max*) en Sinaloa, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(3), 371-390. 2021. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2105-2>.

González-Ramírez, A. I., Ramírez-Granillo, A., Medina-Canales, M. G., Rodríguez-Tovar, A. V., & Martínez-Rivera, M. Á. (2016). Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. *Bmc microbiology*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0859-4>.

González-Tobón, J., Childers, R., Olave, C., Regnier, M., Rodríguez-Jaramillo, A., Fry, W., & Danies, G. (2020). Is the phenomenon of mefenoxam-acquired resistance in *Phytophthora infestans* universal? *Plant disease*, *104*(1), 211-221.

Goss, M., Mafongoya, P., & Gubba, A. (2017). *Moringa oleifera* extracts effect on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* growth. *Asian research journal of agriculture*, *6*(1), 1-10. <https://doi.org/10.9734/aria/2017/29835>.

Goulart, A. C. P. (2022). Effectiveness of fungicide seed treatment in the control of soybean seedling dampingoff caused by *Rhizoctonia solani* under greenhouse conditions. *Summa phytopathologica*, *48*(3), 121-125. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/266033>.

Grijalba, P. E., & Ridao, A. (2017). Control químico de *Pythium spp.* En plántulas de soja. *Ria. Revista de investigaciones agropecuarias*, *43*(1), 67-71. <http://www.redalyc.org/pdf/864/86451165010.pdf>.

Guillén, G. L., & López, I. C. (2023). Bioecología, comportamiento y control del picudo de la soya. *Temas de ciencia y tecnología*, *27*(81).

Gupta, S., Chaturvedi, P., Kulkarni, M. G., & Van staden, J. (2020). A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. *Biotechnology advances*, *39*, 107462. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107462>.

Gutiérrez-Venegas, G. (2018). Flavonoides en el tratamiento de la hipertensión en pacientes geriátricos. *Revista médica del instituto mexicano del seguro social*, *56*(s1), 94-101

Henciya, S., Dinakaran, V. T., Sakthivel, B., Somasundaram, M., Kaviarasan, T., Devendiran, V., Dahms, H., & Rathinam, A. J. (2022). Bioactive efficacy of novel carboxylic acid from halophilic *Pseudomonas aeruginosa* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Metabolites*, *12*(11), 1094. <https://doi.org/10.3390/metabo12111094>.

Hermida-Montero, L. A., Pariona, N., Mtz-Enriquez, A. I., Carrión, G., Paraguay-Delgado, F., & Rosas-Saito, G. (2019). Aqueous-phase synthesis of nanoparticles of copper/copper oxides and their antifungal effect against *Fusarium oxysporum*. *Journal of hazardous materials*, *380*, 120850. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120850>.

Hofmann, I., Hirsch, M., & Ruthstein, S. (2021). Advances in understanding of the copper homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, *22*(4), 2050. <https://doi.org/10.3390/ijms22042050>.

Hossain, M. M., Sultana, F., Yesmin, I., Rubayet, M. T., Abdullah, H. M., Siddique, S. S., Bhuiyan, M. A. B., & Yamanaka, N. (2024). Understanding *Phakopsora pachyrhizi* in soybean:

comprehensive insights, threats, and interventions from the asian perspective. *Frontiers in microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1304205>.

Hosseini, B., Voegelé, R. T., & Link, T. I. (2023). Diagnosis of soybean diseases caused by fungal and oomycete pathogens: existing methods and new developments. *Journal of fungi*, 9(5), 587. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-49856-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-49856-6_13).

Huzar-Novakowski, J., & Dorrance, A. E. (2018). Genetic diversity and population structure of *Pythium irregulare* from soybean and corn production fields in ohio. *Plant disease*, 102(10), 1989-2000. <https://doi.org/10.1094/pdis-11-17-1725-re>.

Lavilla, M., & Ivancovich, A. (2016). Propuestas de escalas para la evaluación, a campo y en laboratorio, del “tizón foliar” y la “mancha púrpura de la semilla”, causadas por *Cercopora kikuchii*, en soja. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. <https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/handle/20.500.12123.666>.

Jaaffar, A. K. M., Paulitz, T. C., Schroeder, K. L., Thomashow, I. S., & Weller, D. M. (2016). Molecular characterization, morphological characteristics, virulence, and geographic distribution of rhizoctonia spp. In washington state. *Phytopathology*, 106(5), 459-473. <https://doi.org/10.1094/phyto-09-15-0208-r>.

Jiménez-Pérez, O., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo, F. D., Cepeda-Siller, M., & Espinoza-Ahumada, C. A. (2022). Characterization and pathogenicity of a *Pythium aphanidermatum* isolate causing ‘damping off’ in pepper seedlings. *Revista mexicana de fitopatología*, 40(1), 116-130. 2022.<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2109-3>.

Júnior, M. B., Resende, M. L., Pozza, E. A., Botelho, D. M., Cardoso, A. M., Siqueira, C. S., ... & Guimarães, S. S. (2020). qPCR-based detection of *Colletotrichum truncatum* in soybean seeds. *Tropical Plant Pathology*, 45, 550-555. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00380-7>.

Kalantary, R. R., Barzegar, G., & Jorfi, S. (2022). Monitoring of pesticides in surface water, pesticides removal efficiency in drinking water treatment plant and potential health risk to consumers using monte carlo simulation in behbahan city, Iran. *Chemosphere*, 286, 131667. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131667>.

Karkee, A., & Mandal, D. L. (2020). Efficacy of fungicides against *Rhizoctonia solani* inciting rhizome rot diseases on large cardamom (*Amomum subulatum* roxb.). *International journal of applied sciences and biotechnology*, 8(1), 61-64. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v8i1.27240>.

Karlekar, A., & Seal, A. (2020). Soynet: soybean leaf diseases classification. *Computers and electronics in agriculture*, 172, 105342. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105342>.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Kaur, R., Mavi, G. K., & Raghav, S. (2019). Bioremediation of sludge using *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 8(04), 69-79. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.804.009>

Kenney, G. E., & Rosenzweig, A. C. (2018). Chalkophores. *Annual review of biochemistry*, 87(1), 645-676. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012300>.

