



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA CEIB-UAEM

Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

ÁREA TERMINAL: BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en B. Ana Yuridia Ocampo Gutiérrez

Director de tesis:

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez

Codirector:

Dr. Pedro Mendoza de Gives

Cuernavaca, Morelos México 2021



Cuernavaca, Morelos, a 08 de febrero del 2021.

NOMBRAMIENTO DE COMISIÓN REVISORA DE TESIS DE GRADO

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (directo de tesis CEIB, UAEM)
Dr. Pedro Mendoza de Gives (codirector de tesis CENID-SAI)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB, UAEM)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB, UAEM)
Dra. Liliana Aguilar Marcelino (CENID-SAI)
Dr. Agustín Olmedo Juárez (CENID-SAI)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Por este conducto, me permito informarle que ha sido asignado integrante de la Comisión Revisora de tesis que presenta la **C. Ana Yuridia Ocampo Gutiérrez**, titulada: **“Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*”**, realizada bajo la dirección del DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ, en el Programa Educativo de Doctorado en Ciencias Naturales.

Agradezco su valiosa participación en esta Comisión y quedo a sus órdenes para cualquier aclaración o duda al respecto.

ATENTAMENTE

“Por una humanidad culta”

DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

Coordinador del Doctorado En Ciencias Naturales



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2021-02-08 19:56:29 | Firmante

h3n3aZBWAM16yGkrOskxNndJBtU/j2mVyAE3nSfwdS00TVnJOxseckbiBsHr2a7TN6U2hQPVAkby1pNfZLV0rK3OHdzUSjyY7AZ6li3Tsx2aldQc95H6/KJzULvWJYLnrYjbyqPEC1w9ML/I3lu9HukHg9RBQsW937pwQ8YHf+XluxedsA/niBb1mG35wcU5OIIWWC1rZp/Kzr786kpXY3pCzVQozoUKMnk4ePov/sS15607TAMKFotLWGB8gvb7RfwPJbyQX4JQkObfUGPWYStLIDbuv84hKdaEMNr16FaL4Hs1bZUveyY5x0d/CX6RPFveoTDPVMJuwreimNBwA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



AWM64g

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/2vvtwaAH0zhhWRLyFitWwPzSKfLkIge5>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Cuernavaca, Morelos, a 08 de febrero del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (directo de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (codirector de tesis CENID-SAI)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB, UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB, UAEM)

Dra. Liliana Aguilar Marcelino (CENID-SAI)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (CENID-SAI)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Tesis: “Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*”

Alumno que lo presenta a revisión: ANA YURIDIA OCAMPO GUTIÉRREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2021-02-22 09:23:33 | Firmante
NSr6PJnqQJ67wU4r3A6m5PFy9XsZxmw3fvicERA4dr+L4tNLqvinbOpqzAK9YfQwlq49YEcWy+coQaFZgtRX9Jzjq4/Bvau26BAuuWI2Ky2t69+AOKirhT38k1x1TDHqFbIR07eCZv
NVPkWwve3BjDko2QmWlZdspMztXPZJma9pV0werNf/114Ekgn8BoUjYrjhTHpHCRKe0Yeh6LL8bJG5v1fUYctt3xOGPpWphsNL25MTrCXletzFvN2Nb186bXaKIQoQ3IGHTB
03rD5IROeKfVnzYndDFvnJLnDCrBftbZP5+9ThgfM0mX9X/GVyWxa/SVTFfxWf0naqPEg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



56ICn2

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/T02NivRp7q0KNIZZDYAh92PS7CrMQSuP>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Cuernavaca, Morelos, a 08 de febrero del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (directo de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (codirector de tesis CENID-SAI)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB, UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB, UAEM)

Dra. Liliana Aguilar Marcelino (CENID-SAI)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (CENID-SAI)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Tesis: "Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*"

Alumno que lo presenta a revisión: ANA YURIDIA OCAMPO GUTIÉRREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. PEDRO MENDOZA DE GIVES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PEDRO MENDOZA DE GIVES | Fecha:2021-02-22 15:37:51 | Firmante

XR9lYPsJfIkRmRj0qleHieqR5D8LmKkwNY/F7y2tdWwwwV/obAHdIRK6/kb08x5SDV2QCdIS8TTaShE3gtw9mu6HFJKGRo89ir0SHOrrBlKy43dPQ7V2zH3OSLznK1HCXw2BqG
goX+GWxGnj6WYnm3na8xrk4dh0UVuCY71p7evGDOVrI4chlXj6UXbxTPftOauu3fAFufqEM5ePs1ezsrqJKcQzcTlBhSCXTpPk+4zwVGoRj8prAbbdCZEGUXVH/JnrNwSajifUsA
NZBGYEK78glONopSFVmKh1L+P4ijsDYbXT+itQeu4L+wgbP0F1NdpSL09OkGp2VTNixag==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

qfHQSn

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mPwr1Rjc7GLyVtcNBW52gq1VxXidFgNs>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Cuernavaca, Morelos, a 08 de febrero del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (directo de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (codirector de tesis CENID-SAI)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB, UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB, UAEM)

Dra. Liliana Aguilar Marcelino (CENID-SAI)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (CENID-SAI)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Tesis: "Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*"

Alumno que lo presenta a revisión: ANA YURIDIA OCAMPO GUTIÉRREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2021-02-22 15:38:03 | Firmante

XgeoD/PF/ltt1C3Bt33skIRgCIRsxyAhezwaqfvgK7cPxaDor49NLdZlKgakaC9cd0ojNkaTfFREp/CevCSBSLzPxUKfv/0+Klrq+ze/zugpyO60BiWaUXWycEb6cDikz:w455BjJD2Q//dF
Yiu8Cswv/f0IFclsBwNd6k4vAunb9/DTR7N1Kic5AYnV7GwhdLGE4uttQWspjkwLHYQYNowtXSWnXZkg1s4WUsVun9OCoJBazgL/ko2o614nrpcSndXWk5rwNcj4+G89idPxl0n3q
phZPq/AV3t9i5HX13csEkJ7TLGImcmbRAaaWPIG20H4QhyLORDyAbcuqbSMSw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



K7LFMx

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/f4hk6COswMEBumqL3MV0xPYcU6MizR0c>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORIA
2017-2023

Cuernavaca, Morelos, a 08 de febrero del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (directo de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (codirector de tesis CENID-SAI)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB, UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB, UAEM)

Dra. Liliana Aguilar Marcelino (CENID-SAI)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (CENID-SAI)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Tesis: “Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*”

Alumno que lo presenta a revisión: ANA YURIDIA OCAMPO GUTIÉRREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2021-02-22 18:18:52 | Firmante
JMS1CxDFSeg4gaSgPJQWqjXwZ112yUkJFn8a6cZfDhvLbllSYe1m4erf0Cr/Nm00ES3izMnOuMai2aEorELsJcLqtEZBDkVXuWe9nc+ElbCndDWeil3+nW8sMLKzVP6oGNeLD
u+GyxRaB5Wcu2lYJHa9191JG3mZ4ya0cHeQRuHEoEM8O19E/S/XdryS4ZjFYxPCE079nWafU2IBP31vYd2E1eTUzPUGIWxaZ3yyYsAVkJrdpnVwTSbU+S8ugv13yITeTOa+mgR
0szc7V/kb310n1uUBs32MdupHJn3mirNKoRO+ZUgLEn6uEEgZjokir2bAPORAJKbAFD/FI/Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



suYz5B

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EeOXA20P1SXMfWbpx65MIS6jAVchlW2N>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Cuernavaca, Morelos, a 08 de febrero del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (directo de tesis CEIB, UAEM)
Dr. Pedro Mendoza de Gives (codirector de tesis CENID-SAI)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB, UAEM)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB, UAEM)
Dra. Liliana Aguilar Marcelino (CENID-SAI)
Dr. Agustín Olmedo Juárez (CENID-SAI)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Tesis: "Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*"

Alumno que lo presenta a revisión: ANA YURIDIA OCAMPO GUTIÉRREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LILIANA AGUILAR MARCELINO | Fecha:2021-02-23 19:17:51 | Firmante
QSdeyeu/gUMv2dsghjWo3aEKvOhxXn08VxgD4EmtlOdSq+wkihnfLjFUD+KLDzEQUPxPgVn+hP+944UOTARdAwtm7sb0VQuO9u9HQ8uhR8PQO6/GtqARDIPU4jwalEpmw1c
dhp0Z4fjGmLA/sTUnSLnCD44eOXumVwmWHxYXxRe6jq4xi705m53Mav+KVqppOPM6+mS0kXDdshRjyuY86rp6ioNhM+SYSiHPIh8fn+5FB5WSTZ4T124H+pZD86bmdGLO
LZS/djSdoxZ+TqznLVU8IKIRbFXvgfHGNTD34j4q2WdN9mozqi8FryhgBuE2S+/CtztuCUUnqTBlooQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Q0IFNe

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/uXdudnvjv4Dpbidr37jcM4xjG2tscVF>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DCN
Doctorado en
Ciencias Naturales

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales

Cuernavaca, Morelos, a 08 de febrero del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (directo de tesis CEIB, UAEM)
Dr. Pedro Mendoza de Gives (codirector de tesis CENID-SAI)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB, UAEM)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB, UAEM)
Dra. Liliana Aguilar Marcelino (CENID-SAI)
Dr. Agustín Olmedo Juárez (CENID-SAI)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Tesis: "Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*"

Alumno que lo presenta a revisión: ANA YURIDIA OCAMPO GUTIÉRREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ | Fecha:2021-04-12 16:20:27 | Firmante

uJrQyFkvDhdekGkydRwfhbVxZNeUNXjpYuYcwKrB4hFJ2uxmjid3r5illsJfJHqsGJGuna0QQQbagjflCGPO4AzXLHyTdTWAay1y4B/F320OVXXBC3VaEJWP611ET4g3bwXkAu
yNqWTkgWXAffucX630QnyojMuhD/59p+/hSBk14wSJoKd6M7n0MhKPzjMldIFLKhbUBcic9PYDdaUX+llQW0z7HP/aw373zZoYQNILhti+9B1TVEqdg9YQMimj+n/xxO75FCHBe
449RU3GGhgssgVdH7DMWEni5HavtTADs/WeK0SYfJOWa7nhClGcejunhDA6ce/zxc7bQIA==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[WzT02u](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/UAAfvPiFhE98y6V17wM7Po10gaMcf5r>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Cuernavaca, Morelos, a 08 de febrero del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (directo de tesis CEIB, UAEM)
Dr. Pedro Mendoza de Gives (codirector de tesis CENID-SAI)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB, UAEM)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB, UAEM)
Dra. Liliana Aguilar Marcelino (CENID-SAI)
Dr. Agustín Olmedo Juárez (CENID-SAI)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB, UAEM)

Tesis: "Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*"

Alumno que lo presenta a revisión: ANA YURIDIA OCAMPO GUTIÉRREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2021-02-24 11:10:55 | Firmante

SsabnYpsMEygDXik7E42+uinKTbrK4CRtJKa9bgTgp5MpjGwuZovCay+rs8Wva0Ri4nlkKb8PHxPlvH2eJUZ0yrWgz6P75FcOCCJ7gVMKkwH9cakaXMsx/e2tK7i+KYfQvB/HwsU
LCC+oYMnh5UQWEGCz0mx9M8gnMLtZ7MhBxMRxUIY64S4RrfqYHSoybYdZf89kgJcuocpLoh2732B4PHINkwbujeMlCrF/2apXh7F4NzHeuN6u1Gc9ewMSeMxQQuO6X/DU
CE/vRpicDuCgAUnFWihJGp1mVONHba0++97RwSHd9z9nhH7xf1WZqld50lx/TA2UZIFxPjCCQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



DneXJN

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/G2NuL6u9iQanre4u6TviVtJUzdcQDJCr>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Doctorado en Ciencias Naturales
Centro de Investigación en Biotecnología CEIB-UAEM

Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*

Cuernavaca, Morelos México, 2021



Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Ciencias (CONACYT) por la beca otorgada durante el proceso de doctorado.

Quiero aprovechar este espacio para agradecer brevemente a mis directores de tesis Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez y Dr. Pedro Mendoza de Gives por la paciencia, por las tantas estrategias profesionales aprendidas y sobre todo por haberme otorgado su amistad y confianza durante la realización del presente proyecto.

A mi comité tutorial por los comentarios muy acertados hacia mi proyecto, ya que en conjunto logramos mejorar cada vez los experimentos y presentación de los resultados.

Al Dr. Alejandro Zamilpa y al Dr. Manasés González por la experiencia profesional, conocimientos y apoyo otorgado en el área química.

A la Dra. Maria Eugenia López Arellano por el apoyo profesional en el laboratorio, gracias por los consejos laborales y muchas muchas gracias por su amistad.

A todas las personas involucradas en la presente tesis, gracias al Dr. Caleb C. Lormendez por el apoyo prestado en el tema de bioprocesos, a la Maestra Laura Lina por la ayuda, además de todo el tiempo y paciencia que me otorgó, al Dr. Jesús Hernández por el asesoramiento obtenido, a la Dra. Manuela Reyes Estebanez por el material bilógico que nos otorgó y por las revisiones de escritorio de documentos.

Muchas gracias a todos

A todo el personal que me apoyó en los laboratorios:

Laboratorio de control biológico, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos,

Laboratorio de Helmintología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP

Centro de Investigación Biomédica del Sur, CIBIS-IMSS.

Infinitas gracias

”Mejores son dos que uno; porque tienen mejor paga de su trabajo. Porque si cayeren, el uno levantará a su compañero; pero ¡ay del solo! que cuando cayere, no habrá segundo que lo levante. También si dos durmieren juntos, se calentarán mutuamente; más ¿cómo se calentará uno solo? Y si alguno prevaleciere contra uno, dos le resistirán; y cordón de tres dobleces no se rompe pronto.” (Eclesiastés 4:9-12)

A mi equipo “familia”: a mi papi Luis, mami Mari y hermanas Gabi, Maye, sobrino Joshua y cuñados, gracias por estar conmigo siempre y por todos los días de junta informativa y bebidas ocasionales que compartimos.

Las más grandes gracias a mi hijo Jorge Milton por esperar a su mami pacientemente en casa, por creer en mí y por poseer increíblemente y como por arte de magia todo el poder necesario para hacer de mí una mejor persona y a la vez una mejor profesionalista, acuérdate hijo que todo es en pro de nosotros.



Contenido temático

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes.....	5
2.1. Parasitosis gastrointestinal.....	5
2.2. Características del parásito <i>Haemonchus contortus</i>	7
2.3. Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i>	7
2.4. Productos químicos utilizados como control parasitario.....	9
2.5. Impacto de los antihelmínticos en el ambiente	11
2.6. Resistencia antihelmíntica.....	12
2.7 Alternativas de control de nematodos gastrointestinales	12
2.7.1. Partículas de óxido de cobre.....	13
2.7.2. Medicina tradicional.....	13
2.7.3. Bacterias.....	13
2.7.4. Ácaros nematófagos	14
2.7.5. Hongos nematófagos	14
2.8. Hongos nematófagos: clasificación, actividad depredadora y uso antihelmíntico	14
2.8.1 Clasificación	14
2.8.2. Forma de alimentación.....	15
2.8.3. Desarrollo de órganos de captura.....	15
2.8.4. Depredación Hongo-Nematodo	16
2.8.5. Mecanismos moleculares involucrados en la depredación de nematodos	16
2.8.6. Evaluación del uso de hongos nematófagos en el control de nematodos	17
2.9. Metabolitos secundarios producidos por hongos nematófagos	18
2.10. Cultivo de hongos nematófagos y producción de metabolitos secundarios	21
3. Justificación	25
4. Hipótesis	26
5. Objetivo General.....	27
6.1. Objetivos particulares.....	27
6. Metodología.....	28
6. 1. Metodología sección I:	29

6.1.1. Activación de cepas	29
6.1.2. Obtención de larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i>	31
6.1.3. Lavado de larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	31
6.1.4. Obtención de huevo de <i>Haemonchus contortus</i>	31
6.1.5. Obtención del nematodo de vida libre <i>Panagrellus redivivus</i>	32
6.1.6. Identificación fúngica a través de taxonomía tradicional (sistema morfométrico).....	32
6.1.7. Identificación molecular.....	33
6.1.8. Análisis múltiple y elaboración de árbol filogenético	33
6.1.9. Evaluación de la actividad depredadora	34
6.1.10. Producción de cepas en medio líquido estático.	35
6.1.11. Producción de cepas en medio líquido agitado	35
6.1.12. Producción a escala de los cultivos de hongos nematófagos seleccionados en condiciones estáticas y agitadas.....	35
6.1.13. Separación de líquido filtrado y micelio	36
6.1.14. Elaboración de extractos.....	36
6.2. Sección metodológica II	37
6.2.1. Realización de bioensayos para evaluar la actividad nematocida de los líquidos filtrados y extractos de micelios de las cepas de hongos nematófagos contra larvas (L3) de <i>H. contortus</i>	37
6.2.2. Tamizaje para la selección de cepas productoras de compuestos AH.....	38
6.2.3. Evaluación de la actividad antihelmíntica de cepas seleccionadas	39
6.2.4. Actividad antihelmíntica de líquidos filtrados y extractos de micelios durante la cinética de crecimiento en fermentador de <i>P. lilacinum</i> (Camp1).....	39
6.2.5. Evaluación de la actividad AH del líquido filtrado liofilizado y extractos de micelio de la biomasa de <i>P. lilacinum</i> (Camp1) en fermentador.....	40
6.2.6. Evaluación de la actividad AH de las fracciones obtenidas de la columna 1 del extracto Metanol/Diclorometano (70:30) de <i>P. lilacinim</i> (Camp1) contra huevos y larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i>	40
6.2.7. Producción de <i>P. lilacinum</i> (Camp1) en fermentador	41
6.2.8. Preparación del inóculo para la producción de la cepa <i>P. lilacinum</i> (Camp1) en fermentador	41
6.2.9. Determinación del peso seco de la biomasa durante la cinética de crecimiento la cepa <i>P. lilacinum</i> (Camp1) en fermentador	42
6.2.10. Cálculo de parámetros cinéticos y estequiométricos mediante un modelo logístico de crecimiento	42
6.2.11. Realización de placas cromatográficas	43

6.2.12. Análisis del perfil fitoquímico en capa fina de los extractos metanol/diclorometano 70:30 de las cepas <i>Arthrobotrys conoides</i> (CL25), <i>A. arthrobotryoides</i> (RM 5.2), <i>A. oligospora</i> (Ovi 29) y <i>P. lilacinum</i> (Camp1)	43
6.2.13. Análisis en cromatografía de capa fina de las fracciones del extracto de la cepa <i>P. lilacinum</i> (columna 1).....	43
6.2.14. Fraccionamiento del extracto Metanol/Diclorometano (70:30) de <i>P. lilacinum</i> y análisis en placas TLC (columna 1)	44
6.2.15. Fraccionamiento en fase reversa de las reuniones 21-24 (Columna 2).....	44
6.2.16. Análisis de los compuestos obtenidos por cromatografía HPLC	44
7. Resultados.....	45
7.1. Resultados preliminares (pre-selección) de filtrados con actividad antihelmíntica obtenidos de cultivos de hongos nematófagos en medios papa dextrosa y Czapek Dox contra <i>Haemonchus contortus</i> (L3)	45
7.2. Resultados preliminares (pre-selección) de extractos (metanol/diclorometano 70:30) de micelios de hongos nematófagos cultivados en caldo Czapek Dox y papa dextrosa contra <i>Haemonchus contortus</i> (L3).....	45
7.3. Identificación de hongos nematófagos mediante taxonomía tradicional.....	46
7.4. Identificación molecular de las cepas <i>A. arthrobotroides</i> (RM5.2), <i>A. oligospora</i> (Ovi29), <i>A. oligospora</i> (HSCSH), <i>A. conoides</i> (CL25) y <i>P. lilacinum</i> (Camp1)	51
7.5. Clasificación filogenética de las cepas de hongos nematófagos identificadas utilizando las secuencias de las regiones 18S, ITS1, 5.8S e ITS2	53
7.6. Actividad depredadora <i>in vitro</i> de hongos nematófagos contra <i>Haemonchus contortus</i> (L3) y <i>Panagrellus redivivus</i>	54
7.7. Actividad nematocida de extractos de hongos nematófagos cultivados bajo condiciones estáticas y agitadas.....	55
7.8. Aumento de la producción de cepas con mayor porcentaje de mortalidad contra <i>Haemonchus contortus</i> (L3).	58
7.9. Análisis del perfil fitoquímico de los extractos metanol/diclorometano 70:30 de las cepas en estudio	58
7.10. Evaluación de cultivos de 10 L de las cepas de hongos nematófagos que mostraron los mayores porcentajes de mortalidad.....	61
7.11. Evaluación de la actividad nematocida <i>in vitro</i> de los extractos de los micelios de 20L de cultivo de la cepa <i>Arthrobotrys arthrobotryoides</i> (RM 5.2) contra <i>Haemonchus contortus</i> (L3)	62
7.12. Perfil fitoquímico en placas TLC de los extractos de los micelios de 20L de cultivo de la cepa <i>Arthrobotrys arthrobotryoides</i> (RM 5.2)	62
7.13. Cálculo de parámetros cinéticos mediante un modelo logístico de crecimiento.....	63

7.14. Monitoreo de la actividad antihelmíntica de líquidos filtrados y extractos de micelios durante la cinética de crecimiento en fermentador de la cepa <i>P. lilacinum</i> (Camp1)	64
7.15. Evaluación de la actividad AH en líquido filtrado liofilizado y extractos de micelio de la biomasa al término de la fermentación	65
7.16. Evaluación de la actividad AH de las fracciones del extracto metanol/diclorometano (70:30) de micelio de <i>P. lilacinum</i> contra <i>H. contortus</i> (L3).....	66
7.17. Evaluación de la actividad AH de las fracciones del extracto metanol/diclorometano (70:30) del micelio de <i>P. lilacinum</i> contra larvas (L3) y huevos de <i>H. contortus</i>	66
7.18. Análisis en placa TLC de las fracciones obtenidas del extracto Metanol/diclorometano (70:30) de <i>P. lilacinum</i>	69
7.19. Análisis de cromatografía (HPLC) de la purificación de la columna 2 (reuniones 21-24) 70	
8. Discusión	73
9. Conclusiones	85
12. Referencias	88

Índice de cuadros

Cuadro 1. Metabolitos aislados de hongos nematófagos y hongos ovidas que presentan diversas actividades	20
Cuadro 2. Condiciones de crecimiento de cepas, producción y extracción de metabolitos secundarios de hongos nematófagos contra nematodos fitopatógenos y patógenos en animales	24
Cuadro 3. Cepas de hongos nematófagos seleccionados para llevar a cabo la evaluación de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antihelmíntica contra el nematodo <i>Haemonchus contortus</i> . Se detalla el sustrato y el lugar del que se aislaron.....	30
Cuadro 4. Resultados preliminares sobre el monitoreo de la actividad nematicida <i>in vitro</i> de extractos (diclorometano/metanol 30:70) de cultivos de hongos nematófagos en medio papa dextrosa contra larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i> después de 48, y 72 h.....	46
Cuadro 5. Características morfométricas de las cepas <i>Arthrobotrys arthrobotryoides</i> (RM 5.2), <i>A. conoides</i> (CL25), <i>A. oligospora</i> (Ovi29) y <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Camp1).	47
Cuadro 6. Porcentajes de similitud de las cepas de hongos nematófagos en estudio comparados con las cepas con mayor porcentajes de similitud mostrados para las regiones 18S, ITS1, 5.8S e ITS2 reportados en la base de datos del NCBI	53
Cuadro 7. Porcentaje de depredación de nematodos <i>Haemonchus contortus</i> (L3) y después de 11 días de confrontación contra las cepas aisladas de hongos nematófagos	55
Cuadro 8. Porcentaje de depredación de nematodos <i>Panagrellus redivivus</i> después de 11 días de confrontación contra las cepas aisladas de hongos nematófagos.....	55
Cuadro 9. Promedio de larvas infectantes de <i>H. contortus</i> después de ser expuestas al efecto de extractos orgánicos (diclorometano/metanol 30:70) de micelio de cuatro hongos nematófagos	57
Cuadro 10. Rendimientos en peso seco de micelios y extractos de micelio de cultivos de 250 mL y 10 L de cepas aisladas de hongos nematófagos.....	58
Cuadro 11. Actividad nematicida de los extractos de micelio de 20 L de la cepa <i>Arthrobotrys arthrobotryoides</i> (RM5.2) contra <i>Haemonchus contortus</i> (L3)	62
Cuadro 12 Porcentajes de mortalidad <i>in vitro</i> de <i>H. contortus</i> (L3) expuestas a filtrados líquidos de <i>P. lilacinum</i> (Camp1) obtenidos durante la cinética de crecimiento en bio-reactor	65
Cuadro 13. Porcentajes de mortalidad <i>in vitro</i> de larvas de <i>Haemonchus contortus</i> (L3) expuestas a los líquidos filtrados y a los extractos metanol/diclorometano (70:30) (100 mg/mL) de los cultivos en biorreactor de <i>P. lilacinum</i> (Camp1).....	65
Cuadro 14. Porcentajes de mortalidad <i>in vitro</i> de <i>H. contortus</i> (L3) expuestas a fracciones y reuniones del extracto (metanol/diclorometano 70:30) de <i>P. lilacinum</i>	66
Cuadro 15. Actividad ovidas de las fracciones y reuniones del extracto de <i>P. lilacinum</i> contra <i>H. contortus</i>	68

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo biológico del nematodo <i>Haemonchus contortus</i> . El ciclo biológico se divide en dos fases: interna y externa (Modificado de Soca <i>et al.</i> 2005).....	9
Figura 2. Micromorfología de <i>Arthrobotrys arthrobotryoides</i> (RM5.2).....	48
Figura 3. Micromorfología de <i>Arthrobotrys conoides</i> (CL25).....	49
Figura 4. Micromorfología de <i>Arthrobotrys oligospora</i> (Ovi 29).....	50
Figura 5. Micromorfología de <i>Purpureocillium lilacinum</i>	51
Figura 6. Fotografía de los productos de PCR de las cepas en estudio.	52
Figura 6. Fenograma generado utilizando las regiones ITS1 secuencia parcial; 5.8 e ITS2....	54
Figura 8. Análisis por TLC de los micelios de las cepas productoras de compuestos AH reveladas con 4-hidroxibenzaldehído.	59
Figura 9. Análisis de las cepas productoras de compuestos AH reveladas con reactivo para flavonoides.....	60
Figura 10. Actividad antihelmíntica de los extractos (DCM/MEOH 30:70) de cultivos de 10L de hongos nematófagos en estudio	61
Figura 11. Cinética de crecimiento de <i>P. lilacinum</i> (Camp1) en el medio líquido PD.	63
Figura 12. Monitoreo de la actividad AH durante la cinética de crecimiento de <i>P. lilacinum</i> (Camp1) contra <i>H. contortus</i> (L3).	64
Figura 13. Análisis en placa TLC de las fracciones obtenidas del extracto Metanol/ Diclorometano (70:30) de <i>P. lilacinum</i>	69
Figura 14. Análisis en placa TLC de las fracciones obtenidas del extracto Metanol/ Diclorometano (70:30) de <i>P. lilacinum</i>	70
Figura 15. Cromatogramas correspondientes al extracto total D/M (30:70) de la cepa <i>P. lilacinum</i> Camp1, y el fraccionamiento de las columnas C1 y fracciones de C2.....	72

Resumen

El nematodo *Haemonchus contortus* es un parásito gastrointestinal que causa grandes pérdidas en la producción de rumiantes en todo el mundo, la infección por este nematodo causa anemia y muerte en ovinos jóvenes. El tratamiento farmacológico contra *H. contortus* ha ocasionado resistencia antihelmíntica, daños al ambiente y en salud pública. Una alternativa de control hacia *H. contortus* son los hongos nematófagos (HN), estos microorganismos desarrollan estrategias morfológicas y metabólicas para depredar, destruir y alimentarse de los tejidos de nematodos, también producen enzimas y metabolitos secundarios que contribuyen a la muerte y degradación de estos, por lo tanto, es importante aislar y caracterizar compuestos con actividad antihelmíntica. En el presente trabajo se evaluaron 21 cepas de HN pertenecientes a la colección del CENID-SAI-INIFAP. El principal objetivo fue evaluar la actividad depredadora *in vitro* de cepas de HN seleccionados e identificar los grupos de compuestos químicos asociados a la actividad nematocida contra *H. contortus*. De la colección de HN se seleccionaron 4 cepas que mostraron una actividad antihelmíntica superior al 30%; estas se identificaron como: *Arthrobotrys conoides* (CL25) **MT052369**, *A. oligospora* (Ovi29) **MT052370**, *A. arthrobotryoides* (RM5.2) **MT052368** y *Purpureocillium lilacinum* (Camp1) **MT052371**. Los porcentajes de depredación que mostraron estos hongos contra larvas de *H. contortus* (L3) fueron: 75, 71, 66 y 52%, respectivamente. Las cepas se cultivaron durante 15 días en cultivos de 50 mL de medio papa dextrosa en condiciones estáticas (CE) y agitadas (CA). La actividad nematocida se encontró en los extractos Metanol/Diclorometano 70:30 del micelio de estas cepas. La actividad nematocida se evaluó a través de un estudio bio-dirigido y se obtuvieron los siguientes porcentajes de mortalidad evaluados a las 96 horas: Bajo CE: CL25=51.9%, Ovi29=60.6%, RM 5.=54.9%; mientras que bajo CA, Camp1=77.68%. Para fines de purificación de los compuestos se produjeron 20 L de cultivo (CE) de la cepa RM5.2, mientras que la cepa *Camp-1* se produjo en biorreactor. Las fracciones obtenidas del extracto de *P. lilacinum* mostraron un efecto inhibitorio contra huevo de *H. contortus*, las reuniones de la columna 2 (21-24) mostraron una actividad ovicida del 85 y 95% evaluadas a 10 y 40 mg/mL respectivamente. Dichas fracciones se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) y los compuestos mayoritarios mostraron la presencia de moléculas derivadas del ácido gálico y cumarinas.

Abstract

The nematode *Haemonchus contortus* is a gastrointestinal parasite that causes great losses in ruminant production throughout the world, infection by this nematode causes anemia and death in young sheep. Pharmacological treatment against *H. contortus* has caused anthelmintic resistance, damage to the environment and public health. A control alternative against *H. contortus* infection are nematophagous fungi (NF), these microorganisms develop morphological and metabolic strategies to predate, destroy and feed nematode tissues, NF also produce enzymes and secondary metabolites that contribute to the death and degradation of nematodes. Therefore, it is important to isolate and characterize compounds with anthelmintic activity. In the present work, 21 NF strains belonging to the CENID-SAI-INIFAP collection were evaluated. The main objective was to evaluate the *in vitro* predatory activity of selected nematophagous fungi and to identify the groups of chemical compounds associated with nematicidal activity against *H. contortus*. From the NF collection, 4 strains were selected that showed larvicidal activity greater than 30%; These were identified as: *Arthrobotrys conoides* (CL25) **MT052369**, *A. oligospora* (Ovi29) **MT052370**, *A. arthrobotryoides* (RM5.2) **MT052368** and *Purpureocillium lilacinum* (Camp1) **MT052371**, the percentages of predation against larvae *H. contortus* (L3) were: 75, 71, 66 and 52%, respectively. The strains were grown for 15 days in 50 mL cultures of potato dextrose medium under static (SC) and agitated (AC) conditions. The nematocidal activity was found in the Methanol/Dichloromethane 70:30 extracts of the mycelium of NF. Nematocidal activity was evaluated through a directed bioassay. The larvae mortality percentages evaluated at 96 hours were the following: under SC: CL25= 51.9%, Ovi29 = 60.6%, RM 5.2 = 54.9%; and under AC, Camp1 = 77.68%. For the purification of the compounds, 20 L of culture (SC) of the *A. arthrobotryoides* strain (RM5.2) were produced, while, *P. lilacillum* strain was produced in a bioreactor. The fractions obtained from the Camp1 extract showed an ovicidal effect against *H. contortus* egg, the reunions in column 2 (21-24) showed an ovicidal activity of 85 and 95% evaluated at 10 and 40 mg/mL respectively. These fractions were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and the majority compounds suggest the presence of molecules derived from gallic acid and coumarins.

1. Introducción

Los nematodos parásitos han ocasionado importantes daños en la agricultura (Bernard *et al.*,2017), en la industria ganadera (Tsotetsi and Mbat, 2003) y en salud pública (Novaes *et al.*,2017). *Haemonchus contortus* es un nematodo hematófago y parasita el abomaso de pequeños rumiantes. El tratamiento de este parásito es por lo regular la administración de antihelmínticos químicos que ayudan a reducir la parasitosis en los animales, sin embargo, estos tratamientos tienen una desventaja puesto que generan resistencia antihelmíntica contra los fármacos utilizados comercialmente (Niciura *et al.*,2019), además, generan riesgos potenciales en salud pública debido al efecto residual de estos fármacos en productos de origen animal para el consumo humano (Beyene, 2016). Otro punto importante es la contaminación del suelo debido a la eliminación de fármacos en heces de los animales tratados (Netra *et al.*,2016). Debido a las grandes desventajas que conlleva la administración de los fármacos antihelmínticos, investigadores de todo el mundo se han motivado a desarrollar estrategias sustentables de control, por ejemplo, el uso de enemigos naturales de nematodos. Algunos controladores naturales en el suelo, incluyen bacterias (Topalović *et al.*, 2019), ácaros (Aguilar-Marcelino *et al.*,2014), nematodos (Aguilar-Marcelino *et al.*,2020) y un grupo de hongos microscópicos llamados hongos nematófagos (HN) (Canhão-Dias *et al.*, 2020).

Los hongos nematófagos son microorganismos que pueden actuar como depredadores de nematodos en suelo. También se les ha considerado como controladores potenciales de nematodos plaga, este hecho es de gran importancia en la agricultura y en la industria ganadera (Braga y Araujo 2014). Se considera que los HN son los principales antagonistas de los nematodos en la naturaleza; estos también participan en la cadena trófica, descomponiendo alimentos, además participan durante el ciclo de N, y también se alimentan de materia en descomposición (Zhang *et al.*,2012). Además, los HN son microorganismos saprófitos que en presencia de nematodos transforman sus micelios en un proceso llamado morfogénesis; en este estado, los hongos producen trampas para capturar,

destruir y finalmente, alimentarse de estos (Nordbring-Hertz 2011). Se han identificado algunos pasos importantes en este proceso, el paso inicial el hongo depredador produce sustancias atrayentes que pueden imitar feromonas sexuales y así atraer al nematodo presa, o bien, moléculas que imitan señales del alimento de los nematodos (Hsueh *et al.*,2013). Una vez que los nematodos son atraídos hacia las trampas, estas producen polímeros mucilaginosos de superficie llamados adhesinas, que están designadas para adherirse e inmovilizar a los nematodos (Lipke, 2018). Posteriormente, se inicia un proceso químico degradativo en el que participan diferentes enzimas como proteasas de serina, colagenasas, fosfatasa y quitinasas, el proceso químico de degradación es seguido por una estructura estratégica llamada “bulbo de infección” que penetra en la cutícula del nematodo para desarrollar posteriormente una hifa invasiva que usa el hongo para obtener nutrientes del tejido del nematodo (López-Llorca *et al.*,2008). También se ha identificado la síntesis de otras moléculas participando en este proceso tales como proteasas y metabolitos secundarios, estos últimos tienen un número de actividades biológicas como antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas y nematocidas entre otras (Degenkolb y Vilcinskis, 2016). Los metabolitos encontrados en HN principalmente en los géneros *Arthrobotrys* pertenecen a diversas familias estructurales, tales como péptidos, sideróforos, alcoholes grasos, amidas de ácidos grasos y además se sugiere que la expresión de estos puede ser especie-específico (Kuo *et al.*,2020). Por otra parte, las especies del orden hipocreales como *Purpureocillium* de igual manera han mostrado producir una variedad extensa de metabolitos secundarios en las que se destacan compuestos de las familias peptídicos, policétidos, terpenoides, esteroides y alcaloides entre otros (Li *et al.*,2020). Es importante aislar y caracterizar compuestos con actividad antihelmíntica. En el presente trabajo se evaluaron 21 cepas de HN pertenecientes a la colección del CENID-SAI-INIFAP. El principal objetivo fue evaluar la actividad depredadora *in vitro* de cepas de HN seleccionados e identificar los grupos de compuestos químicos asociados a la actividad nematocida contra *H. contortus*.

2. Antecedentes

2.1. Parasitosis gastrointestinal

Los nematodos gastrointestinales ocasionan parasitosis tanto en pequeños rumiantes, como en ganado mayor, han sido considerados como uno de los principales causantes de un importante impacto económico a nivel global (Roerber *et al.*, 2013). Las parasitosis gastrointestinales causadas por nematodos son una de las principales enfermedades que afectan a la producción animal y a la salud de rumiantes en países en desarrollo, particularmente donde los sistemas de manejo, nutrición y saneamiento son deficientes (Regassa *et al.* 2006).

Las parasitosis ocasionan diversos efectos adversos en el tracto digestivo de los animales, incluyendo inflamación de la mucosa seguido de un proceso diarreico que ocasiona un deterioro general de los animales (Jacobson *et al.*, 2020), además se puede observar una reducción de la ganancia de peso, baja producción de leche, deterioro del rendimiento reproductivo, afectación de órganos y en casos de parasitosis severa, se ocasiona la muerte del animal infectado (Raza *et al.*, 2007). Estudios recientes han estimado las pérdidas económicas de hasta el 40% en la producción ovina (Ilangopathy *et al.*, 2019).

Además, las diversas condiciones agroclimáticas, la práctica de cría de animales, y el manejo de pastoreo largo, determina la incidencia y la severidad de varias enfermedades parasíticas en ciertas áreas en las que se presenten las condiciones que favorecen el desarrollo y supervivencia de estos parásitos como las que ofrecen las zonas de clima húmedo y templado (FAO, 2001).

La epidemiología de las infecciones en pequeños rumiantes ya se ha documentado ampliamente, este hecho ayuda a mejorar las medidas de control de los parásitos, así como la mejora animal y decrementar la pérdida de la producción (Telila *et al.*, 2014; Bisimwa *et al.*, 2018; Moussouni *et al.*, 2018).