Kerbauy, G., CP Vivan, A., C Simões, G., S Simionato, A., Pelisson, M., C Vespero, E., & Andrade, G. (2016). Effect of a metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(4), 389-397. <https://doi.org/10.2174/138920101704160215171649>.

Keswani, C., Singh, H. B., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y. W., Mezaache-Aichour, S., & Sansinenea, E. (2020). Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(3), 1013-1034. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10300-8>.

Klaus, J. R., Coulon, P. M., Koirala, P., Seyedsayamdost, M. R., Déziel, E., & Chandler, J. R. (2020). Secondary metabolites from the *Burkholderia pseudomallei* complex: structure, ecology, and evolution. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology: Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(9-10), 877-887. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02317-0>.

Kontomina, E., Garefalaki, V., Fylaktakidou, K. C., Evmorfidou, D., Eleftheraki, A., Avramidou, M., & Boukouvala, S. (2022). A taxonomically representative strain collection to explore xenobiotic and secondary metabolism in bacteria. *Plos one*, 17(7), e0271125.

Kowalska-krochmal, B., & Budek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>.

Kumari, S & Prajapati, Priyanka & Andhare, Prasad & Upadhyay, Dhvani. (2021). Microbial secondary metabolites. *International journal of biology, pharmacy and allied sciences*. 10. 488-496. 10.31032/ijbpas/2021/10.4.1056.

Lago, M. E., Rojo, R. A., Magnano, I. I., Huarte, F., Menegazzo, M., Biscayart, J., & Gasoni, I. (2016). Control de *Rhizoctonia solani* en soya con formulaciones de *Trichoderma harzianum* con disitntos periodos de almacenamiento.

Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., Hamss, H. E., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological control of plant pathogens: a global perspective. *Microorganisms*, 10(3), 596. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>.

Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., & Aubertot, J. N. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. *A review. Agronomy for sustainable development*, 38(3), 28.

Lavilla, M., & Peper, A. (2024). Evolución de la mancha marrón (*Septoria glycines*) en diferentes sistemas de producción de soja (*Glycine max*). *Agronomía Mesoamericana*, 35(1). <https://doi.org/10.15517/am.2024.54632>.

Lavilla, M., Ivancovich, A., & Paleo, A. D. (2021). Evaluación del tizón foliar y la mancha púrpura en semilla de soja en argentina. *Agronomía mesoamericana*, 32(2), 619-628.

Le, D. P., Smith, M. K., & Aitken, E. A. B. (2016). An assessment of *Pythium spp.* Associated with soft rot disease of ginger (*Zingiber officinale*) in queensland, Australia. *Australasian plant pathology*, 45(4), 377-387. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0424-5>.

Les, N., Henneberg, I., Nadal, V. G. R., Müller, M. M. L., Szemocoviaki, A. G., Carneiro, F. T., & de Souza Jaccoud Filho, D. (2020). Controle de *Rhizoctonia solani* com produtos biológicos no tratamento de sementes na cultura da soja/ control of *Rhizoctonia solani* with biological products in the seed treatment in soybean. *Brazilian journal of development*, 6(12), 99919-99935. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-470>.

Li, N., Zhou, Q., Chang, K., Yu, H., Hwang, S., Conner, R. L., Strelkov, S. E., McLaren, D. L., & Turnbull, G. D. (2019). Occurrence, pathogenicity and species identification of *Pythium* causing root rot of soybean in alberta and manitoba, Canada. *Crop protection*, 118, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.12.009>.

Lin, F., Chhapekar, S. S., Vieira, C. C., da Silva, M., Rojas, A., Lee, D., Liu, N., Pardo, E. M., Lee, Y., Dong, Z., Pinheiro, J. B., Ploper, I. D., Rupe, J. C., Chen, P., Wang, D., & Nyuyen, H. T. (2022). Breeding for disease resistance in soybean: a global perspective. *Theoretical and applied genetics*, 135(11), 3773-3872. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04101-3>.

Llases, M. E., Morgada, M. N., & Vila, A. J. (2019). Biochemistry of copper site assembly in heme-copper oxidases: a theme with variations. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3830. <https://doi.org/10.3390/ijms20153830>.

Long, D., Fu, R., & Han, J. (2017). Tolerance and stress response of *Sclerotigenic aspergillus oryzae* g15 to copper and lead. *Folia microbiologica*, 62(4), 295-304. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0494-y>.

López-Cardona, N., Guevara, Y. A., & Gañán, I. (2020). First report of target spot of soybean caused by *Corynespora cassiicola* in the colombian eastern plains. *Plant disease*, 10.1094/pdis-07-20-1586-pdn. Advance online publication. <https://doi.org/10.1094/pdis-07-20-1586-pdn>.

López-Casallas, M., Guevara-Castro, Y. A., Pisco-Ortíz, Y. C., Cabrera, I. M., & López-Cardona, N. (2020). Pudrición de raíces y tallo de la soya por *Phytophthora sojae* kaufm. & gerd. En la altillanura plana del departamento del meta. *Summa phytopathologica*, 46(2), 113-120. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/230356>.

Lozano, M.A.M., & Pichón, J.P.Z. (2018). Ecología y aplicaciones de metabolitos secundarios de los géneros dictyota, padina y sargassum (phaeophyta). *Ciencia e ingeniería*, 5(1): e065-e065, issn: 2389-9484. [Http://revistas.uniguajira.edu.co/rev/index.php/cei/article/view/117](http://revistas.uniguajira.edu.co/rev/index.php/cei/article/view/117).

Machaca, G. C., & Calle, B. H. (2017). Comportamiento agronómico de ocho variedades de soya (*Glycine max*) en relación a tres densidades de siembra, en Alto Beni-La Paz: Gonsalo Chipana Machaca; Braulio H. Calle M. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 4(2), 37-47. <https://doaj.org/article/1CD585FBE0D7488494B59FEB0BAE58A3>.

Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V., & Brakhage, A. A. (2016). Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annual review of genetics*, 50(1), 371-392. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>.

Maldonado, G. A. E., & Gamarra, M. A. F. (2021). *Cercospora kikuchii* ¿patógeno potencial de la soya? *Revista impacto*, 1(1), 69-72.

Manjarrez, P. E. J., Miranda, P. N. M. Á., & Bejarano, U. P. (2020). Biología de protistas y algas: laboratorio y campo (colección «textos académicos» no 135) (1.a ed.). Universidad de sonora.

Martinenko, N. V., Lavrent'yeva, S. I., Tarasova, O. N., & иваченко, л. Е. (2021). Effect of *Septoria* on the specific activity of *Glycines max* (l.) Merr hydrolases. Iop conference series. Earth and environmental science, 677(5), 052089. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/677/5/052089>.

Matthiesen, R. L., & Robertson, A. E. (2021). Comparison of aggressiveness and fungicide sensitivity of four *Pythium spp.* That cause damping-off of soybean in the united states. *Canadian journal of plant pathology*, 43(5), 769-782. <https://doi.org/10.1080/07060661.2021.1881162>.

Matthiesen, R. L., ahmad, A. A., & Robertson, A. E. (2016). Temperature affects aggressiveness and fungicide sensitivity of four *Pythium spp.* That cause soybean and corn damping off in iowa. *Plant disease*, 100(3), 583-591. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-15-0487-re>.

Mccabe, C. E., & Graham, M. A. (2020). New tools for characterizing early brown stem rot disease resistance signaling in soybean. *THE æplant genome*, 13(3). <https://doi.org/10.1002/tpg2.20037>.

McCoy, A. G., Belanger, R. R., Bradley, C. A., Cerritos-Garcia, D. G., Garnica, V. C., Giesler, L. J., ... & Chilvers, M. I. (2023). A global-temporal analysis on *Phytophthora sojae* resistance-gene efficacy. *Nature communications*, *14*(1), 6043. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41321-7>.

Mederos-Ramírez, A., & Ortiz-Pérez, R. (2021). Análisis de la interacción genotipo ambiente en el cultivo de la soya (*Glycine max* (l) merrill). *Cultivos tropicales*, *42*(1), 10. <https://doi.org/10.1234/ct.v42i1.1584>.

Meena, R. P., Kalariya, K. A., Saran, P. L., & Roy, S. (2019). Efficacy of fungicides and biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* causes damping off disease in ashwagandha (*withania somnifera* l. Dunal). *Medicinal plants*, *11*(4), 404. <https://doi.org/10.5958/0975-6892.2019.00052.2>.

Melzer, Yu, H., Labun, T. J., Dickson, A., & Boland, G. J. (2016). Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. From field crops in canada. *Canadian journal of plant pathology*, *38*(3), 367-374. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1199596>.

Mena, E., Stewart, S., Montesano, M., & de León, I. P. (2020). Soybean stem canker caused by *Diaporthe caulivora*; pathogen diversity, colonization process, and plant defense activation. *Frontiers in plant science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01733>.

Mir, A. R., Pichtel, J., & Hayat, S. (2021). Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of cu-contaminated soil. *Biometals*, *34*(4), 737-759. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00306-z>.

Molin, C., Ribeiro, N. R., Matusomoto, M. N., Lütkemeyer, A. J., Bordignon, K. B., Ferreira, M. L. B., Barbieri, M., Deuner, C. C., & Huzar-Novakowski, J. (2021). Seed treatment for controlling damping-off caused by *Globisporangium irregulare* and *Globisporangium ultimum* var. *Sporangiiferum* in soybean from southern brazil. *Crop protection*, *149*, 105782. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105782>.

Molina, J. P. E., Navarro, B. L., Allen, T., & Godoy, C. V. (2022). Soybean target spot caused by *Corynespora cassiicola*: a resurgent disease in the americas. *Tropical plant pathology*, *47*(3), 315-331. <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00495-z>.

Montoya, B. P., Chávez, M. C., Alcivar, J. A., & Robles, A. J. (2024). Efectos antifúngicos de extractos botánicos sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. A nivel in vitro, causante de antracnosis en la fruta de aguacate. *593 digital publisher ceit*, *9*(1), 869-879.

Moraes, D., Rodrigues, J. G. C., Silva, M. G., Soares, L. W., de Almeida Soares, C. M., Bailão, A. M., & Silva-Bailão, M. G. (2023). Copper acquisition and detoxification machineries are conserved in dimorphic fungi. *Fungal Biology Reviews*, *44*, 100296. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.11.004>.

Mu, H., Wang, K., Yang, X., Xu, W., Liu, X., Ritsema, C., & Geissen, V. (2022). Pesticide usage practices and the exposure risk to pollinators: a case study in the north China plain. *Ecotoxicology and environmental safety*, 241, 113713. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113713>.

Munhoz, I. D., Fonteque, J. P., Santos, I. M. O. D., Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., goya, E. T., Rezende, M. I., Balbi-Peña, M. I., de Oliveira, A. G., & Andrade, A. (2017). Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* lv strain. *Cogent food & agriculture*, 3(1), 1282592. <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1282592>.

Muthukumar, A., Udhayakumar, R., & Naveenkumar, R. (2016). Eco friendly management of damping-off of solanaceous crops caused by *Pythium* species. *En fungal biology* (pp. 49-90). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9_3).

Navarro, M. O. P., Dilarri, G., Simionato, A. S., Grzegorzcyk, K. G., Dealis, M. L., Cano, B. G., Barazetti, A. R., Afonso, I., Chryssafidis, A. L., Ferreira, H., & Andrade, G. (2020). Determining the targets of fluopsin c action on gram-negative and gram-positive bacteria. *Frontiers in microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01076>.

Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., Pérez, J. C. B., Barazetti, A. R., Emiliano, J., Niekawa, E. T. G., ... & Andrade, G. (2019). Fluopsin C for treating multidrug-resistant infections: in vitro activity against clinically important strains and in vivo efficacy against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2431. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02431>.

Neves, D. L., Wang, A., Weems, J. D., Kelly, H., Mueller, D. S., Farman, M. L., & Bradley, C. A. (2022). Identification of *Septoria glycines* isolates from soybean with resistance to quinone outside inhibitor fungicides. *Plant disease*, 106(10), 2631-2637. <https://doi.org/10.1094/pdis-08-21-1836-re>.

Nguyen, T. D., Nguyen, H. T., Phung, H. T., Nguyen, T. K., & Nguyen, D. P. (2024). Investigating the antifungal activity of the pectin-stabilized copper nanoparticles against *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani*. *International journal of environmental science and technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-024-05737-y>.

Okello, P. N., Petrovic, K., Singh, A. K., Kontz, B., & Mathew, F. M. (2020). Characterization of species offusariumcausing root rot of soybean (*Glycine max* l.) In south dakota, usa. *Canadian journal of plant pathology*, 42(4), 560-571. <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1746695>.

Oussou-Azo, A. F., Nakama, T., Nakamura, M., Futagami, T., & Vestergaard, M. C. (2020B). Antifungal potential of nanostructured crystalline copper and its oxide forms. *Nanomaterials*, 10(5), 1003. <https://doi.org/10.3390/nano10051003>.

Oyarvide-Ramírez, H., Arce-Olivo, T., Loor-Reasco, W., & Quiñónez Monrroy, G. (2023). La soya en Ecuador: importancia y alternativas para su producción sustentable con rentabilidad económica. *Agroalimentaria Journal-Revista Agroalimentaria*, 28(55), 19-38.

Pagano, M. C., & Miransari, M. (2016). The importance of soybean production worldwide. *Elsevier ebooks (pp. 1-26)*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801536-0.00001-3>.

Paliwal, K., Jajoo, A., Tomar, R. S., Prakash, A., Syed, A., Bright, J. P., & Sayyed, R. Z. (2023). Enhancing biotic stress tolerance in soybean affected by *Rhizoctonia solani* root rot through an integrated approach of biocontrol agent and fungicide. *Current microbiology*, 80(9). <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03404-y>.

Palmer, I. D., & Skaar, E. P. (2016). Transition metals and virulence in bacteria. *Annual review of genetics*, 50(1), 67-91. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035146>.

Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, I., & Cheng, Y. (2021). Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. *Frontiers in plant science*, 12, 621276. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276>.

Parakhia, M. V. (2017). Application of scanning electron microscope in agriculture. *New Delhi: MedCrave Group LLC, India*, 29, 1-27.

Pariona, N. (2018). Síntesis de nanopartículas de cobre para el control de hongos fitopatógenos. *Revista eciperú*, 15(2), 8-8.

Patel, J. V., & Singh, A. (2020). Compatibility of *Trichoderma spp.* with fungicides and efficiency against *Rhizoctonia solani*. *International journal of chemical studies*, 8(2), 2254-2257. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2ah.9086>.

Patel, S., & Sangeeta, S. (2018). Pesticides as the drivers of neuropsychotic diseases, cancers, and teratogenicity among agro-workers as well as general public. *Environmental science and pollution research international*, 26(1), 91-100. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3642-2>.

Patiño-Moscoso, M. A., Osorio-Guerrero, K. V., Flórez-Gómez, D. L., Sarmiento-Moreno, I. F., & Vargas-Ramírez, D. N. (2023). Identificación molecular y prevalencia de contaminantes fúngicos en semillas de cultivos semestrales. *Scientia agropecuaria*, 14(3), 347-358.

Patteson, J. B., Putz, A. T., Tao, I., Simke, W. C., Bryant, I. H., 3RD, Britt, R. D., & Li, b. (2021). Biosynthesis of fluopsin c, a copper-containing antibiotic from *Pseudomonas aeruginosa*. *Science (new york, n.y.)*, 374(6570), 1005–1009. <https://doi.org/10.1126/science.abj6749>.

Paul, C., & Walker, D. R. (2022). Aggressiveness of isolates of five *Pythium* species on seeds and seedlings of six north american soybean cultivars. *Canadian journal of plant pathology*, 44(4), 596-614. <https://doi.org/10.1080/07060661.2022.2036814>

Pazos-Rojas, I. A., Marín-Cevada, V., Elizabeth, Y., García, M., & Baez, A. (2016). Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. *Revista iberoamericana de ciencias*, 3(7), 72-85.

Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, 36(2), 180-189. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180>.

Pérez, D. H., Castellanos, M. D., Ramos, R. Q., Bermúdez, R. S., González, N. P., & Isla, I. H. (2018). Control de *Rhizoctonia solani* en frijol común con rizobacterias y productos naturales. *Centro agrícola*, 45(2), 55-60. <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v45n2/cag08218.pdf>.  
Pérez, I., Farías, I. G., Silvero, O. R., Maidana, E., Villalba, A., Perdomo, G., & Rojas, P. (2023). Influence of colletotrichum truncatum on the physiological and chemical quality in different varieties of soy seed. *Agricultural sciences*, 14(10), 1393-1404. <https://doi.org/10.4236/as.2023.1410091>.

Petrova, Y. D., & Mahenthalingam, E. (2022). Discovery, mode of action and secretion of *Burkholderia* sensu lato key antimicrobial specialised metabolites. *The cell surface*, 8, 100081. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2022.100081>

Pham, N., Duong, M., Le, M., Hoang, H. A., & Pham, I. (2019). Preparation and characterization of antifungal colloidal copper nanoparticles and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici*. *Comptes rendus. Chimie*, 22(11-12), 786-793. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2019.10.007>.