Las principales especies de nematodos que ocasionan las parasitosis gastrointestinales son diversas y la prevalencia de estos a nivel global puede variar de una zona a otra, por ejemplo, en un estudio realizado en el Llorin Nigeria, se analizó la prevalencia de nematodos gastrointestinales, se analizaron 80 muestras de heces fecales en busca de huevos y larvas encontrando 80 especies de

helminthos, la prevalencia de estos fue la siguiente: *Haemonchus contortus* (60.46%), *Trichostrongylus* spp. (46.44%), *Ostertagia ostertagi* (42.05%), *Bunostomum phlebotomum* (28.87%), *Cooperia* spp. (24.27%), *Oesophagostomum radiatum* (21.97%), *Strongyloides papillosus* (12.13%), y *Fasciola gigantica* (10.67%) (Ola-Fadunsin *et al.*, 2020) En México, la nematodiasis gastrointestinal afecta a rumiantes de distintas edades, y se presenta en las zonas tropicales, subtropicales y templadas del país donde las condiciones de humedad y temperatura (entre 18 y 33°C con humedad relativa mayor al 75%) son favorables para la continua proliferación de estos parásitos (Torres-Acosta y Hoste, 2008; López *et al.*, 2013). En cuanto a la prevalencia de estos, un estudio en el estado de Tabasco mostró que las especies de nematodos que más prevalecen en esta zona son *H. contortus*, *Cooperia curticei* y *Trichostrongylus colubriformis*, los conteos promedio de adultos, fueron superiores a 1009, 813 y 335, respectivamente (González *et al.*, 2011). Otro estudio importante lo realizó López (2013), en esta investigación se determinó la prevalencia y conteo de nematodos gastrointestinales de ovinos destinados al abasto. De igual manera el estudio se llevó a cabo en un rastro de Villahermosa, Tabasco, las especies de nematodos encontrados fueron *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, y *Cooperia curticei*, además del cestodo *Moniezia expansa*.

Por otra parte, las pérdidas económicas también han hecho estragos en especies superiores, ya que la parasitosis en el ganado ovino ha generado grandes pérdidas durante los años 2000-2010 que ascienden a los 44.10 millones de dólares, esto se vió reflejado en la producción de carne y leche, en esta investigación mostraron que los géneros de nematodos responsables de estas parasitosis fueron: *H. contortus* spp, *Cooperia* spp, *Trichostrongylus* spp, *Oesophagostomum* spp y *Ostertagia* spp (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2015).

Estas investigaciones demuestran claramente la alta prevalencia de los nematodos en ovinos; sin embargo, el nematodo *H. contortus* es considerado como el parásito de mayor relevancia a nivel mundial en la producción ovina y el que causa mayores pérdidas económicas en esta actividad, debido a este, la economía se ve afectada con pérdidas de más de 2000 millones de dólares anuales, lo que representa un

10% de la producción total (López *et al.*, 2013). Este nematodo es hematófago, se localiza en el abomaso (estómago verdadero) alimentándose de sangre y debido a esto los ovinos presentan anemia y pérdida de apetito, además, en la sobrepoblación parasítica, los nematodos irritan y forman nódulos en la mucosa (Munguía *et al.*, 2013).

2.2. Características del parásito *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus forma parte de la familia Trichostrongylidae, a la que pertenecen los nematodos parásitos gastrointestinales (NGI) más frecuentes de pequeños rumiantes (ovinos y caprinos). Los machos de la especie *H. contortus* se caracterizan por tener una longitud de 10 a 20 mm y las hembras entre 18 y 30 mm. Los machos tienen una cápsula bucal rudimentaria y poseen una bolsa copulatriz, su localización en los animales principalmente es en el abomaso (Gallego, 2006). Se alimenta de la sangre del animal, la cual succiona por medio de un estilete que mide entre 450-500 μm de longitud y presenta un pequeño gancho en su extremidad. Comúnmente, los nematodos son incoloros, pero esta especie presenta una coloración roja en el intestino debido a la sangre de la cual se alimenta. En las hembras, los ovarios presentan una coloración blanca alrededor del intestino (Lukovich, 1968).

2.3. Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*

El ciclo biológico (Figura 1) consta de dos fases a) Fase externa o pre-parasítica. Se refiere al estadio de vida libre del nematodo. La fase comienza cuando los huevos del parásito presentes en el intestino del animal se expulsan al ambiente por medio de las heces. Entre 24 y 30 horas después, las larvas emergen de los huevos y se desarrollan hasta el primer estadio, denominado L1, en este, la larva madura en un período de 3 días a la fase L2. En este segundo estadio, las larvas al ser de vida libre (no infectantes) pueden alimentarse de bacterias, detritus y protozoarios que hay en el ambiente. Las larvas L2 se desarrollan aproximadamente en 2 días al tercer estadio L3, también llamada larva infectante. La larva L3 posee una vaina que le permite ser más resistente durante el tiempo que se encuentra en el ambiente.

b) Fase interna o parasítica. Esta fase comienza una vez que la larva (L3) es ingerida. Generalmente en las mañanas, el pasto de los agostaderos tiene gotas de rocío, en esta fase, las larvas migran hacia la parte alta de los pastos y permanecen en las gotas del rocío en espera de ser ingeridas. Si el factor de temperatura asciende o la humedad desciende, entonces estas larvas optarán por regresar al suelo, retomando cada mañana la misma rutina hasta lograr ser ingeridas. Una vez dentro del rumen, las larvas (L3) pierden su vaina y se desarrollan a L4. Las larvas L5 migran al abomaso y se convierten en adultos, diferenciándose entre macho y hembra (Fernández *et al.*, 1994). Cuando la larva (L3) llega al aparato digestivo, interactúa con diversos estímulos fisiológicos, principalmente los niveles de bióxido de carbono, por lo que la larva segrega un fluido que contiene enzimas (incluida la leucinaminopeptidasa) que actúan sobre la vaina liberándose así el nematodo de ella; una vez desenvainada migra del rumen hacia el abomaso penetrando la mucosa, transformándose en larvas L4 en el interior de las glándulas, ahí permanecen entre 10 y 14 días, pero su desarrollo depende de las condiciones a las que se enfrenten, ya que si no son las adecuadas, la infección se puede inhibir. Posteriormente, las larvas L4 dejan la mucosa y se alojan en el lumen abomasal para transformarse finalmente en parásitos adultos, hembras y machos. Tras la copulación, las hembras comienzan a poner huevos, con lo que se completa el ciclo; la hembra de *H. contortus* es muy prolífera y puede producir alrededor de 5,000 huevos al día (Soca *et al.*, 2005).

Ciclo biológico del nematodo *Haemonchus contortus*

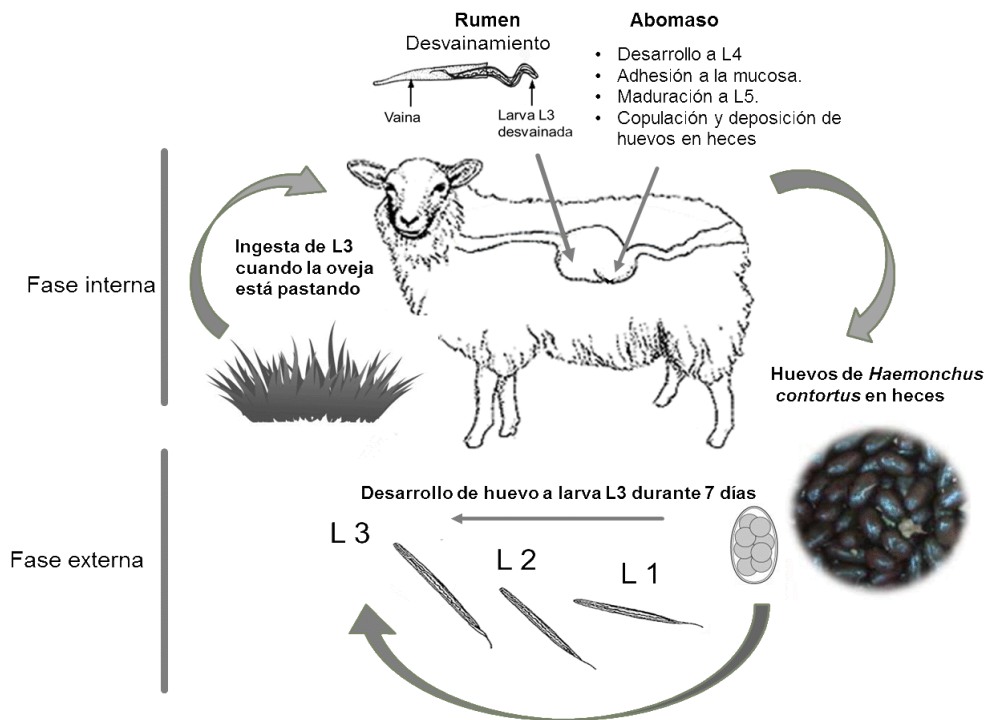


Figura 1. Ciclo biológico del nematodo *Haemonchus contortus*. El ciclo biológico se divide en dos fases: interna y externa (Modificado de Soca *et al.* 2005).

2.4. Productos químicos utilizados como control parasitario

Las parasitosis se controlan mediante fármacos químicos que desde hace mucho tiempo son la alternativa más fácil, puesto que son altamente eficientes. Existen varios antihelmínticos comerciales para combatir a los nematodos gastrointestinales, entre ellos los Benzimidazoles, las Avermectinas y los agonistas nicotínicos que son los tres grupos más usados en rumiantes (Márquez, 2007; Höglund *et al.*, 2019).

Los mecanismos de acción de los benzimidazoles ya se han estudiado, estas moléculas se internalizan en el parásito atravesando la cutícula por difusión. Los benzimidazoles actúan sobre los microtúbulos de las células intestinales y

tegumentarias del parásito, específicamente sobre la molécula β -tubulina por consiguiente se lleva a cabo un bloqueo de la polimerización evitando la formación de microtúbulos (Lacey, 1990); entre otros efectos, este fármaco también inhibe la enzima fumarato-reductasa que reduce el glucógeno, esto causa la muerte del helminto por hambre. La enzima fumarato reductasa no está en el hospedero, esta acción selectiva permite tener un margen terapéutico muy amplio. Los benzimidazoles son eficaces frente a las diferentes fases del parásito (huevos, larvas y formas adultas) aunque no son tan buenos en larvas enquistadas porque el acceso es más difícil. El Mebendazol tiene una acción diferente al resto de los compuestos porque inhibe al parásito de la captación de glucosa (Mottier *et al.*, 2006). Los benzimidazoles se emplean en el control de parásitos pulmonares y NGI. En el grupo de las tetrahidropirimidinas encontramos a el tartrato de pirantel y morantel, estos son antihelmínticos empleados comúnmente en forma de sales. Son eficientes en contra de NGI, y la forma en que actúan es promoviendo la parálisis muscular debido a la activación de los receptores nicotínicos excitatorios, de tal manera que el helminto muere al ser expulsado por el hospedero ya que no es capaz de fijarse a la pared gastrointestinal (Molinari, 2010).

Las lactonas macrocíclicas (LM) han demostrado ser el fármaco con mayor éxito en la medicina veterinaria, tienen una acción de amplio espectro en cuanto a la acción parasitaria, fueron aisladas como productos de la fermentación natural del actinomiceto *Streptomyces avermitilis* (Campbell, 1981). Las avermectinas son un grupo formado por dos grandes familias dependiendo del actinomiceto de cuya fermentación proviene, ya sea por *S. avermitilis* o por *S. cyaneogriseus*. El nombre de avermectinas se debe a sus propiedades como anti, verm (vermes) y ect (ectoparásitos), como nematodos gastrointestinales, pulmonares, tisulares, ácaros de la sarna, larvas de moscas, garrapatas y piojos chupadores (Botana, 2002).

El mecanismo de acción está ligado a la interacción con los canales que se encuentran cercanos a sitios mediados por ácido gamma-amino butírico (GABA). La ivermectina es parte de los antiparasitarios que actúan sobre nervios y células musculares del parásito. A concentraciones nanomolares, la ivermectina afecta la movilidad del nematodo, la alimentación y reproducción y actúa vía interacción

ligando-receptor en canales de cloro, específicamente regulados por glutamato.(Cully *et al.*, 1994; Yates *et al.*, 2003). Los canales de cloro regulados por glutamato (GluCl) no están presentes en vertebrados y como tal se cree que confieren el amplio margen de seguridad de IVM; sin embargo, a concentraciones micromolares, la ivermectina puede interactuar con un amplio rango de canales regulados por ligandos que se encuentran tanto en vertebrados como invertebrados incluyendo los receptores GABA, glicina, histamina, y receptores nicotínicos acetilcolinérgicos (Wolstenholme y Rogers, 2005).

2.5. Impacto de los antihelmínticos en el ambiente

Algunos estudios revelan que ciertos antihelmínticos se eliminan por medio de las heces de los animales previamente tratados. Algunos de estos fármacos son tóxicos al ambiente; por ejemplo, la población de insectos coprófagos en las praderas se ve afectada por la eliminación de ivermectinas con gran porcentaje del producto aún activo, este se desecha al ambiente dando como resultado una prolongación en el tiempo de descomposición del estiércol de vacas, caballos y ovinos (Márquez, 2007; Adediran y Uwalaka, 2015; Hamad *et al.*, 2017).

De los antihelmínticos (AH) disponibles actualmente en el mercado, las ivermectinas son las que causan mayor efecto negativo sobre el ambiente, especialmente en las poblaciones larvarias de insectos benéficos asociados al estiércol (Lumaret *et al.*, 2012). Algunos estudios indican que dípteros como Ciclorrafas, se afectan de gran manera por la ivermectina, provocando toxicidad de hasta 30 días después de un tratamiento antihelmíntico. Así mismo, en otros experimentos se observó un efecto nocivo sobre los escarabajos *Onthophagus* y *Aphodius* en estiércol de vacas y ovejas que habían sido tratadas con organofosforados, benzimidazoles, levamisol e ivermectina (Márquez, 2003).

Las lactonas macrocíclicas además de provocar daños a organismos benéficos tanto terrestres, como acuáticos (Powell *et al.*, 2018), se ha comprobado que residuos de estos compuestos afectan a la flora en el ambiente (Navrátilová *et al.*, 2020).

Es importante destacar que la ivermectina y productos derivados muestran efectos indirectos en organismos benéficos aún después de la administración de un tratamiento AH, afectando tanto a especies terrestres como acuáticas teniendo estragos en el crecimiento de plantas, algas e invertebrados (Lumaret *et al.*, 2012). Por otra parte, algunos de los componentes de los AH pueden permanecer como contaminantes en animales puesto que se encuentran restos de estos en productos designados para consumo humano; por ejemplo, carne, leche, queso etc. (FAO, 2004).

2.6. Resistencia antihelmíntica

Otra de las principales consideraciones de las drogas empleadas en el control de parásitos en los rumiantes es el desarrollo de la resistencia antihelmíntica que se genera en los parásitos, esto disminuye la eficacia de los fármacos y es una amenaza a la sustentabilidad económica en la producción de cabras (Sargison, 2011). La resistencia AH se desarrolla enormemente cuando los parásitos generan mutaciones que los hacen menos susceptibles a los diferentes fármacos AH. Este fenómeno se conoce como “resistencia antihelmíntica múltiple”. La ineficiencia de los antihelmínticos comerciales es una situación real en la actualidad (Saeed *et al.*, 2010; Sargison *et al.*, 2019). Esta situación motiva a los investigadores de todo el mundo a montar estrategias de control sobre estos parásitos.

2.7 Alternativas de control de nematodos gastrointestinales

Debido al grave problema que implican las parasitosis gastrointestinales al ganado y a los efectos secundarios del uso de tratamientos químicos antihelmínticos, se ha llegado a la necesidad de buscar métodos alternativos de control diferentes al uso de compuestos químicos.

Existen diversos métodos de control o medidas preventivas de las parasitosis gastrointestinales que pueden ser utilizadas como herramientas de control para lograr reducir de manera eficaz las cargas parasitarias a niveles aceptables que permitan lograr el potencial zootécnico de los animales, algunas de las estrategias empleadas incluyen desde el uso de partículas de óxido de cobre, uso de la

medicina tradicional, uso de organismos del suelo así como de antagonistas naturales, estos incluyen a nematodos, ácaros, bacterias y hongos nematófagos entre otros (Mendoza de Gives, 1999).

2.7.1. Partículas de óxido de cobre

Las partículas de cobre (POCS) son pequeños filamentos de cobre contenidos en una cápsula de gelatina, se administran por vía oral y llegan al abomaso, en donde las capsulas se desintegran para liberar los filamentos, mismos que permanecen atrapados en los pliegues de este órgano (Burke *et al.*, 2005). Estas se oxidan para liberar iones de cobre que provocan la muerte y expulsión de los parásitos del abomaso. Las POCs presentan una reducción de la carga parasitaria de *H. contortus* entre 75 y 90%, con una dosis de 1.7 g de POCs, además son persistentes en un 46%, 35 días posterior a la dosificación. Una desventaja de este método es la alta concentración de cobre acumulado en el hígado de los animales tratados que puede ocasionar severas intoxicaciones (Galindo-Barboza *et al.*, 2011; Jones, 2020).

2.7.2. Medicina tradicional

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la medicina tradicional fue definida como el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, sean o no explicables, utilizados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, diagnóstico, mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (WHO, 2020).

Las propiedades que poseen las plantas utilizadas en la medicina tradicional se deben a la presencia de metabolitos secundarios lo que le confiere la cualidad de su potencial terapéutico (Seca y Pinto, 2019)

2.7.3. Bacterias

Otros microorganismos como las bacterias y hongos nematófagos han sido de gran ayuda en la reducción de nematodos en el suelo. Las bacterias que se han

reportado anteriormente son del género *Pasteuria*, teniendo como nematodos blanco a *Meloidogyne incognita*, *M. hapla*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *Heterodera elastica*, *Helicotylenchus pseudorobustus*, *Rotylenchus capensis*, *Pratylenchus brachurus*, entre otros (Siddiqui y Mahmood, 1999; Topalović *et al.*, 2019). Otra especie muy estudiada por la gran capacidad de citotóxica es *Bacillus thuringiensis*, esta es productora de cristales de naturaleza proteica que han sido explorados como agentes de control de insectos plaga (Heckel, 2020) y contra nematodos parásitos del ganado (Vázquez-Pineda *et al.*, 2012; Sanders, 2020).

2.7.4. Ácaros nematófagos

Los ácaros nematófagos son otro grupo de organismos estudiados para controlar a nematodos. El ácaro *Lasioseius penicilliger* ha sido de gran ayuda para disminuir tres especies de nematodos en estadios infectantes *H. contortus* (L3) y nematodos adultos de *Panagrellus redivivus* y *Rhabditis* sp (García-Ortiz *et al.*, 2015).

2.7.5. Hongos nematófagos

Algunos organismos estudiados como posibles agentes de control biológico son los hongos nematófagos, que tienen la capacidad de atrapar y digerir las formas libres de los nematodos (Canhão-Dias *et al.*, 2020).

2.8. Hongos nematófagos: clasificación, actividad depredadora y uso antihelmíntico

2.8.1 Clasificación

El phylum Ascomycota es un grupo del Reino Fungi incluye más de 33,000 especies descritas. Este se divide en tres Subphylum monofiléticos: Taphrinomycotina, Saccharomycotina y Pezizomycotina (James *et al.*, 2006). El Subphylum Pezizomycotina incluye la mayoría de las especies filamentosas productoras de cuerpos fructíferos. La filogenia molecular agrupa a los Orbiliomycetes y Pezizomycetes como los linajes tempranos de divergencia del subphylum Pezizomycotina. Los Orbiliomycetes consisten en un simple Orden (Orbiliales) y una familia (Orbiliaceae) que incluye organismos que habitan en el suelo, abarcan desde

climas tropicales hasta los climas más fríos como la Antártida. Yu *et al.*, (2014) proponen una reclasificación de tres géneros llamados *Arthrobotrys* (54 especies), *Drechlerella* (14 especies) y *Dactylellina* (28 especies); se ha encontrado un cuarto género propuesto por Scholler *et al.*, (1999) al que se le ha dado el nombre de “*Gamsylella*”.

2.8.2. Forma de alimentación

La mayoría de estos hongos pueden vivir como saprófitos. Se cree que estos organismos al encontrarse en hábitats con limitantes de sustancias nutritivas emplean a los nematodos como fuente de alimento. El hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* entra en contacto con partículas glucosídicas que forman parte de la secreción de las células de descamación de la epidermis del nematodo, a la cual se le ha nombrado “nemina”, esta envía una señalización en cascada para llevar a cabo la formación de estructuras en forma de trampas en el micelio (Braga y araujo, 2014) que captan, adhieren y consumen a nematodos (Pfister y Liftik, 1995; Saumell y Fernández 2008; Hyde y Zhan, 2014). Otra de las grandes razones en el estudio de estos microorganismos, es la capacidad voraz para controlar a nematodos en el campo administrándose como controladores biológicos (Nordbring-Hertz, 2011; Luns *et al.*, 2018).

2.8.3. Desarrollo de órganos de captura

La forma de captura de estos hongos dependerá de la especie que se trate puesto que presentan cuatro estructuras principales: redes, botones y ramas adhesivas, además de una estructura de anillos constrictores (Li *et al.*, 2005). Las especies formadoras de trampas adhesivas capturan nematodos usando polímeros extracelulares que acumulan en el sitio de infección; mientras que las especies formadoras de anillos constrictores atrapan al nematodo por una hinchazón acelerada por parte de las células circundantes del hongo depredador. En los dos casos, la cutícula del nematodo es atravesada y dentro de este, el hongo coloniza al nematodo donde crece un bulbo de infección. En el tiempo de penetración, el nematodo se paraliza, muere, y así una hifa crece dentro de éste, las enzimas

degradan el tejido, los nutrientes quedan disponibles y un nuevo micelio se desplaza fuera del nematodo (Rosen *et al.*, 1997).

2.8.4. Depredación Hongo-Nematodo

Los nematodos presentan barreras protectoras: la cubierta de los huevos y la cutícula en el caso de larvas y adultos. La cubierta de los huevos está compuesta por tres capas con diferente contenido proteico: una externa (vitelina y lectinas), una media (quitina), y una interna (lipoproteínas) (Wharton, 1980). La cutícula del nematodo es crucial en la movilidad, mantenimiento de la integridad morfológica y en la protección contra enemigos naturales y factores ambientales, tiene tres capas: cortical, media y basal. La superficie de la epidermis está constituida por carbohidratos y proteínas involucradas en el reconocimiento y especificidad de las interacciones con diversas especies de hongos (Morton *et al.*, 2004). El mecanismo de esta depredación no está del todo dilucidado. La complejidad de la penetración de la cubierta y cutícula sugiere un mecanismo sinérgico en el que; sin duda, se requiere de vigorosa actividad enzimática, así como eventos mecánicos y otros compuestos bioactivos (Huang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007).

2.8.5. Mecanismos moleculares involucrados en la depredación de nematodos

El proceso de infección de los hongos nematófagos incluye diferentes pasos: atracción/reconocimiento, adhesión, penetración y digestión (Dong *et al.*, 2006). La atracción y el reconocimiento de algunos hongos nematófagos se basa en ciertos componentes orgánicos volátiles (VOCs) mediante estos, los nematodos son atraídos y posteriormente atrapados y digeridos; tal es el caso de *Esteya vermicola* que produce compuestos volátiles incluyendo monoterpenos (α -pinene y β -pinene) y un terpenoide (alcánfor), estas moléculas son similares a las producidas en el pino, de las que se alimenta *Bursaphelenchus xilophilus* (PWN) “el nematodo de los pinos” (Lin *et al.*, 2013).

Por otra parte, los mecanismos moleculares de como los hongos reconocen e inician la transición morfológica todavía no está bien establecido; sin embargo, se cree que moléculas como los ascarosidos, una molécula constitutiva liberada de la cutícula

de muchas especies de nematodos puede llevar a cabo la formación de trampas en *A. oligospora* y especies relacionadas produciendo redes adhesivas tridimensionales. Esto sugiere que los hongos nematófagos pueden reconocer a los nematodos vía comunicación química y entonces regular la morfogénesis, esta involucra múltiples vías de transducción de señales para percibir y responder a las señales ambientales, así como para transferir las señales a las células. Las proteínas G son los principales sensores involucrados en un grupo diverso de procesos biológicos en hongos filamentosos incluyendo desarrollo, patogénesis y respuesta (López-Llorca *et al.*, 2008). Se ha reportado que una señal de transducción vía proteína G-heterométrica es esencial para la construcción de anillos constrictores en *A. dactyloides*. En estos hongos, un activador de proteínas G y un incremento en el Ca^{2+} intracelular estimula la hinchazón de las células de los anillos constrictores, en esta investigación se observó que con el empleo de un inhibidor de proteínas G, se lleva a cabo una disminución de la hinchazón en el anillo constrictor (Chen *et al.*, 2001).

2.8.6. Evaluación del uso de hongos nematófagos en el control de nematodos

Duddingtonia flagrans y *Arthrobotrys* spp. son los depredadores más estudiados y efectivos en el control biológico de los parásitos de animales (Braga y Araújo, 2004). En México, se evaluaron dos cepas de *D. flagrans*, una mexicana y otra francesa en un cultivo con larvas de *Panagrellus redivivus*, se observaron reducciones de larvas de 98,9% con la cepa mexicana y de 97,7% con una cepa francesa (Flores *et al.*, 1999). Además, se evaluó el porcentaje de reducción de larvas de *H. contortus* en pastos mediante la administración oral de conidios de *Dactylaria* sp., *A. oligospora* y conidios de *D. flagrans* a ovejas, observándose que *D. flagrans* es el microorganismo con mayor habilidad para reducir la población de larvas de nematodos de *H. contortus* en heces (Flores *et al.*, 2003). En Francia se observaron también reducciones de larvas de nematodos en praderas; los resultados de mortalidad fueron superiores al 90% al evaluar *D. flagrans* en ovejas infectadas con *Trichostrongylus colubriformis* y *Teladorsagia circumcincta* (Chartier *et al.*, 2003). Debido al efecto nematicida que se ha obtenido en el manejo de *D. flagrans* en el

campo, diversos investigadores se han dado a la tarea de implementar dosificaciones de clamidosporas de *D. flagrans* como una herramienta de control de nematodos patógenos en ovinos. El esquema de administración consiste en proveer esporas en geringas (Larsen *et al.*, 1998), cápsulas de gelatina (Faedo *et al.*, 1997), suspensión acuosa con esporas (Mendoza-de Gives, 2006) y directamente en cánulas que llegan al rumen (Faedo *et al.*, 1998). También se ha evaluado la administración de galletas nutricionales conteniendo clamidosporas de *D. flagrans* administradas oralmente, al hacer el conteo de larvas infectantes en heces, se demostró un porcentaje de reducción letal del 82%, considerándose a *D. flagrans* como una excelente vía alternativa para el control de la hemoncosis ovina (Aguilar Marcelino *et al.*, 2016). El control de nematodos gastrointestinales con hongos nematófagos es una buena opción para disminuir los daños que los nematodos ocasionan; sin embargo, la principal problemática que presenta este método se restringe a la falta de un producto en el mercado con un estándar del inóculo y del medio en el que se cultiva (Ribeiro y de Araújo, 2014).

2.9. Metabolitos secundarios producidos por hongos nematófagos

Hasta la fecha, numerosos hallazgos se han hecho gracias al estudio de los hongos nematófagos y a los compuestos secundarios que producen (Li *et al.*, 2007a), estos presentan diferentes actividades biológicas en las que se incluyen: antimicrobianas, antifúngicas, anticancerígenas, antivirales, insecticidas y antihelmínticas entre otras (Degenkolb y Vilcinskis, 2016).

En una investigación llevada a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Tabasco, Veracruz y Yucatán México, se aislaron nueve cepas fúngicas de hongos nematófagos. Los efectos letales de los extractos de estas cepas se evaluaron bajo condiciones *in vitro* contra *Meloidogyne incognita* (J2). Se evaluó el efecto letal de los líquidos filtrados de los cultivos en contra de este nematodo, mostrando un porcentaje de mortalidad del 100 % y con extractos metanólicos se obtuvieron valores superiores al 90 %; esto demuestra que las cepas *Aspergillus* sp. 2XA5 y *Selenospora* sp. poseen mayor actividad nematicida, La CE₅₀ (concentración efectiva) más baja (0.08 mg mL⁻¹) se obtuvo con el extracto

metanólico de la cepa 2XA7, no identificada. Los resultados obtenidos indican que la microbiota tropical tiene potencial como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos (Gamboa *et al.*, 2015). Recientemente, Acevedo-Ramírez (2015), encontró actividad paralizante contra *H. contortus* al evaluar productos extracelulares de un filtrado del hongo *A. musiformis*, este autor asume que este compuesto es de la familia de las proteasas del grupo de las serinas encontrándolo con gran potencial antihelmíntico.

Diversas investigaciones muestran una amplia producción de compuestos antihelmínticos derivados de hongos depredadores de huevos, quistes y nematodos. El Cuadro 1 muestra algunos de los metabolitos aislados de hongos nematófagos y hongos ovidas presentando diferentes actividades (antihelmínticas, antibacteriales e insecticidas entre otras)

Cuadro 1. Metabolitos aislados de hongos nematófagos y hongos ovidas que presentan diversas actividades

Metabolitos aislados de hongos predadores de nematodos				
Metabolito	Especie aislada	Concentraciones empleadas	Actividad	Referencias
Ácido linoleico	<i>Arthrobotrys conoides</i>	DL ₅₀ : 5–10 µg/mL	Antihelmíntica: <i>Caenorhabditis elegans</i>	Stadler <i>et al.</i> , 1993a.
Oligosporon, oligosporol A, y oligosporol B	<i>A. oligospora</i> , <i>A. conoides</i> , <i>Dactylella brochopaga</i>	DL ₅₀ : 25 µg/mL	Antihelmíntica: <i>Haemonchus contortus</i> Otras actividades: Hemofílicos, citotóxica	Anderson <i>et al.</i> , 1995.
Flagranones A, B, y C	<i>A. flagrans</i>	100 mg/mL poca actividad nematocida	Antihelmíntica: <i>H. contortus</i> Otras actividades: Antimicrobiana: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptomyces aureofaciens</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Erwinia carotovora</i> Fitopatógeno: <i>Pythium cinnamomi</i> , <i>P. ultimum</i> , y <i>Rhizoctonia solani</i>	Anderson <i>et al.</i> , 1999.
Talathermophilins A Y B	<i>Dactylellina entomopaga</i>	400 µg/mL (inhibición 38%)	Antihelmíntico: <i>Panagrellus redivivus</i>	Chu <i>et al.</i> , 2010.
Arthrosporols A, B y C	<i>A. oligospora</i>	0.5-5 µg/mL	Precursores de la respuesta depredadora (crecimiento fúngico y regulación morfológica) Otras actividades: Antifúngicos	Zhang <i>et al.</i> , 2012.
Metabolitos derivados de hongos que infectan huevos y quistes de nematodos				
Metabolito	Especie aislada	Concentraciones utilizadas	Actividad	Referencias
Phomalactone	<i>Pochonia chlamidosporia</i> <i>Drechslera sp.</i> <i>Curvularia inaequalis</i>	500 mg/mL	Antihelmíntico <i>Meloidogyne incognita</i>	Khambay <i>et al.</i> , 2000.
Pyrralobenzoxazine paeciloxazine	<i>Paecilomyces sp.</i>	<i>Rhabditella axei</i> (50 µg/mL) <i>Culex pipiens</i> : (MIC: 25 µg/mL) <i>Plutella xylostella</i> : DL ₅₀ : 250 µg/mL	Antihelmíntico: <i>R. axei</i> Otras actividades: Insecticida: <i>C. pipiens pallens</i> (L2) <i>P. xylostella</i> larva (L3)	Kanai <i>et al.</i> , 2004.
4-(4'-carboxy-2'-ethylhydroxypentyl)-5,6-dihydro-6-methylcyclobuta[b]pyridine-3,6-dicarboxylic acid	<i>Paecilomyces sp.</i>	DL ₅₀ : (52.4 µg/mL), <i>M. incognita</i> (47.1 µg/mL), <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (167.7 µg/mL)	Antihelmíntico: <i>P. redivivus</i> , <i>M. incognita</i> y <i>B. xylophilus</i>	Liu <i>et al.</i> , 2009.
Aurovertins E, F y D	<i>Pochonia. chlamydosporia</i>	Aurovertina (D CL ₅₀ : 41.7 µg/mL) Aurovertina (F CL ₅₀ : 88.6 µg/mL)	Antihelmíntico: <i>M. incognita</i> (J2)	Niu <i>et al.</i> , 2010.
leucinostatins	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	100 µg/mL (Mortalidad 100% 24h)	Antihelmíntico: <i>C. elegans</i>	Martínez y Morales 2015.

2.10. Cultivo de hongos nematófagos y producción de metabolitos secundarios

Para llevar a cabo la producción y aislamiento de hongos nematófagos, se han descrito algunos medios como: Agar bacteriológico, PDA (papa dextrosa agar), CMA (agar de harina de maíz) OMA (harina de avena), RDA (agar de estiércol de conejo) y diferentes medios selectivos. Es importante mencionar que como regla general, estos medios deben de tener bajo contenido de nutrientes para el aislamiento y contrariamente, para su incubación se debe preparar un medio alto en nutrientes; sin embargo, se ha notado de manera general, que un medio rico puede producir menor cantidad de conidióforos (Li *et al.*, 2014). Después del aislamiento, los hongos nematófagos necesitan ser preservados por largos periodos de tiempo y necesitan ser evaluados cuidadosamente para ser seleccionados como potentes candidatos de control AH. El mantenimiento en el laboratorio es un requisito básico para que la actividad permanezca, esto requiere periodos de replicación, exposición del cultivo a condiciones ambientales que puedan llevar a cabo mutaciones favorables además de mejorar la capacidad depredadora (Mota *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2004). Una de las principales ventajas de usar hongos nematófagos como controladores biológicos es la habilidad de estos a sobrevivir por largos periodos de tiempo bajo condiciones de laboratorio; sin embargo, algunos hongos aislados pueden perder su actividad depredadora (Braga *et al.* 2011).

De acuerdo con Nozaki (2004), las condiciones de crecimiento y esporulación no siempre son las mismas. Se conoce que algunos medios de cultivo favorecen más que otros para ambos fines. Además, la actividad depredadora que poseen los hongos nematófagos no se asocia con crecimiento micelial o crecimiento fúngico (clamidoporas o micelio). Este hecho es un factor importante en términos de propagación y sobrevivencia de estos organismos en condiciones ambientales (Dackman *et al.*, 1987). Para producir micelio y esporas se han hecho un gran número de estudios en función de nutrientes del medio de crecimiento, los principales factores nutrimentales que se han evaluado son las fuentes de carbono (C), nitrógeno (N) y la relación C/N en el medio, así como vitaminas y minerales

(Sun y liu, 2006). Gao en 2014 estudió los efectos de estos nutrientes y encontró en cultivos de la cepa ARF907 que el mejor crecimiento micelial se obtuvo con una concentración de C de 6 g /l y la relación N/C 160:1. Además, menciona que la mejor fuente de carbono seleccionada es la fructosa con peptona de soya, ya que en conjunto, mostraron la mejor producción micelial con el uso de la cepa ARF907. Algunos investigadores concluyen que el uso de los medios de SD (soya dextrosa) y CG (granos de maíz) en pH 6.0 y 7.0 en condiciones de agitación son idóneos para llevar a cabo alta producción de masa de *D. flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* (da Silva *et al.*, 2013). En un cultivo en matraz de 50 mL con *D. flagrans* 1.07 g de masa micelial en pH 6.0 a las 168 h y con *M. thaumasium*; estos autores obtuvieron 1.12 g de masa en pH 7.0 a las 48 h.

Como se ha observado, se han usado diferentes medios de cultivo con el fin de obtener mejor producción de micelio o esporas; sin embargo, existen grandes diferencias para ambas condiciones y esto depende en medida de las propias características de la especie de cepa, diferencias nutricionales, condiciones fisicoquímicas en el medio de cultivo y la relación con los componentes de la fórmula que se desee emplear (Gao, 2007). De igual manera, en el cultivo micelial se espera la producción de metabolitos secundarios; sin embargo, tal producción depende de los factores antes mencionados; además, se tienen reportes que indican que la biosíntesis de metabolitos está ligada en función del sustrato y las condiciones de su cultivo (Shinya *et al.*, 2008; Regaieg *et al.*, 2010, Gamboa *et al.*, 2015).

En el Cuadro 2 se muestran algunas condiciones para producir metabolitos en diferentes medios de cultivo, así como el método de extracción de estos. Algunos de los metabolitos y proteínas aisladas afectan la viabilidad y movilidad de nematodos patógenos de plantas (*Meloidogyne incognita*) y animales (*H. contortus* y *Angiostrongylus vasorum*)

En el presente trabajo de investigación, el grupo del CENID-SAI-INIFAP cuenta con una colección de hongos nematófagos que han mostrado actividad depredadora mayor del 75% contra *H. contortus*. Algunos de los candidatos existentes comprenden especies del género *Arthrobotrys*, *Gliocadium* y *Trichoderma*. Actualmente, se cuenta con alrededor de 100 cepas de hongos nematófagos de las

cuales se espera aislar metabolitos secundarios que puedan combatir al nematodo *H. contortus*.

Cuadro 2. Condiciones de crecimiento de cepas, producción y extracción de metabolitos secundarios de hongos nematófagos contra nematodos fitopatógenos y patógenos en animales

Producto	Especie	Medio de crecimiento	Obtención	Nematodo blanco	Dosis	Referencia
Oligosporon, Oligosporol A, y 4'5' dihidro-oligosporon	<i>Arthrobotrys oligospora</i> , <i>A. conoides</i>	Papa dextrosa(PD) Agitación:200 rpm Cultivo: 7 días	Micelio Extracto: Acetato de Etilo	<i>Haemonchus contortus</i> (L3)	Oligosporon A: DL ₅₀ :25 µg/mL 4'5' dihidro-oligosporol: DL ₅₀ :50-100 µg/ml	Anderson <i>et al.</i> , 1995.
Roselipinas 1-5	<i>Clonostachys candelebrum</i>	Semillas de mijo, extracto de levadura, sacarosa, alfalfa, tartrato disodico, aceite de maíz, y sulfato de hierro. 28 días	Micelio Extracto: Acetona en agitación 3h	<i>H. contortus</i> (L3)	Inhibición de la movilidad Concentración efectiva: CE ₉₀ : 22µg/mL	Ayers <i>et al.</i> , 2010.
Aurovertinas A3 y A4	<i>Pochonyia clamidosporia</i>	PD Agitación: 180 rpm. 28°C, cultivo: 12 días	Líquido filtrado	<i>Meloidogyne Incognita</i>	Aurovertinas A 3: DL ₅₀ :88.6 µg/mL Aurovertinas A 4: DL ₅₀ :41.7 µg/mL	Niu <i>et al.</i> , 2010.
Proteasas	<i>Verticillium leptobactrum</i>	Czapek Dox-Broth Cultivo: 14 días	Líquido filtrado 1/10, ¼ y 1/2 (v:v).	<i>M. incognita</i> (Eclósión de huevos y J2)	Huevo: 7 días: 50% inhibición eclósión Larvas (J2): 1, 4 y 7 días > 93 % reducción letal	Regaieg <i>et al.</i> , 2010
3 Proteasas	<i>A. sinensis SF53</i>	Extracto de levadura, glucosa, K2HPO4 MgSO4, ZnSO4, FeSO4, CuSO4 Agitación 120 rpm Cultivo: 6 días	Líquido filtrado 100%	<i>Angiostrongylus vasorum</i> (L1)	24 h 64.3 % reducción letal	de Freitas <i>et al.</i> , 2014
Proteasas Grupo: serina	<i>A. musiformis</i>	PD Cultivo: 14 días	Líquido filtrado Fracciones utilizadas al 100%: Líquido filtrado Concentrado de intercambio iónico (IEX) y de interacción hidrofóbica (HIC)	<i>H. contortus</i> (L3)	48 h Daño en movilidad: L. filtrado: 38% IEX: 85% HIC: 82% Observaciones: daño celular	Acevero-Ramírez <i>et al.</i> , 2015

3. Justificación

Los nematodos gastrointestinales ocasionan grandes pérdidas económicas a la producción ovina y caprina en México. *Haemonchus contortus* es el nematodo que presenta mayor patogenicidad debido a que es hematófago, ocasionando anemia y muerte en rumiantes jóvenes. Los tratamientos comúnmente utilizados contra estos parásitos se basan en el uso periódico de drogas químicas antihelmínticas que si bien ayudan a reducir las parasitosis; también traen consigo características indeseables como la resistencia antihelmíntica, contaminación de la carne y leche; además de contaminar el suelo a través de la eliminación de moléculas bio-activas afectando a organismos benéficos. La presente investigación plantea la búsqueda de compuestos producidos por hongos nematófagos con actividad antiparasitaria. Como mostramos anteriormente, existen algunas moléculas ya identificadas como flagranonas, oligosporones, roselpinas con actividad antihelmíntica, estos antecedentes fortalecen nuestro planteamiento. Contar con metabolitos bio-activos contra nematodos abrirá nuevas alternativas biotecnológicas para el control de nematodos que afectan a la producción pecuaria en México.