Pineda-Insuasti, J. A., Gómez-Andrade, W. E., Duarte-Trujillo, A. S., Soto-Arroyave, C. P., Pineda-Soto, C. A., Fierro-Ramos, F. J., Mora-Muñoz, E. S., & Álvarez-Ramos, S. E. (2017). Producción de *Pycnoporus spp.* Y sus metabolitos secundarios: una revisión. *Icidca. Sobre los derivados de la caña de azúcar*, 51(2), 60-69. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223154251010>.

Pineda-Mendoza, D. Y., González-Mancilla, A., Almaraz, J. J., Rodríguez-Guzmán, M. P., García-Barradas, O., & Argumedo-Delira, R. (2019). Characterization of the antifungal activity of three rhizobacterial strains against *Rhizoctonia solani*. *Spanish journal of agricultural research*, 16(4), e1011. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018164-13334>.

Pinzón-Junca, A. (2019). *Pseudomonas*. *Acta medica colombiana*, 44(1), 52. Epub June 12, 2019. Retrieved October 22, 2023, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?Script=sci\\_arttext&pid=s0120-24482019000100052&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=s0120-24482019000100052&lng=en&tlng=es).

Pistori, J. F., Simionato, A. S., Navarro, M. O., Andreato, M. F., Santos, I. M., Meneguim, I., & Andrade, G. (2018). Low-molecular-weight metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* as an alternative to control Huanglongbing in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Tropical plant pathology*, 43, 289-296.

Ponmurugan, P., Manjukarunambika, K., Elango, V., & Gnanamangai, B. M. (2016). Antifungal activity of biosynthesised copper nanoparticles evaluated against red root-rot disease in tea plants. *Journal of experimental nanoscience*, *11*(13), 1019-1031. <https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1184766>.

Porto, M. A. F., de Queiroz Ambrósio, M. M., de Carvalho Nascimento, S. R., da Cruz, B. L. S., & Torres, T. M. (2019). Interaction of *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* as root rot pathogens of cucumis melo. *Summa phytopathologica*, *45*(4), 355-360. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/182687>.

Prakash, B., Kedia, A., Singh, A., Yadav, S., Singh, A., Yadav, A., & Dubey, N. K. (2016). Antifungal, antiaflatoxin and antioxidant activity of plant essential oils and their in vivo efficacy in protection of chickpea seeds. *Journal of Food Quality*, *39*(1), 36-44. <https://doi.org/10.1111/jfq.12168>

Prasad, R., Gupta, N., Kumar, M., Kumar, V., Wang, S., & Abd-Elsalam, K. A. (2017). Nanomaterials act as plant defense mechanism. *En springer ebooks* (pp. 253-269). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4678-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4678-0_14).

Qadri, H., Shah, A. H., Ahmad, S. M., Alshehri, B., Almilaibary, A., & Mir, M. A. (2022). Natural products and their semi-synthetic derivatives against antimicrobial-resistant human pathogenic bacteria and fungi. *Al-mi'galat' al-sa'udiyat' li-ulum al-hayat'*, *29*(9), 103376. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103376>.

Quintana, J., Novoa-Aponte, I., & Argüello, J. M. (2017). Copper homeostasis networks in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of biological chemistry*. *The journal of biological chemistry*, *292*(38), 15691-15704. <https://doi.org/10.1074/jbc.m117.804492>.

Radmer, I. E., Anderson, G. B., Malvick, D., Kurle, J. E., Rendahl, A., & Mallik, A. (2017). *Pythium*, *Phytophthora*, and *Phytophthora* spp. Associated with soybean in Minnesota, their relative aggressiveness on soybean and corn, and their sensitivity to seed treatment fungicides. *Plant disease*, *101*(1), 62-72. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-16-0196-re>.

Raffa, N., Osharov, N., & Keller, N. P. (2019). Copper utilization, regulation, and acquisition by *Aspergillus fumigatus*. *International journal of molecular sciences*, *20*(8), 1980. <https://doi.org/10.3390/ijms20081980>

Rampazo, I. G. L. (2004). Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. Master's, universidade estadual de londrina.

Rangel-Ortiz, E., Landa-Cansigno, O., Páramo-Vargas, J., & Camarena-Pozos, D. A. (2023). Prácticas de manejo de plaguicidas y percepciones de impactos a la salud y al medio ambiente entre usuarios de la cuenca del río turbio, Guanajuato, México. *Acta universitaria*, *33*, 1-26. <https://doi.org/10.15174/au.2023.3749>.

Raudales, R. E., & Mcgehee, C. (2016). *Pythium* root rot on hydroponic lettuce. *E-gro edible alert*, 1(4).

Reis, D., Pinto, H. S., & Lima, R. P. (2023). Controle químico de antracnose da cultura da soja: uma revisão da literatura. *Foco*, 16(11), e3607. <https://doi.org/10.54751/revistafoco.v16n11-091>.

Reis, E. M., Zanatta, T., & Zanatta, M. (2016). Curative and eradicator action of fungicides to control *Phakopsora pachyrhizi* in soybean plants. *Summa phytopathologica*, 42(4), 295-302. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2180>.

Ren, F., Logeman, B. L., Zhang, X., Liu, Y., Thiele, D. J., & Yuan, P. (2019). X-ray structures of the high-affinity copper transporter *ctr1*. *Nature communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09376-7>.

Reverchon, F., Escudero-Osorio, Y. S., Morteo-Zavaleta, J., Guevara-Avenidaño, E., & Ramírez-Vázquez, M. (2020). Inhibición de *Fusarium solani* por bacterias de la filósfera y rizósfera de árboles del bosque mesófilo de montaña. *Bioteología y sustentabilidad*, 5(1), 3-18.

Rezende, C. C., Silva, M. A., de Mello Frasca, I. L., Faria, D. R., de Filippi, M. C. C., Lanna, A. C., & Nascente, A. S. (2021). Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. *Research, society and development*, 10(2), e50810212725. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12725>.