4. Hipótesis

Los hongos nematófagos producen compuestos con actividad antihelmíntica contra *Haemonchus contortus*.



5. Objetivo General

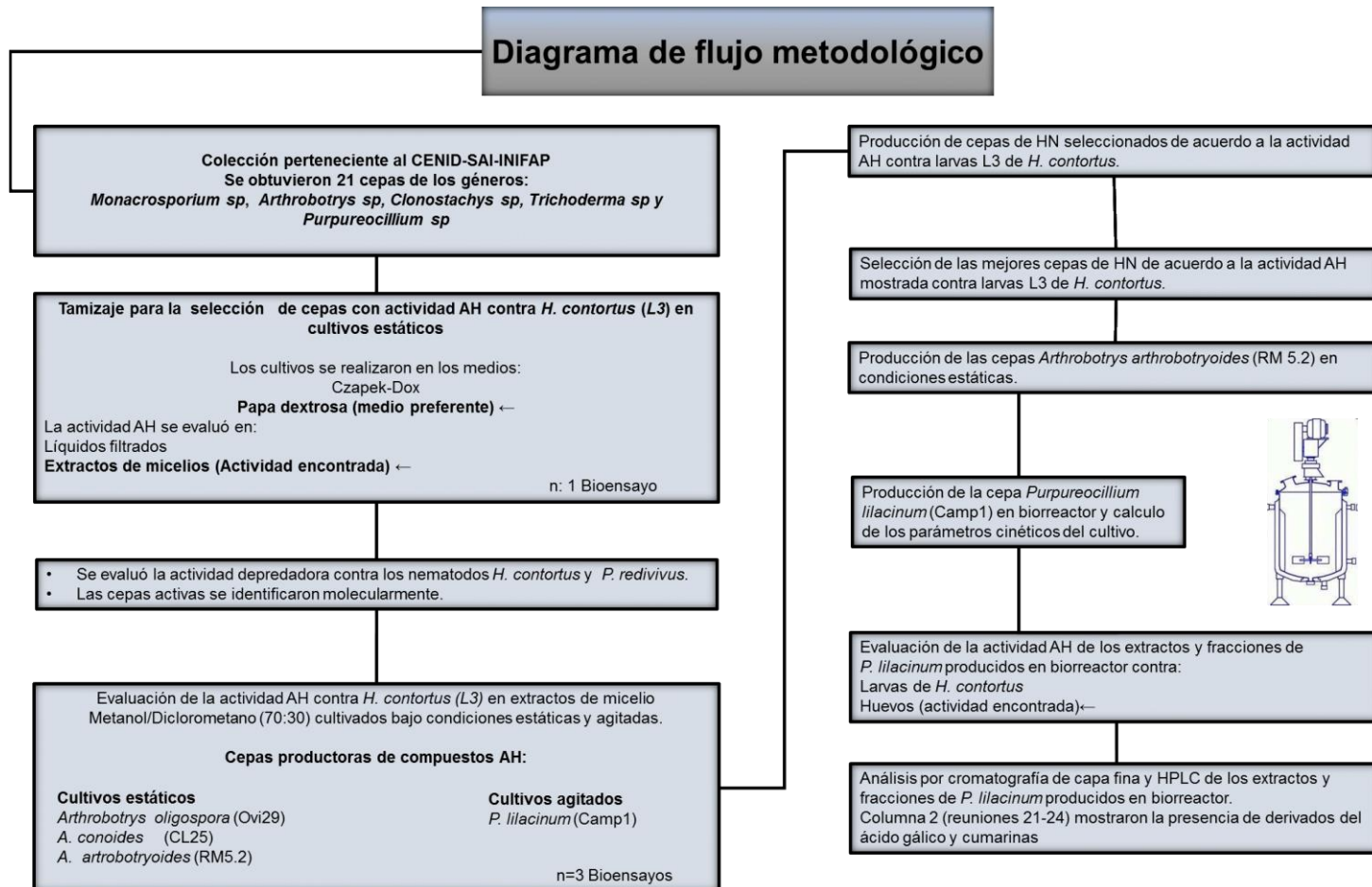
Evaluar la actividad depredadora *in vitro* de cepas de hongos nematófagos seleccionados e identificar los grupos de compuestos químicos asociados a la actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*

6.1. Objetivos particulares

1. Identificar morfológica y molecularmente cepas de hongos nematófagos seleccionadas a partir de la colección de hongos pertenecientes al CENID-SAI-INIFAP.
2. Evaluar la actividad depredadora *in vitro* de los hongos seleccionados en contra de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (L3).
3. Evaluar la actividad nematocida *in vitro* de extractos orgánicos de los hongos nematófagos seleccionados en contra de larvas infectantes de *H. contortus* (L3).
4. Identificar los grupos de compuestos producidos por los hongos nematófagos seleccionados asociados a la actividad nematocida contra *H. contortus* (L3) a través de técnicas cromatográficas.

6. Metodología

Para la realización del presente proyecto, se llevó a cabo la metodología general que se resume a continuación (Diagrama de flujo).



6. 1. Metodología sección I:

En esta sección se incluye la metodología utilizada para cumplir con los siguientes objetivos:

1-Identificar morfológica y molecularmente cepas de hongos nematófagos seleccionadas a partir de la colección de hongos pertenecientes al CENID-SAI-INIFAP.

2-Evaluar la actividad depredadora *in vitro* de los hongos seleccionados en contra de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Algunos puntos importantes que se desarrollaron se enlistan a continuación:

- Obtención de material biológico.
- Evaluación de la actividad depredadora de las cepas seleccionadas.
- Identificación morfométrica y molecular de cepas de los hongos nematófagos seleccionados y elaboración de un árbol filogenético taxonómico.
- Elaboración de cultivos de 50 ml de cepas de hongos nematófagos.
- Producción a escala y selección de cepas de hongos nematófagos de acuerdo a la actividad AH mostrada contra larvas de *H. contortus* (L3).
- Obtención de líquidos filtrados y micelios.
- Elaboración de extractos.

6.1.1. Activación de cepas

De la colección de hongos nematófagos pertenecientes al Área de Investigación en Helmintología del CENID-SAI, del INIFAP, mantenidos bajo condiciones de criopreservación en nitrógeno líquido, se seleccionaron 21 cepas que fueron re-activadas mediante su transferencia a placas de Petri con agua agar, donde permanecieron durante 1-4 semanas. Una vez que las cepas fueron activadas se llevó a cabo su análisis taxonómico mediante taxonomía morfométrica tradicional a través de su genotipificación. En el cuadro 3, se muestra un listado de las cepas seleccionadas; así como su origen y fuente de aislamiento (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cepas de hongos nematófagos seleccionados para llevar a cabo la evaluación de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antihelmíntica contra el nematodo *Haemonchus contortus*. Se detalla el sustrato y el lugar del que se aislaron.

Cepas	Fuente de aislamiento	Lugar de aislamiento
<i>Monacrosporium eudermatum</i> (Z-2.1)	Suelo Base de árbol	Ahuatepec
<i>M. eudermatum</i> (Z-3.3)	Composta	Ahuatepec
<i>M. eudermatum</i> (Z-3.4)	Suelo base de flores	Ahuatepec
<i>M. eudermatum</i> (Z-3.6)	Suelo base de rieles de tren	Ahuatepec
<i>Duddingtonia flagrans</i> (D1)	Suelo	Veracruz
<i>Arthrobotrys conoides</i> (730)	-Hojarasca	-
<i>Lecanicillium saksanae</i> (C-LST)	Suelo	Tepoztlán
<i>L. psalliotae</i> (OC-LPJ)	Suelo	Jiutepec
<i>L. psalliotae</i> (CL-O)	Suelo	Ocuituco
<i>A. arthobotryoides</i> (RM 5.2)	Suelo	Rancho "Las margaritas Puebla"
<i>Arthrobotrys</i> sp. (JOSS)	Suelo seco	Tlayacapan Mor. San Agustín
<i>A. conoides</i> (CL25)	Heces Ovino	Temazcaltepec, Estado de México.
<i>Arthrobotrys</i> sp. (Ovi 4)	Heces Ovino	Temazcaltepec, Estado de México.
<i>Arthrobotrys</i> sp. (Ovi 21)	Heces Ovino	Temazcaltepec, Estado de México.
<i>Arthrobotrys</i> sp. (Ovi 22)	Heces Ovino	Temazcaltepec, Estado de México.
<i>A. oligospora</i> (Ovi 29)	Heces Ovino	Temazcaltepec, Estado de México.
<i>Arthrobotrys</i> sp. (466)	-	-
<i>Clonostachys</i> (T3H91)	Suelo	Campeche
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	-Hojarasca	Campeche
<i>Trichoderma essaux</i>	-	Campeche
<i>Kehlacer</i>	-	Campeche

No se conoce el dato (-).

6.1.2. Obtención de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*

Las larvas de *H. contortus* se obtuvieron de las heces de un cordero de la raza Pelibuey de 4 meses de edad infectado artificialmente con 350 larvas (L3) por kg. Para la obtención de larvas infectantes se realizó un coprocultivo donde las muestras de heces (que contienen los huevos de *H. contortus*) se maceraron sobre una palangana de plástico, se homogenizaron con agua corriente y hule espuma para permitir oxigenación, evitar malos olores y proliferación de larvas externas. El coprocultivo se homogenizó manualmente tres veces por semana (tiempo en el que se desarrollan los huevos a larvas (L3)).

Las larvas se recuperaron utilizando la técnica de Baermann o método de migración larvaria. La muestra de heces se dejó sedimentar en un embudo durante 24 h, en este se colocó un muñón de heces diseñado con tela gasa y se cubre con agua. Al final del embudo se coloca una manguera con un tubo de ensayo de 10 mL, las larvas migran del cultivo fecal al fondo del embudo pasando a través del muñón. Para concentrar las larvas (L3), La solución recuperada se colocó en tubos de 50 mL, se dejaron enfriar a 4°C durante 2 h. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y finalmente las larvas sedimentadas se filtraron. Las larvas se almacenaron a 4°C para los bioensayos posteriores.

6.1.3. Lavado de larvas de *Haemonchus contortus*

Las larvas se lavaron con una solución de sacarosa al 40%, se colocaron 10 mL de esta solución en un tubo falcon y cuidadosamente se agregaron 3 mL de la suspensión de larvas previamente concentradas, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min. El anillo de larvas se colectó y las larvas se lavaron 3 veces durante 1 min a 2500 rpm.

6.1.4. Obtención de huevo de *Haemonchus contortus*

Los huevos del nematodo *H. contortus* se obtuvieron de heces fecales de un borrego donador previamente infectado. Se colectaron 40g de heces directamente del recto del animal. Las heces se trituraron con agua, posteriormente los huevos se lavaron en un sistema de tamices, los huevos quedaron suspendidos en el tamiz de 45 micras. Los huevos de *H. contortus* se extrajeron por medio de un gradiente de densidad con sacarosa al 40% donde se colocan 8 mL de una suspensión inicial de

sacarosa 40% y cuidadosamente se añadieron 5 mL de la suspensión de huevo, se centrifugaron a 3000 rpm y posteriormente se retiró el anillo de huevo de la interfase, se realizaron 3 lavados con agua destilada mediante centrifugación.

6.1.5. Obtención del nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus*.

Se utilizó una cepa del nematodo de vida libre *P. redivivus* perteneciente al CENID-SAI INIFAP. Los nematodos se reprodujeron en masa utilizando un medio a base de avena, previamente cocida durante 5 min. El medio se inoculó con 5 mL de una suspensión acuosa conteniendo un número indeterminado de nematodos y se dejaron incubar durante 7 días a 25-27°C de temperatura en el laboratorio (de Lara *et al.*, 2007). Después de este periodo, los nematodos fueron recuperados mediante la técnica del método del Embudo de Baermann (Thiempont *et al.*, 1986). Los nematodos fueron lavados con agua simple utilizando tamices de 100 micras y resuspendidos en agua estéril para su uso.

6.1.6. Identificación fúngica a través de taxonomía tradicional (sistema morfométrico)

Los hongos nematófagos se cultivaron en placas Petri con medio agar bacteriológico al 2%. Las cepas de hongos fueron incubadas en agua agar durante 15 días a temperatura ambiente (25-28°C). Después del periodo de incubación en cada caja (n=3) se confrontaron con 1500 larvas de *H. contortus* (L3) y de manera separada 1500 especímenes (miscelanea de estadios, incluyendo juveniles y adultos del nematodo *Panagrellus redivivus*). Las confrontaciones se realizaron durante 10 días. La morfología y talla de las estructuras de los hongos nematófagos (conidióforo, conidios, trampas, hifas y micelio) se observaron bajo microscopio compuesto (LEICA DM6 B). Las estructuras se fotografiaron bajo aumento de 10X, 20X y 40X y posteriormente se analizaron con ayuda del programa LAS Versión 4.9 [Build:129] copyright C ©2003-2016 Leica Microsystems (Switzerland) Limited. Se fotografiaron 25 conidios de cada cepa. Las clasificaciones taxonómicas se realizaron según las claves descritas por Haard (1968), Drechsler (1937), y Kepenekci *et al.* (2015).

6.1.7. Identificación molecular

Los resultados de la taxonomía tradicional fueron corroborados mediante la identificación molecular a partir de la extracción de ADN de los hongos nematófagos, seguido de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando primers: ITS1 (GGA AGTAAA AGT CGT AAC AAG G) e ITS4 (TCC TCC GCTTAT TGA TAT GC). Estos oligonucleótidos se utilizaron para secuenciar regiones ITS1, 5.8S e ITS2, (White *et al.*, 1990; Castañeda-Ramírez *et al.*, 2016). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial: 94°C, 3 min; desnaturalización: 94°C, 1 min.; alineamiento: 42°C, 90 segundos; extensión: 72°C, 90 segundos.; extensión final: 72°C, 5 min. Para purificar el producto de PCR obtenido, se utilizó el kit de purificación QIAquick Gel Extraction Kit protocol. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1%. La secuenciación de los productos de la reacción se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM) utilizando el secuenciador Applied Biosystems Sequencer (7700). Para realizar el análisis de homología de las secuencias, se utilizó la base de datos de NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Los porcentajes de identidad y alineamientos se obtuvieron para comparar y confirmar la identidad de las cepas basadas en la identificación morfométrica de las cepas aisladas.

6.1.8. Análisis múltiple y elaboración de árbol filogenético

Se realizó un análisis múltiple en la base de datos GenBank (NCBI) y las secuencias con un porcentaje de identidad mayor al 90% se analizaron separadamente para determinar los porcentajes de similitud entre las regiones ITS1, 5.8S e ITS2. Se analizaron un total de 28 cepas de la base de datos y los alineamientos se analizaron con el programa CLC sequence Viewer software (Sequencer). El costo de los gaps y el costo de las extensiones se designaron como 10 y 1 respectivamente. Se generó un fenograma con el uso del algoritmo UPGMA bajo las mediciones de las distancias de nucleótidos de Jukes -Cantor, los análisis de bootstrap se realizaron con 100 replicados.

6.1.9. Evaluación de la actividad depredadora

Cada cepa de HN seleccionadas (*Arthrobotrys conoides* (CL25), *A. arthrobotryoides* (RM 5.2), *A. oligospora* (Ovi 29) y *P. lilacinum* (Camp1) se cultivó en cajas Petri con medio agar bacteriológico al 2%. Después de 15 días de cultivo (25-30°C) se añadieron 750 larvas de *H. contortus* (L3) ó 750 nematodos *P. redivivus* (Miscelanea de estadios tanto juveniles como adultos) a cada cultivo en cajas Petri. Se colocaron controles negativos que solo contienen medio agar y nematodos 750 larvas de *H. contortus* (L3) ó 750 nematodos *P. redivivus*. Para coleccionar las larvas que no se depredaron, el agar se colocó en un embudo de Baermann con la superficie del agar de manera invertida. Los tratamientos (T1-T10) se elaboraron como se describe a continuación:

Cultivo de cepas de HN durante 15 días	Confrontación durante 11 días	
	Adición de 750 larvas de <i>H. contortus</i> (L3)	Adición de 750 larvas (juveniles) de <i>P. redivivus</i>
<i>A. arthrobotryoides</i> (RM5.2)	✓ T1	✓ T6
<i>A. oligospora</i> (Ovi29)	✓ T2	✓ T7
<i>A. conoides</i> (CL25)	✓ T3	✓ T8
<i>P. lilacinum</i> (Camp1)	✓ T4	✓ T9
Control Agar (sin hongo)	✓ T5	✓ T10

Cada unidad experimental consistió en 1 cultivo en caja Petri de cada cepa de HN + nematodos ó 1 placas Petri con agar + nematodos. Cada tratamiento contó con 10 unidades experimentales y los tratamientos se repitieron 3 veces.

El porcentaje de larvas recuperadas se obtuvo y se comparó con los grupos control. La fórmula que se utilizó para estimar el porcentaje de depredación fue la siguiente:

$$A = \frac{X}{X + Y} * 100,$$

Donde “A” es el porcentaje de depredación, “X” es el promedio de las larvas recuperadas con hongos, y es el promedio de las larvas recuperadas de las placas sin hongos.

Análisis estadístico: Los datos se transformaron mediante la función de arco seno [$y = \arcsin(\sqrt{s/100})$]. Se empleó un diseño experimental completamente al azar para evaluar si existen diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba de rangos múltiples de Tukey mediante el software SAS (versión 9.0)

6.1.10. Producción de cepas en medio líquido estático.

Para llevar a cabo el crecimiento en cultivo líquido, se transfirieron 3 discos ($\varnothing=7$ mm) del cultivo sólido a 50 mL de los medios líquidos de papa agua (200 g de papa + 10 g de dextrosa en 1 L agua) y Czapek-Dox Broth (35 g/L). Se dejaron cultivar durante 14 días (25 - 30°C) en fotoperiodo natural (12/12 h) sin agitación.

Nota: las pruebas de tamizaje de las 21 cepas de la colección de HN se realizaron con los medios líquidos: Czapek Dox y papa dextrosa. La selección de cepas de HN productoras de compuestos bioactivos se seleccionaron con base en los porcentajes de letalidad mayores al 30%.

6.1.11. Producción de cepas en medio líquido agitado

Se inocularon 3 discos ($\varnothing=7$ mm) del cultivo sólido en 50 mL de los medios líquidos de papa agua (200 g de papa + 10 g de dextrosa en 1 L agua). Se dejaron cultivar durante 14 días (25 - 30°C) en fotoperiodo natural (12/12 h) en agitación (150 rpm).

6.1.12. Producción a escala de los cultivos de hongos nematófagos seleccionados en condiciones estáticas y agitadas

La producción a escala de los cultivos estáticos se realizó en matraces de 1L a temperatura ambiente (28-30°C). Se colocaron 15 discos de 0.7mm de diametro a cada cultivo de 300 mL y el cultivo se dejó fermentar durante 15 días. Los cultivos

de la cepa *P. Lilacinum* se colocaron en agitación durante 11 días (28 30°C, 150 rpm). Posteriormente, el micelio recuperado se liofilizó y se elaboraron los extractos correspondientes como se menciona en el punto metodológico 7.1.14.

6.1.13. Separación de líquido filtrado y micelio

Los líquidos del cultivo se obtuvieron mediante filtración en papel filtro Whatman® No. 42. Los micelios se liofilizaron, se pesaron, se trituraron y se almacenaron a -20°C para la futura evaluación y extracción de compuestos (Gamboa *et al.*, 2015).

6.1.14. Elaboración de extractos

Para la elaboración de los extractos, los micelios liofilizados se maceraron con una mezcla de disolventes (Metanol/Diclorometano 70:30), la extracción se realizó 3 veces durante 24 horas (Gamboa *et al.*, 2016), los extractos se liofilizaron, se pesaron y se guardaron a -20°C para su futura evaluación.

6.2. Sección metodológica II

En esta sección se incluye la metodología que se utilizó para cumplir con los objetivos:

3. Evaluar la actividad nematocida *in vitro* de extractos orgánicos de los hongos nematófagos seleccionados en contra de larvas infectantes de *H. contortus* (L3).
4. Identificar los grupos de compuestos producidos por los hongos nematófagos seleccionados asociados a la actividad nematocida contra *H. contortus* (L3) a través de técnicas cromatográficas.

Los puntos importantes que se desarrollaron en esta sección se enlistan a continuación:

- Evaluación de la actividad AH mediante Bioensayos.
- Producción a escala de la cepa *A. arthrobotryoides* (RM5.2) en condiciones estáticas y producción de la cepa *P. lilacinum* en biorreactor.
- Análisis por cromatografía de capa fina de los extractos y análisis por HPLC de las fracciones de *P. lilacinum* producidos en biorreactor.

6.2.1. Realización de bioensayos para evaluar la actividad nematocida de los líquidos filtrados y extractos de micelios de las cepas de hongos nematófagos contra larvas (L3) de *H. contortus*

Los bioensayos se realizaron en placas de microtitulación de 96 pozos. La confrontación se realizó en los micropozos de la placa como se menciona a continuación:

Evaluación de líquidos filtrados: se adicionaron 90 μ L del líquido filtrado de cada una de las cepas y 150 larvas infectantes de *H. contortus* (L3) contenidos en un volumen de 10 μ L ajustando a un volumen final fue 100 μ L. Los controles negativos fueron: Caldo papa y agua; los controles positivos fueron: Ivermectina 5 mg/mL .

Evaluación de la actividad AH en micelios: se colocaron 90 μ L el extracto de micelio (100 mg/mL) de cada una de las cepas. En cada extracto se confrontaron 150 larvas infectantes de *H. contortus* (L3) contenidos en un volumen de 10 μ L ajustando a un

volúmen final fue 100 µL. Los controles negativos fueron: DMSO 5% y los controles positivos: Ivermectina 5 mg/mL. La actividad antihelmíntica se evaluó a las 24, 48, 72 y 96 horas.

El porcentaje de mortalidad larvaria se calculó mediante la siguiente fórmula de Abbot:

$$\text{Porcentaje de mortalidad larval} = \frac{\bar{X}_{\text{grupo control}} - \bar{X}_{\text{grupo tratado}}}{\bar{X}_{\text{grupo tratado}}} \times 100$$

Donde:

$\bar{X}_{\text{grupo control}}$ = Promedio de larvas recuperadas vivas en el grupo control

$\bar{X}_{\text{grupo tratado}}$ = Promedio de larvas recuperadas vivas en el grupo tratado

Cada unidad experimental se realizó en un pozo de la placa de microtitulación y se ajustó a un volúmen final de 100µL en el que se confrontaron 100 mg/mL del extracto o Líquido filtrado al 100% y 150 Larvas (L3). Para hacer el análisis estadístico, se realizaron tres repeticiones de cada bioensayo (cada uno contó con 4 unidades experimentales).

Análisis estadístico: Los datos se transformaron mediante la función de arco seno [$y = \arcsin(\sqrt{s/100})$]. Se empleó un diseño experimental completamente al azar. Para evaluar si existen diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba de rangos múltiples de Tukey mediante el software SAS (versión 9.0).

6.2.2. Tamizaje para la selección de cepas productoras de compuestos AH.

Los bioensayos se llevaron a cabo como se mencionó en el punto metodológico 6.2.1. Se evaluó la actividad AH de los líquidos filtrados sin concentrar y la actividad AH de los micelios de 21 cepas de HN de la colección del CENID-SAI INIFAP, las cepas se cultivaron en 50 mL de los medios Czapek dox y papa dextrosa. Este bioensayo fue preliminar, es decir, contó con 1 replica con 4 unidades experimentales y las cepas que tuvieron porcentajes de letalidad contra larvas L3 mayores al 30% se seleccionaron como productoras de compuestos AH.

6.2.3. Evaluación de la actividad antihelmíntica de cepas seleccionadas

Se cultivaron las cepas seleccionadas (*Arthrobotrys conoides* (CL25), *A. arthrobotryoides* (RM 5.2), *A. oligospora* (Ovi 29) y *P. lilacinum* (Camp1) en cultivos de 50 mL del medio papa dextrosa, las cepas se cultivaron en condiciones: estáticas y agitadas, la actividad AH de los extractos de micelio se evaluaron como se describió previamente. Estos bioensayos contaron con 3 réplicas con cuatro unidades experimentales cada una.

6.2.4. Actividad antihelmíntica de líquidos filtrados y extractos de micelios durante la cinética de crecimiento en fermentador de *P. lilacinum* (Camp1)

Los líquidos se colectaron a las 48, 96, 144, 192, 240, 288 y 336 horas de cultivo y estos fueron utilizados sin diluir. Las confrontaciones contra larva de *H. contortus* L3 se llevaron a cabo en placas de microtitulación como se describió previamente. Se colocaron 100 µl por pozo de las muestras obtenidas a las 48, 96, 144, 192, 240, 288 y 336 horas y posteriormente se les adicionaron 10 µl de una suspensión acuosa que contenía 150 larvas de *H. contortus* (L3), a cada bioensayo se les adicionaron las pruebas control: agua, líquido de papa e ivermectina 5%, las lecturas fueron registradas a las 96 horas post confrontación estos bioensayos contaron con tres réplicas con cuatro unidades experimentales cada una.

Los micelios colectados a las 48, 96, 144, 192, 240, 288 y 336 h de la cinética de *P. lilacinum* (Camp1) fueron liofilizados, pesados y posteriormente se llevó a cabo una extracción de compuestos utilizando los disolventes diclorometano/metanol (30:70). Para llevar a cabo la evaluación de efecto AH contra larvas de *H. contortus* L3, los extractos se ajustaron a una concentración de 100 mg/mL, y posteriormente se realizaron los bioensayos como se describió previamente, cada bioensayo contó con sus controles correspondientes: agua, DMSO 5% e ivermectina 5 mg/mL; mientras que las lecturas se registraron a las 96 horas post confrontación. Cabe mencionar que las evaluaciones de la actividad AH, tanto en líquidos filtrados como

extractos de micelio, fueron realizados por triplicado (cada repetición contó con cuatro unidades experimentales).

6.2.5. Evaluación de la actividad AH del líquido filtrado liofilizado y extractos de micelio de la biomasa de *P. lilacinum* (Camp1) en fermentador

Al término de cada fermentación, los productos como líquido y biomasa (micelio) se recuperaron por filtración con papel Whatman® N° 42. El líquido fue recuperado y 10 mL de cada fermentación se liofilizó. Posteriormente, se evaluó la actividad AH ajustando los líquidos liofilizados a una concentración de 100 mg/ml.

Por otra parte, los micelios se recuperaron, se les retiró el líquido restante por filtración, posteriormente la biomasa se liofilizó y para determinar el rendimiento esta se pesó. Para llevar a cabo las extracciones se siguió la metodología descrita en el punto metodológico 7.1.14.

Las muestras se liofilizaron y los extractos se ajustaron a una concentración de 100 mg/mL. Los bioensayos se realizaron como se describió previamente y cada bioensayo contó con sus respectivos controles, estos fueron realizados por triplicado (cada repetición contó con cuatro unidades experimentales).

6.2.6. Evaluación de la actividad AH de las fracciones obtenidas de la columna 1 del extracto Metanol/Diclorometano (70:30) de *P. lilacinim* (Camp1) contra huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*

Los bioensayos realizados con las fracciones del extracto Metanol/Diclorometano (70:30) de la cepa *P. lilacinim* (Camp1) se diseñaron como se describe en el punto metodológico 7.2.1. Las fracciones y reuniones se confrontaron a una concentración de 40 mg/mL durante 96 horas contra larvas L3.

Los bioensayos en huevo se realizaron en placas de microtitulación como se describió previamente, se agregó un volumen final de 100 µL conteniendo 200 huevos de *H. contortus*. Los productos que se evaluaron en este bioensayo fueron las fracciones obtenidas del extracto Metanol/Diclorometano (70:30) (columna 1) en las siguientes concentraciones: 40, 30, 20 y 10 (mg/mL). Los bioensayos contaron con el control negativo agua. El bioensayo se dejó confrontar durante 48 horas 25-

28 °C. Las reuniones utilizadas fueron: 17-20 y 21-24 las concentraciones utilizadas fueron: 40, 30, 20 y 10 (mg/mL).

La estimación de la inhibición de la eclosión, se obtuvo calculando el promedio de Larvas L1 y promedio de huevo no eclosionado. Se analizaron 10 alícuotas de la solución de los bioensayos de 5 µl cada una, la diferenciación visual de huevos y larvas L1, se realizó en microscopio compuesto con objetivos 4X y 10X (Coles *et al.*, 1992).

Cada bioensayo contó con sus respectivos controles, estos fueron realizados por triplicado (cada repetición contó con cuatro unidades experimentales).

Análisis estadísticos. Los datos se transformaron mediante la función de arco seno [$y = \arcsin(\sqrt{s/100})$]. Se empleó un diseño experimental completamente al azar. Para evaluar si existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas, se realizó la prueba de rangos múltiples de Tukey mediante el software SAS (versión 9.0)

6.2.7. Producción de *P. lilacinum* (Camp1) en fermentador

La producción en masa de la cepa *P. lilacinum* (Camp1), se realizó en un fermentador de 7 L equipado con una turbina Rushton (diámetro del impulsor/diámetro del tanque= 0.4), el volumen de trabajo es de 5 L, el volumen de aire constante se reguló a 1 vvm (velocidad por volumen de aire por minuto). Se mantuvo una velocidad de agitación de 150 rpm, 25-29° C. Para llevar a cabo el seguimiento de la producción de la biomasa y mediciones de pH y actividad AH se tomaron muestras de 50 mL cada 48 horas durante 14 días. Para lograr una producción de 20 L de la cepa *P. lilacinum* (Camp1), se prepararon cuatro réplicas de 5 L cada una.

6.2.8. Preparación del inóculo para la producción de la cepa *P. lilacinum* (Camp1) en fermentador

El inóculo utilizado, consistió en un cultivo de 150 mL de caldo papa-dextrosa en un matraz Erlenmeyer, en el que se inocularon 9 discos (7 mm Ø) de un cultivo de agar bacteriológico al 2% de *P. lilacinum* (Camp1) cultivado durante 14 días. El inóculo

fue agitado en un homogeneizador de matraces a 150 rpm durante 7 días. Posteriormente, el inóculo se vació en el fermentador que contenía un volúmen de 5 L de trabajo de caldo papa-dextrosa.

6.2.9. Determinación del peso seco de la biomasa durante la cinética de crecimiento la cepa *P. lilacinum* (Camp1) en fermentador

Para llevar a cabo la estimación de la biomasa se utilizó el método gravimétrico en peso seco (g/L). Se tomaron 50 mL del cultivo del fermentador durante 48, 96, 144, 192, 240, 288 y 336 horas del cultivo. Para la determinación de la biomasa en peso seco, la biomasa contenida en este volúmen fue centrifugada a 2500 rpm, 10 min., el líquido se recuperó y se congeló a -20°C. Por otra parte, el micelio fue separado de los residuos del medio de cultivo y fue liofilizada para pesarse en balanza analítica. Cabe mencionar que dicha cinética tuvo cuatro réplicas experimentales.

6.2.10. Cálculo de parámetros cinéticos y estequiométricos mediante un modelo logístico de crecimiento

Un modelo logístico simple se empleó para describir el crecimiento celular, con el objetivo de determinar con más precisión la velocidad específica de crecimiento, este modelo se empleó para resolver las ecuaciones de producción y consumo de sustrato, mediante la siguiente expresión:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu_{\max} X \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)$$

Donde:

$$\mu t = \ln \frac{X}{X_{\max} - X} + \left(\ln \frac{X}{X_0} - 1 \right)$$

Integrando para $X_0 = X(t=0)$.

$$\mu t = \ln \frac{X}{X_{\max} - X} + \left(\ln \frac{X}{X_0} - 1 \right)$$

Donde:

$$X^* = \frac{Xt}{X_{\max}}$$

y (b) es el intercepto.

$$-b = \ln \left[\left(\frac{X_{\max}}{X_0} \right) - 1 \right]$$

La velocidad específica de crecimiento (μ) fue calculada por regresión lineal de $(X^*/1-X^*)$ contra tiempo, el coeficiente angular de la tendencia lineal corresponde al valor de (μ).

6.2.11. Realización de placas cromatográficas

Se realizaron placas TLC (Thin Layer Chromatography) con los extractos metanol/diclorometano (70:30) de cada una de las cepas activas. Las muestras se corrieron en placas TLC de fase normal y fase reversa, estas se visualizaron con lámpara de UV a una longitud de onda de 256 y 365 nm UV. Las placas se revelaron con reactivos 4-hidroxibenzaldehído y reactivo para flavonoides.

6.2.12. Análisis del perfil fitoquímico en capa fina de los extractos metanol/diclorometano 70:30 de las cepas *Arthrotrys conoides* (CL25), *A. arthrotryyoides* (RM 5.2), *A. oligospora* (Ovi 29) y *P. lilacinum* (Camp1)

El sistema de corrida en capa fina para la fase normal fue: diclorometano/metanol (9:1) y el sistema de elución para la fase reversa fue: agua/acetonitrilo (8:2). En la fase normal se utilizó un control estándar de ácido ursólico y para la fase reversa se utilizó el estándar control rutina.

Los estándares utilizados fueron β -citosterol, ácido ursólico, apigenina y luteonina. Las placas se observaron a una longitud de onda de 256 y 365 nm UV. Las placas fueron reveladas con el reactivo para flavonoides y 4 hidroxibenzaldehído.

6.2.13. Análisis en cromatografía de capa fina de las fracciones del extracto de la cepa *P. lilacinum* (columna 1)

Las fracciones resultantes se corrieron en placas TLC en diferentes sistemas de elución, las fracciones 17-22: Diclorometano/Metanol (8:2), las fracciones 23-30: Diclorometano/Metanol (5:5), y fracciones 31-35 (Metanol 100%). Las placas se revelaron con 4 hidroxibenzaldehído y reactivo para revelar flavonoides, el revelado se comparó con un control estándar β citosterol.

6.2.14. Fraccionamiento del extracto Metanol/Diclorometano (70:30) de *P. lilacinum* y análisis en placas TLC (columna 1)

El fraccionamiento se llevó a cabo bajo un sistema de fase normal, donde se utilizaron 150g de silica gel. Las fracciones se colectaron en un volumen de 100 mL, y el sistema de elución se realizó en polaridad creciente: Diclorometano/Metanol 100, 90:1, 70:30, 50:50 y metanol 100. Cada fracción se analizó por el método de cromatografía en capa fina (CCF).

6.2.15. Fraccionamiento en fase reversa de las reuniones 21-24 (Columna 2)

Se reunieron 250 mg de las fracciones activas (20-24). Las reuniones se adsorbieron en 2 g de silica gel fase reversa, posteriormente, se empacó en una columna conteniendo 8g de silica gel empacada con metanol 100%. El fraccionamiento se realizó con los disolventes Agua/Acetonitrilo. Las fracciones eluidas fueron las siguientes: 1-7 (agua 100%); 8-15 (95:5); 16-20 (9:1), 85:15 (21-24; 25-30 (7:3); 31-43 (6:4); 44-52 (100% Acetonitrilo).

6.2.16. Análisis de los compuestos obtenidos por cromatografía HPLC

El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando un equipo de HPLC (Cromatografía de líquidos de alta resolución). Se utilizó un módulo de separación Waters 2695, equipado con un detector de matriz de fotodiodos Waters 996 y los cromatogramas se analizaron con el software EmpowerPro (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.).

La separación de los compuestos se realizó en una columna Supelcosil LC-F (4,6 mm 50 mm), con un tamaño de partícula de 5µm, (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, EE. UU.). La fase móvil consistió en una solución acuosa acuosa de ácido trifluoroacético al 0,5% (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). Las condiciones de los gradientes fueron: 0-1 min, 0% B; 2-3 min, 5% B; 4-20 min, 30 % B; 21 a 23 minutos, 50% B; 24 a 25 minutos, 80% B; 26 a 27 100% B; 28 a 30 minutos, 0% B. El flujo se mantuvo a 0.9 ml/min. El volumen de inyección fue de 10µL. El detector de matriz de fotodiodos se fijó a una longitud de onda de 280 y 300 nm para la identificación de compuestos fenólicos.

7. Resultados

7.1. Resultados preliminares (pre-selección) de filtrados con actividad antihelmíntica obtenidos de cultivos de hongos nematófagos en medios papa dextrosa y Czapek Dox contra *Haemonchus contortus* (L3)

Los resultados preliminares de los filtrados de hongos nematófagos cultivados en medios Czapek-Dox y papa dextrosa, en su mayoría no presentaron actividad AH, sin embargo, los filtrados de tres cepas mostraron actividad a las 120h: *Arthrobotrys* sp. (466) , *Trichoderma esaux*, y *Arthrobotrys conoides* (730), los porcentajes de letalidad mostraron valores debajo del 20%. Los hongos restantes no mostraron actividad nematocida.

7.2. Resultados preliminares (pre-selección) de extractos (metanol/diclorometano 70:30) de micelios de hongos nematófagos cultivados en caldo Czapek Dox y papa dextrosa contra *Haemonchus contortus* (L3)

Los resultados de los extractos (metanol/diclorometano 70:30) obtenidos a partir de micelios de los hongos cultivados en medio Czapek-Dox que mostraron la mayor actividad nematocida *in vitro* correspondieron a las cepas: *Arthrobotrys* sp (466) con un 51.8%; seguido de *A. conoides* (730) con un 32.0% de actividad letal. El extracto obtenido a partir del hongo *Clonostachys* sp. (T3H91) mostró una actividad del 20%. El resto de los extractos no mostró efecto nematocida.

Los porcentajes de mortalidad *in vitro* de larvas infectantes de *H. contortus* expuestas a extractos (metanol/diclorometano 70:30) de los micelios de hongos nematófagos cultivados en medio PD se muestran en el Cuadro 4. Las cepas cuyos extractos mostraron actividades superiores al 80% fueron *A. oligospora* (Ovi29) (98.2%) y *Arthrobotrys* sp. (JOSS) (83%); seguidas de *P. lilacinum* (Camp1) (62%) y *A. conoides* (CL25) (42.7%) y las actividades más bajas correspondieron a las cepas *A. oligospora* (HSCSH) (38.02%), *L. saksanae* (LS-T) (30.1%) y *A. artrobotryoides* (RM5.2) 21.94%.

Cuadro 4. Resultados preliminares sobre el monitoreo de la actividad nematocida *in vitro* de extractos (diclorometano/metanol 30:70) de cultivos de hongos nematófagos en medio papa dextrosa contra larvas infectantes de *Haemonchus contortus* después de 48, y 72 h

Cepas	Actividad nematocida (%)	
	48 h	72 h
<i>Duddingtonia flagrans</i> (D1)	4.5 ±2.9 ^d	3.5±1.3 ^f
<i>Arthrobotrys arthrobotryoides</i> (RM5.2)	12.0 ±2.3 ^{cde}	21.9±10.4 ^{def}
<i>Monacrosporium eudermatum</i> (Z- 2.1)	7.4 ±2.8 ^{cde}	8.8 ±2.9 ^{ef}
<i>M. eudermatum</i> (Z-3.3)	7.4 ±3.8 ^{cde}	4.7 ±3.6 ^f
<i>M. eudermatum</i> (Z-3.4)	8.8 ±5.1 ^{cde}	10.4 ±4.3 ^{ef}
<i>M. eudermatum</i> (Z-3.6)	5.1 ±1.5 ^{cde}	7.6 ±4.7 ^{ef}
<i>Arthrobotrys oligospora</i> (HSC SH)	11.8 ±7.8 ^{cde}	38.0 ±27.2 ^{cde}
<i>Arthrobotrys</i> sp. (JOSS)	25.8 ±6.8 ^b	83 ±9.9 ^{ab}
<i>A. conoides</i> (CL25)	17.7 ±9.4 ^{bd}	42.7 ±8.6 ^{dc}
<i>A. oligospora</i> (Ovi29)	96.7 ±0 ^a	98.2 ±0 ^a
<i>Arthrobotrys</i> sp. (Ovi 4)	3.5 ±7.4 ^{de}	16.0 ±10 ^{def}
<i>Arthrobotrys</i> sp. (Ovi 21)	1.1 ±4 ^e	7.2 ±7.8 ^{ef}
<i>Arthrobotrys</i> sp. (Ovi 22)	3 ±1.7 ^e	11 ±2.4 ^{def}
<i>Arthrobotrys</i> sp. (466)	0.9 ±0.7 ^e	1 ±0.7 ^f
<i>A. conoides</i> (730)	2.0 ±2.9 ^e	0 ±0 ^f
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	19.8 ±5 ^{bd}	62 ±31.5 ^{bc}
<i>Lecanicillium saksanae</i> (C-LST)	17.1 ±14.7 ^d	30.1 ±18.7 ^{cdef}
<i>L. psalliotae</i> (OC-LPJ)	4.8 ±3.9 ^e	6.8 ±3.2 ^{ef}
<i>L. psalliotae</i> (CL-O)	0 ±0 ^e	0 ±0 ^f
<i>Clonostachys</i> sp. (T3H91)	0.5 ±0.6 ^e	9.0 ±3.6 ^{ef}
<i>Trichoderma essaux</i>	1.5 ±6 ^e	8.7 ±1.9 ^{ef}
Control DMSO	0.87±0.8 ^e	0.86± 0.7 ^f
Control Ivermectina	100 ^a	100 ^a

n=1. ± desviación estándar. Medias dentro de cada columna con distinta letra indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Partes sombreadas :extractos de las cepas que tuvieron una actividad AH mayor al 30%.

7.3. Identificación de hongos nematófagos mediante taxonomía tradicional

Las características morfológicas observadas en cada una de las cuatro cepas de hongos nematófagos seleccionados; así como las medidas de conidios y conidióforos y el tipo de órgano de captura, se muestran en las Figuras 2-5. Los hongos identificados correspondieron a las especies *A. arthrobotryoides* (RM5.2); *A. conoides* (cepa CL25); *A. oligospora* (cepa HSCSH) y *A. oligospora* (Ovi29) y una

más que correspondió a *P. lilacinum* (Camp1) (hipocreales). Las medidas de los conidios, incluyendo promedios y rangos de largo y ancho; así como la descripción de la forma de conidios y conidióforos, tipo de trampas y presencia o ausencia de clamidosporas, se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Características morfométricas de las cepas *Arthrobotrys arthrobotryoides* (RM 5.2), *A. conoides* (CL25), *A. oligospora* (Ovi29) y *Purpureocillium lilacinum* (Camp1).

Especie	Mediciones de conidios			observaciones generales
		Promedio (µm)	Rango	
<i>Arthrobotrys arthrobotryoides</i> (RM5.2)	Largo:	20.8	17.6-24.1	Conidios ovoides, >15 conidios Conidióforo geniculado Presencia redes adhesivas y Trampas 3D no presenta clamidosporas
	Ancho:	11.2	6.4-12.7	
	Septo:	8.6	9.1-12.5	
<i>A. conoides</i> (CL25)	Largo:	20.8	17.6 - 24.1	Conidios ovoides, presencia de clamidosporas y redes y trampas adhesivas 3D
	Ancho:	11.2	6.4 - 12.7	
	Septo:	8.6	9.1 - 12.5	
<i>A. oligospora</i> (Ovi29)	Largo:	21.4	19.1 - 22.2	Conidios septados (1), alargados ovoides, presencia de trampas y redes adhesivas 3D
	Ancho	11.8	11.4 - 12.5	
	Septo	8.6	6.7 - 10.0	
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Camp1)	Conidios			El cultivo presenta coloración lila, Microconidios ovoides, las fiálides son gruesas e hinchadas. Presenta clamidosporas
	Largo:	3.4	3.23 - 3.48	
	Ancho	2.4	1.94 - 2.8	
	Fialides			
	Largo:	9	7 - 12.7	

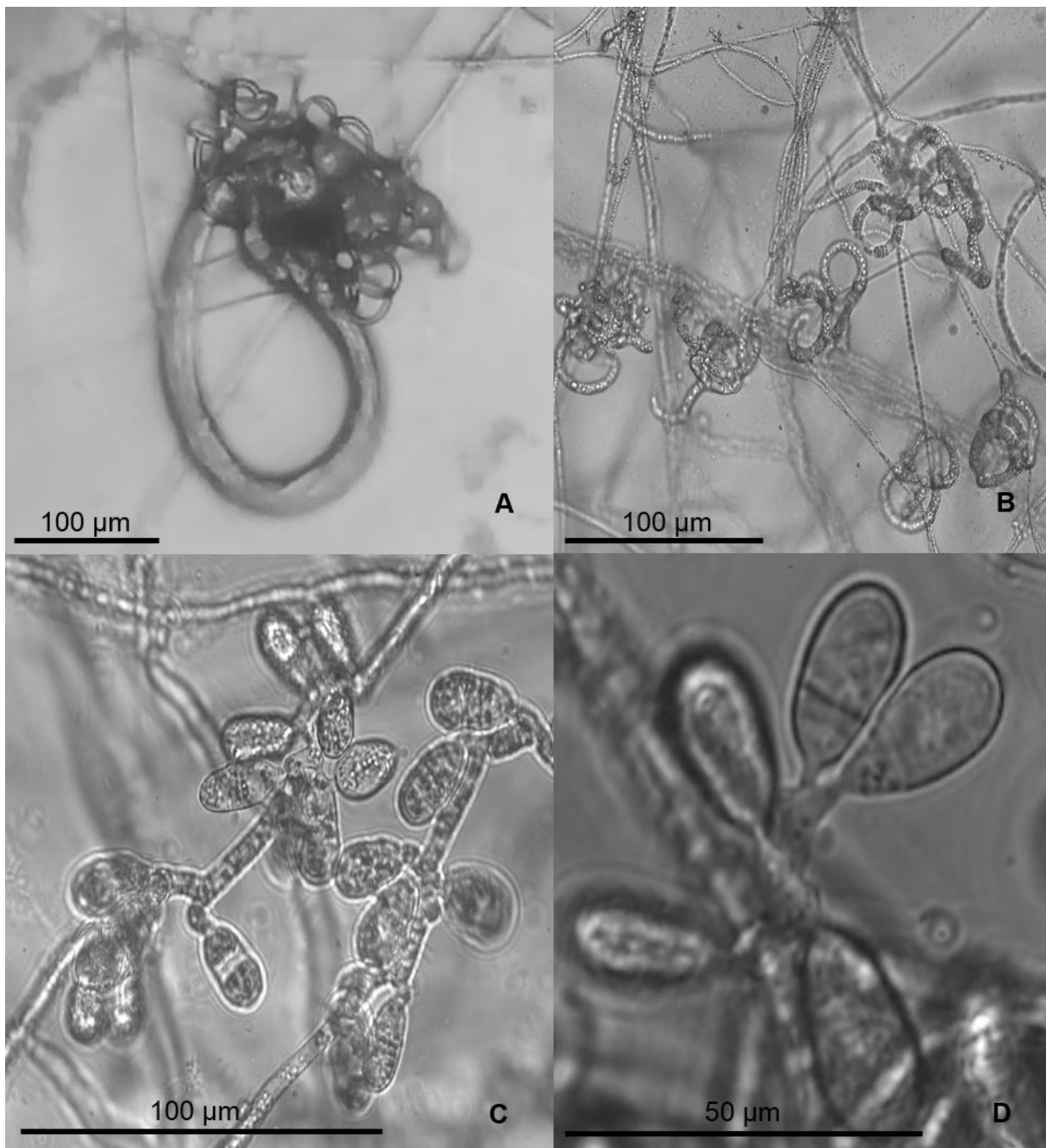


Figura 2. Micromorfología de *Arthrobotrys arthrobotryoides* (RM5.2). Presencia de conidios hialinos y ovoides (D); Conidióforo geniculado (C), Presencia de redes adhesivas y Trampas 3D en respuesta a nematodos A y B.

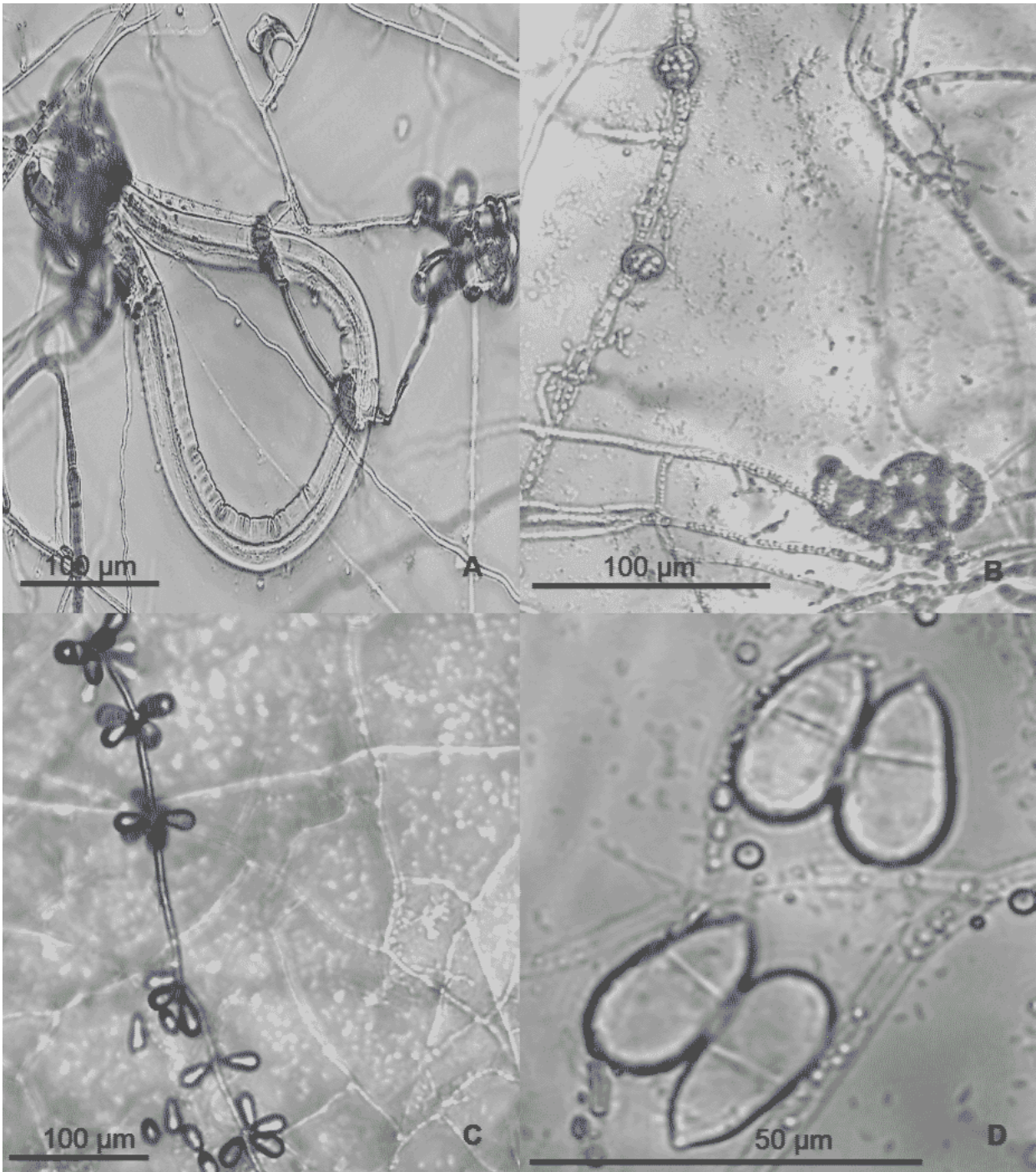


Figura 3. Micromorfología de *Arthrobotrys conoides* (CL25). En respuesta a nematodos, se observa depredación (A) y trampas y redes tridimensionales (B). Los conidióforos se observan en racimos (C) y en D se observan los conidios ovoides y hialinos.

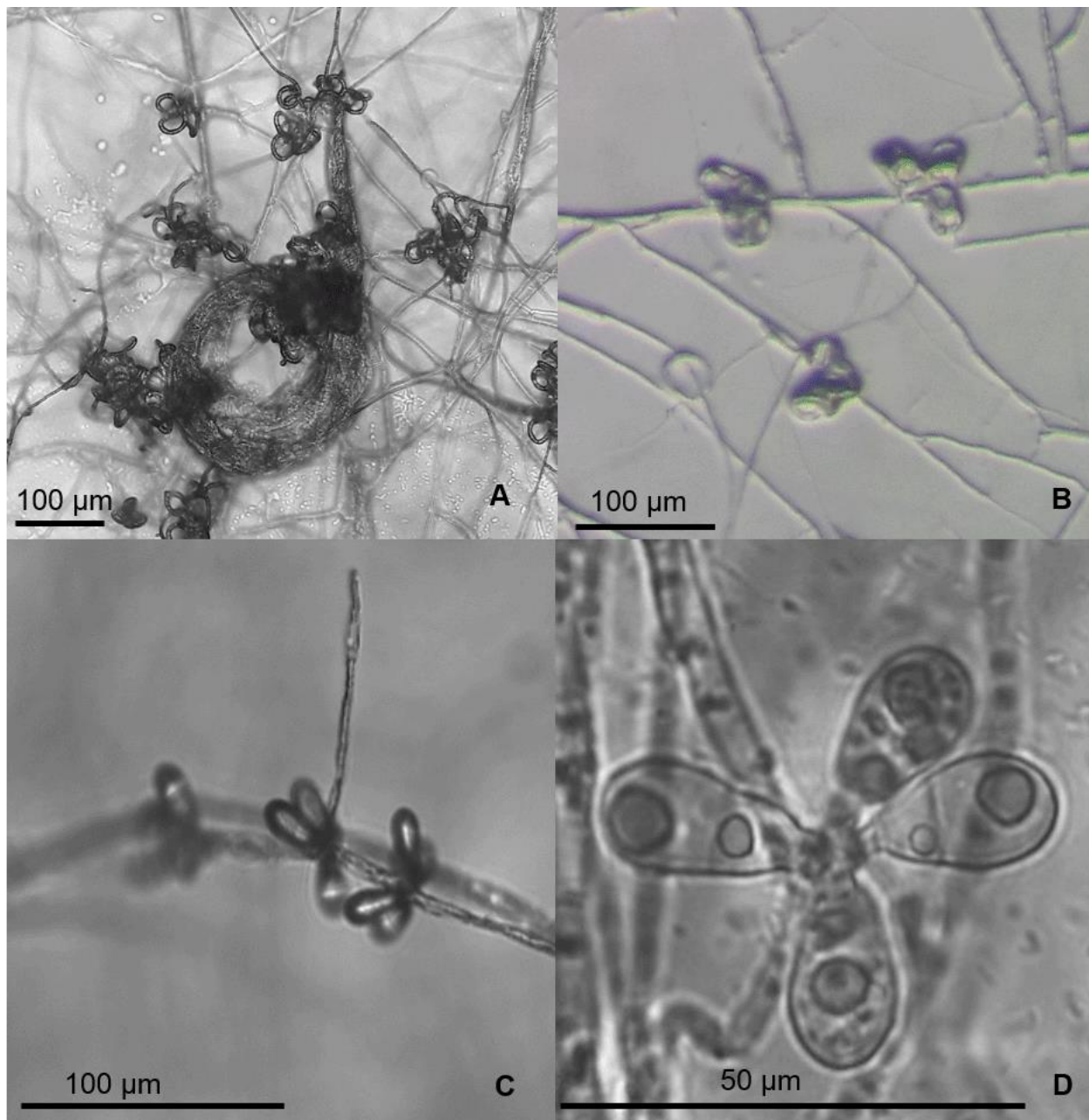


Figura 4. Micromorfología de *Arthrobotrys oligospora* (Ovi 29). Se observa depredación en respuesta a nematodos (A), en B se muestran las trampas adhesivas y redes tridimensionales. En C se muestran los conidióforos y en D se observan conidios ovoides hialinos.

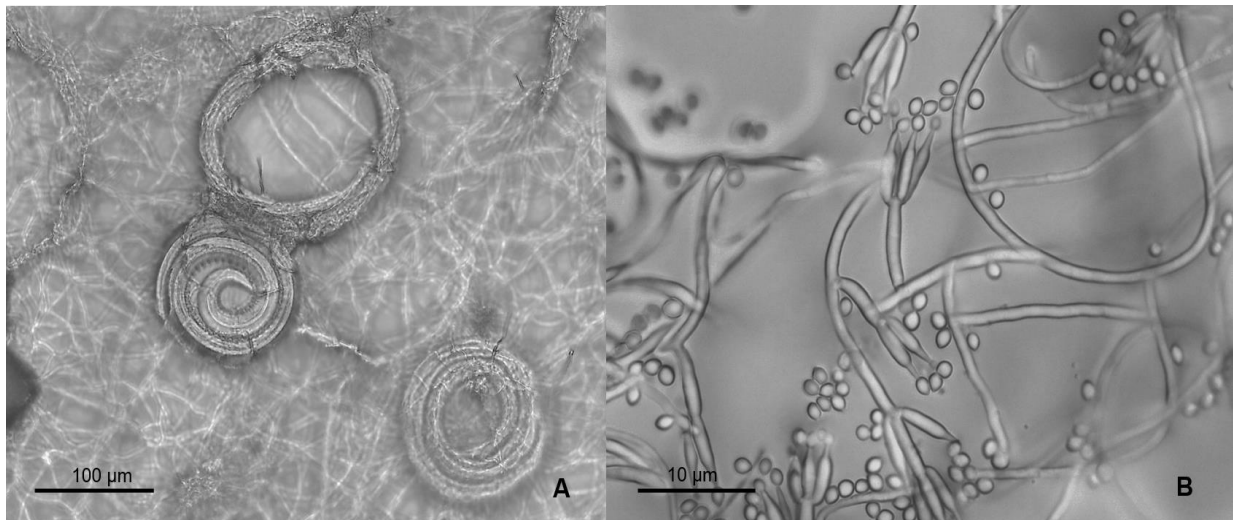


Figura 5. Micromorfología de *Purpureocillium lilacinum*. En **A** se observa depredación y atrofia larvaria y conidióforos en **B**.

7.4. Identificación molecular de las cepas *A. arthrobotroides* (RM5.2), *A. oligospora* (Ovi29), *A. oligospora* (HSCSH), *A. conoides* (CL25) y *P. lilacinum* (Camp1)

Para conocer la identidad de cepas faltantes, se lograron identificar las 5 cepas que tuvieron efecto AH y altos niveles de depredación *in vitro* contra *H. contortus* y *P. redivivus*, estas se identificaron como *A. arthrobotroides* (RM 5.2) 663 pb, *A. oligospora* (Ovi 29) 661pb, *A. oligospora* (HSCSH) 661pb, *A. conoides* (CL25) 635 y *P. lilacinum* (Camp1) 567 pb. Las secuencias derivadas de los productos de PCR que se muestran en la Figura 6. Las secuencias derivadas de los productos de PCR fueron analizadas mediante homología y los porcentajes de identidades del 99-100% que se obtuvieron al hacer el BLAST en la base de datos NCBI fueron considerados para compararlos con los genes de las siguientes regiones: regiones parciales del ITS1, región completa de 5.8 S, y región completa de ITS 2.

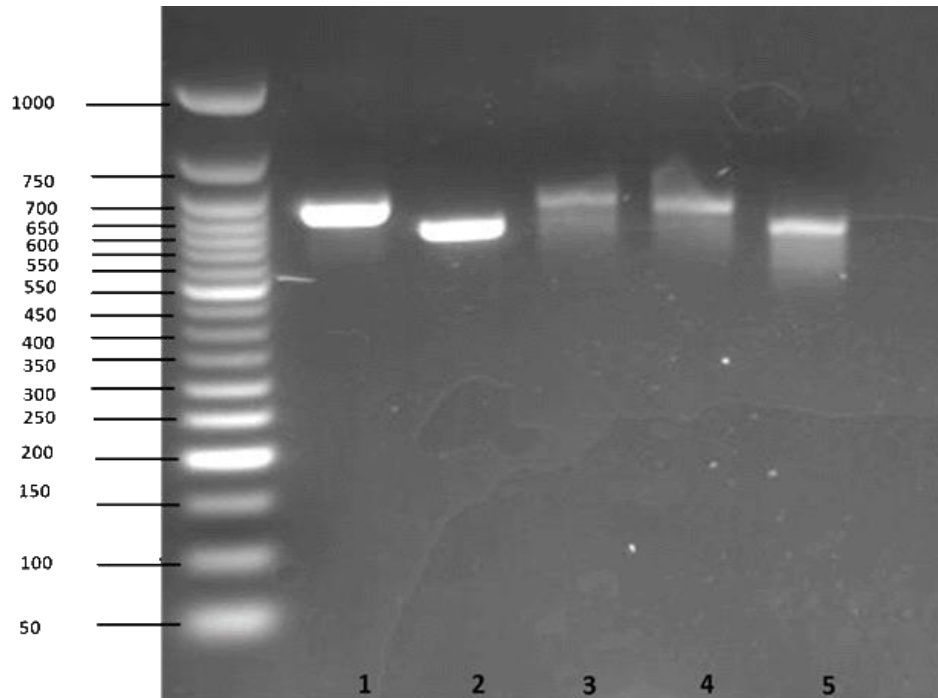


Figura 6. Fotografía de los productos de PCR de las cepas en estudio. 1) *Arthrobotrys arthrobotryoides* (RM 5.2) 663pb, 2) *A. oligospora* (Ovi 29) 661pb, 3) *A. oligospora* (HSCSH) 661pb, 4), *A. conoides* (CL25) 635 y 5) *Purpureocillium lilacinum* 567 pb.

Las secuencias de los productos de PCR de las cepas obtenidas se reportaron y se publicaron en la base de datos del NCBI con los siguientes números de acceso: **MT052368** para *A. arthrobotryoides*, RM5.2, **MT052369** para *A. conoides* CL25, **MT052370** para *A. oligospora* Ovi29 y **MT052371** para *P. lilacinum* Camp1. En el cuadro 6 se muestran los porcentajes de similitud de las 5 cepas de hongos nematófagos se compararon a través de su secuencia nucleotídica de las regiones 18S, ITS1, 5.8S e ITS2.

Cuadro 6. Porcentajes de similitud de las cepas de hongos nematófagos en estudio comparados con las cepas con mayor porcentajes de similitud mostrados para las regiones 18S, ITS1, 5.8S e ITS2 reportados en la base de datos del NCBI

Cepas	Similitud %	Covertura	Numero de acceso del NCBI de las cepas comparadas
<i>Arthrobotrys arthrobotryoides</i> (RM5.2)	99.05	100	MH857262.1
	99.05	100	MN014048.1
	99.04	98	EU977508.1
<i>A. conoides</i> (CL25)	100	98	KX683419.1
	100	98	JX9124941.1
	99.8	95	JN191309.1
<i>A. oligospora</i> (Ovi29)	99.8	100	KC663625.1
	99.68	100	MF926589.1
	99.68	99	KC663626.1
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Camp1)	99.81	100	MK952526.1
	99.81	99	MK729128.1
	99.81	99	MH430168.1

7.5. Clasificación filogenética de las cepas de hongos nematófagos

identificadas utilizando las secuencias de las regiones 18S, ITS1, 5.8S e ITS2

Se generó un fenograma que incluyó las cinco cepas de hongos nematófagos y las secuencias fueron comparadas con las secuencias registradas en la base de datos de NCBI, cuyos porcentajes de identidad fueron del 99-100%. Se muestra una clara separación entre las especies *A. oligospora*, *A. conoides*, *A. arthrobotryoides* y *P. lilacinum* (Camp1). En el caso de *A. arthrobotryoides* (RM 5.2) existe una identidad importante con la cepa *A. vermicola* EU975508; sin embargo, los análisis morfológicos agruparon a esta cepa dentro de la especie *A. arthrobotryoides* (Figura 6).

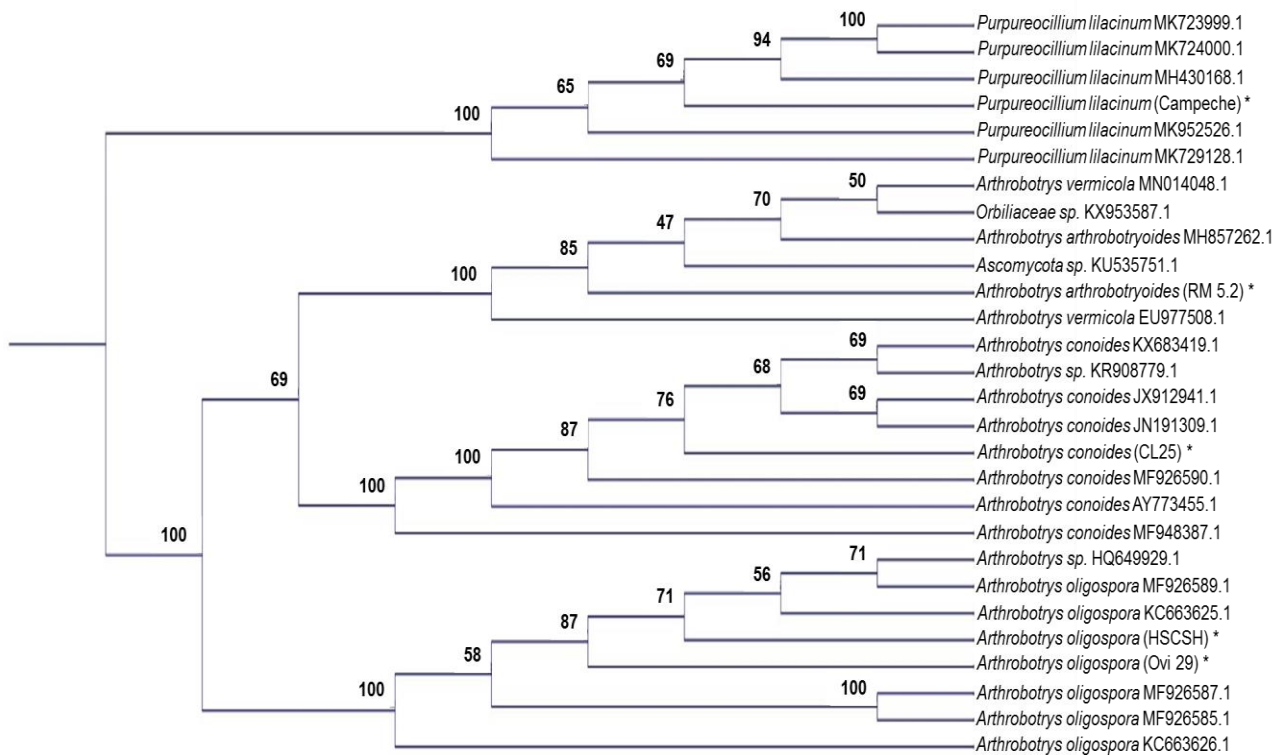


Figura 6. Fenograma generado utilizando las regiones ITS1 secuencia parcial; 5.8 e ITS2. Se incluyen las secuencias de cinco cepas de hongos nematofagos aislados (*) y las secuencias homólogas con diferentes niveles de similitud

7.6. Actividad depredadora *in vitro* de hongos nematofagos contra *Haemonchus contortus* (L3) y *Panagrellus redivivus*

En el cuadro 7 se puede observar que los porcentajes de reducción con el nematodo *H. contortus* estuvieron en un rango del 55% al 75%, mientras que la respuesta depredadora hacia el nematodo *P. redivivus* fue cerca del 100% Cuadro 8 en todas las cepas.

Cuadro 7. Porcentaje de depredación de nematodos *Haemonchus contortus* (L3) y después de 11 días de confrontación contra las cepas aisladas de hongos nematófagos.

cepa	<i>Haemonchus contortus</i>		
	Promedio de larvas del grupo control	Promedio de larvas del grupo tratado	Reducción larvas (%)
<i>Arthrobotrys conoides</i> (CL 25)	123.6 ±7.2	31 ±25.6	75 ±21.2 ^a
<i>A. oligospora</i> (Ovi 29)	180.3 ±95.2	57.6 ±48.2	71 ±14.1 ^a
<i>A. arthrobotryoides</i> (RM 5.2)	180.3 ±95.2	77 ±90.7	66.1 ±27 ^a
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Camp1)	100 ±44.6	47 ±19	52 ±4.1 ^a

Nota: (±) SD. N=3. Medias dentro de cada columna con distinta letra indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Cuadro 8. Porcentaje de depredación de nematodos *Panagrellus redivivus* después de 11 días de confrontación contra las cepas aisladas de hongos nematófagos

Cepa	<i>Panagrellus redivivus</i>		
	Promedio de larvas del grupo control	Promedio de larvas del grupo tratado	Reducción larvas (%)
<i>Arthrobotrys conoides</i> (CL 25)	953.6 ±46	1.3 ±2.3	99.8 ±0.2 ^a
<i>A. oligospora</i> (Ovi 29)	848.6 ±189.8	0.6 ±0.6	99.9 ±0 ^a
<i>A. arthrobotryoides</i> (RM 5.2)	953.6 ±46	3.6 ±3.2	99.4 ±0.1 ^a
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Camp1)	851.6 ±184.8	27.3 ±35.3	96.3 ±2.8 ^a

Nota: (±) SD N=3. Tukey: Medias dentro de cada columna con distinta letra indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

7.7. Actividad nematocida de extractos de hongos nematófagos cultivados bajo condiciones estáticas y agitadas

Los extractos de micelios de las cepas de HN con actividad nematocida mayor al 30% fueron seleccionados. Los resultados de la actividad nematocida de extractos (Metanol/Diclorometano 70:30) obtenidos a partir del micelio de hongos nematófagos cultivados bajo condiciones estáticas y de agitación se muestran en el Cuadro 9. Los extractos obtenidos (bajo condiciones estáticas) de las cepas *A. oligospora* (Ovi 29), *A. conoides* (CL 25) y *A. arthrobotryoides* (RM 5.2) mostraron

las siguientes actividades nematocidas: 71.56%, 77.1% y 83.67% respectivamente, a las 96 horas de confrontación ($p < 0.05$). Los extractos de las cepas *P. lilacinum* (Camp1) y *L. saksanae* (CLS-T) no mostraron porcentajes significativos de mortalidad. Los porcentajes de mortalidad en condiciones agitadas de las cepas *A. oligospora* (Ovi 29), *A. oligospora* (HSCSH) y *A. arthrobotryoides* (RM 5.2) evaluados a las 72 h postconfrontación fueron los siguientes: 25.95, 22.47 y 10.25 respectivamente. Mientras que la cepa *P. lilacinum* (Camp1) mostró el 77.68% ($p < 0.05$). *L. saksanae* no mostró actividad nematocida significativa. Por otra parte, los resultados a las 96 h postconfrontación fueron los siguientes: *A. oligospora* (Ovi 29) y *A. arthrobotryoides* (RM 5.2); 41.5% y 41.7% respectivamente. Los controles positivos con Ivermectina en ambos tiempos de lectura mostraron una actividad nematocida del 100%.

Es importante mencionar que se encontró actividad nematostática en los extractos de micelios al confrontarlos a las 72 horas, las cepas que mostraron dicha actividad fueron *Arthrobotrys* sp (JOSS) con 67.53 % y *A. oligospora* (HSCSH) con un 78.9%, estas cepas se cultivaron bajo condiciones estáticas.

Cuadro 9. Promedio de larvas infectantes de *H. contortus* después de ser expuestas al efecto de extractos orgánicos (diclorometano/metanol 30:70) de micelio de cuatro hongos nematófagos

Extractos de cepas	Cultivos estáticos				Cultivos agitados			
	72 h		96 h		72 h		96 h	
	LM/LT	% de mortalidad	LM/LT	% de mortalidad	LM/LT	% de mortalidad	LM/LT	% de mortalidad
<i>Arthrobotrys oligospora</i> (Ovi 29)	403/638	63.1± 5.4 ^b	468/649	72.1± 13.7 ^b	204/745	27.4±17.4 ^b	232/960	24.2± 7.4 ^{bc}
<i>A. conoides</i> (CL 25)	476/874	54.4± 7.4 ^b	538/659	81.6±18 ^b	414/1496	27.7± 4 ^b	419/1305	32.1± 3 ^b
<i>A. arthrobotryoides</i> (RM 5.2)	277/490	56.53± 14.3 ^b	205/229	89.51±12 ^{ab}	75/696	11± 2.5 ^{ab}	282/700	40.2±14.3 ^b
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Camp1)	48/638	7.5± 3 ^c	67/684	9.7.0±2.7 ^c	703/902	78± 1.4 ^c	287/434	66.1±7 ^b
DMSO 5%	11/765	1.4 ^d	15/730	2.0 ^d	11/305	3.2 ^d	11/627	1.8 ^d
Ivermectina	640/640	100 ^a	615/615	100 ^a	713/713	100 ^a	642/642	100 ^a

N=3 . Tukey: Medias dentro de cada columna con distinta letra indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$), LM/LT (Larvas muertas / Larvas totales). Concentración: 100 mg/mL

7.8. Aumento de la producción de cepas con mayor porcentaje de mortalidad contra *Haemonchus contortus* (L3).

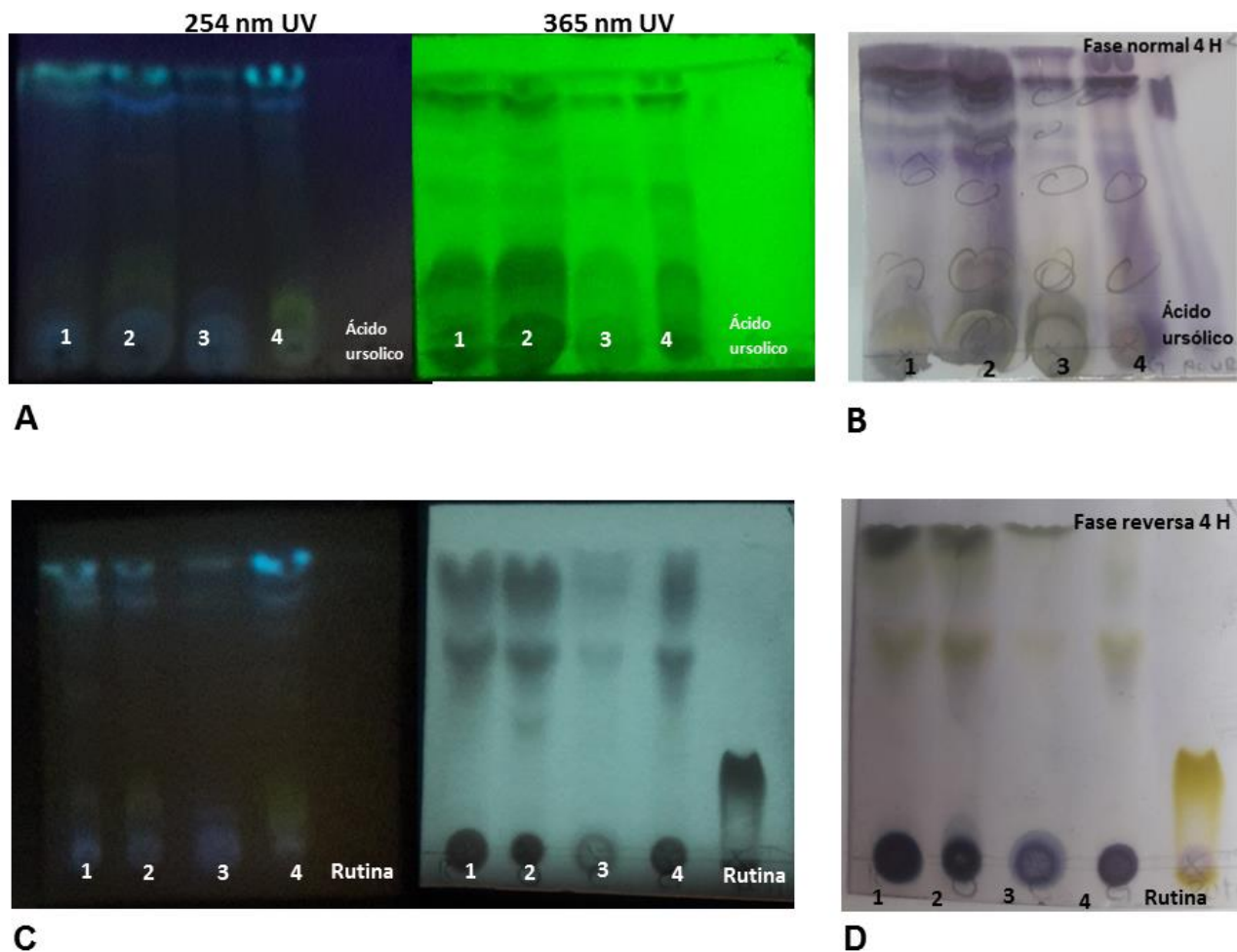
Las cepas que presentaron mayor porcentaje de efecto AH se produjeron en mayor cantidad. Los rendimientos de los cultivos de 300mL y hasta 10 L se muestran en porcentajes de rendimiento. La cantidad de cultivo obtenido no fue el mismo, para la cepa *A. oligospora* (Ovi 29) se obtuvieron cultivos de 5 L, para *A. conoides* (CL25) se obtuvo un cultivo de 4.2 L, para *A. arthrobotryoides* (RM 5.2) se obtuvo un cultivo de 8 L y para *P. lilacinum* (Camp1) se obtuvo un cultivo de 10L en condiciones agitadas. La biomasa se liofilizó y las cantidades resultantes se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Rendimientos en peso seco de micelios y extractos de micelio de cultivos de 250 mL y 10 L de cepas aisladas de hongos nematófagos

Cepas aisladas	Cultivos de 250 ml (g/L)			Producción 10 L (g/L)		
	Micelio (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)	Micelio (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>Arthrobotrys conoides</i> (CL25)	2.56	0.24	9.4	1.71	0.17	9.9
<i>A. oligospora</i> (Ovi 29)	2.36	0.20	8.4	1.3	0.122	9.3
<i>A. arthrobotroides</i> (RM 5.2)	2.16	0.28	12.16	1.25	0.1	8
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Camp1)	4.4± 0.3	0.4	9.0	3.22	0.36	11.18

7.9. Análisis del perfil fitoquímico de los extractos metanol/diclorometano 70:30 de las cepas en estudio

En la búsqueda de compuestos con actividad AH, se realizaron placas TLC con los extractos metanol/diclorometano 70:30 de cada una de las cepas productoras de metabolitos. En la figura 8, se muestran placas de TLC reveladas con reactivo 4-hidroxibenzaldehído; mientras que en la figura 9, se muestran placas de TLC de fase normal y fase reversa reveladas con reactivo para flavonoides, visualizadas con lámpara de UV.