Ribeiro, T. C., Weiblen, C., de Avila Botton, S., Pereira, D. I. B., de Jesus, F. P. K., Verdi, C. M., Gressler, I. T., Sangioni, I. A., & Santurio, J. M. (2016). In vitro susceptibility of the oomycete *Pythium insidiosum* to metallic compounds containing cadmium, lead, copper, manganese or zinc: table 1. *Medical mycology*, myw115. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw115>.

Robinson, J. R., Isikhuemhen, O. S., & Anike, F. N. (2021). Fungal–metal interactions: a review of toxicity and homeostasis. *Journal of fungi*, 7(3), 225.

Robles-García, M. A., Aguilar, A., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., del Río, J. M., Guerrero-Medina, P. J., Madrigal-Pulido, J. A., & del-Toro-Sánchez, C. L. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* Pittier) / qualitative identification of secondary metabolites and cytotoxicity determination of tempisque extracts. *Biotecnia*, 18(3), 3-8. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v18i3.328>.

Rodríguez, J. A. V., Samaniego, H. L. R., Lema, E. M. M., & Jiménez, J. D. N. (2020). Análisis epidemiológico de la toxicidad asociada a la utilización de plaguicidas en la parroquia Benítez. Dilemas contemporáneos: educación, política y valores.

Rojas, J. A., Jacobs, J. L., Napieralski, S., Karaj, B., Bradley, C. A., Chase, T., Esker, P. D., Giesler, I. J., Jardine, D. J., Malvick, D. K., Markell, S. G., Nelson, B. D., Robertson, A. E., Rupe,

J. C., Smith, D. L., Sweets, I. E., Tenuta, A. U., Wise, K. A., & Chilvers, M. I. (2017). Oomycete species associated with soybean seedlings in north america—part i: identification and pathogenicity characterization. *Phytopathology*, *107*(3), 280-292. <https://doi.org/10.1094/phyto-04-16-0177-r>.

Ross, M. O., Macmillan, F., Wang, J., Nisthal, A., Lawton, T. J., Olafson, B. D., Mayo, S. L., Rosenzweig, A. C., & Hoffman, B. M. (2019). Particulate methane monooxygenase contains only mononuclear copper centers. *Science*, *364*(6440), 566-570. <https://doi.org/10.1126/science.aav2572>.

Roth, M. G., Webster, R. K., Mueller, D. S., Chilvers, M. I., Faske, T., Mathew, F. M., Bradley, C. A., Damicone, J. P., Kabbage, M., & Smith, D. L. (2020). Integrated management of important soybean pathogens of the united states in changing climate. *Journal of integrated pest management*, *11*(1). <https://doi.org/10.1093/jipm/pmaa013>.

Ruiz-Cisneros, M. F., Rios-Velasco, C., Berlanga-Reyes, D. I., de Jesús Ornelas-Paz, J., Acosta-Muñiz, C. H., Romo-Chacón, A., Zamudio-Flores, P. B., Pérez-Corral, D. A., Salas-Marina, M. Á., Ibarra-Rendón, E., & Fernández-Pavía, S. P. (2017). Incidencia y agentes causales de enfermedades de raíz y sus antagonistas en manzanos de chihuahua, méxico. *Revista mexicana de fitopatología*, *35*(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1704-3>.

Ryzhenko, N. O., Kavetsky, S. V., & Kavetsky, V. M. (2018). Cd, zn, cu, pb, co, ni phytotoxicity assessment. *Polish journal of soil science*, *50*(2), 197. <https://doi.org/10.17951/pjss.2017.50.2.197>.

S., Hafeez, F. Y., Mirza, M. S., Rasul, M., Arshad, H. M. I., Zubair, M., & Iqbal, M. (2017). Biocontrol of bacterial leaf blight of rice and profiling of secondary metabolites produced by rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* brp3. *Frontiers in microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01895>.

Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental science and pollution research*, *23*, 3984-3999.

Salah, I., Parkin, I. P., & Allan, E. (2021). Copper as an antimicrobial agent: recent advances. *Rsc advances*, *11*(30), 18179-18186. <https://doi.org/10.1039/d1ra02149d>.

Sánchez, H. L. (2022). Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista digital universitaria*, *23*(2). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079E.2022.23.2.10>.

Sánchez, H. L. (2022). Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Hermes*, *23*(2).

Sánchez, R., and P. Guerra. "Pseudomonas spp. Benéficas en la agricultura." universidad autónoma chanpingo (2022): 715-725.

Santos, I. M. O. D., Abe, V. Y., de Carvalho, K. M. B., Barazetti, A. R., Simionato, A. S., de Almeida Pega, G. E., Matis, S. H., Cano, B. G., Cely, M. V. T., Marcelino-Guimarães, F. C., Chryssafidis, A. L., & Andrade, G. (2021). Secondary metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* lv strain decrease asian soybean rust severity in experimentally infected plants. *Plants*, 10(8), 1495. <https://doi.org/10.3390/plants10081495>.

Santos, R. A. A. D., D'addazio, V., Silva, J. V. G., Falqueto, A. R., da Silva, M. B., Schimdt, E. R., & Fernandes, A. A. (2019). Antifungal activity of copper, zinc and potassium compounds on mycelial growth and conidial germination of *Fusarium solani* f. Sp. Piperis. *Microbiology research journal international*, 1-11. <https://doi.org/10.9734/mrji/2019/v29i630179>.

Sautua, F., González, S., Doyle, V. P., Berretta, M. F., Gordo, M., Scandiani, M., Rivarola, M., Fernández, P., & Carmona, M. (2019). Draft genome sequence data of *Cercospora kikuchii*, a causal agent of cercospora leaf blight and purple seed stain of soybeans. *Data in brief*, 27, 104693. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104693>.

Senapati, M., Tiwari, A., Sharma, N., Chandra, P., Bashyal, B. M., Ellur, R. K., Bhowmick, P. K., Bollinedi, H., Vinod, K. K., Singh, A. K., & Krishnan, S. G. (2022). *Rhizoctonia solani* kühn pathophysiology: status and prospects of sheath blight disease management in rice. *Frontiers in plant science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881116>.