C **D**
 Figura 8. Análisis por TLC de los micelios de las cepas productoras de compuestos AH reveladas con 4-hidroxibenzaldehído. Placas TLC de fase normal (A, B) y fase reversa (C, D), visualizadas a 254 y 365 nm UV. Orden: 1) *Arthrotrys arthrotryooides* (RM5.2) 2) *A. oligospora* (Ovi29), 3) *A. conoides* (CL25) y 4) *Purpureocillium lilacinum* (Camp1).

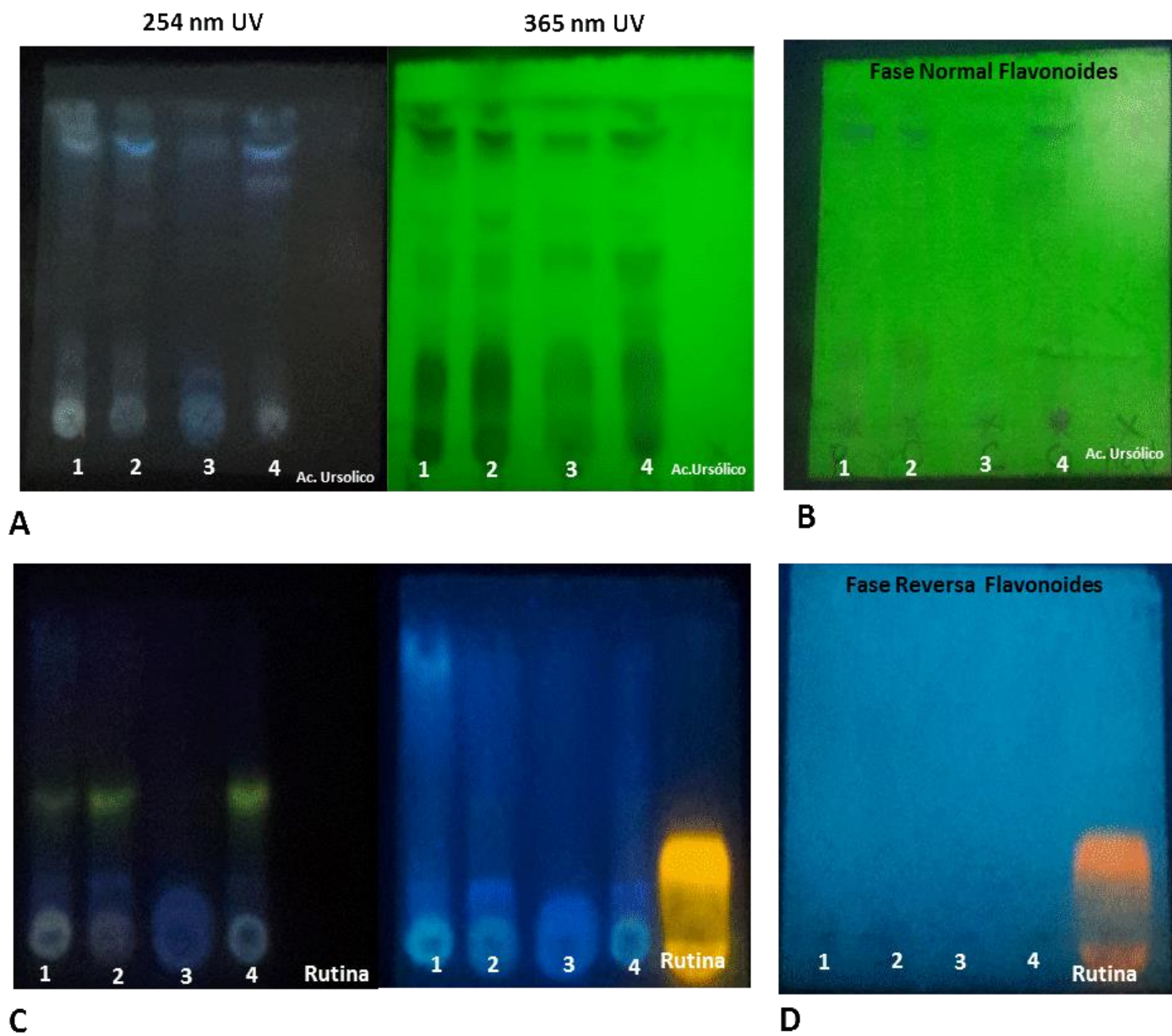


Figura 9. Análisis de las cepas productoras de compuestos AH reveladas con reactivo para flavonoides. Placas TLC de fase normal (A, B) y fase reversa (C, D), visualizadas a 254 y 365 nm UV. Reveladas con Flavonoides (B, D). Orden: 1) *Arthrobotrys arthrobotryoides* (RM 5.2) 2) *A. oligospora* (Ovi29), 3) *A. conoides* (CL25) y 4) *Purpureocillium lilacinum* (Camp1).

7.10. Evaluación de cultivos de 10 L de las cepas de hongos nematófagos que mostraron los mayores porcentajes de mortalidad

Las cepas de HN con la mayor actividad AH se cultivaron hasta producir 10L, de estos se realizaron extractos metanol/diclorometano (70:30) y los resultados del efecto AH se muestran en la figura 10, los porcentajes de mortalidad fueron *A. oligospora* (Ovi29) 20%. *A. arthrobotryoides* (RM 5.2) 47.4%, *A. conoides* (CL25) 57% y *P. lilacinum* (Camp1) 53.8%, este último se cultivó en condiciones agitadas.

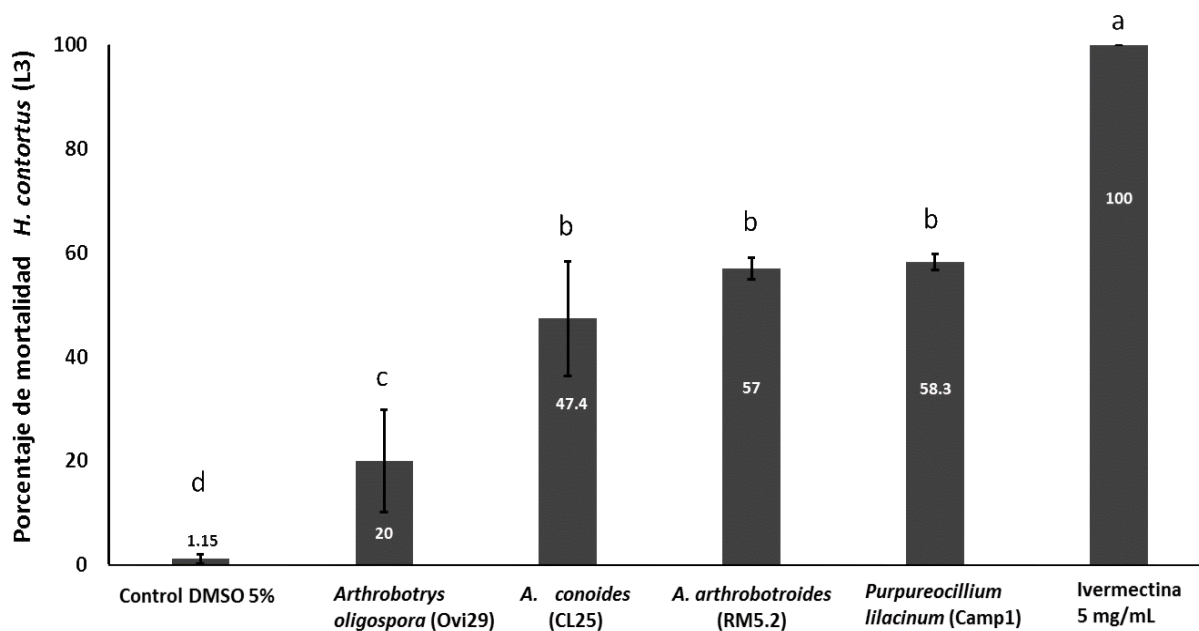


Figura 10. Actividad antihelmíntica de los extractos (DCM/MEOH 30:70) de cultivos de 10L de hongos nematófagos en estudio. Las cepas *Arthrobotrys arthrobotryoides* (RM 5.2) y *Purpureocillium lilacinum* presentaron los mayores porcentajes de mortalidad contra larvas de *Haemonchus contortus* (L3). Tukey: Medias dentro de cada columna con distinta letra indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). N=3

7.11. Evaluación de la actividad nematocida *in vitro* de los extractos de los micelios de 20L de cultivo de la cepa *Arthrobotrys arthrobotryoides* (RM 5.2) contra *Haemonchus contortus* (L3)

Los extractos de los micelios (diclorometanólico y 3 extractos metanólicos) de 20L de cultivo de la cepa *Arthrobotrys arthrobotryoides* (RM 5.2) se evaluaron contra las larvas L3 de *H. contortus*, los porcentajes de mortalidad se muestran en el cuadro 11. Nota: el rendimiento de este cultivo fué de 22g de biomasa en peso seco.

Cuadro 11. Actividad nematocida de los extractos de micelio de 20 L de la cepa *Arthrobotrys arthrobotryoides* (RM5.2) contra *Haemonchus contortus* (L3)

Tipos de extracto	% mortalidad	
	72 h	96 h
E. diclorometano	5.8 ± 6.7	0.4 ± 11.6
E metanólico	6.6 ± 3.15	9.7 ± 8.34
E metanólico 2	10 ± 3.5	17.6 ± 7.6
E. metanólico 3	10.11 ± 4.1	15.4 ± 1.9
Control agua	0.79±1.37	1.6±1

7.12. Perfil fitoquímico en placas TLC de los extractos de los micelios de 20L de cultivo de la cepa *Arthrobotrys arthrobotryoides* (RM 5.2)

Los extractos de los micelios del cultivo de 20L de la cepa *A. arthrobotryoides* se analizaron en placas TLC. El patrón cromatográfico de los extractos diclorometanólicos y metanólicos se revelaron en capa fina y se observó que la presencia de compuestos de origen flavonólico fueron escasos. Los rendimientos de los extractos en peso seco fueron: E. diclorometanólico: 357.3 mg, y tres extractos metanólicos: (1) 265 mg, (2) 1.88g y (3) 215.4 mg.

7.13. Cálculo de parámetros cinéticos mediante un modelo logístico de crecimiento

En la figura 11 podemos observar la biomasa obtenida a través del tiempo. Se puede observar que la biomasa inicial fue de 0.4 g/L y posteriormente, se obtuvo un rendimiento de 2.7 g/L al día 14 de la cosecha. También se logró calcular una $\mu=0.281 \text{ d}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 2.46 días.

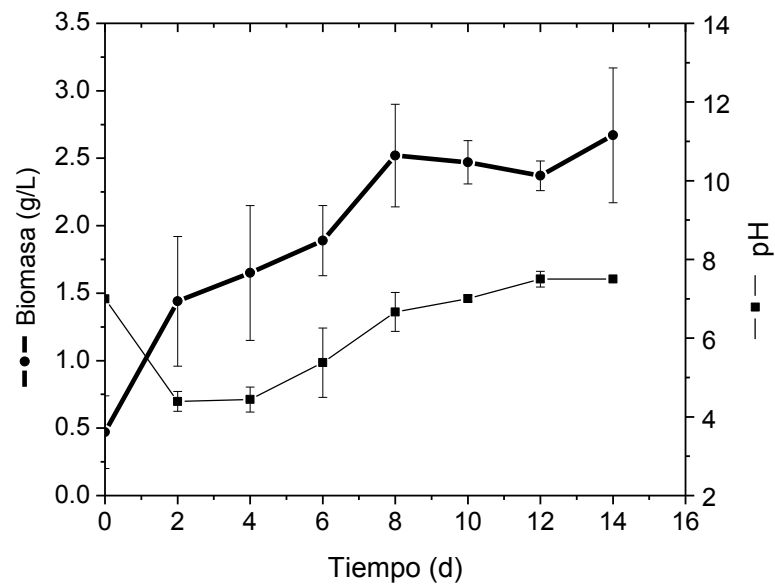


Figura 11. Cinética de crecimiento de *P. lilacinum* (Camp1) en el medio líquido PD. se midieron los parámetros de Biomasa g*L (-●-) y pH (-■-). N=3

Mientras tanto, durante la cinética se mostraron cambios de pH. En los primeros cuatro días, el pH inicial de 7 se acidificó a 4.4 y en días posteriores se obtuvo un aumento hasta alcanzar un pH final de 7.5.

7.14. Monitoreo de la actividad antihelmíntica de líquidos filtrados y extractos de micelios durante la cinética de crecimiento en fermentador de la cepa *P. lilacinum* (Camp1)

El extracto de micelios a una concentración de 100 mg/mL de cada punto de la cinética resultó con una actividad antihelmíntica de 30.5% a partir del día 10 de cultivo (Figura 12) mientras que la máxima actividad registrada (44.4%) se obtuvo hasta los 14 días. Los controles DMSO 5% y agua mostraron un porcentaje de actividad AH de 5.8% \pm 0.59 y 0.80%, respectivamente.

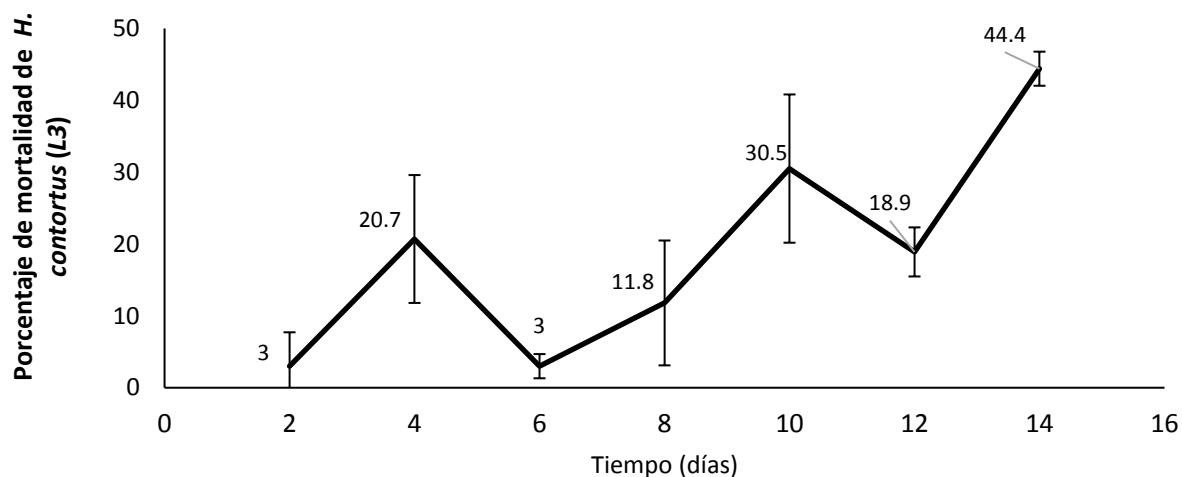


Figura 12. Monitoreo de la actividad AH durante la cinética de crecimiento de *P. lilacinum* (Camp1) contra *H. contortus* (L3). Nota: El punto de actividad AH máxima se obtuvo a los 14 días de cultivo. Los controles de DMSO 5% y agua mostraron un porcentaje de actividad AH de 5.8% \pm 0.59 y 0.80% respectivamente. N= 3.

Por otra parte, la evaluación de la actividad AH contra *H. contortus* (L3) de los líquidos filtrados (100% V:V) durante la cinética se muestran en el cuadro 12, podemos observar que no se obtuvo actividad AH significativa.

Cuadro 12 Porcentajes de mortalidad *in vitro* de *H. contortus* (L3) expuestas a filtrados líquidos de *P. lilacinum* (Camp1) obtenidos durante la cinética de crecimiento en bio-reactor

Horas	Larvas Muertas	Larvas Vivas	% mortalidad
48	160	836	11.8±17
96	60	697	6.8±7.6
144	24	731	4.4±4.1
192	23	760	3.4±3.2
240	6	785	0.7±0.6
288	20	769	2.2±3.8
336	12	875	1±1.8
Control papa	64	890	5.2±7

N=3. ± = desv. est.

7.15. Evaluación de la actividad AH en líquido filtrado liofilizado y extractos de micelio de la biomasa al término de la fermentación

Los líquidos liofilizados evaluados a una concentración de 100 mg/mL mostraron actividad AH de hasta el 63.5 % contra *H. contortus* (L3) (cuadro 13). Los extractos obtenidos de la fermentación se evaluaron a una concentración de 100 mg/mL y se determinó que estos causan un porcentaje de mortalidad del 69.46% (P<0.05) contra *H. contortus* (L3) (cuadro 16).

Cuadro 13. Porcentajes de mortalidad *in vitro* de larvas de *Haemonchus contortus* (L3) expuestas a los líquidos filtrados y a los extractos metanol/diclorometano (70:30) (100 mg/mL) de los cultivos en biorreactor de *P. lilacinum* (Camp1)

Productos (100 mg/ml)	Larvas Muertas	Larvas Vivas	Porcentaje de mortalidad
Líquido liofilizado	1608	768	63.5 ±16.9 ^a
Control papa	285	1383	16.5 ± 5.1 ^b
Control agua	59	1231	4.8 ± 5.5 ^c
Extracto	677	656	55.84 ± 3.4 ^a
Control DMSO (5 mg/mL)	26	573	4.34 ± 1.8 ^b
Control agua	6	673	0.88 ± 0.8 ^c

N=3 ±= desviación estándar Tukey: medias con letras iguales no muestran diferencias significativas, concentración:100 mg/mL.

7.16. Evaluación de la actividad AH de las fracciones del extracto metanol/diclorometano (70:30) de micelio de *P. lilacinum* contra *H. contortus* (L3)

Las fracciones y reuniones obtenidas se evaluaron a una concentración de 40 mg/mL contra larvas (L3) de *H. contortus* y se observó que el porcentaje de efecto letal máximo se obtuvo con la reunión de las fracciones 15 y 16, obteniendo una mortalidad de 10.3% a las 96 horas de confrontación (Cuadro 14).

Cuadro 14. Porcentajes de mortalidad *in vitro* de *H. contortus* (L3) expuestas a fracciones y reuniones del extracto (metanol/diclorometano 70:30) de *P. lilacinum*

Tratamiento Fracciones y reuniones	Número de larvas muertas	Número de larvas vivas	Porcentaje de mortalidad (L3)
R 1 a 5	7	134	1.1 ± 3.5
F 6	16	281	2.5 ± 1.54
F 7	24	343	3.8 ± 7.8
R 8 a 10	9	82	6.97 ± 2.3
R 11 a 12	6	441	0
F13	32	272	7.7 ± 2.5
14	7	249	0
R 15 a 16	31	282	10.3 ± 6.7
R 17 a 20	16	296	4.8 ± 4.7
F22	11	411	2.67 ± 0.7
R 21 a 24	6	352	1.61 ± 1.47
F25	2	327	0.6 ± 0.5
R 26 a 30	2	366	0.51 ± 0.45
R 31 a 35	13	327	3.8 ± 0.76
Agua	5	601	0.83
DMSO 1%	13	581	2.2

F= Fracciones; R= Reuniones. N=1 ±= desv. est.

7.17. Evaluación de la actividad AH de las fracciones del extracto metanol/diclorometano (70:30) del micelio de *P. lilacinum* contra larvas (L3) y huevos de *H. contortus*

Las fracciones y reuniones obtenidas se evaluaron a una concentración de 40 mg/mL contra larvas (L3) de *H. contortus* y se observó que no se obtuvo actividad

AH significativa. Sin embargo, se obtuvo un efecto inhibitorio de más del 50% al confrontarlas con las siguientes fracciones y reuniones: F13, F17, F22 y R21 a 24. Las concentraciones utilizadas fueron (mg/mL): 40, 30, 20 y 10, 5 y 2. El bioensayo se confrontó durante 48h (Cuadro 15).

Cuadro 15. Actividad ovicida de las fracciones y reuniones del extracto de *P. lilacinum* contra *H. contortus*.

Reuniones (mg/mL)	Número de huevos	Número de larvas (L1-L2)	% Inhibición de la eclosión
R 13			
40	492	64	84.5 ± 4 ^a
20	242	434	32 ± 0.53 ^b
Control agua	27	535	3.76± 1 ^c
R 25			
40	101	425	14.93 ± 14.8 ^a
20	120	254	29.21 ± 13.3 ^a
Control agua	27	535	3.76± 1 ^b
R 17 a 20			
20	469	65	87.8 ± 7.2 ^a
15	412	83	83.2 ± 8.9 ^a
10	328	139	70.2 ± 8.3 ^a
5	226	162	58.2 ± 21.7 ^a
2.5	58	173	25 ± 11.56 ^b
Control agua	27	535	3.76± 1 ^c
R 21 a 24			
10	454	88	83.7 ± 13.4 ^a
8	234	93	71.5 ± 10 ^a
6	161	132	55 ± 29.5 ^a
4	114	289	28.2 ± 10.4 ^{ab}
2	48	432	10 ± 8.2 ^b
Control Agua	27	535	3.76 ± 1 ^c

N=3 Medias dentro de cada columna con distinta letra indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

7.18. Análisis en placa TLC de las fracciones obtenidas del extracto Metanol/diclorometano (70:30) de *P. lilacinum*

En las figuras 13 y 14 podemos observar el patrón de corrida que tuvieron las fracciones obtenidas del extracto metanol/diclorometano 70:30 así como la obtención de cada una de estas. En la figura 13 A podemos observar las fracciones 1-8. En B las fracciones 13-16. En la figura 14 A se observan las fracciones 17-22 y en la Figura 14 B las fracciones 23 a 31. Los patrones de corrida se analizaron en lámpara UV de 254 y 365 nm los productos se revelaron con 4-hidroxibenzaldehído.

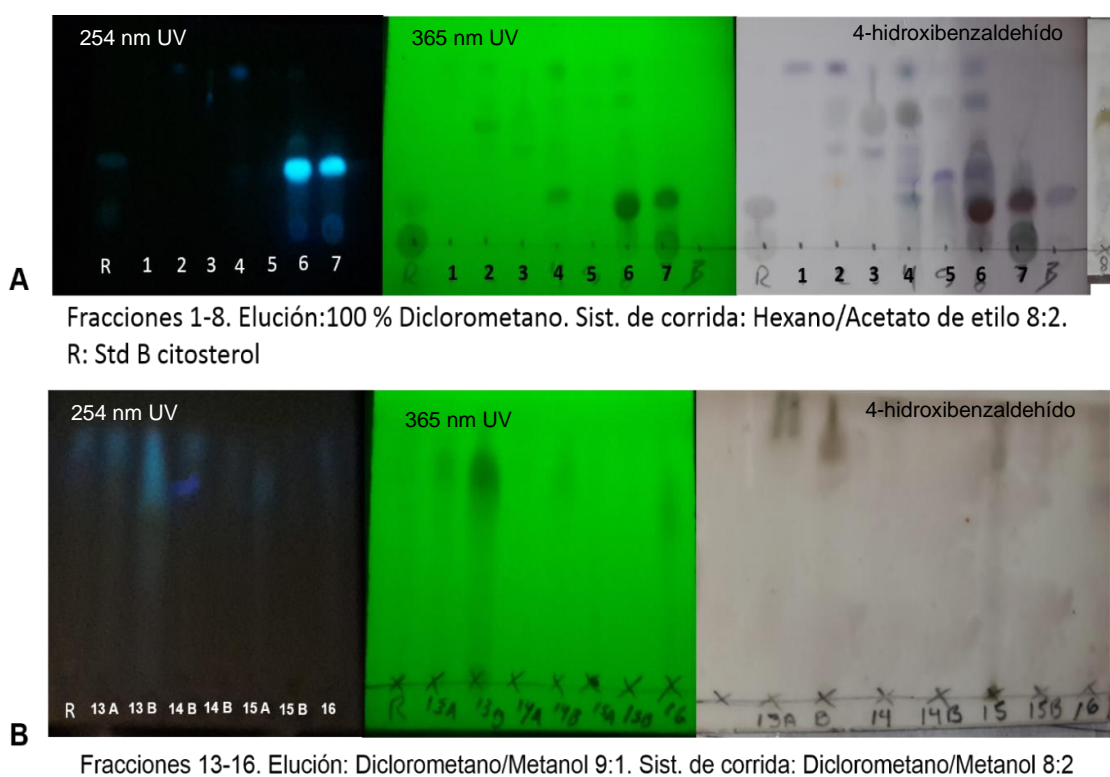
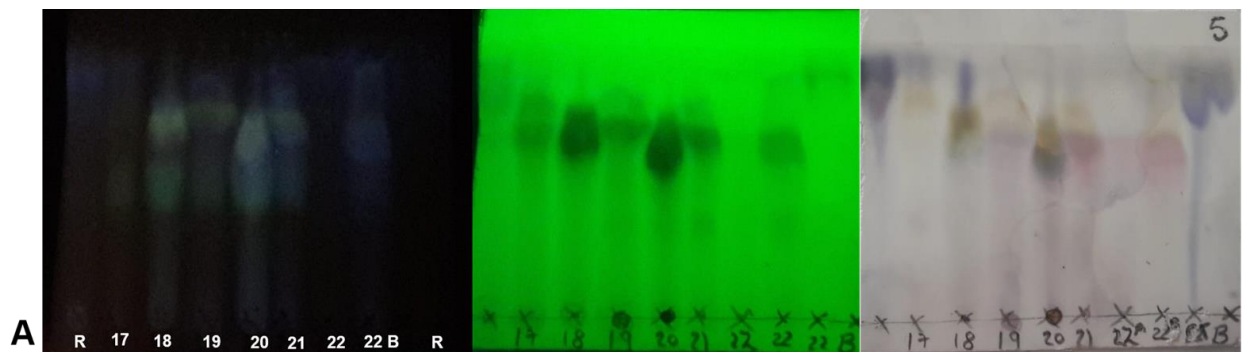
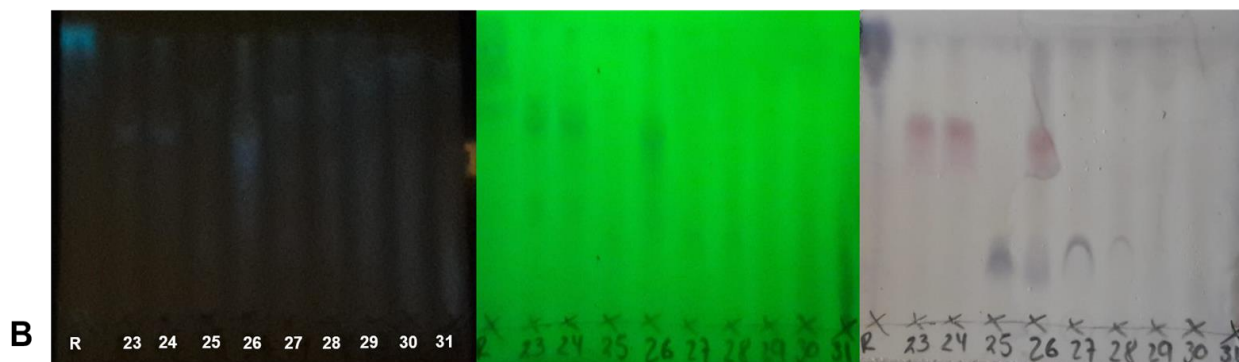


Figura 13. Análisis en placa TLC de las fracciones obtenidas del extracto Metanol/ Diclorometano (70:30) de *P. lilacinum*. En A se observa el patrón de corrida de los metabolitos presentes en las fracciones 1-8. En B se observa el patrón de corrida de las fracciones 13-16. R= estándar β citosterol. Revelado con 4-hidroxibenzaldehído.



Fracciones 17-22. Elución: Diclorometano/Metanol 7:3. Sist. de corrida: Diclorometano/Metanol 8:2
R: Std B citosterol



Fracciones 23-31. Elución: Diclorometano/Metanol 5:5 23-30
31-35. Elución: 100% Metanol
Sist. de corrida: Diclorometano/Metanol 8:2

Figura 14. Análisis en placa TLC de las fracciones obtenidas del extracto Metanol/ Diclorometano (70:30) de *P. lilacinum*. En A se observa el patrón de corrida de los metabolitos presentes en las fracciones 17-22. En B se observa el patrón de corrida de las fracciones 23-35. R= estándar β citosterol. Revelado con 4-hidroxibenzaldehído.

7.19. Análisis de cromatografía (HPLC) de la purificación de la columna 2 (reuniones 21-24)

Hasta ahora, los compuestos purificados son de tipo flavonólicos y al menos cuatro fracciones mayoritarias se lograron purificar. En la figura 15 se pueden observar los cromatogramas obtenidos del extracto total D/M (30:70), de la fracción 21-24 (Referencia C1(21-24)) y las fracciones purificadas (C2 F8 y C2 F28) y el estándar galato de metilo. El extracto metanol/diclorometano (70:30) presentó varias señales con diferentes tiempos de retención (tr)=4.2,4.4, 6.87, 8.5, 8.8, 10.8 y 13.5. La fracción C2 F8, presentó dos señales, que corresponden a un tiempo de retención

(TR) de 8.58min con una λ_{\max} de 218 nm y otra señal con un TR= 8.8 min. Con una λ_{\max} =229 nm, estas señales se compararon con el estándar galato de metilo que correspondió a un tr=8 y una λ_{\max} = 219. También pudimos observar que la fracción C2 F28 tuvo un tr= 9.74 y λ_{\max} =201; aunque no se obtuvo un patrón estándar para comparar esta señal, los patrones de corrida en placa TLC mostraron un patón de corrida similar a moléculas tipo cumarinas cuando se observó en luz UV a 254 y 365nm.

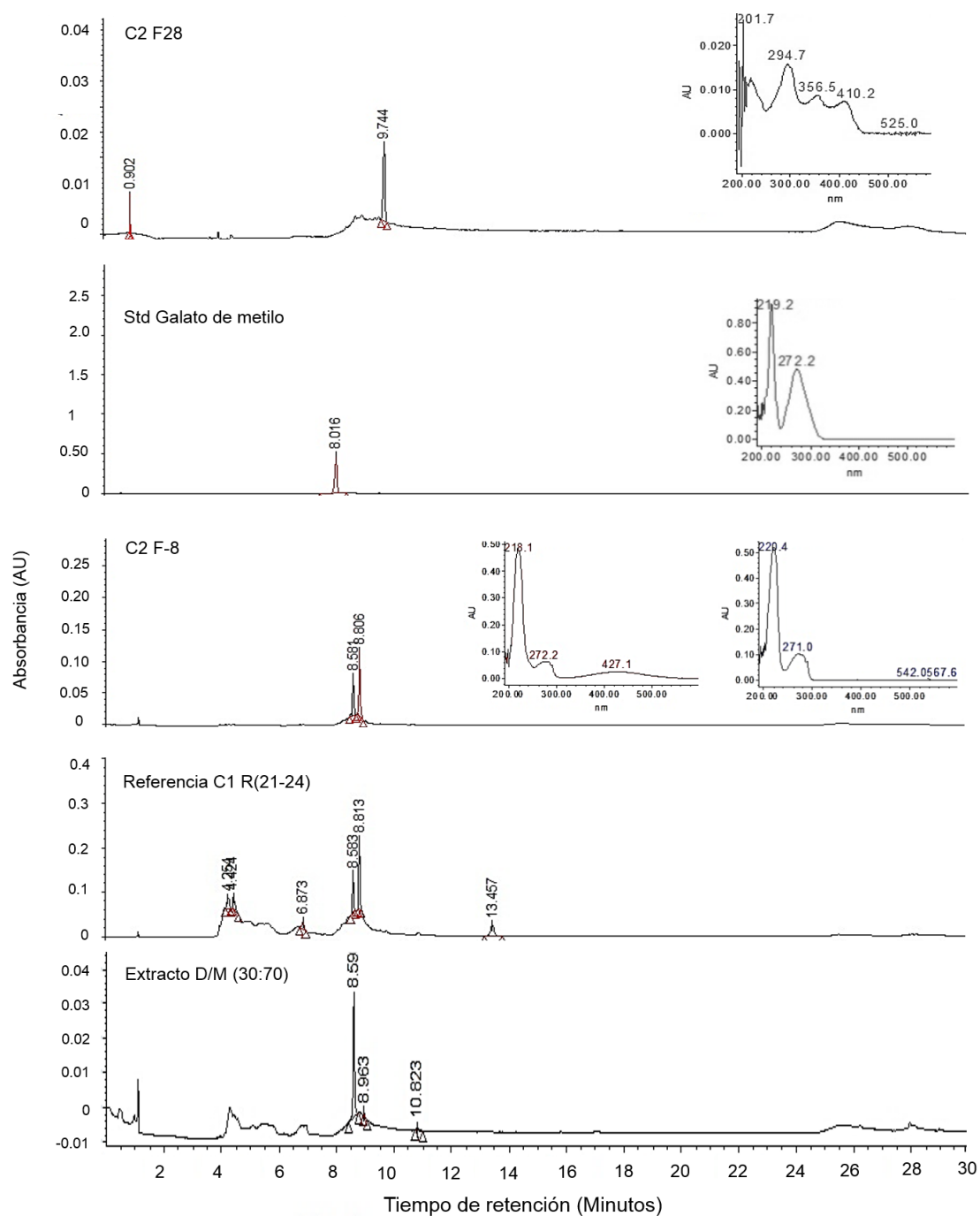


Figura 15. Cromatogramas correspondientes al extracto total D/M (30:70) de la cepa *P. lilacinum* Camp1, y el fraccionamiento de las columnas C1 y fracciones de C2. Se observa la reunión 21-24 (Referencia C1(21-24)), también la fracción purificada C2 F8 tr= 8.58min, λ_{max} de 218 nm y otra señal con un tr= 8.8 min. λ_{max} =229 nm, estas señales se compararon con el estándar galato de metilo que correspondió a un tr=8 y una λ_{max} = 219 lo que indica la presencia de compuestos fenólicos. También se aprecia la fracción C2F28 tr= 9.74 λ_{max} =201.

8. Discusión

Tamizaje y selección de hongos nematófagos con actividad antihelmíntica contra *H. contortus*

Como hemos visto hasta ahora, los HN han sido considerados una importante herramienta de control de enfermedades parasitarias siendo muy eficaces en la agricultura y en la industria del ganado, además podemos mencionar que los HN son pequeñas fábricas de compuestos antihelmínticos, que pueden formar parte de tratamientos terapéuticos contra la haemoncosis ovina en investigaciones futuras.

Identificación morfométrica y molecular de hongos nematófagos

En el presente estudio se trabajó con una variedad de HN; algunos de estos ejemplares estaban previamente identificados al inicio del proyecto; por lo tanto, algunas de las cepas no identificadas se clasificaron morfológica y molecularmente. Las cepas productoras de compuestos AH se identificaron como: *A. oligospora* (Ovi 29), *A. oligospora* (HSCSH), *A. conoides* (CL25), y *P. lilacinum* (Camp1).

El género *Arthrobotrys* es el más abundante entre los ejemplares de HN; además es uno de los más estudiados debido a los metabolitos secundarios que este género presenta; por ejemplo, en *A. oligospora*, se han encontrado algunos policétidos, benceniodes, y terpenoides. El ácido linoleico es una de las principales moléculas nematocidas encontradas (Stadler *et al.*, 1993a). Otros hallazgos químicos importantes incluyen a los oligosporones, estos son una familia de compuestos que incluyen al oligosporol, oligosporon A, B entre otros. Estas moléculas presentan varias actividades biológicas, por ejemplo se les ha atribuido una actividad citotóxica, antimicrobiana y hemolítica (Stadler *et al.*, 1993b). En el nematodo *H. contortus*, el oligosporon 4'5'-dihydro-oligosporon retarda el desarrollo de la larva del parásito en el intestino con un LD₅₀ de 50-100 µg/ml. Como se puede observar, se tienen registros de varias moléculas con diferentes actividades incluyendo nematocidas, y debido a la enorme variabilidad de distribución, desarrollo, estructura y genética de esta especie en todo el mundo, se espera descubrir en esta investigación nuevos metabolitos que puedan incrementar la actividad AH en larvas del nematodo *H. contortus*.

Otra especie identificada hasta el momento es *P. lilacinum* (Camp1) (Luangsa-ard *et al.*, 2011), anteriormente conocida como *Paecilomyces lilacinus*, es un hongo que se encuentra en el suelo. El interés biológico de esta especie se debe a su actividad antagónica sobre huevos y hembras de nematodos parásitos de plantas (Lamovsek *et al.*, 2013).

Hasta la fecha, se han aislado varias cepas de *P. lilacinum* (Camp1), en la mayoría se han encontrado productos con actividad AH como leucinostatinas, la cantidad de estas es muy grande llegando a encontrarse 25 tipos (Fukushima *et al.* 1983a, b; Isogai *et al.* 1992; Martinez y Moraes 2015). Un estudio Australiano reportó la actividad de 20 aislados de *P. lilacinum* (Park *et al.* 2004), los tres ejemplos más potentes de ellos son leucocinostatinas B, D, F, H, L y T. Estos productos mostraron actividad AH cuando se evaluaron contra una población mezclada de estadios juveniles y adultos del nematodo *C. elegans*, una mezcla de leucocinostatinas mostró un 77% de mortalidad después de las 2 h y 100% de mortalidad después de 12 h, evaluados a una concentración de 100 µg/ml, y 74% de mortalidad después de las 24h. Algunas cepas de este experimento mostraron la producción de ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolenico, cada uno de estos tiene actividad AH (Stadler *et al.* 1993a; Stadler *et al.* 1994; Park *et al.* 2004), también se han identificado gran cantidad de quitinasas como productos de secreción de estos ejemplares (Hartl *et al.*, 2012; de Freitas *et al.*, 2015).