Serrano, M., mcduffee, D., & Robertson, A. E. (2018). Damping-off caused by *Pythium sylvaticum* on soybeans subjected to periods of cold stress is reduced by seed treatments. *Canadian journal of plant pathology*, 40(4), 571-579. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1522516>.

Servicio de informacion agroalimentaria y pesquera (11 de septiembre de 2024). precios internacionales de productos agrícolas septiembre 2023. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/879192/precios\\_internacionales\\_agricolas\\_sep2023.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/879192/precios_internacionales_agricolas_sep2023.pdf).

Shao, Z., & Duan, D. (2022). The cell wall polysaccharides biosynthesis in seaweeds: a molecular perspective. *Frontiers in plant science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.902823>.

Shende, S., Bhagat, R., Raut, R., Rai, M., & Gade, A. (2021). Myco-fabrication of copper nanoparticles and its effect on crop pathogenic fungi. *IEEE transactions on nanobioscience*, 20(2), 146-153. <https://doi.org/10.1109/tnb.2021.3056100>.

Shi, G., Yan, Y., Yu, Z., Zhang, L., Cheng, Y., & Shi, W. (2020). Modification-bioremediation of copper, lead, and cadmium-contaminated soil by combined ryegrass (*Lolium multiflorum* lam.) And *Pseudomonas aeruginosa* treatment. *Environmental science and pollution research international*, 27(30), 37668-37676. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09846-2>.

Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., de Jesus, M. L. A., Barazetti, A. R., da Silva, C. S., Simões, G. C., Balbi-Peña, M. I., de Mello, J. C. P., Panagio, I. A., Almeida, R. S., Andrade, G., & de

Oliveira, A. G. (2017). The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of botrytis cinerea produced by pseudomonas aeruginosa lv strain. *Frontiers in microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01102>.

Singh, B. P., Rateb, M. E., Rodriguez-Couto, S., Polizeli, M. D. L. T. D. M., & li, w. J. (2019). Microbial secondary metabolites: recent developments and technological challenges. *Frontiers in microbiology*, 10, 914.

Sjarpe, D. A., Kandel, Y. R., Chilvers, M. I., Giesler, I. J., Malvick, D. K., Mccarville, M. T., Tenuta, A. U., Wise, K. A., & Mueller, D. S. (2019). Multi-location evaluation of fluopyram seed treatment and cultivar on root infection by fusarium virguliforme, foliar symptom development, and yield of soybean. *Canadian journal of plant pathology*, 42(2), 192-202. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1666166>.

Skinider, M. A., Johnston, C. W., Gunabalasingam, M., Merwin, N. J., Kieliszek, A. M., Maclellan, R. J. & Magarvey, N. A. (2020). Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nature communications*, 11(1), 6058.

Smaili, A., Rifai, I. A., Esserti, S., Koussa, T., Bentiss, F., Guesmi, S., Laachir, A., & Faize, M. (2017). Copper complexes of the 1,3,4-thiadiazole derivatives modulate antioxidant defense responses and resistance in tomato plants against fungal and bacterial diseases. *Pesticide biochemistry and physiology*, 143, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.10.002>.

Smith, A. D., Logeman, B. L., & Thiele, D. J. (2017). Copper acquisition and utilization in fungi. *Annual review of microbiology*, 71(1), 597-623. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020444>

Su, S. S., Lae, K. Z. W., & Ngwe, H. (2018). Isolation and identification of pseudomonas aeruginosa from the clinical soil. *University of yangon res j*, 8, 270-5.

Taiti, C., Giorni, E., Colzi, I., Pignattelli, S., Bazihizina, N., Bucciatti, A., Luti, S., Pazzagli, I., Mancuso, S., & Gonnelli, C. (2016). Under fungal attack on a metalliferous soil: ros or not ros? Insights from silene paradoxa l. Growing under copper stress. *Environmental pollution*, 210, 282-292. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.020>.

Talubnak, C., Schoonbeek, H. J., Parinthawong, N., & Jaenaksorn, T. (2022). Morphological and molecular identification of *Pythium spp.* From hydroponically-grown lettuce. *Science & technology asia*, 143-154.

Tirado, E. A., & Duran, A. B. (2017). Inhibición de hongos fitopatógenos de guanábana (*Annona muricata*) mediante metabolitos secundarios de bacterias *Pseudomonas*. *Revista bio ciencias*, 4(5), 2-3. <https://doi.org/10.15741/336>.

Tonial, F., de Macedo Nava, F. F., Teixeira, D. M., Mar, T. B., Guerra, K. C. F., Gayger, A. L., Glienke, C., & Scortegagna, G. T. (2023). *Diaporthe endophytes* in the control of standard bacterial strains and clinical isolates. *Ensaos e ciência*, 26(4), 470-474. <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2022V26N4P470-474>.

Ttacca, B. L., & Calderon, I. M. (2016). Hongos fitopatógenos asociados a semillas de palto (*Persea americana mill.*). *Revista de investigaciones altoandinas*, 18(4), 423. <https://doi.org/10.18271/ria.2016.234>.

Tyc, O., Cui, S., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in microbiology*, 25(4), 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>.

Udompongsuk, M., Soyong, K., Kanokmedhakul, S., & Kanokmedhakul, K. (2018). In vitro efficacy of chaetomium brasiliense against *Pythium spp.* Causing root rot disease of tangerine. *International journal of agricultural technology*, 14, 2181-2190. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20193185774>.

Vaca-Sánchez, M. S., González-Rodríguez, A., Maldonado-López, Y., Fernandes, W. G., & Cuevas-Reyes, P. (2016). Importancia de los taninos en especies del género *Quercus* como metabolitos secundarios asociados a defensa contra insectos herbívoros. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 18(1), 10-20.

Valente, J., Fonseca, A., Denardi, I., Ben, V. D., Filho, F. M., Zambrano, C., Braga, C., Alves, S., Botton, S., & Pereira, D. B. (2016). In vitro activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*. *Journal of applied microbiology*, 121(4), 998-1003. <https://doi.org/10.1111/jam.13234>.