Actividad depredadora de los hongos nematófagos contra *H. contortus* y *P. redivivus*

Los hongos nematófagos son el único grupo de hongos del suelo que pueden convertir sus hábitos alimenticios de saprobios a depredadores, estos pueden mantenerse intactos hasta que detectan a un nematodo y entonces desarrollan una serie de mecanismos morfogénicos que cambian la estructura del micelio para capturar al nematodo, estos pasos son importantes para que el HN pueda tomar fuentes importantes de Nitrógeno (N₂) y otros requerimientos nutricionales (Gao *et al.*, 2007; Xingzhong y Liu, 2011). Hasta ahora, en esta investigación evaluamos la actividad depredadora de varias especies del género *Arthrobotrys*: *A. oligospora* (ovi

29), *A. oligospora* (HSCSH) *A. conoides* (CL 25), *A. arthrobotryoides* (RM 5.2) y *P. lilacinum* (Camp1). Estos ejemplares mostraron una depredación moderada cuando se los confrontó con el nematodo *H. contortus*; sin embargo, cuando se confrontaron con *P. redivivus*, que es un nematodo de vida libre, el porcentaje de depredación se incrementó hasta el 100% en las cuatro cepas evaluadas. Esta diferencia de depredación se puede deber a diferentes hechos, por ejemplo, el sitio de aislamiento geográfico, este es importante debido a las condiciones de crecimiento y disposición de nutrientes en su medio, principalmente en la disposición que tiene el HN sobre una determinada población de nematodos, es decir, la presencia o ausencia de este y añadiendo otro factor importante es el tamaño de la población de nematodos puesto que se ha demostrado una actividad depredadora denso-dependiente (Cooke *et al.*, 1964). Otro de los factores importantes es la presencia lectinas, estas son proteínas específicas, capaces de unirse a azúcares y otras moléculas específicas a cada tejido de nematodo (Sharon *et al.*, 1989). Este hecho puede explicar la respuesta depredatoria moderada al nematodo *H. contortus*, lo que nos puede sugerir una respuesta no específica.

Por otra parte, cabe mencionar que, en condiciones saprobias, cuando se evaluó la mortalidad de extractos (diclorometano/metanol 70:30) del micelio de los HN, se mostró un alto porcentaje de mortalidad larval cuando las larvas fueron confrontadas con 100 mg/mL, esto nos lleva a pensar que estas cepas son productoras de metabolitos de manera saprofita y que pudieron estar participando en la muerte y depredación de los nematodos de *H. contortus* durante los inicios de la confrontación hongo-nematodo.

Tamizaje y selección de hongos nematófagos con actividad antihelmíntica contra larvas de *H. contortus* (L3)

Las pruebas preliminares para la pre-selección de filtrados de los hongos mostraron diferencias interesantes en cuanto a la actividad nematicida. Los productos obtenidos a partir de los líquidos filtrados de los hongos cultivados en los medios Czapek-Dox y papa-dextrosa no mostraron ninguna o muy baja actividad nematicida. Al revisar estos resultados llama la atención del porque los filtrados del

líquido de cultivo de los hongos en estos dos medios no tuvieron actividad nematocida importante. Es de gran interés analizar el contenido nutricional que estos medios de cultivo ofrecen para el desarrollo de los hongos nematófagos y su metabolismo. El medio líquido papa dextrosa contiene carbohidratos, proteínas, fibra vitaminas y minerales; mientras que el medio Czapek Dox es una fuente de azúcares y sales minerales. Los hongos nematófagos son saprobios y en presencia de nematodos se vuelven parásitos o depredadores facultativos (Ji *et al.*, 2020). Los nematodos están compuestos por una cubierta compuesta de quitina, fibrina, elastina, colágeno, resilina, cuticulina y queratina; además de una capa lipídica (Lee y Atkinson, 1977). Los hongos que se encuentran bajo una situación de saprofiticidad, como ocurriría en el laboratorio en un medio de cultivo, como los dos medios utilizados en este bioensayo, en teoría al no contar con la presencia de nematodos podrían continuar como saprobios utilizando la dieta que aportan estos dos medios, sin la necesidad de sintetizar compuestos que en presencia de nematodos tendrían que producir para la degradación de los tejidos de los nematodos. Como podemos observar, ambos medios presentan grandes diferencias nutricionales. Se puede asumir que son estas diferencias las que influyen en la producción de compuestos con actividad AH en las cepas seleccionadas. Algunos autores mencionan que la composición química en el medio de cultivo, es una condición que puede modificar completamente las vías biosintéticas de varios microorganismos incluyendo los ascomicetos; y por lo consiguiente, la producción de los compuestos obtenidos serán diferentes y puede que la actividad de dichos compuestos no sea la esperada. Además, estos autores mencionan que pequeños cambios en las condiciones de cultivo pueden alterar el perfil metabólico secundario (Bode *et al.*, 2002). Probablemente esta es la razón del porque bajo estas condiciones experimentales, los hongos no produjeron compuestos bioactivos contra nematodos. Es importante mencionar que esto es solamente una suposición que tendría que demostrarse en otros estudios. Otra posible explicación podría ser que si alguno o algunos compuestos con actividad nematocida hubiesen sido secretados al medio, tal vez estos compuestos no se encontraban en la cantidad suficiente al estar diluidos en el medio y este factor

podría ser la causante de la ausencia de la actividad nematocida esperada. Tal vez si estos líquidos hubiesen sido concentrados, la cantidad de compuestos con actividad nematocida podría haber sido la necesaria para causar la mortalidad larval. Por otro lado, cuando se utilizaron extractos orgánicos obtenidos a partir de micelios de los hongos cultivados en papa-dextrosa se obtuvieron actividades nematocidas importantes en diversas cepas.

Los extractos orgánicos obtenidos a partir del micelio de los hongos *A. oligospora* (ovi29) *A. oligospora* (HSCSH), *A. conoides* (CL25) y *P. lilacinum* (Camp1) mostraron las mayores actividades nematocidas. Al analizar estos resultados es interesante preguntarse ¿porque los líquidos filtrados no tuvieron actividad nematocida a diferencia de los extractos orgánicos del micelio cultivado en un medio PD?. Una posible explicación a este hecho es que probablemente el micelio de estas cepas de hongos contienen compuestos intracelulares con actividad nematocida que en una vida como saprobios los hongos no los utilizan y por lo tanto no los vierten al medio. Sin embargo, probablemente el proceso de extracción orgánica con el sistema Metanol:diclorometano 70:30 fue capaz de extraer los compuestos bioactivos junto con los solventes hacia nuestro extracto obteniéndose los resultados en la actividad nematocida.

En lo que respecta a las pruebas de confirmación de la actividad antihelmíntica, algunos extractos mostraron resultados contundentes. Asimismo, podemos observar que las cepas del género *A. oligospora* (OVI 29), *A. conoides* (CL25) y *A. arthrobotryoides* (RM 5.2) mostraron porcentajes de mortalidad mayores al 70% al ser evaluadas a las 96 h, por consiguiente, estas cepas pueden ser consideradas como productoras de metabolitos secundarios responsables de la actividad antihelmíntica. En contraste, las cepas *P. lilacinum* (Camp1) y *Lecanicillium* CLS-T no mostraron efecto antihelmíntico significativo al cultivarlas bajo estas condiciones estáticas.

Por otra parte, los extractos de hongos nematófagos de las cepas *A. oligospora* (Ovi 29), *A. conoides* (CL 25) y *A. arthrobotryoides* (RM 5.2), que se cultivaron en medio agitado, mostraron porcentajes de actividad nematocida menores al 40%. Por el

contrario, bajo estas condiciones el extracto de la cepa *P. lilacilum*. mostró un incremento en la actividad nematocida de más del 70%; siendo esta cepa considerada como otra candidata para elucidar compuestos con actividad nematocida. Un punto interesante fue el hecho de que los extractos de los micelios de *Arthrobotrys* sp (JOSS) y *A. oligospora* (HSCSH) cultivados estáticamente, no presentaron altos porcentajes de mortalidad; sin embargo, mostraron una actividad nematostática del 67.53% y 78.9% respectivamente. Este efecto se caracteriza por la disminución de la motilidad de las larvas con respecto a un control en agua. La presencia de actividad nematostática se ha observado ya en algunas cepas de hongos nematófagos. Acevedo-Ramírez *et al.*, (2015) encontró dicha actividad en el líquido filtrado del cultivo de *Arthrobotrys musiformis* evaluando un efecto nematostático del 38% al confrontar durante 48 horas larvas de *H. contortus* (L3), en esta evaluación se utilizó el 100% de líquido filtrado; sin embargo, dicho efecto fue mayor cuando se concentró por columnas cromatográficas llegando a valores del 85%.

En otra investigación se evaluaron las roselipinas 1-5, estas son metabolitos extraídos de *Clonostachys candelabrum*, estos presentan actividad nematostática cerca del 90% cuando se confronta a concentraciones de 22 mg/mL (Ayers *et al.*, 2010).

La actividad nematostática es importante porque en su medio natural, los hongos nematófagos necesitan producir compuestos que inmovilicen a su presa para posteriormente invadirla y llevar a cabo la penetración del nematodo y alimentarse de él; es muy probable que los compuestos de las cepas *Arthrobotrys* sp. (JOSS) y *A. oligospora* (HSCSH) tengan un compuesto de interés que pueda estar participando en dicha actividad.

Por otra parte, existen algunas estrategias que podemos incluir en la producción y optimización de metabolitos secundarios. Estas incluyen la sobreproducción de compuestos con actividad AH, para ello se ha propuesto el uso de algunas moléculas inductoras del desarrollo de trampas y respuesta AH. Las moléculas que se han evaluado son: la nemina, este es un complejo proteico que forma parte del desecho de la cutícula de los nematodos (Pramer *et al.*, 1963). Asimismo, se podría

usar un homogenado del nematodo *P. redivivus* (Stirling *et al.*, 2005) y algunas otras moléculas inductoras como ácido abscísico, óxido nítrico, extracto de levadura o valina (Herrera-Medina *et al.*, 2007, Xu *et al.*, 2011).

La nemina es un complejo proteico, obtenido a partir de la cutícula externa de los nematodos, y se le ha atribuido actuar como un agente estimulante de la depredación y probablemente como un promotor de la producción de compuestos con actividad nematocida (Pramer *et al.*, 1963). La producción de metabolitos secundarios por la estimulación de dichas moléculas inductoras se desconoce; sin embargo, la utilización de estas podría dar la pauta para obtener y potencializar la producción de metabolitos de hongos nematófagos con potencial como agentes de control de nematodos parásitos de importancia pecuaria.

Producción de hongos nematófagos productores de compuestos AH

Para obtener mayor cantidad de extracto de las cepas productoras de compuestos AH, se llevó a cabo un aumento de la producción de micelio de las cepas *A. oligospora* (OVI 29) (5 L), *A. conoides* (CL25) (4.2 L), *A. arthrobotryoides* (RM 5.2) (8 L) y *P. lilacinum* (Camp1) (10 L), de esta producción se puede observar que se obtuvieron rendimientos de los extractos (diclorometano/metanol (70:30)) de hasta el 10% que equivale a 3.6 g de extracto de la cepa *P. lilacinum* (Camp1). Sin embargo, esta cantidad no es suficiente para llevar a cabo la purificación de compuestos, por lo tanto, se espera la producción de 300g de micelio en peso seco que equivale a obtener 30g de extracto de cada cepa. El incremento de la biomasa es necesario para poder evaluar el efecto AH además de realizar el fraccionamiento correspondiente a la cromatografía de columna abierta y futuras purificaciones.

Análisis fitoquímico de los extractos metanol/diclorometano (70:30) de las cepas de HN productoras de compuestos AH

Los extractos (diclorometano/metanol (70:30)) de las cepas *A. oligospora* (OVI 29), *A. conoides* (CL25), *A. arthrobotryoides* (RM 5.2) y *P. lilacinum* (Camp1) se analizaron en placas TLC en fase normal y en fase reversa demostrando que los extractos contienen menor cantidad de flavonoides puesto que no se observaron

señales mayoritarias cuando se revelaron con este reactivo. Por el contrario, se observó una mayor cantidad de compuestos cuando las placas se revelaron con el reactivo 4-hidroxibenzaldehído. Este reactivo revela la presencia de glucósidos, carbohidratos y compuestos grasos. Esto es de esperarse ya que la mayoría de los compuestos AH identificados hasta este momento en previas investigaciones son compuestos policarbonados, encontrados principalmente en agregados oleosos, un ejemplo de esto es los oligosporones (Anderson *et al.*, 1995), Roselipinas (Ayers *et al.*, 2010) y Aurovertinas (Niu *et al.*, 2010) entre otros.

Evaluación de la actividad nematocida de cultivos de 10 L de las cepas productoras de compuestos antihelmínticos contra larvas (L3) de *Haemonchus contortus*

Las cepas productoras de compuestos AH se produjeron en grandes cantidades con el fin de obtener mayor cantidad de biomasa y por lo tanto obtener mayor cantidad de extractos para la futura elucidación de compuestos, como pudimos observar, en la figura 8 las cepas que mostraron mayor porcentaje de mortalidad fueron los micelios de las cepas *A. arthrobotryoides* (RM5.2) y *P. lilacinum* (Camp1), con un porcentaje de mortalidad de 57 y 58.3% respectivamente. Estos resultados son de gran importancia ya que demuestran que estas cepas son candidatas ideales para purificar compuestos AH contra larvas (L3) de *H. contortus*.

Actividad nematocida de los extractos de los micelios de 20L de cultivo de la cepa *Arthrobotrys arthrobotryoides* (RM 5.2) contra larvas (L3) de *Haemonchus contortus*

Anteriormente, los extractos de la cepa *A. arthrobotryoides* (RM 5.2) tuvieron una actividad nematocida contra *H. contortus* del 57%, por este motivo esta cepa fue una de las mejores candidatas para llevar a cabo la purificación de compuestos con actividad AH. En el cuadro 10 se muestran los extractos del micelio de 20 L de cultivo de esta cepa; anteriormente, los compuestos con actividad nematocida en se extrajeron de los micelios con el extracto compuesto: diclorometanol /metanol (30:70), cabe mencionar que para llevar a cabo la extracción de compuestos del

micelio recuperado de 20L de cultivo de la cepa *A. arthrobotryoides* (RM 5.2), se cambió el método de extracción; en esta ocasión los extractos se elaboraron con los solventes diclorometano (100%) y metanol (100%), obteniéndose 4 extractos (1 extracto Diclorometanólico y 3 extractos metanólicos) sin embargo, al evaluar los porcentajes de mortalidad de dichos extractos, estos no tuvieron efecto antihelmíntico esperado, los resultados de mortalidad que mostraron efecto mayor se obtuvieron al evaluar el extracto metanólico (2) obteniendo solo el 17.6% de mortalidad a las 96 horas. Esta diferencia nos hace pensar que en esta ocasión la extracción de compuestos no fue la adecuada a pesar de que en ya se han utilizado estas estrategias para separar compuestos AH en varios tipos de cepas de hongos nematófagos.

Al hacer en análisis fitoquímico, pudimos observar que, al revelar las placas tanto en fase reversa como en fase normal, no se obtuvieron compuestos de tipo flavonólicos y al revelarse con el reactivo 4´hidroxibenzaldehído revelaron la presencia de compuestos tipo terpenoides y azúcares.

Producción de la cepa *P. lilacinum* (Camp1) en fermentador y evaluación de la actividad AH en contra de *H. contortus*

Hasta el momento, los resultados del presente estudio hemos demostrado que la cepa *P. lilacinum* (Camp1) ejerce una actividad AH contra larvas infectantes de *H. contortus* cuando esta es producida en medio papa-dextrosa en matraz agitado; sin embargo, la obtención de extractos en la presente investigación ha sido escasa, por lo que se buscó mejores opciones para el cultivo de este microorganismo. La producción de biomasa fungal bajo condiciones de un biorreactor tanque agitado ha sido hasta el momento una opción para la mejora y optimización de la producción de *P. lilacinum* (Camp1). En cuanto a los parámetros cinéticos, se pudo determinar un crecimiento de $\mu=0.28$ d⁻¹ y un tiempo de duplicación Td: 2.4 días. Hasta ahora, no se han encontrado investigaciones que sirvan de comparación con estos resultados, ya que al parecer esta es la primera vez que se produce *P. lilacinum* (Camp1) en biorreactor. A pesar de que el extracto de este hongo se logró incrementar hasta el 15% mediante el proceso de la biofermentación, se espera que

en futuros trabajos se determinen las condiciones óptimas para la producción de este hongo en el biofermentador y de esta manera se podrá contar con suficiente material fungal para la obtención de una suficiente cantidad de compuestos de los líquidos filtrados de *P. lilacinum* (Camp1) para su evaluación y análisis. Por otra parte, algunos parámetros importantes en esta investigación que se pudieron monitorear fueron cambios de pH, siendo el pH inicial de 7, acidificándose hasta pH 4.9 en los primeros seis días de cultivo y posteriormente se observa una elevación hasta pH 7.9 al día catorce, estos cambios concuerdan con las mediciones que hizo Cavello en el 2012, donde al estandarizar las condiciones en matraz sumergido (200 rpm) para la producción de una enzima queratinolítica en medio sustituido con residuo de pelo como sustrato y sales minerales en el medio, el pH inicial fue de 7 y posteriormente, a las 250 h de fermentación, el pH se elevó hasta un pH 7. Este autor menciona que, al inmovilizar la proteína, esta mostró actividad queratinolítica en un rango de pH 5 - 9. Además, obtuvieron mejor producción enzimática en un pH inicial de 5 incrementando 1.7 veces la producción (Cavello *et al.*, 2014).

El micelio obtenido en biorreactor nos mostró que los compuestos con actividad AH continúan sintetizándose, ya que los porcentajes de mortalidad se mantuvieron en un 55.8%, este resultado fue similar al evaluado en cultivos agitados. Otro punto importante es que se concluyó que en el día 14 de producción se obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad (44.4%).

Por otra parte, pudimos llevar a cabo la evaluación de la actividad AH en líquido liofilizado obteniendo hasta un 63.8% de efecto letal; este punto es importante ya que no se había considerado al líquido filtrado como un producto de *P. lilacinum* (Camp1) con actividad AH, sin embargo, debido a estos resultados se pretende seguir con la elucidación de compuestos tanto en extracto de micelio como líquidos filtrados (liofilizados o extractos).

Es importante mencionar que no había sido posible alcanzar la biomasa requerida para extraer compuestos de *P. lilacinum* (Camp1) y poder realizar la parte fitoquímica para llevar cabo el proceso de purificación de los compuestos. Sin embargo, gracias a la producción en biorreactor hemos logrado extraer 9 g de extracto metanol/diclorometano (70:30) de la cepa *P. lilacinum* y en cultivos

estáticos 5g de extracto metanol/diclorometano (70:30) de la cepa *A. arthrobotryoides* (RM 5.2). Con esta cantidad esperamos llevar a cabo la purificación de los compuestos responsables de la actividad AH contra el nematodo *H. contortus* (L3).

Fraccionamiento del extracto metanol/diclorometano (70:30) de la cepa *P. lilacinum*

Hasta ahora, logramos fraccionar el extracto del micelio de *P. lilacinum* Camp1, y como se mostró en los resultados, las fracciones no tuvieron actividad AH; sin embargo, cuando las fracciones (1-6, 17-20 y 21-24) se confrontaron contra huevo de *H. contortus*, se obtuvo un potente efecto inhibitorio. Aunque hasta ahora no hemos tenido éxito en la elucidación de los compuestos responsables de la actividad AH, es importante señalar la actividad AH proporcionada por *P. lilacinum* Camp1 ya que los filtrados y extractos tuvieron actividad en larvas (L3) y el fraccionamiento resultó con gran actividad inhibitoria en huevo de *H. contortus*. Lo anterior es importante ya que algunos estudios mencionan actividad en solo un estadio larvario por ejemplo, Bonants *et al.* (1995) reportaron el efecto mortal del filtrado de un cultivo de *P. lilacinum* sobre huevos de *Meloidogyne hapla*, estos autores mencionan que la causa de este efecto, se debe a una proteasa extracelular que actúa sobre huevos; sin embargo, dicha proteasa no afectó a los J2.

Hasta ahora, algunos reportes indican que *P. lilacinum* ha mostrado un efecto antihelmíntico contra algunos parásitos de importancia veterinaria y agrícola; algunos metabolitos que se han elucidado de cultivos de *P. lilacinum* son Purpureona, esta molécula se aisló de un extracto (acetato de etilo) del micelio de un cultivo de arroz fermentado durante 3 semanas, además, de este extracto se aislaron varias moléculas pero purpureona tuvo actividad antileishmaniasis con una IC₅₀ de 0.29 µg/mL y una buena selectividad (SI>49) (Lenta *et al.*, 2016). Otra molécula importante se aisló del caldo de papa, nuevamente, la extracción se realizó con acetato de etilo. La molécula elucidada fue una mezcla de contenido enzimático y leucinostatinas, esta última causó una mortalidad del 78.3% en el segundo estado juvenil del nematodo *C. elegans*. Y un 73.3% en una población mezclada con diferentes estadios larvales (Park *et al.*, 2004).

Identificación de compuestos bioactivos por HPLC

Las fracciones del extracto del micelio de *P. lilacinum* Camp1 no tuvieron actividad AH contra larvas (L3); sin embargo, las fracciones (1-6, 17-20 y 21-24) tuvieron un efecto inhibitorio contra huevo de *H. contortus*. Lo anterior es importante ya que algunos estudios mencionan actividad en solo un estadio larvario, por ejemplo, Bonants y cols (1995) reportaron el efecto ovicida de una proteasa en el filtrado del cultivo de *P. lilacinum* sobre huevos de *Meloidogyne hapla*; sin embargo, esta no afectó a los estadios juveniles J2.

Otros reportes indican que *P. lilacinum* mostró un efecto AH contra algunos parásitos de importancia médica; por ejemplo, la molécula purpureona tuvo actividad antileishmaniasis a una concentración inhibitoria CI_{50} de 0.29 $\mu\text{g/mL}$ y una buena selectividad ($SI > 49$) (Lenta *et al.*, 2016). Otra molécula importante fue leucinoestatina, esta última causó una mortalidad del 78.3% en el segundo estado juvenil del nematodo *C. elegans* y un 73.3% en una población mezclada con diferentes estadios larvales (Park *et al.*, 2004). La cantidad de leucinoestatinas es muy grande llegando a encontrarse 25 tipos (Isogai *et al.* 1992; Martinez y Moraes, 2015). Por otra parte, también se han identificado gran cantidad de quitinasas como productos de secreción de los ejemplares de *P. lilacinum* (Cavello 2012).

En el presente estudio no se elucidaron compuestos activos, sin embargo, los análisis de HPLC de las fracciones purificadas mostraron compuestos de tipo flavonólicos como el ácido gálico y cumarinas como los responsables de la actividad ovicida (figura 15).

Ya se ha reportado a los flavonoides como antihelmínticos potentes contra huevos y larvas de *H. contortus* (L3); sin embargo, las moléculas flavonólicas encontradas en cepas de *P. lilacinum* son poco comunes. Jayakrishnan, (2016) encontró a la molécula flavaucona en el extracto de acetato de etilo del líquido filtrado de un cultivo de *P. lilacinum*, esta molécula tiene efectos antioxidantes y además tiene propiedades anticancerígenas y antibacterianas.

En plantas se han encontrado productos derivados del ácido gálico como agente ovicida en el extracto metanólico de la planta *Caesalpinia coriaria*, en este estudio se observó un efecto ovicida con una CL_{50} : 0.0006466 mg/mL ; Sin embargo, en

larvas se obtuvo una CL₅₀: 78 mg/mL, mucho mayor a la reportada en huevo (De Jesús-Martínez *et al.*, 2018).

Otras de las moléculas identificadas por HPLC fueron las cumarinas, recientemente se ha reportado a estas moléculas como agentes antihelmínticos contra la lombriz india de tierra *Pheretima postuma* (Patil *et al* 2015). Algunos autores obtuvieron una alta actividad contra *H. contortus* atribuido al efecto de las cumarinas, por ejemplo, Castillo-Mitre (2017) reporta un efecto ovicida contra *H. contortus*, encontrada en una fracción de la planta *Acacia cochliacantha*, esta contiene derivados fenólicos y componentes cumarínicos. Igualmente, se ha reportado una alta actividad antihelmíntica debida a la molécula identificada como 2H-chromen-2-one, esta molécula tiene una alta actividad contra el nematodo *cooperia punctata*, un parásito digestivo en rumiantes, esta molécula inhibe la eclosión del huevo y desarrollo larvario con una DL₅₀: 0.024 mg/mL (von Son de Fernex *et al.*, 2017).

Es importante seguir analizando los compuestos obtenidos de estas fermentaciones puesto que la presencia de compuestos fúngicos con actividad antihelmíntica y en especial biodirigido hacia *H. contortus* o nematodos de importancia veterinaria han sido escasos; sin embargo, estas cepas demuestran gran importancia y dan una opción más hacia la elucidación de nuevos compuestos contra nematodos patógenos.

Es importante seguir analizando los compuestos obtenidos de estas fermentaciones puesto que la presencia de compuestos fúngicos con actividad antihelmíntica y en especial biodirigido hacia *H. contortus* o nematodos de importancia veterinaria han sido escasos; sin embargo, estas cepas demuestran la importancia y dan una opción más hacia la elucidación de compuestos contra nematodos patógenos.

9. Conclusiones

Se logró identificar a las cepas *A. oligospora* (Ovi 29), *A. conoides*, *A. arthrobotryoides* (RM 5.2) y *P. lilacinum* (Camp1) como productoras de compuestos AH. Las fracciones del extracto metanol/diclorometano (70:30) de *P. lilacinum*, no tuvieron actividad AH contra larvas L3; sin embargo, al evaluar dichas fracciones en contra de huevos de este parásito, mostraron actividad ovicida del 95% evaluando

con 40mg/mL, y 85 % con 10 mg/mL. Los compuestos mayoritarios de la fracción activa 21-24 del extracto de *P. lilacinum* se analizaron por cromatografía HPLC mostrando moléculas derivadas del ácido gálico y cumarinas. Con estos resultados se pretende llevar a cabo la elucidación de estos compuestos AH por RMN.

11. Pendientes:

Elucidar los compuestos que presenten mayor actividad antihelmíntica contra larva (L3) o huevo de *H. contortus*.

Algunos resultados de esta investigación se publicaron en la revista Fungal Ecology:

Ana Yuridia Ocampo-Gutiérrez, Víctor Manuel Hernández-Velázquez, Liliana Aguilar-Marcelino, Alexandre Cardoso-Taketa, Alejandro Zamilpa, María Eugenia López-Arellano, Manasés González-Cortázar, Jesús Hernández-Romano, Manuela Reyes-Estebanez, Pedro Mendoza-de Gives (2020). Morphological and molecular characterization, predatory behaviour and effect of organic extracts of four nematophagous fungi from Mexico, *Fungal Ecology*, Volume 49, 2021, 101004, ISSN 1754-5048, <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.101004>.

Fungal Ecology 49 (2021) 101004

Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funeco

Morphological and molecular characterization, predatory behaviour and effect of organic extracts of four nematophagous fungi from Mexico

Ana Yuridia Ocampo-Gutiérrez^{a, c}, Víctor Manuel Hernández-Velázquez^{c, **, *}, Liliana Aguilar-Marcelino^a, Alexandre Cardoso-Taketa^c, Alejandro Zamilpa^b, María Eugenia López-Arellano^a, Manasés González-Cortázar^b, Jesús Hernández-Romano^d, Manuela Reyes-Estebanez^e, Pedro Mendoza-de Gives^{a, *}

^a Laboratorio de Helmintología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP, Morelos, México, Boulevard Paseo Cuauhnahuac No. 8534, Col. Progreso, Jiutepec, Mor., México CP 62570, Mexico
^b Centro de Investigación Biomédica del Sur, CIBIS-IMSS Argentina 1, Col Centro Xochitepec, Mor México CP 62790, Mexico
^c Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No.1001 Col, Chamilpa, Cuernavaca, Mor., México CP 62209, Mexico
^d Departamento de Investigación, Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Boulevard Paseo Cuauhnahuac No. 556, Col. Lomas del Texcat, Jiutepec, Mor., México CP 62550, Mexico
^e Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universidad Autónoma de Campeche, Av. Agustín Melgar s/n entre Juan de la Barrera y Calle 20, Colonia Buena vista, Campeche, Camp., México CP 24039, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 April 2020
Received in revised form 6 October 2020
Accepted 8 October 2020
Available online xxx

Corresponding Editor: Duur Aanen

Keywords:
Nematode-fungi interaction
Nematophagous fungi
Nematodes
Predation
Organic extracts
Genotyping
Nematocidal activity
Traditional taxonomy
Natural enemies

ABSTRACT

Four nematophagous fungi (NF) were identified by traditional and molecular techniques, and their in vitro predatory activity (PA) against *Haemonchus contortus* (Hc), and *Panagrellus redivivus* (Pr) was assessed. Additionally, the nematocidal activity (NA) of fungal organic extracts (OEs) obtained from a methanol/dichloromethane system was assessed. Fungi were grown in PDB medium under shaking (SchC) and static conditions (StatC). The PA of *Arthrobotrys conoides* (Ac), *A. oligospora* (Ao), *A. arthrobotryoides* (Aa) and *Purpureocillium lilacinum* (Pl) against Hc were 75, 71, 66 and 52%, respectively. Meanwhile, the PA against Pr for same fungal genera/species were 99.8, 99.9, 99.4 and 96.3%, respectively. The highest NA of the OEs were 89.5, 81.6 and 72.1% for Aa, Ac and Ao, respectively, under StatC. Moreover, Pl cultured under SchC caused 78% Hc larval mortality. The four assessed NF and their OEs are promising candidates as potential biocide agents against parasitic nematodes.

© 2020 Elsevier Ltd and British Mycological Society. All rights reserved.

1. Introduction

Nematodes are the most abundant animals on earth reaching 4.5×10^{20} individuals (van den Hoogen et al., 2019). Soil nematodes are small, usually measuring about 100–1000 μm in length; although some species can reach several mm or even more (Barron, 1977). Soil nematodes have adapted to different environments including animals, plants and human beings and act as parasites causing important damage to agriculture (Bernard et al., 2017) and livestock industries (Tisotetsi and Mbat, 2003) and public health (Faro de Novaeds et al., 2017). *Haemonchus contortus* is a blood-sucking parasitic nematode living in the soil and the stomachs of

* Corresponding author.
** Corresponding author.
E-mail addresses: vmanuelh@uaem.mx (V.M. Hernández-Velázquez), mendoza.pedro@inifap.gob.mx (P. Mendoza-de Gives).

<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.101004>
1754-5048/© 2020 Elsevier Ltd and British Mycological Society. All rights reserved.

12. Referencias

- Acevedo-Ramírez, P.M., Figueroa-Castillo, J.A., Martínez-García, L.G., Guevara-Flores, A., Rendón, J.L., Valero-Coss, R.O., Mendoza-de G.P. y Quiroz-Romero, H. (2015) Proteolytic activity of extracellular products from *Arthrobotrys musiformis* and their effect *in vitro* against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Veterinary Record Open*. 2: e000103.
- Adediran, O.A. y Uwalaka E. C. (2015) Effectiveness evaluation of levamisole, albendazole, ivermectin, and *vernonia amygdalina* in West African Dwarf Goats. *Journal of Parasitology Research*. 2015:1-5. Doi:10.1155/2015/706824
- Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., Torres-Hernández, G, López-Arellano, M.E., Becerril-Pérez, C.M, Orihuela-Trujillo A., Torres-Acosta, J.F.J. y Olmedo-Juárez A. (2016) Consumption of nutritional pellets with *Duddingtonia flagrans* fungal chlamydozoospores reduces infective nematode larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of Saint Croix lambs. *Journal of Helminthology*. 1–7. doi:10.1017/S0022149X1600081X
- Anderson, M.G., Jarmin, T.B. y Rickards, R.W. (1995) Structures and absolute configurations of antibiotics of the oligosporon group from the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *J. Antibiot.* 48:391–39. doi:10.7164/antibiotics.48.391.
- Anderson, M.G., Rickards, R.W. y Lacey, E. (1999) Structures of flagranones A, B and C, cyclohexenoxide antibiotics from the nematodetrapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *Journal of Antibiotics* 52:1023–1028. doi:10.7164/antibiotics.52.1023
- Ayers, S., Zink, D.L., Mohn, K., Powell, J.S., Brown, C.M., Bills, G., Grund, A., Thompson, D. y Singh, S.B. (2010) Anthelmintic constituents of *Clonostachys candelabrum*. *Journal of Antibiotics* (Tokyo). 63(3):119-22. doi: 10.1038/ja.2009.131.
- Braga, F.R., de Araújo, J.V. (2014) Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 98:71–82. doi.org/10.1007/s00253-013-5366-z.
- Bernard, G.C., Egnin, M. y Bonsi C. (2017) The Impact of Plant-Parasitic Nematodes on Agriculture and Methods of Control chap. 7 121-151. In: Mohammad Manjur Shah, Mohammad Mahamood (Eds), *Nematology Concepts Diagnosis and Control*. August 2017. Intech open.
- Beyene, T. (2016) Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *J Veterinar Sci Technol*. 7: 285. doi:10.4172/2157-7579.1000285
- Bisimwa, N.P., Lugano, R.M., wihangane, B.A., Wasso, S.D., Kinimi, E., Banswe, G. y Bajope, B. (2018) Prevalence of gastrointestinal helminths in slaughtered cattle in Walungu territory, South Kivu province, Eastern Democratic Republic of Congo. *Austin J. Vet. Sci. Anim. Husband.* 5(1): 1039-1046. doi: 10.14202/vetworld.2019.48-54

- Bode, H.B., Bethe, B., Hofs, R. y Zeeck, A. (2002) Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem*, 3, 619–627. doi: 10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9
- Bonants, P.J., Fitters, P.F., Thijs, H. den Belder E., Waalwijk, C., Henfling, J.W. (1995) A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiology*. 141 (Pt 4): 775-84. doi: 10.1099/13500872-141-4-775.
- Botana, L. M., Landoni, F. y Martín, J. (2002) *Farmacología y terapéutica veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. p545-558.
- Braga, F.R., Araújo, J.V., Araújo, J.M., Tavela, A.O., Ferreira, S.R., Soares, F.E.F., Benjamin, L.A. y Frassy, L.N. (2011) Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae). *Exp Parasitol* 128:460–463. doi: 10.1016/j.exppara.2011.05.013
- Burke, J.M., Miller, J.E. y Brauer, D.K. (2005) The effectiveness of copper oxide wire particles as an anthelmintic in pregnant ewes and safety to offspring. *Veterinary Parasitology*. 131(3–4): 291-297. doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.009.
- Campbell, W.C. (1981) An introduction to the avermectins. *N. Z.Vet.J.* 29:174–178. doi:10.1080/00480169.1981.34836
- Campos, A.K., Araújo, J.V., Mota, M.A. y Cecon, P.R. (2004) Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação. *Ciência Rural*. 34(2):465–469. doi:10.1590/S0103-84782004000200020
- Canhão-Dias M., Paz-Silva A. y Madeira de Carvalho L.M. (2020) The efficacy of predatory fungi on the control of gastrointestinal parasites in domestic and wild animals-A systematic review. *Veterinary Parasitology*. 283,109173. doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109173.
- Castañeda-Ramírez, G.S., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Marcelino, L., López-Arellano, M.E., y Hernández-Romano, J. (2016) Phylogenetic Analysis of Nucleotide Sequences from the ITS Region and Biological Characterization of Nematophagous Fungi from Morelos, Mexico. *Journal of Mycology*. 2016. doi:10.1155/2016/8502629
- Castillo-Mitre, G.F., Zamilpa, A., Rojo-Rubio, R., Cortázar-González, M., Reyes-Guerrero, D.E., Mendoza- de Gives, P., López-Arellano, M.E., Ramírez-Vargas, G. y Olmedo-Juárez, A. (2016) Fraccionamiento del extracto Hidro-alcohólico de *Acacia cochliacantha* y su efecto contra huevos del parásito nematodo *Haemonchus contortus*. En: Martínez-Herrera, J., Ramírez-Guillermo, M.A., Cámara-Córdova, J. (Eds.). *Innovación para la Seguridad Alimentaria*. pp 32–346. doi: 10.1007/s11259-017-9687-8
- Cavello, I., Hours, R., Cavalitto, S. (2012) Bioprocessing of “Hair Waste” by *Paecilomyces lilacinus* as a Source of a Bleach-Stable, Alkaline, and Thermostable Keratinase with Potential Application as a Laundry Detergent Additive: Characterization and Wash Performance Analysis. *Biotechnology Research International*. 2012. 1-12. doi:10.1155/2012/369308.

- Cavello, I.A., Cavalitto, S.F. (2014) Kinetic Modelling of Thermal Inactivation of a Keratinase from *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876 and the Influence of Some additives on Its Thermal Stability. *Appl Biochem Biotechnol* 173, 1927–1939. doi:10.1007/s12010-014-0977-0
- Cooke, R. C. y Godfrey, B. E. S. (1964) "A key to the nematode destroying fungi," *Transactions of the British Mycological Society*. volúmen 47, no. 1, pp. 61–74, 1964.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., (1992) World association or the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35-44. doi:10.1016/0304-4017(92)90141-U
- Cully, D.F. et al. (1994) Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371, 707–711. doi: 10.1038/371707a0
- Chartier, C. y Pors, I. (2003) Effect of the nematophagous fungus, *Duddingtonia flagrans*, on the larval development of goat parasitic nematodes: a plot study. *Veterinary Research* 34: 221-230. doi: 10.1051/vetres:2002069
- Chen, T.H., Hsu C.S., Tsai, P.J., Ho Y.F., Lin, N.S. y Lin, N.S. (2001) Heterotrimeric G-protein and signal transduction in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. *Planta*. 2001; 212:858–863. doi: 10.1007/s004250000451.
- Chu, Y.-S., Niu, X.-M., Wang, Y.-L., Guo, J.-P., Pan, W.-Z., Huang, X.-W. y Zhang, K.Q. (2010) Isolation of putative biosynthetic intermediates of prenylated indole alkaloids from a thermophilic fungus. *Organic Letters* 12:4356–4359. doi: 10.1021/ol101817g
- da Silva, M.E., Araújo, J.V., Braga, F.R., Alcantara, B.L., Soares FE, Santos, W.L. y Guimares, M.P. (2013) Mycelial mass production of fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* under different culture conditions. *BMC Research Notes* 6:340. doi:10.1186/1756-0500-6-340
- Dackman, C., Olsson, S., Jansson, H.B., Lundgren, B. y Nordbring, H. B. (1987) Quantification of predatory and endoparasitic nematophagous fungi and their activities in soil. *Microbial Ecology* 13:89–93.
- de Freitas, S.F.E, de Queiroz, J.H., Braga, F.R., Lima, W.S., Zamprogno, T.T. y de Araujo, J.V. (2014) Proteolytic activity of the nematophagous fungus *Arthrobotrys sinensis* on *Angiostrongylus vasorum* larvae. *BMC Research Notes*. 7:811. doi:10.1186/1756-0500-7-811
- de Freitas, S. F. E., de Queiroz, J. H., de Araújo, J. V., Queiroz, P. V., de Souza, G. A., Hiura, E. y Braga, F. R. (2015) Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thaumasium* under laboratorial conditions. *Biocontrol Science and Technology*. 25:3, 337-344. doi:10.1080/09583157.2014.979133
- De Jesús-Martínez, X., Olmedo-Juárez, A., Olivares-Pérez, J., Zamilpa, A., Mendoza de Gives, P., López-Arellano, M. E., Rojas-Hernández, S., Villa-Mancera, A., Camacho-Díaz, L. M., y Cipriano-Salazar, M. (2018) "In vitro" anthelmintic activity of methanolic extract from

- Caesalpinia coriaria* J. willd fruits against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae". BioMed Research International. volúmen 2018.1-6. doi.org/10.1155/2018/7375693
- Degenkolb, T. y Vilcinskis, A. (2016) Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. Applied Microbiol Biotechnol. 100:3799–381. doi:10.1007/s00253-015-7233-6
- Dong, L. y Zhang, K. (2006) Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. Plant Soil 288:31–45. doi: 10.1007/s11104-006-9009-3
- Drechsler, C. (1937) Some Hyphomycetes that prey on free living terricolous nematodes. Mycologia 29 (4), 447e552. doi:10.1080/00275514.1937.12017222
- Faedo, M., Barnes, E.H., Dobson, R.J. y Waller, P.J. (1998) The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. Vet. Par. 72:129–135. doi: 10.1016/s0304-4017(97)00057-5
- Faedo, M., Larsen, M. y Waller P.J. (1997) The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*. Vet Par. 72:149–155. doi:10.1016/s0304-4017(01)00545-3.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAOSTAT. (2004). Producción, consumo, comercio.
- Fernández, R. M., Vázquez, P. V., y Liébano, H. E. (1994) Development and recovery of *Haemonchus contortus* first larval stages on experimental plots in Mexico. Veterinary Parasitology, 51, 263-269. doi:10.1016/0304-4017(94)90164-3
- Flores, J., Herrera, D., Vázquez, V., Martínez, J. y Mendoza de Gives P. (1999) Capacidad nematófaga de dos cepas del hongo *Duddingtonia flagrans* desarrollada en harina de maíz agar. Veterinaria México. 30(2): 199- 203. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42330211>
- Flores, J., Herrera, D., Mendoza de Gives, P., Liébano, E., Vasquez, V.M., Fontenot, M., Miller, J., Peña, M., Larsen, M. y Gillespie, A. (2003) Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamidospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. Vet Par. 118: 203-213. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.10.017
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2001) Sustainable approaches for managing haemonchosis in sheep and goat: Final report of FAO technical cooperation project in South Africa. South África. 2001:1-90.
- Fukushima K., Arai T., Mori Y., Tsuboi M. y Suzuki M. (1983b) Studies on peptide antibiotics, leucinostatins. II. The structures of leucinostatins A and B. J Antibiot 36:1613–1630. doi:10.7164/antibiotics.36.1613
- Fukushima, K., Arai, T., Mori, Y., Tsuboi, M. y Suzuki M. (1983a) Studies on peptide antibiotics, leucinostatins. I. Separation, physico-chemical properties and biological activities of leucinostatins A and B. J Antibiot. 36:1606–1612. doi: 10.7164/antibiotics.36.1606

- Galindo-Barboza, A.J., Torres-Acosta, J.F., Cámara-Sarmiento, J. R., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Ojeda-Robertos, N.F., Reyes-Ramírez R. y Espana-España, E. (2011) Persistence of the efficacy of copper oxide wire particles against *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Par* 176:201-207. doi:10.1016/j.vetpar.2012.06.018
- Gallego, B. J. (2006) Manual de parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Barcelona: Ediciones Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
- Gamboa, A. M., Moreno, E. J. A., Herrera, P. E, Pérez, C. J., Cristóbal, A. J. y Heredia, A. G. (2015) *In vitro* toxicity of tropical Mexican Micromycetes on infective juveniles of *Meloidogyne incognita* Toxicidad *in vitro* de Micromicetos del Trópico. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 34, N. 1.
- Gao, L. (2014) A preliminary study on nutritional requirements of nematophagous fungus ARF907 for mycelial growth. *Academic Journals*. 5(7), pp. 92-95. doi: 10.5897/JYFR2014.0141
- Gao, L., Sun, M.H., Liu, X.Z. y Che, Y.S. (2007) Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on grown and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological. Research* 111:87-92. doi: 10.1016/j.mycres.2006.07.019
- García-Ortiz, N., Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., López-Arellano, M.E., Bautista-Garfias, C.R. y González-Garduño, R. (2015) *In vitro* activity of *Lasioseius penicilliger* (Arachnida: Mesostigmata) against three nematode species: *Teladorsagia circumcincta*, *Meloidogyne* sp. and *Caenorhabditis elegans*. *Veterinaria México OA*. 2015;2(1). doi:10.21753/vmoa.2.1.340.
- González Garduño, R., Córdova Pérez, C., Torres Hernández, G., Mendoza de Gives, P., y Arece García, J. (2011) Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. *Veterinaria México*, 42(2), 125-135. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S030150922011000200003&lng=es&esytlng=es.
- Haard, K., (1968) Taxonomic studies on the genus *Arthrobotrys corda*. *Mycologia* 60(6), 1140e1159.
- Hartl, L., Zach, S. y Seidl-Seiboth, V. (2012) Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 533–543 (2012). doi:10.1007/s00253-011-3723-3
- Hamad, K.K., F.A. Kadir, y H.O. Hamad. (2017) Control of antinematicidal resistant gastrointestinal nematodes in tamed small ruminants: achievements, trends and perspectives. *ZANCO Journal of Pure and Applied Sciences*. ZJPAS. 29:62-77
- Heckel DG. 2020 How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective. *Arch Insect Biochem Physiol*. doi:10.1002/arch.21673
- Herrera-Medina, M. J., Steinkellner, S., Vierheilig, H., Ocampo Bote, J. A. y Garrido, J. M. G. (2007) Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 175, 554–564. doi:10.1016/j.jip.2007.11.005.

- Höglund, J., Elmahalawy, S.T., Halvarsson, P., Gustafsson, K. (2019) Detection of *Haemonchus contortus* on sheep farms increases using an enhanced sampling protocol combined with PCR based diagnostics. *Vet. Parasitol.* 2, 100018. doi:10.1016/j.vpoa.2019.100018.
- Huang, X., Zhao, N. y Zhang, K. (2004) Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Research in Microbiology* 155, 811–816.
- Hsueh, Y.P, Mahanti, P., Schroeder, F.C. y Sternberg P, (2013) Nematode trapping fungi eavesdrop on nematode pheromones. *Curr. Biol.* 23(1): 83-86. doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.035
- Hyde, K., Swe, A. y Zhang KQ. (2014) Nematode-Trapping Fungi. In: Zhang KQ., Hyde K. (eds) *Nematode-Trapping Fungi. Fungal Diversity Research Series*, vol 23. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-017-8730-7_1
- Ilangopathy, M., Palavesam, A., Amaresan, S., y Muthusamy, R. (2019) Economic Impact of Gastrointestinal Nematodes in Sheep on Meat Production. *International Journal of Livestock Research*, 9(10), 44-48. doi: 10.5455/ijlr.20190331051814
- Isogai A, Nakayama J, Takayama S, Kusai A y Suzuki A. (1992) Structural elucidation of minor components of peptidyl antibiotic P168s (leucinostatins) by tandem mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem.* 56:1079–1085. ISSN 0304-4017. doi:10.1016/j.vetpar.2020.109173.
- Jacobson, C., Larsen, J. W., Besier, R. B., Lloyd, J. B., y Kahn, L. P. (2020) Diarrhoea associated with gastrointestinal parasites in grazing sheep. *Veterinary Parasitology*, 109139. doi:10.1016/j.vetpar.2020.109139
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B. y Hofstetter, V.V. (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature.* 443: 818–822. doi: 10.1038/nature05110
- Jayakrishnan, T.B. (2016) *Purpureocillium lilacinum* Strain BP13 Produces flavoglucanin. *Electronic Journal of Biology*, 2016, Volúmen12(4): 472-476.
- Ji X, Yu Z, Yang J, Xu J, Zhang Y, Liu S, Zou C, Li J, Liang L, Zhang KQ. (2020) Expansion of adhesion genes drives pathogenic adaptation of nematode-trapping fungi. *iScience.* 2020 May 22;23(5):101057. doi: 10.1016/j.isci.2020.101057.
- Jones, O. (2020) Use of diatomaceous earth and copper oxide wire particles to control gastrointestinal nematodes in lambs. *Animal science undergraduate honors theses* retrieved from <https://scholarworks.uark.edu/anscuht/35>
- Kanai, Y., Fujimaki, T., Kochi, S-I., Konno, H., Kanazawa, S. y Tokumasu, S. (2004) Paeciloxazine, a novel antibiotic from *Paecilomyces* sp. *Journal Antibiotics* 57:24–28. doi:10.7164/antibiotics.57.24
- Kepenekci, I., Oksal, E., Saglam, D., Atay, T., Tülek, A. y Evlice, E., (2015). Identification of Turkish isolate of the entomopathogenic fungi, *Purpureocillium lilacinum* (syn: *Paecilomyces lilacinus*) and its effect on potato pests, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera:

- gelechiidae) and *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: chrysomelidae). Egypt. J. Biol. Pest. Co. 25 (1), 121e127. <https://www.researchgate.net/publication/290955180>.
- Khambay, B.P.S., Bourne, J.M., Cameron, S., Kerry, B.R. y Zaki M.J. (2000) A nematicidal metabolite from *Verticillium chlamydosporium*. Pest Management Science 56:1098–1099. doi:10.1002/1526-4998(200012)56:12<1098::AID-PS244>3.0.CO;2-H
- Kuo, T.-H.; Yang, C.-T.; Chang, H.-Y.; Hsueh, Y.-P. y Hsu, C.-C. (2020). Nematode-Trapping Fungi Produce Diverse Metabolites during Predator–Prey Interaction. *Metabolites*. 10, 117. doi:10.3390%2Fmetabo10030117
- Lacey, E. (1990) Mode of action of benzimidazoles. Parasitol Today. 1990;6:112–115. doi:10.1016/0169-4758(90)90227-u
- Lamovsek, J., Urek G. y Trdam S. (2013) Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*): Microbes against the pests. Acta Agriculturae Slovenica 101: 263-275. doi:10.2478/acas-2013-0022
- Larsen, M., Faedo, M., Waller, P.J. y Hennessy, D.R. (1998) The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: studies with *Duddingtonia flagrans*. Veterinary Parasitology 76:121–12. doi: 10.1016/s0304-4017(97)00056-3.
- Lee, D.L. y Atkinson H.J. (1977) Physiology of nematodes. Columbia University Press. Second Edition, New York, p14.
- Lenta, B., Ngatchou, J., Frese, Marcel., Ladoh Y., Christelle F., Voundi, S., Nardella, F., Michalek, C. Wibberg, D., Silvere, N., Tsamo, E., Kaiser, M., Kalinowski, J., Sewald, N. (2016) Purpureone, an antileishmanial ergochrome from the endophytic fungus *Purpureocillium lilacinum*. 71. 1159-1167. doi:10.1515/znb-2016-0128.
- Li G., Zhang K., Xu J., Dong J. y Liu Y. (2007^a) Nematicidal substances from fungi. Recent Patents on Biotechnol 1:212–233. doi: 10.2174/187220807782330165
- Li, J., Hyde, K.D. y Zhang y Ke-Qin. (2014) Chapter 2 Methodology for Studying Nematophagous Fungi. K.-Q. Zhang, K. D. Hyde (eds.), Nematode-Trapping Fungi, Fungal Diversity Research Series 23, © Mushroom Research Foundation . doi:10.1007/978-94-017-8730-7_2,
- Li, Y., Hyde, K.D., Jeewon, R., Cai L. y Vijaykrishna, D. (2005) Phylogenetics and evolution of nematode-trapping fungi (Orbiliaceae) estimated from nuclear and protein coding genes. Mycologia 97: 1034–1046. doi: 10.3852/mycologia.97.5.1034
- Li, X.Q., Xu, K., Liu, X.M. y Zhang, P. (2020) A systematic review on secondary metabolites of *Paecilomyces* species: chemical diversity and biological activity. Planta Med 86:805–821. doi:10.1055/a-1196-1906
- Lin F, Ye J, Wang H, Zhang A y Zhao B. (2013) Host deception: predaceous fungus, *Esteya vermicola*, entices pine wood nematode by mimicking the scent of pine tree for nutrient. Plos one. 8:e71676. doi:10.1371/journal.pone.0071676
- Lipke, P.N. (2018) What we do not know about fungal cell adhesion molecules. *J. Fungi*, 4, 59. doi.org/10.3390/jof4020059

- Liu, Y-J., Zhai, C-Y., Liu, Y. y Zhang, K-Q. (2009) Nematicidal activity of *Paecilomyces* spp. and isolation of a novel active compound. *Journal Microbiology* 47:248–252. doi:10.1007/s12275-009-0012-
- López, R. O. A., González, G. R., Osorio, A. M. M., Aranda, I. E. y Díaz, R. P. (2013) Cargas y especies prevalentes de nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo destinados al abasto. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 4(2):223-234.
- López-Llorca L, Macía-Vicente J y Jansson H-B. (2008) Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*, ed. A Ciancio, KGMukherjee, pp. 51–76. Dordrecht, Neth.: Springer
- Luangsa-ard, J., Houbraken J., Van Doorn T., Hong S-B., Borman A.M., Hyel-Jones N.L. y Samson R.A. (2011) *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters* 321: 141-149. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x
- Lukovich, R. (1968) Identificación de las formas adultas de los nematodos gastrointestinales y pulmonares de los rumiantes en la República Argentina. FAO.
- Lumaret, J.P., Errouissi, F., Floate, K., Römbke, J. y Wardhaugh, K. (2012) A Review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *current pharmaceutical biotechnology*. 13, 1004-1060. doi: 10.2174/138920112800399257
- Luns, F.D., Assis, L R.C., Laryssa Pinheiro Costa Silva, Carolina Magri Ferraz, Fábio Ribeiro Braga, y Jackson Victor de Araújo (2018) Coadministration of nematophagous fungi for biological control over nematodes in Bovine in the South-Eastern Brazil". *BioMed Research International*. 1-6. doi.org/10.1155/2018/2934674
- Márquez, L. D. (2003) Resistencia a los antihelmínticos: Origen, desarrollo y control. Programa Nacional de Salud Animal. CORPOICA-CEISA 1. 17 p.
- Márquez, D., Jiménez, G., García, F., Garzón, C. (2008) Resistencia a los antihelmínticos en nematodos gastrointestinales de bovinos en municipios de Cundinamarca y Boyacá. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 9(1), 113-123. ISSN: 0122-8706. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945024013>
- Martinez, A.F. y Moraes, L.A. (2015) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of five new leucinoestatinas produced by *Paecilomyces lilacinus* CG-189. *The Journal of Antibiotic* 68:178–184. doi:10.1038/ja.2014.12
- Mendoza de Gives, P. (1999) "Interaction between nematodes and bio-control agents with potential for use in bio-management systems." Ph. D. Thesis. Faculty of Life Sciences. University of Nottingham, Nottingham, UK.
- Mendoza-de-Gives, P., Zapata-Nieto, C., Liébano-Hernández, E., López-Arellano, E., Herrera-Rodríguez, D. y González-Garduño, R. (2006) Biological control of gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1081:355–359. doi: 10.1196/annals.1373.050

- Molinari, G. B. (2010) Ivermectinas: evaluación de su efecto deletéreo mediante ensayos de genotoxicidad. Universidad Nacional de la plata. Facultad de ciencias naturales y museo. 116p.
- Morton, C., Hirsch, P. y Perry, B. (2004) Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi—a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology* 6(2): 161-170. doi: 10.1163/1568541041218004
- Mota, M.A, Campos, A.K. y Araújo, J.V. (2003) Influence of different storage methods on the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* after passage through the bovine gastrointestinal tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19:913–916. doi:10.1023/B:WIBI.0000007314.76357.00
- Mottier, L., Álvarez, L., Ceballos, C. y Lanusse, C. (2006) Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive diffusion of benzimidazol anthelmintics. *Experimental Parasitology* 113(1):49-57. doi:10.1016/j.exppara.2005.12.004
- Moussouni, L., Benhanifia, M., Saidi, M. y Ayad, A. (2018) Prevalence of gastrointestinal parasitism infections in cattle of Bass Kabylie Area: case of Bejaia Province, Algeria. *Mac. Vet. Rev.*, 41(1): 73-82. 17. doi:10.2478/macvetrev-2018-0010
- Munguía, X. J. A., Valenzuela, M.W., Leyva, C. J. C. y Morales, P. M. I. (2013) Potencial del orégano como alternativa natural para controlar *Haemonchus contortus* en ovinos de pelo. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 9:1: 150-154.
- Navrátilová, M., Raisová Stuchlíková, L., Skálová, L. *et al.* (2020) Pharmaceuticals in environment: the effect of ivermectin on ribwort plantain (*Plantago lanceolata* L.). *Environ Sci Pollut Res* 27, 31202–31210. doi:10.1007/s11356-020-09442-4
- Netra, B.A., Gunaseelan, L., Porteen, K. y Bojiraj M. (2016). Veterinary Drug Residues in Environment- Potential Hazards Indian. *Vet. J.* 93 (07): 14 – 16.
- Niciura, S.C.M., Tizioto, P.C., Moraes, C.V. *et al.* (2019) Extreme-QTL mapping of monepantel resistance in *Haemonchus contortus*. *Parasites Vectors*. 12:403. doi.org/10.1186/s13071-019-3663-9
- Niu, X. M., Wang, Y. L., Chu, Y. S., Xue, H. X., Li, N., Wei, L.X., Mo, M. H. y Zhang, K. Q. (2010) Nematodetoxic aurovertin-type metabolites from a root-knot nematode parasitic fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 828–834. doi:10.1021/jf903259n
- Nordbring-Hertz B, Jansson H-B y Tunlid A. (2011) *Nematophagous Fungi*. eLS. Chichester: John Wiley y Sons, Ltd.
- Novaes, S. Faro de, Schreiner, L. L., Silva, P. I. y Franco R.M. (2017) Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. *Ciência Rural*,47(8). doi.org/10.1590/0103-8478cr20170215
- Nozaki, M.H., Camargo, M. y Barreto, M. (2004) Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de culturas, condições de temperatura e luminosidade. *Fitopato Bras* 29(4):429-432. doi:10.1590/S0100-41582004000400012.

- Park, J.O., Hargreaves, J.R., McConville, E.J., Stirling, G.R., Ghisalberti, E.L. y Sivasithamparam, K. (2004) Production of leucinostatins and nematicidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. Letters in Applied Microbiology 38(4):271–276. doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01488.x
- Ola-Fadunsin, S.D., Ganiyu, I.A., Rabi, M., Hussain, K., Sanda, I.M., Baba, A.Y., Furo, N.A. y Balogun, R.B. (2020) Helminth infections of great concern among cattle in Nigeria: Insight to its prevalence, species diversity, patterns of infections and risk factors. Vet World 13(2):338-344. doi: 10.14202/vetworld.2020.338-344. Epub 2020
- Patil, S.A., Prabhakara, C.T., Halasangi, B.M., Toragalmath, S.S. y Badami, P.S. (2015) DNA cleavage, antibacterial, antifungal and anthelmintic studies of Co (II), Ni (II) and Cu (II) complexes of coumarin Schiff bases: synthesis and spectral approach. Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spec 137, 641e651. doi: 10.1016/j.saa.2014.08.028
- Pfister, D.H y Liftik, M.E. (1995) Two *Arthrotrys* anamorphs from *Orbilbia auricolor*. Mycologia 87: 684–688.
- Powell, K., Foster, C., y Evans, S. (2018) Environmental dangers of veterinary antiparasitic agents. Veterinary Record 183(19): 599–600. doi:10.1136/vr.k4690
- Pramer, D. y Kuyama, S. (1963) Nemin and the nematode trapping fungi. Symposium on biochemical bases of morfogenesis in fungi. Department of Agricultural Microbiology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey. Bacteriol. Rev Vol:27.
- de Lara, R., T. Castro, J. Castro, y G. Castro. (2007) “Cultivo de nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Spirulina sp.*,” Revista de Biología Marina y Oceanografía 42(1):29–36. doi:10.4067/S0718-19572007000100004
- Raza A.M, Iqbal Z, Jabbar A, y Yaseen M. (2007) Point prevalence of gastrointestinal helminthiasis in ruminants in southern Punjab, Pakistan. J Helminthol 2007 Sep;81(3):323-328. doi: 10.1017/S0022149X07818554
- Regaieg, H., Ciancio, A., Raouani, N.H., Grasso, G., y Rosso, L. (2010) Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26:2285–2289. doi:10.1007/s11274-010-0397-4.
- Regassa, F., Teshale, S., Reta, D. y Yosef, K. (2006) Epidemiology of Gastrointestinal Parasites of Ruminants in Western Oromia, Ethiopia. Intern J Appl Res Vet Med 4: 51-57.
- Ribeiro, B.F., y de Araújo, J.V. 2014 Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. Applied Microbiological Biotechnology. 98:71-82. doi: 10.1017/S1751731111001339
- Rodríguez-Vivas, R.I., Grisi, L., Pérez-de León, A.A., Silva-Villela, H., Torres-Acosta, J.F.J., Fragoso-Sánchez, H., Romero-Salas, D. y Rosario-Cruz, R. (2017) Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Revisión. Rev. Mex. Técnica Pecu. 2017 (8): 67–74.

- Roeber, F., Jex, A.R. y Gasser, R.B. (2017) Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance an Australian perspective. *Parasites & Vectors* 2013, 6:153 doi:10.1186/1756-3305-6-153
- Rosén, S., Sjollem, K., Veenhuis, M., & Tunlid, A. (1997) A cytoplasmic lectin produced by the fungus *Arthrobotrys oligospora* functions as a storage protein during saprophytic and parasitic growth. *Microbiology-Uk*, 143, 2593-2604. doi:10.1099/00221287-143-8-2593
- Saeed, M., Iqbal, Z., Jabbar, A., Masood, S., Babar, W., Saddiqi, H.A., Yaseen, M., Sarwar, M. y Arshad, M. (2010) Multiple anthelmintic resistance and the possible contributory factors in Beetal goats in an irrigated area (Pakistan). *Research in Veterinary Science* 88(2): 267-72. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.08.004.
- Sanders, P.J. (2020) The anthelmintic effect of *Bacillus thuringiensis* Cry5B on *Haemonchus contortus* in sheep. MSc Degree Thesis. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University University of Virginia, Va. EUA.
- Sargison, N.D., MacLeay, M., Morrison, A.A., Bartley, D.J., Evans, M. y Chaudhry, U. (2019) Development of amplicon sequencing for the analysis of benzimidazole resistance allele frequencies in field populations of gastrointestinal nematodes *IJP: Drugs and drug resistance* Aug; 10:92-100. doi: 10.1016/j.ijpddr.2019.08.003.
- Sargison, N. D. (2011) Pharmaceutical control of endoparasitic helminths infections in sheep. *The Veterinary Clinics North America. Food Animal. Practice* 27(1):139-156. doi:10.1016/j.cvfa.2010.10.014
- Saumell, C. y Fernández, A. (2008) Hongos nematófagos para el control biológico de nematodos parásitos de rumiantes. *Revista de Medicina Veterinaria* 81: 270-273.
- Saumell, C., Fuse, L., Iglesias, L., Fernandez, S. y Fiel, C. (2008) Enfoque bioecológico del potencial de los hongos nematófagos en el control biológico de tricostrongilideos de rumiantes. *Revista de Medicina Veterinaria* 89(2): 45-54.
- Scholler, M., Hagedorn, G. y Rubner, A. (1999) A reevaluation of predatory oriboliceous fungi. II. A new generic concept. *Sydowia* 51:89–113.
- Seca, A. M. L. y Pinto, D. C. G. (2019) Biological potential and medical use of secondary metabolites. *Medicines*, 6(2), 66. doi:10.3390/medicines6020066
- Sharon N, Lis H. (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Science* 177:227-234. doi:10.1126/science.2552581
- Shinya, R., Aiuchi, D., Kushida, A., Tani, M., Kuramochi, K. y Koike M. (2008) Effects of fungal culture filtrates of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium spp.*) hybrid strains on *Heterodera glycines* eggs and juveniles. *Journal of Invertebrate Pathology* 97:291–297. doi:10.1016/j.jip.2007.11.005
- Siddiqui Z. A y Mahmood L (1999) Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes" A review. *Bioresource Technology* 69 (1999) 167-179. doi:10.1016/S0960-8524(98)00122-9
- Soca, M. y Roque, E. (2005) Epizootiología de los nematodos gastrointestinales de los bovinos jóvenes. *Pastos y Forrajes* 28(3):175-185.

- Stadler, M., Anke, H. y Sterner, O. (1993a) Linoleic acid, the nematicidal principle of nematophagous fungi. *Arch Microbiol* 160:401–405. doi:10.1007/BF00252228
- Stadler, M., Mayer, A., Anke, H. y Sterner, O. (1994) Fatty acids and other compounds with nematicidal activity from cultures of basidiomycetes. *Planta Med* 60:128–132. doi:10.1055/s-2006-959433
- Stadler, M., Anke, H. y Sterner, O. (1993a) Linoleic acid, the nematicidal principle of nematophagous fungi. *Archives of Microbiology* 160:401–405. doi:10.1007/BF00252228
- Stadler, M., Anke, H. y Sterner, O. (1993b) New biologically active compounds from the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* Fresen. *Z Naturforsch C* 48:843-850.
- Stirling, G., Wilson, E., Stirling, A., Pankhurst, C., Moody, P., Bell, M. y Halpin, N. (2005) Amendments of sugarcane trash induce suppressiveness to plant-parasitic nematodes in a sugarcane soil. *Australasian Plant Pathology* 34:203–211. doi:10.1071/AP05022
- Sun, M.H., y Liu, X.Z. (2006) Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia* 161:295-305. doi:10.1007/s11046-006-0249-9
- Telila, C., Abera, B., Lemma, D. y Eticha, E. (2014) Prevalence of gastrointestinal parasitism of cattle in East Showa Zone, Oromia Regional State, Central Ethiopia. *J. Vet. Med. Anim. Health.* 6(2): 54-62. doi:10.5897/JVMAH2013.0260
- Thienpont, D., Rochette, F. y Vanparijs, O.F.J. (1979) Diagnóstico de las helmintiasis por medio de examen coprológico. *Janssen Research Foundation*. pp. 7-183.
- Topalović, O., Elhady, A., Hallmann, J. *et al.* (2019) Bacteria isolated from the cuticle of plant-parasitic nematodes attached to and antagonized the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Sci Rep* 9,11477. doi:10.1038/s41598-019-47942-7
- Tsotetsi, A.M. y Mbatl, P.A. (2003) Parasitic helminths of veterinary importance in cattle, sheep and goats on communal farms in the north-eastern Free State, South Africa. *Journal of South African Veterinary Association*, 74 (2): 45-48.
- Torres-Acosta, J.F.J. y Hoste, H. (2008) Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Res.* (77):159-173. doi:10.1016/j.smallrumres.2008.03.009
- Vázquez-Pineda, A., Bravo-de-la-Parra, A., Mendoza-de-Gives P., Liébano-Hernandez, E., Hernández-Linares, I., Yáñez-Pérez, N., Aguilar-Marcelino, L., Ramírez-Vargas, G., Hernández-Castro, E., Gutiérrez-Segura, I. y López-Arellano, M. E. (2012) Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nematodos de importancia veterinaria. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 3(1):77-88.
- von Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M.A., Valles-de la Mora, B., Mendoza-de Gives, P., González-Cortazar M. y Zamilpa, A. (2017) Anthelmintic effect of 2Hchromen-2-one isolated from *Gliricidia sepium* against *Cooperia punctata*. *Exp Parasitol.* 178, 1-6. doi:10.1016/j.exppara.2017.04.013

- Wang, M., Yang, J. y Zhang, K. (2006) Characterization of an extracellular protease and its cDNA from the nematode-trapping fungus *Monacrosporium microscaphoides*. *Canadian Journal of Microbiology* 52:130–139.
- Wharton, D. (1980) Nematode egg-shells. *Parasitology*. 81(2),447-463. doi:10.1017/S003118200005616X
- White, T. J., Bruns, T.D., Lee, S. B., y Taylor, J.W. (1990) “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics,” in *Protocols: A Guide to Methods and Application*, In book: *PCR - Protocols and Applications - Laboratory Manual*, Publisher: Academic Press, pp.315-322.
- World Health Organization. Programme on traditional medicine (2002) Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67719>
- Wolstenholme, A.J y Rogers, A.T. (2005) Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/ milbemyacin anthelmintics. *Parasitology* 2005;131 (Suppl), S85–S95. doi:10.1017/S0031182005008218.
- Xingzhong Z. Liu y Senyu Y. Chen (2003) Nutritional requirements of *Pochonia chlamydospora* and ARF18, fungal parasites of nematode eggs. *Journal of Invertebrate Pathology*.83, 1:10-15. doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00037-5.
- Xu, L. L., Lai, Y. L., Wang, L. y Liu, X. Z. (2011) Effects of abscisic acid and nitric oxide on trap formation and trapping of nematodes by the fungus *Drechlerella stenobrocha* AS6.1. *Fungal Biology* 2(114), 97–101. doi:10.1016/j.funbio.2010.10.006
- Yang, Y., Yang, E., An, Z. y Liu, Y. (2007) Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:8379-8384. doi:10.1073/pnas.0702770104
- Yates, D.M. et al. (2003) The avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Parasitol* 33, 1183–1193. doi:10.1016/s0020-7519(03)00172-3
- Yu, Z-F, Mo, M-H., Zhang, Y. y Zhang, K-Q. (2014) Taxonomy of nematode trapping fungi from Orbiliaceae, Ascomycota. In: Zhang K-Q, Hyde. KD (eds) *Nematode-trapping fungi*. Springer, Dordrecht, pp 41–209.
- Zhang, H.-X., Tan, J.-L., Wei, L.-X., Wang, Y.-L., Zhang, C.-P., Wu, D.-K., Zhu, C.-Y., Zhang, Y., Zhang, K.-Q. y Niu X.-M. (2012) Morphology regulatory metabolites from *Arthrobotrys oligospora*. *J. Nat. Prod.* 75:1419–1429. doi:10.1021/np300342w



Morphological and molecular characterization, predatory behaviour and effect of organic extracts of four nematophagous fungi from Mexico



Ana Yuridia Ocampo-Gutiérrez^{a, c}, Víctor Manuel Hernández-Velázquez^{c, **},
Liliana Aguilar-Marcelino^a, Alexandre Cardoso-Taketa^c, Alejandro Zamilpa^b,
María Eugenia López-Arellano^a, Manasés González-Cortázar^b,
Jesús Hernández-Romano^d, Manuela Reyes-Estebanez^e, Pedro Mendoza-de Gives^{a, *}

^a Laboratorio de Helmintología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP, Morelos, México, Boulevard Paseo Cuauhnahuac No. 8534, Col. Progreso, Jiutepec, Mor., México CP 62570, Mexico

^b Centro de Investigación Biomédica del Sur, CIBIS-IMSS Argentina 1, Col Centro Xochitepec, Mor México CP 62790, Mexico

^c Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No.1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor., México CP 62209, Mexico

^d Departamento de Investigación, Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Boulevard Paseo Cuauhnahuac No. 556, Col. Lomas del Texcal, Jiutepec, Mor, México CP 62550, Mexico

^e Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universidad Autónoma de Campeche, Av. Agustín Melgar s/n entre Juan de la Barrera y Calle 20, Colonia Buena vista, Campeche, Camp., México CP 24039, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2020

Received in revised form

6 October 2020

Accepted 8 October 2020

Available online xxx

Corresponding Editor: Duur Aanen

Keywords:

Nematode-fungi interaction

Nematophagous fungi

Nematodes

Predation

Organic extracts

Genotyping

Nematocidal activity

Traditional taxonomy

Natural enemies

ABSTRACT

Four nematophagous fungi (NF) were identified by traditional and molecular techniques, and their in vitro predatory activity (PA) against *Haemonchus contortus* (Hc), and *Panagrellus redivivus* (Pr) was assessed. Additionally, the nematocidal activity (NA) of fungal organic extracts (OEs) obtained from a methanol/dichloromethane system was assessed. Fungi were grown in PDB medium under shaking (SchC) and static conditions (StatC). The PA of *Arthrobotrys conoides* (Ac), *A. oligospora* (Ao), *A. arthrobotryoides* (Aa) and *Purpureocillium lilacinum* (Pl) against Hc were 75, 71, 66 and 52%, respectively. Meanwhile, the PA against Pr for same fungal genera/species were 99.8, 99.9, 99.4 and 96.3%, respectively. The highest NA of the OEs were 89.5, 81.6 and 72.1% for Aa, Ac and Ao, respectively, under StatC. Moreover, Pl cultured under SchC caused 78% Hc larval mortality. The four assessed NF and their OEs are promising candidates as potential biocide agents against parasitic nematodes.

© 2020 Elsevier Ltd and British Mycological Society. All rights reserved.

1. Introduction

Nematodes are the most abundant animals on earth reaching 4.5×10^{20} individuals (van den Hoogen et al., 2019). Soil nematodes

are small, usually measuring about 100–1000 μm in length; although some species can reach several mm or even more (Barron, 1977).

Soil nematodes have adapted to different environments including animals, plants and human beings and act as parasites causing important damage to agriculture (Bernard et al., 2017) and livestock industries (Tsetetsi and Mbatia, 2003) and public health (Faro de Novaeds et al., 2017). *Haemonchus contortus* is a blood-sucking parasitic nematode living in the soil and the stomachs of

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: vmanuelh@uaem.mx (V.M. Hernández-Velázquez), mendoza.pedro@inifap.gob.mx (P. Mendoza-de Gives).

small ruminants, occasioning severe gastritis characterised by anaemia, emaciation, loss of weight and even the death of young animals (Yadav et al., 1993; Qamar et al., 2011). The common way to control these nematodes is by the regular administration of chemical anthelmintic drugs that help to reduce the parasitosis in the animals; however, this strategy has some disadvantages in their use, i.e. the development of resistance in the parasites against most of the commercially available drugs (Niciura et al., 2019), the potential risk of public health due to drug residues in animal products for human consumption (Beyene, 2016) and the contamination of soil due to the elimination of drug residues in faeces of treated animals to the environment (Aswar-Netra et al., 2016). These disadvantages in the use of chemical drugs to deworm animals have motivated workers to search for sustainable strategies of control, i.e. the use of natural nematode enemies.

Nematodes have several natural enemies in the soil, including bacteria (Tian et al., 2007), mites (Aguilar-Marcelino et al., 2012), nematodes (Aguilar-Marcelino et al., 2020) and a group of microfungi called nematophagous fungi (Yang et al., 2020).

Nematophagous fungi (NF) are microorganisms that can act as predators or parasites of microscopic nematodes in the soil. They are considered to be potential agents to control nematode infestations. This role is crucial for agriculture and the livestock industry (Braga and Araújo, 2014). The NF are considered to be the main nematode antagonists in nature; they also participate in food chains, nitrogen cycling and organic matter decomposition (Zhang et al., 2014). Furthermore, NF are saprotrophic microorganisms that, in the presence of nematodes, trigger a morphogenesis process in which NF transform their mycelia into trapping devices to capture, destroy and feed on nematodes. The morphogenesis process is influenced by biotic and abiotic factors including the presence of nematodes, oxygen concentration, pH, light and temperature (Grønbold et al., 1999). The morphogenesis changes NF from saprophytes to predatory fungi (Nordbring-Hertz et al., 2011).

Different biological strategies have been identified in NF concerning how they capture and destroy nematodes. In the initial step of the capture and nematode tissue degradation, predatory fungi produce nematode attractant substances that mimic sexual and food signals (Hsueh et al., 2013). Once nematodes are attracted to the fungal trapping devices, fungi develop other biological tools characterised by the production of surface polymers produced by cells of the trapping devices. These mucilaginous substances are proteins identified as adhesins; they are designed to attach and immobilise nematodes (Lipke, 2018). After nematodes are trapped, a chemical process initiates where different enzymes participate in nematode tissue degradation. The fungal enzymes involved in nematode tissue degradation include serine proteases, collagenases, phosphatases and chitinases, among others (Nordbring-Hertz and Hans, 2006; Cruz et al., 2015). The fungal chemical process of nematode tissue degradation is followed by a mechanical fungal strategy where an appressorium is produced at the point of contact between the fungus and its prey nematode. This structure becomes an infective bulb that breaks and penetrates the nematode cuticle to develop invasive and assimilative hyphae that the fungus uses to obtain nutrients from the nematode's tissues (López-Llorca et al., 2008). Other extracellular molecules are also synthesised by NF. These compounds have several biological activities, including antioxidant, nematocidal, anti-microbial and anticancer activities (Degenkolb and Vilcinskis, 2016).

The synthesis of metabolites produced by filamentous fungi is triggered by in vivo and in vitro interactions with other organisms, for example, the contact with nematodes (Wang et al., 2018) as well as other organisms, i.e. algae, bacteria, plants. In such interactions, specific genes are associated with the expression of new fungal metabolites (Pereira de Oliveira et al., 2019). These interactions

mainly occur in their micro-environment (López-Llorca et al., 2008; Zhang et al., 2014).

There is enormous unknown metabolic potential in the fungal community worldwide. The objectives of the present study were to: (1) morphologically and phylogenetically identify NF from different sources and localities of Mexico, (2) assess in vitro predatory activity of isolated NF and (3) evaluate the nematocidal activity of fungal organic extracts against *Haemonchus contortus* (L3).

2. Materials and methods

2.1. Biological material

2.1.1. Nematodes

2.1.1.1. *H. contortus* infective larvae. A 4-month-old Pelibuey sheep was artificially infected with 350 *H. contortus* infective larvae per kg body weight (BW). After 21 days of the pre-patent period, faecal samples were collected directly from the rectum of this animal. The faecal material containing eggs of the parasite was used to elaborate faecal cultures in plastic bowls. Faeces were ground with a mortar, and tap water was added and mixed with foam rubber (polyurethane) to get a final homogeneous paste. These coprocultures remained at room temperature (25–28 °C) for 3–5 d (Liéban, 2004). Infective larvae were recovered using the Baermann funnel technique, where they remained for 24 h (Valcárcel-Sancho et al., 2009). Finally, the recovered larvae were washed by density gradients, using a 40% (w/v) saccharose solution by differential centrifugation at 3500 rpm for 5 min. Larvae were eventually re-suspended in sterile water and kept at 4 °C until use (González-Cruz et al., 2018). It is important to clarify that animal welfare and preventing unnecessary animal suffering are good management practice policies that are well-established in our institution. Thus, to ensure animal welfare when this experiment was performed, the Norma Oficial Mexicana (Official rule number NOM-052-ZOO-1995; <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lfsa.htm>) was strictly abided by, and all the procedures in this study were performed following the ethical standards at INIFAP.