Valle, R. V., & Torres, I. R. R. (2018). Necrosis foliar; nuevo síntoma asociado a la pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum*) en durango y zacatecas, México. *Scientia fungorum*, 46. <https://doi.org/10.33885/sf.2017.46.1176>.

Van Der Heyden, H., Wallon, T., Lévesque, C. A., & Carisse, O. (2019). Detection and quantification of *Pythium tracheiphilum* in soil by multiplex real-time qPCR. *Plant disease*, 103(3), 475-483. <https://doi.org/10.1094/pdis-03-18-0419-re>.

Vargas, A., Paul, P. A., Winger, J., Balk, C., Eyre, M. M., Clevinger, B., Noggle, S., & Dorrance, A. E. (2022). Oxathiapiprolin alone or mixed with metalaxyl seed treatment for management of soybean seedling diseases caused by species of *Phytophthora*, *Phytophthora*, and *Pythium*. *Plant disease*, 106(8), 2127-2137. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-21-1952-re>

Vargas-González, G., de Paul Álvarez-Reyna, V., Guigón-López, C., Cano-Ríos, P., & García-Carrillo, M. (2019). Impacto ambiental por uso de plaguicidas en tres áreas de producción de melón en la comarca lagunera, México. *Ciencia*, 13(2), 113. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i2.1141>.

Vega Oliveros, C. (2016). Comparación de la producción de metabolitos secundarios bioactivos con dos fuentes de carbono en la fermentación líquida de una especie de pleurotus y su uso potencial en un alimento de tipo funcional (doctoral dissertation, universidad nacional de colombia).

Wang, C., Liu, X., Li, J., Yue, L., Yang, H., Zou, H., Wang, Z., & Xing, B. (2021). Copper nanoclusters promote tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Yield and quality through improving photosynthesis and roots growth. *Environmental pollution*, 289, 117912. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117912>.

Wang, J., Hu, X., Yang, C., Wu, X., Li, R., & Li, M. (2021). Growth restriction of *Rhizoctonia solani* via breakage of intracellular organelles using crude extracts of gallnut and clove. *Molecules* 26(6), 1667. <https://doi.org/10.3390/molecules26061667>.

Waters, J. E., Stevens-Cullinane, I., Siebenmann, I., & Hess, J. (2023). Recent advances in the development of metal complexes as antibacterial agents with metal-specific modes of action. *Current opinion in microbiology*, 75, 102347. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102347>.

Wei, B., Du, A., Zhou, Z., Lai, C., Yu, W., Yu, J., Yu, Y., Chen, J., Zhang, H., & Xu, X. (2021). An atlas of bacterial secondary metabolite biosynthesis gene clusters. *Environmental microbiology*, 23(11), 6981-6992. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15761>.

Wu, W., Ogawa, F., Ochiai, M., Yamada, K., & Fukui, H. (2020). Common strategies to control pythium disease. *Reviews in agricultural science*, 8, 58-69. [https://doi.org/10.7831/ras.8.0\\_58](https://doi.org/10.7831/ras.8.0_58)

Xiong, T., Dumat, C., Dappe, V., Vezin, H., Schreck, E., Shahid, M., Pierart, A., & Sobanska, S. (2017). Copper oxide nanoparticle foliar uptake, phytotoxicity, and consequences for sustainable urban agriculture. *Environmental science & technology*, 51(9), 5242-5251. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6B05546>.

Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Chambon, P., Dufour, M., Corio-Costet, M., Guyoneaud, R., & Rey, P. (2016). Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect vitis vinifera L., by inducing plant resistance against phaeomoniella chlamydospora, a pathogen involved in esca, a grapevine trunk disease. *Biological control*, 92, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.08.005>.

Yang, I., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.

Yang, I., Wen, K., Ruan, X., Zhao, Y., Feng, W., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules annual*, *23*(4), 762. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>.

Yeon, J., Park, A. R., Nguyen, H. T. T., Gwak, H., Kim, J., Sang, M. K., & Kim, J. (2022). Inhibition of oomycetes by the mixture of maleic acid and copper sulfate. *Plant disease*, *106*(3), 960-965. <https://doi.org/10.1094/pdis-07-21-1559-re>.

Zayed, M., El-Garawani, I., El-Sabbagh, S. M., Amr, B., Alsharif, S. M., Tayel, A. A., Alajmi, M. F., Ibrahim, H. M. S., Shou, Q., Khalifa, S. A. M., El-Seedi, H. R., & Elfeky, N. (2022). Structural diversity, lc-ms-ms analysis and potential biological activities of *Brevibacillus laterosporus* extract. *Metabolites*, *12*(11), 1102. <https://doi.org/10.3390/metabo12111102>.

Zhao, Y., Chang, X., Qi, D., Dong, I., Wang, G., Fan, S., Jiang, I., Cheng, Q., Chen, X., Han, D., Xu, P., & Zhang, S. (2017). A novel soybean erf transcription factor, gmerf113, increases resistance to *Phytophthora sojae* infection in soybean. *Frontiers in plant science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00299>.

Zhao, Y., Wang, X., Zhang, I., Wang, K., Wu, Y., Yao, J., Cui, B., & Chen, Z. (2022). Anti-fungal activity of moutan cortex extracts against rice sheath blight (*Rhizoctonia solani*) and its action on the pathogen's cell membrane. *Acs omega*, *7*(50), 47048-47055. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2C06150>.

Zhu, I., Zhou, Y., Li, X., Zhao, J., & Guo, N. (2018). Metabolomics analysis of soybean hypocotyls in response to phytophthora sojae infection. *Frontiers in plant science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01530>.

Zitnick-Anderson, K., Norland, J. E., del Río Mendoza, I. E., Fortuna, A., & Nelson, B. D. (2017). Probability models based on soil properties for predicting presence-absence of pythium in soybean roots. *Microbial ecology*, *74*(3), 550-560. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0958-2>.