2.1.1.2. *The free-living nematode Panagrellus redivivus*. A *P. redivivus* strain belonging to the CENID-SAI, INIFAP, was used. Nematodes were cultivated using an oat medium mixed with tap water in plastic bowls. This medium was inoculated with 5 mL of an aqueous suspension containing an undetermined number of nematodes. Cultures were incubated at room temperature (25–28 °C) for 7 d (de Lara et al., 2007). Subsequently, an adequate number of nematodes were obtained and recovered by the Baermann funnel technique, where they remained for 24 h (Thienpont et al., 1986). The nematodes were washed following the same procedure described for *H. contortus*.

2.1.2. Fungal isolates

Four NF belonging to the collection of the National Centre of Disciplinary Research in Animal Health from INIFAP, Mexico, were used (Table 1).

2.2. Taxonomic identification of selected fungal strains from traditional taxonomy keys

Fungi were identified by morphological and morphometric characteristics based on specialised taxonomic keys (Drechsler, 1937; Haard, 1968; Kepenekci et al., 2015). The lengths and widths of 25 conidia and conidiophores were measured using a light microscope (40× and 100× objective lenses). The presence or absence of chlamydospores and the type of trapping devices comprised other fungal features of taxonomic identification.

Table 1
Fungal isolates, institutional collection internal key number (strain), source and isolation locality.

Fungus	Strain	Source	Locality
<i>A. arthrobotryoides</i>	RM52	Decaying leaves	Las Margaritas farm, Hueytamalco, Puebla, Mexico
<i>A. conoides</i>	CL25	Goat faeces	Temascaltepec, State of Mexico, Mexico.
<i>A. oligospora</i>	Ovi29	Ovine faeces	Temascaltepec, State of Mexico, Mexico
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Camp1	Decaying leaves	Campeche, State of Campeche, Mexico

2.3. Molecular identification

The four selected fungi, *Arthrobotrys oligospora* (Ovi29), *Arthrobotrys arthrobotryoides* (RM5.2), *Arthrobotrys conoides* (CL25) and *Purpureocillium lilacinum* (Camp1), were genotyped with polymerase chain reaction (PCR) and Sanger sequencing method, based on the region amplified by primers *ITS5* (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') and *ITS4* (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White et al., 1990). According to White et al. (1990), *ITS4* and *ITS5* oligonucleotides amplify the *ITS* regions that are situated between the small rDNA, 5.8S region and large rDNA genes. The PCR products were sequenced using the *ITS4* primer, followed by bioinformatics analysis (Castañeda-Ramírez et al., 2016).

The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min; amplification stage, which included 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 42 °C for 90 s and extension at 72 °C for 90 s; and a final extension stage at 72 °C for 5 min. The QIAquick gel extraction protocol was used to purify the PCR product. PCR products were sequenced at the Institute of Biotechnology of the National Autonomous University (IBT-UNAM), Mexico, using an Applied Biosystem Sequencer (7700).

To analyse the similarity of sequences, the NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) was used. The identity percentages and alignment were obtained for comparison and confirmation of the identity of the fungal strains based on traditional taxonomy.

2.3.1. Multiple alignment and phenogram

A multiple alignment was performed using the obtained sequences; an identity percentage greater than 90% from the BLAST results (NCBI) was used to determine the similarity percentages among the *ITS1* partial sequence; 5.8S and *ITS2* regions. Twenty-seven fungal strains were analysed using the database; the alignment was analysed using the CLC sequencer viewer software. The costs of gaps and extensions were set as 10 and 1, respectively. A cladistics phenogram with an unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) algorithm was used under measurements of Jukes-Cantor nucleotide distances; the bootstrap analysis was performed with 100 replicates (Castañeda-Ramírez et al., 2016).

2.4. Assessing the in vitro predatory activity of selected NF

The fungal predatory activity was evaluated as follows. Fungi were individually cultured in water agar plates for 7 d. The in vitro predatory activity of the four fungi was evaluated in two individual experiments (n = 3 each). The first experiment was performed to assess the predatory activity against *H. contortus* infective larvae (L3), while the other experiment was designed to evaluate the predatory activity against *P. redivivus*. In experiment 1, there were five groups of water agar plates, corresponding to the following treatments. Treatment 1 (control, without NF) had 1 mL of an aqueous suspension containing 750 *H. contortus* (L3) approximately deposited on the surface of each water agar plate. Treatments 2, 3, 4 and 5 contained the following fungal strains: *A. conoides* CL25, *A. oligospora* Ovi29, *A. arthrobotryoides* RM5.2 and *P. lilacinum* Camp1, respectively. Experiment 2 was performed in the same way,

except with *P. redivivus* was assessed instead of *H. contortus*. All cultures were incubated at room temperature (25–28 °C) for 11 d. After incubation, the uncaptured nematodes were recovered through the funnel Baermann technique for comparison with their controls. After incubation, the content of each experimental plate was individually subjected to the Baermann funnel technique for 24 h. Recovered larvae were counted by taking 10 5-μL aliquot drops; the means of the recovered larvae in each group were compared with their respective controls (Ojeda-Robertos et al., 2019). The mortality rate was estimated using Abbott's formula:

$$A = \frac{X}{X + Y} \times 100,$$

where *A* = predatory activity (percentage), *X* = mean of recovered larvae in plates with fungi and *Y* = mean of recovered larvae in plates without fungi. Note that this experiment was repeated in triplicate.

2.5. Assessing the nematocidal activity of fungal organic extracts

The nematocidal activity of organic extracts was performed as follows. First, the NF were cultured in potato-dextrose broth medium (PDB) for 15 d at 25–28 °C. The NF mycelia were processed for organic extraction through a methanol/dichloromethane system (70:30). Organic extracts were obtained at 25–28 °C using two culture conditions: static and shaking flasks (150 rpm). The nematocidal activity of the organic extracts was assessed through in vitro bio-guided assays. The confrontation between nematodes and extract was performed in 96-well micro-titre plates. Two similar experiments were performed; the only difference was that one used fungi cultured in flasks under static conditions and the other under agitated conditions (150 rpm). One hundred microlitres of the mycelial organic extracts at 100 mg/mL concentration were deposited in one well of the plate, then 15 μL of an aqueous suspension containing approximately 200 *H. contortus* (L3) were deposited in each well (n = 3). The controls were water, 5% dimethyl sulphoxide (DMSO), 5 mg/mL ivermectin and broth potato medium (BP). Plates were incubated at room temperature (25–28 °C). The results were obtained at two times: 72 and 96 h post-confrontation. The data were recorded based on the quantification of live or dead larvae under a light microscope. Quantification of larvae was performed by taking ten 5-μL aliquot-drops, depositing them on a slide followed by observation under the microscope (using 4× and 10× objectives). The criterion of discrimination between live and dead larvae was based on the motion of larvae. Motionless larvae were stimulated by a touch to their cuticle using a metal needle. If after this stimulus larvae remained motionless, they were considered dead (Olmedo-Juárez et al., 2017). The mean of dead larvae in fungal organic extracts was compared with the means in the control wells. The mortality rate was estimated using Abbott's formula:

$$\%Mortality = \frac{X_{Control} - X_{Treatment}}{X_{Control}} \times 100,$$

where $X_{Control}$ = mean of live larvae (L3) in the Control group and $X_{Treated}$ = mean of live larvae (L3) in the Treated group. Note that this experiment was repeated in triplicate.

2.6. Statistical analysis

The data were arcsine transformed to obtain a normalised distribution and to stabilise the variance. The predatory activity assay and fungal extract activity assay data were analysed by a completely randomised model, using analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. A p less than 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Traditional taxonomic identification

Table 2 shows the means and ranges of conidia length and width and a general morphological description, including conidia size and shape, conidia septa, the type of conidiophores, as well as the presence of one to several loops attached to each other in a three-dimensional way as a result of several anastomoses, which correspond to trapping devices called 3-D adhesive nets, fialids in addition to the presence or absence of chlamydo spores as well as the genus and species and their identification codes. The main morphological features, i.e. kind of conidia, conidiophores, trapping devices, fialids, chlamydo spores and *H. contortus* trapped nematodes are shown in Figs. 1–4.

3.2. Molecular taxonomic identification

Multiple alignment of the four isolates showed unique features for each sequence. The high quality of the electropherogram and the sequences obtained from these fungi allowed us to establish that the molecular data matched with the traditional taxonomic method. The nucleotide sequences of the four fungal strains were recorded in NCBI with the following accession numbers: **MT052368** for *A. arthrobotryoides*, RM5.2, **MT052369** for *A. conoides* CL25, **MT052370** for *A. oligospora*, Ovi29 and **MT052371** for *P. lilacinum* Camp1.

3.3. Phenogram

Fig. 5 presents a phenogram generated from the phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the *ITS1* partial sequence as

well as the *5.8S* and *ITS2* regions. This phenogram shows that the differences among the sequences were informative enough to clearly separate each sequence into a distinct clade. Four main groups are distinguishable, each one containing one of the fungal isolates reported in this work. The similarity percentages of our strains in relation to the sequences reported by the NCBI were 99–100% (Table 3).

3.4. In vitro predatory activity of fungi against *H. contortus* and *P. redivivus*

Tables 4 and 5 present the mean values of recovered nematodes from both genera from water agar plates, either in the treated or control group, as well as the reduction percentages. The predatory activity of the different fungi *A. conoides* (CL25), *A. oligospora* (Ovi29), *A. arthrobotryoides* (RM5.2) and *P. lilacinum* (Camp1) against *H. contortus* (L3) were 75, 71, 66 and 52%, respectively. The activities against *P. redivivus* were: 99.8, 99.9, 99.4 and 96.3%, respectively.

3.5. Nematocidal activity of fungal organic extracts

Table 6 shows the mean mortality rates and total larvae recovered 72 and 96 h post-confrontation with the organic extract from mycelia of the four NF obtained under either static or shaking conditions. At 96 h post-confrontation, the highest nematocidal activity of the organic extracts were 89.5, 81.6 and 72.1% for *A. arthrobotryoides* (RM5.2), *A. conoides* (CL25) and *A. oligospora* (Ovi29), respectively, under static conditions. Under shaking conditions, the highest nematocidal activity recorded after 96 h for *P. lilacinum* (Camp1), *A. arthrobotryoides* (RM5.2) and *A. conoides* (CL25) were 66.1, 40.2 and 32.1%, respectively. Moreover, *P. lilacinum* (Camp1) under shaking conditions showed 78% mortality after 72 h.

4. Discussion

4.1. Traditional taxonomy

Regarding the morphological analysis of *A. arthrobotryoides* (RM 5.2), the characteristics were similar to those reported by Haard (1968) concerning the conidia and conidiophore shapes. However, there were some interesting differences regarding the size of conidia. Data on conidia length and width and other taxonomic characteristics for different genera/species of NF are shown in

Table 2
Taxonomic morphological characteristics of four nematophagous fungi.

Genus/species	Conidia size		General Observations
	Mean (µm)	Range (µm)	
<i>A. arthrobotryoides</i> (RM5.2)	Length: 23.2 Width: 12.1	19.8–27.8 10.6–14.4	Obovoid conidia, >15 conidia per conidiophore Geniculated conidiophores 3-D adhesive nets No chlamydo spores
<i>A. conoides</i> (CL25)	Length: 20.8 Width: 11.2	17.6–24.1 9.14–12.5	Ovoid conidia, Presence of chlamydo spores 3-D adhesive nets
<i>A. oligospora</i> (Ov29)	Length: 21.4 Width: 11.8	17.5–25.6 11.4–12.5	Septate conidia (1 septum), Ovoid and elongated conidia 3-D adhesive nets
<i>P. lilacinum</i> (Camp1)	Length: 3.4 Width: 2.4 Fialids Length: 9	3.23–3.48 1.94–2.8 7–12.7	Purple macroscopical colour Ovoid microconidia, Thick and swollen fialids No chlamydo spores

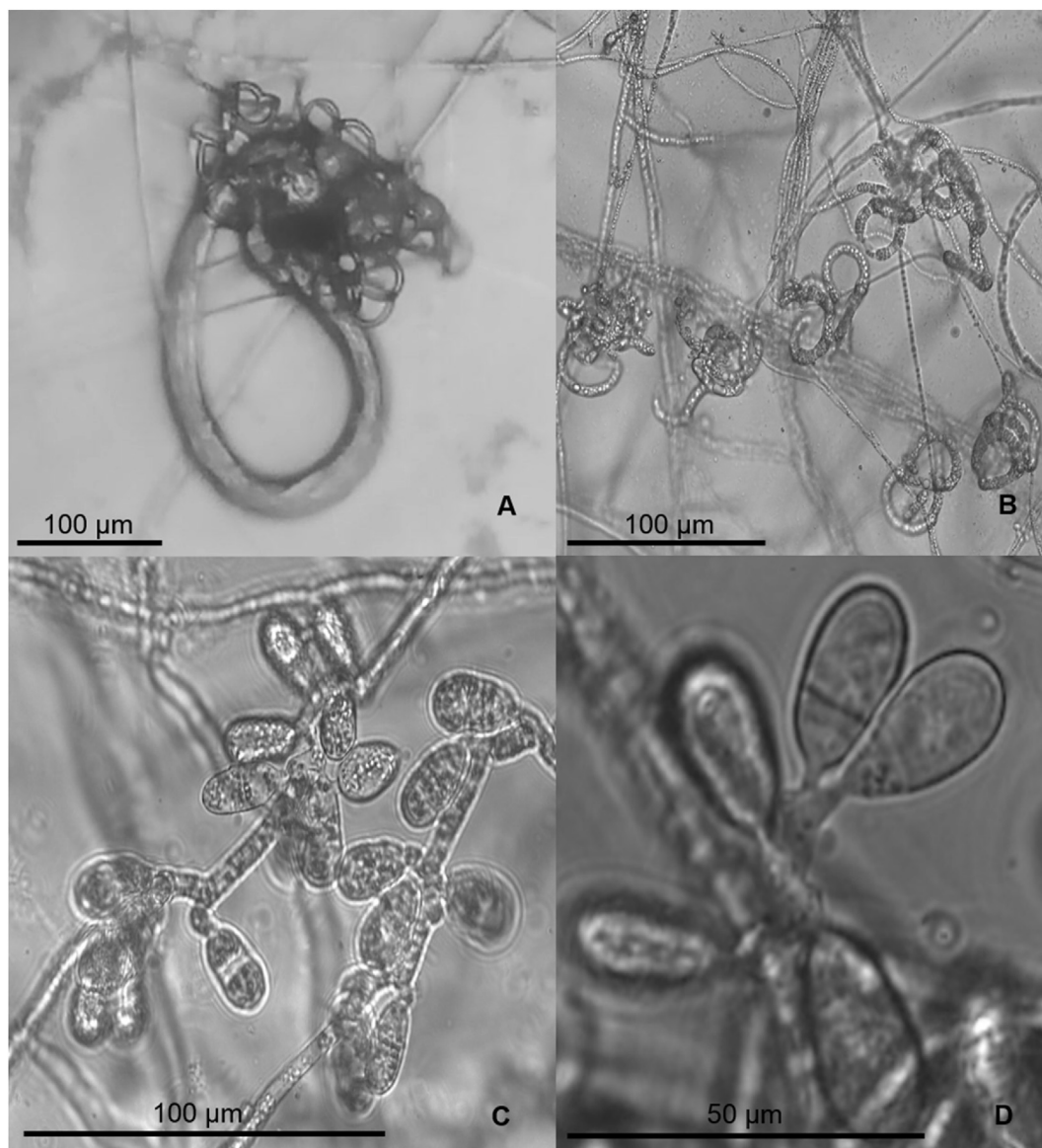


Fig. 1. Micromorphology of the *Arthrobotrys arthrobotryoides* isolate (RM 5.2). (A) *Haemonchus contortus* infective larvae captured by the fungus; (B) 3-D adhesive nets and trapped nematodes; (C) Geniculated conidiophores; (D) Conidia.

Table 7. For example, Haard (1968) mentioned the presence of branched conidiophores that contain conidia clusters with a capitated base, a swollen distal cell and a shorter proximal cell with a constriction in the centre. These authors also reported the absence of chlamydo spores. We observed these characteristics in our RM 5.2 strain; hence, this information led us to confirm that our strain was *A. arthrobotryoides*. Concerning our CL25 isolate, the microscopic characteristics of conidia showed similarities with those described by Drechsler (1939) for *A. conoides*. The conidia appeared obovoid and elongated with a middle septum and lightly constricted in the centre. Notably, the conidia of our strain showed a mean length of 20.8 µm and a width of 11 µm. Comparatively, the conidia measurements reported by Haard (1968) were 32 µm (length) and 13 µm (width). Likewise, Yu et al. (2014) reported distinct conidia dimensions in their strains: 28.4 µm (length) and 11 µm (width). On the other hand, in the case of our Ovi29 strain, the mean conidia dimensions reported by Drechsler (1939) were 27 µm (length) by 11.5 (width); our Ovi29 strain had smaller conidia. These differences are probably due to adaptive processes of the

strains to the natural habitat where they were originally isolated. Fungi also show a growth process that is dependent on the culture medium (Drechsler, 1937).

4.2. Molecular taxonomy

Our sequence analysis based on the *ITS1*, *5.8S* and *ITS2* regions corroborated our morphological identification, with excellent similarities (greater than 99%) for *A. oligospora* (Ovi29), *A. conoides* (CL25), *A. arthrobotryoides* (RM5.2) and *P. lilacinum* (Camp1). Nevertheless, we used complementary phylogenetic analysis based on the UPGMA algorithm as well as the measurements of the distances between the Jukes-Cantor nucleotides of *ITS1* partial sequence as well as the *5.8S* and *ITS2* regions of 23 strains reported at the NCBI to compare with the isolated strains obtained in the present study. The analysis of the phylogenetic tree allowed us to associate three of our nematophagous fungi into three different clades, but each was closely related with a unique type of trapping device mechanism, the 3-D adhesive networks. The identified

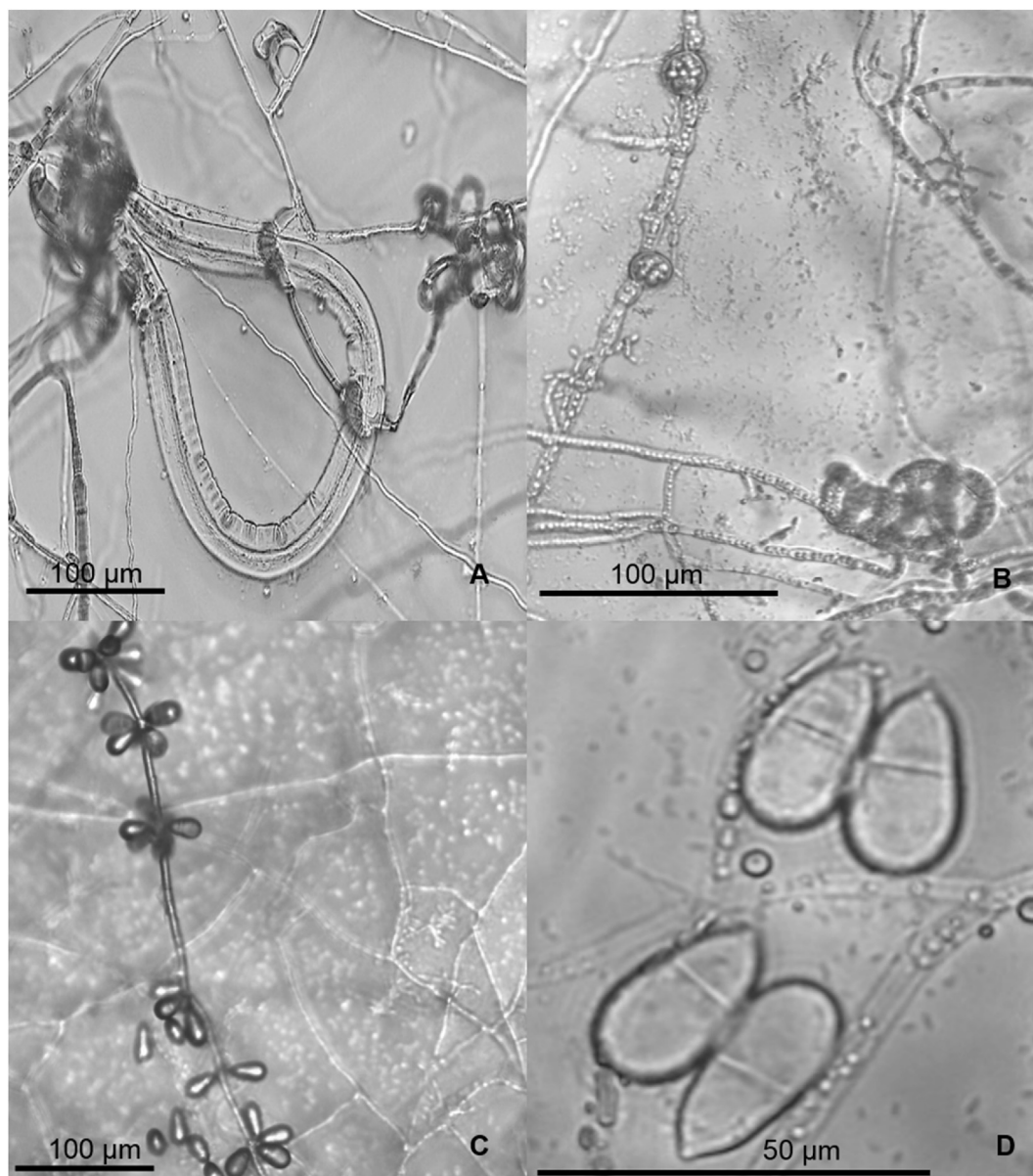


Fig. 2. Micromorphology of the *Arthrobotrys conoides* isolate (CL25). (A) *Haemonchus contortus* infective larvae captured by the fungus; (B) Chlamydospores, hyphae and 3-D adhesive nets; (C) Conidiophore with various conidia clusters along the conidiophore stem; (D) Conidia.

species *A. oligospora*, *A. arthrobotryoides* and *A. conoides* are classified into the group of Orbiliales, and on the other hand, the analysis of the phylogenetic tree allowed differentiating another fungus from a completely different clade, *P. lilacinum*, which is characterised by producing invasive mycelia and has been classified into the group of Hypocreales. The phylogenetic analysis of the *ITS1* partial sequence, as well as the *5.8S* and *ITS2* from the homologous sequences, provide an important conceptual focus for further and more detailed analysis of the molecular biology and evolution of these nematophagous fungi.

This analysis allowed us to identify the phylogenetic relationship with other organisms grouped in the clade that are highly conserved, i.e. *P. lilacinum* (Camp1), that showed 100% similarity with other species grouped in the same clade.

4.3. Predatory activity of NF against *H. contortus* and *P. redivivus*

There was noteworthy predatory activity of the assessed fungi against *H. contortus* (L3); it ranged from 52 to 76%. This predatory activity is very similar to that reported with *Duddingtonia flagrans*, that ranged in its predatory activity against *H. contortus* infective larvae from 40 to 70% (Mendoza de Gives et al., 1999). The predatory activity showed by the three Orbiliales can be considered important; however, the reduction of the larval population in faeces of infected sheep after been orally treated with a suspension of spores of these fungi would be the overwhelming proof that these fungi can be considered biological control tools.

The in vitro predatory activity of NF, in general, has been reported to be variable and dependent upon the strains and their prey nematodes (Table 8). Hence, it is important to consider that the NF

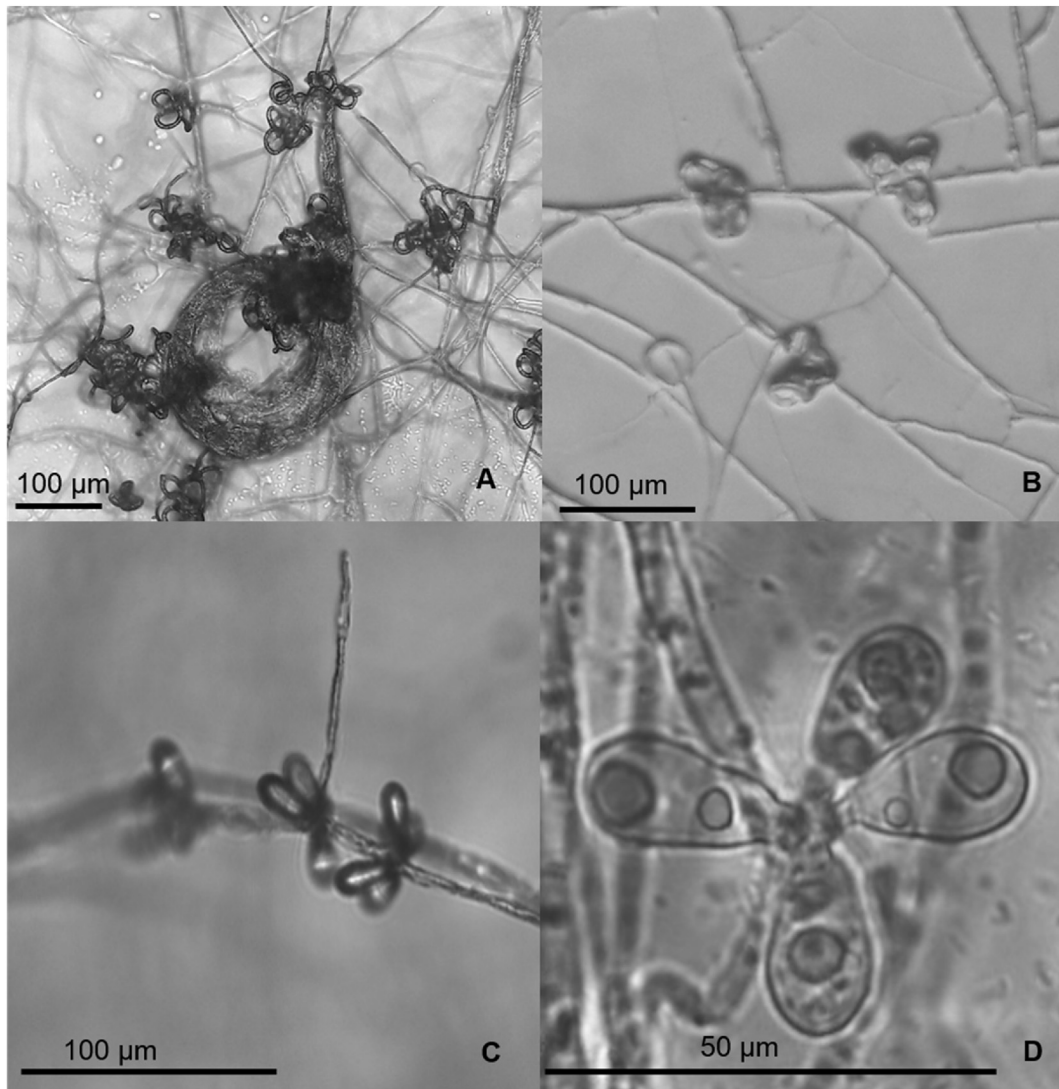


Fig. 3. Micromorphology of *Arthrobotrys oligospora* (isolate Ovi29). (A) 3-D adhesive nets and a trapped coiled nematode *Haemonchus contortus*; (B) 3-D adhesive nets; (C) conidia clusters along a conidiophore; (D) Conidia cluster.

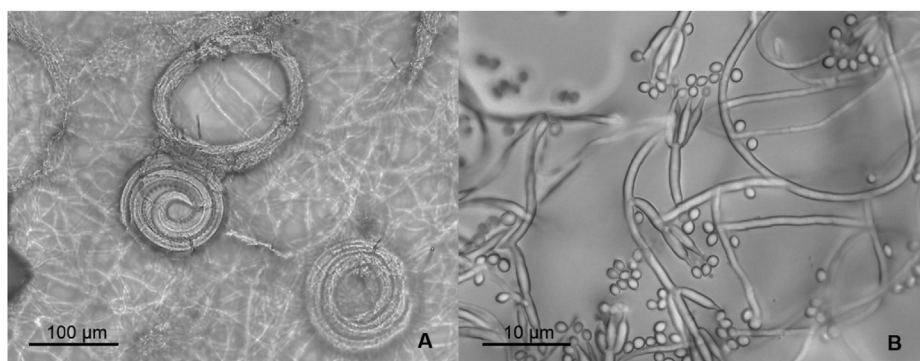


Fig. 4. *Purpureocillium lilacinum* (Camp1). (A) *Haemonchus contortus* infective larvae Invaded by the nematophagous fungus; (B) Conidiophores, conidia and fialids.

live under a continuous adaptive process in their environment, and their predatory behaviour is associated with different biotic factors such as weather, the substratum and other abiotic factors like coprofauna, fungistasis and pastures (Saumell et al., 2008). On the

other hand, it is interesting that high concentrations of elements like nitrogen ($N = 0.05 \text{ M}$) and carbon ($C = 0.12 \text{ M}$) in the media promoted a higher saprotrophic activity in *A. oligospora* against the nematode *Turbatrix aceti* (Scholler and Rubner, 1994). These

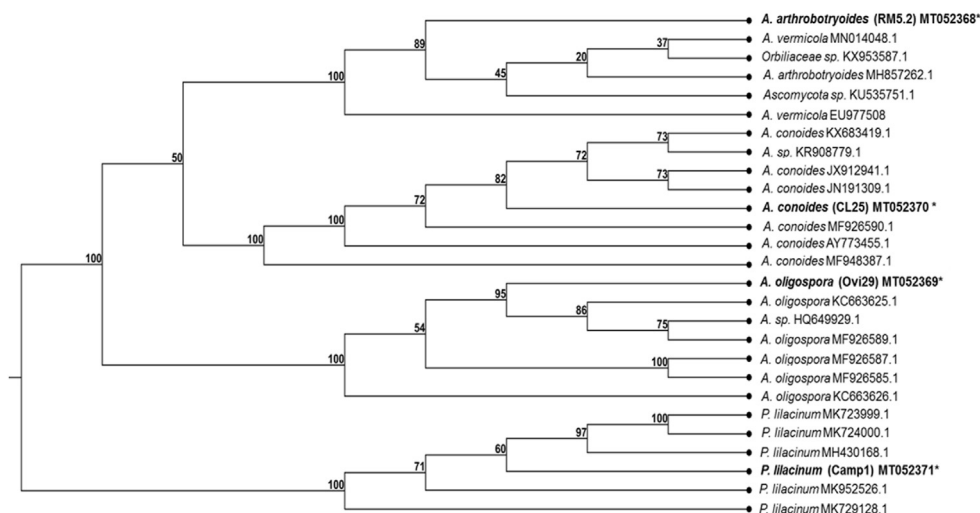


Fig. 5. Phenogram generated by using the *ITS1* partial sequence, 5.8S and *ITS2* from the homologous sequences and the 4 nematophagous fungi isolates under study. (*) = NCBI access code number of our 4 fungi isolates.

Table 3
Similarity percentages of four nematophagous fungi strains after comparing with sequences reported by the NCBI based on their *ITS1* partial sequence, 5.8S and *ITS2* regions.

Strains	Similarity %	Coverage	Strain of comparison from Gen Bank Accession number
<i>Arthrobotrys arthrobotryoides</i> (RM5.2)	99.05	100	MH857262.1
	99.05	100	MN014048.1
	99.04	98	EU977508.1
<i>A. conoides</i> (CL25)	100	98	KX683419.1
	100	98	JX912494.1
	99.8	95	JN191309.1
	99.8	100	KC663625.1
<i>A. oligospora</i> (Ovi29)	99.68	100	MF926589.1
	99.68	99	KC663626.1
	99.81	100	MK952526.1
	99.81	99	MK729128.1
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Camp1)	99.81	99	MH430168.1
	99.81	99	MK729128.1
	99.81	99	MH430168.1

Table 4
Means of *Haemonchus contortus* infective larvae (L3) recovered from water agar plates after 11 d in vitro interaction with four nematophagous fungi strains and reduction percentages.

Strain	<i>Haemonchus contortus</i> (L ₃)		
	Mean larvae recovered from control group	Mean larvae recovered from treated group	Larvae reduction (%)
<i>Arthrobotrys conoides</i> (CL25)	123.6 ± 7.2	31 ± 25.6	75 ^a
<i>A. oligospora</i> (Ovi29)	180.3 ± 95.2	57.6 ± 48.2	71 ^a
<i>A. arthrobotryoides</i> (RM5.2)	180.3 ± 95.2	77 ± 90.7	66.1 ^a
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Camp1)	100 ± 44.6	47 ± 19	52 ^a

Note: ± = Standard Deviation; n = 3.
Different letters in each column indicate statistic differences in the larvae reduction among the different fungal isolates (p ≤ 0.05).

Table 5
Mean number of *Panagrellus redivivus* recovered after 11 d in vitro interaction with nematophagous fungi strains and reduction percentages.

Strain	<i>Panagrellus redivivus</i>		
	Mean nematodes recovered from control group	Mean nematodes recovered from treated group	Larvae reducción (%)
<i>A. conoides</i> (CL25)	953.6 ± 46	1.3 ± 2.3	99.8 ^a
<i>A. oligospora</i> (Ovi29)	848.6 ± 189.8	0.6 ± 0.6	99.9 ^a
<i>A. arthrobotryoides</i> (RM5.2)	953.6 ± 46	3.6 ± 3.2	99.4 ^a
<i>P. lilacinum</i> (Camp1)	851.6 ± 184.8	27.3 ± 35.3	96.3 ^a

Note: ± = Standard Deviation; n = 3.
Different letters in each column indicate statistic differences in the larvae reduction among the different fungal isolates (p ≤ 0.05).

Table 6

Means of death and total larvae of *Haemonchus contortus* (L3) recovered after 72 and 96 h post confrontation with an organic extract from mycelia of 4 nematophagous fungi obtained under static and shaken growth conditions and mortality percentages.

Strains	Static conditions				Shaken conditions			
	72 h		96 h		72 h		96 h	
	DL/TL	Mortality %	DL/TL	Mortality %	DL/TL	Mortality %	DL/TL	Mortality %
<i>Arthrobotrys oligospora</i> (Ovi29)	403/638	63.1 ± 5.4 b	468/649	72.1 ± 13.7 b	204/745	27.4 ± 17.4 b	232/960	24.2 ± 7.4 bc
<i>A. conoides</i> (CL25)	476/874	54.4 ± 7.4 b	538/659	81.6 ± 18 b	414/1496	27.7 ± 4 b	419/1305	32.1 ± 3 b
<i>A. arthrobotryoides</i> (RM5.2)	277/490	56.53 ± 14.3 b	205/229	89.51 ± 12 ab	75/696	11 ± 2.5 ab	282/700	40.2 ± 14.3 b
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Camp1)	48/638	7.5 ± 3 c	67/684	9.7.0 ± 2.7 c	703/902	78 ± 1.4 c	287/434	66.1 ± 7 b
DMSO 5%	11/765	1.4 d	15/730	2.0 d	11/305	3.2 d	11/627	1.8 d
Ivermectin	640/640	100 a	615/615	100 a	713/713	100 a	642/642	100 a

Note: ± = Standard Deviation, Means with same letter did not show statistic significance; DL/TL (Death Larvae/Total Larvae). Mycelia extract concentration: 100 mg/mL; DMSO = Dimethyl Sulfoxide; n = 3 p < 0.05.

Table 7

Conidia dimensions and other taxonomic characteristics of *Arthrobotrys* spp. and *Purpureocillium lilacinum* reported by different authors.

Genus/species	Conidia dimensions			Taxonomic characteristics	Author
	Parameters	Mean (µm)	Range		
<i>Arthrobotrys arthrobotryoides</i>	Length: width:	20.7 9.5	12.6–32.2 4.2–12.8	Conidia: ovoids (clusters >8), capitated, nodulated 3-Dimension adhesive nets yellow or pink mycelia	Haard (1968)
<i>A. conoides</i>	Length width	26 13	18–45 11–14	Conidia: ovoids, elongated a middle septum lightly constrained in the centre	Drechsler (1937)
<i>A. oligospora</i>	Length width	24 11.5	18–13 9–14	Conidia: Elongated to ovoids, septated Septum close to the conidium base, constrained in the septum 3-Dimension adhesive nets	Drechsler (1937)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Conidia - 3.0–4.0 Hyphae - 5.0–4.0 Branches verticillated Fialids 2–4 length: 8.4–13			Colony purple or lilac Microconidia ovoids Thick and swollen fialids	Kepeneci et al. (2015)

authors mention that a medium without nitrogen induces the trap formation, even when containing carbon. Additionally, a carbon-free medium induces a higher predatory activity in *A. oligospora*.

On the other hand, these fungi showed overwhelming predatory activity against the free-living nematode *P. redivivus*; they captured, destroyed and fed on nearly 100% of this prey species. The fact that all the assessed NF were more efficient in the predatory activity against the free-living nematode *P. redivivus* compared to the ruminant parasitic nematode *H. contortus* could be due to some differences in the structural features of these prey nematodes. For instance, the cuticular coats in both species are different. *H. contortus* (L3) possesses a thick and resistant coat, called a sheath, which protects the infective larvae from degradation once they are consumed by the animals and the gastric juices and their digestive proteolytic enzymes degrade their coat (Le Jambre et al., 1970). This sheath allows the larvae to get into the abomasum before being destroyed by the digestive processes. In contrast, *P. redivivus* possesses only a simple cuticular coat. Hence, NF can dissolve and penetrate this coat much more easily. This difference could explain why the free-living nematodes were more susceptible to predation by the fungi. Other factors that influence the predatory capability of NF to trap nematodes include the number of nematodes that make contact with fungi; this phenomenon is known as density-dependence. This factor is closely related to the amount of a cuticle protein present in the nematode coat called “nemin”, that stimulates any fungal structure to trigger the morphogenesis and as a consequence enhance the capture and

destruction of nematodes (Pramer and Stoll, 1959; Su et al., 2015).

On the other hand, other factors, i.e. temperature and pH, influence trap formation and predatory activity (Wang et al., 2019). Grønbold et al. (1985) found that the range of optimum temperature for *A. oligospora* both growing and trapping nematodes was between 20 and 23 °C, and Domsch et al. (1980) found that at 32 °C the trap formation was reduced. On the other hand, Mendoza-de Gives et al. (1994) reported a null predatory activity with *A. oligospora* against *H. contortus* infective larvae at 30 °C. In the present study, we used a room temperature of 25–28 °C that allowed us to reach 71% mortality.

4.4. Nematocidal activity of organic fungal extracts from mycelia of NF

Interestingly, the mycelia extracts from the different fungal strains responded in distinct ways when they were exposed to different culture conditions. Clearly, media and growth conditions influence the production of fungal extracellular bioactive compounds against nematodes (Scholler and Rubner, 1994). The three studied *Arthrobotrys* species responded with notable nematocidal activity after 72 and 96 h exposure under static conditions, reaching 63.1% and almost 90% as the highest mortality activity. In contrast, the *P. lilacinum* extract showed very low activity under these culture conditions (5.5–10%). We observed a completely different result when fungi were cultured under shaking conditions; the *Arthrobotrys* species mycelia extracts showed lower ranges of

Table 8

Predatory activity shown by different genera/species of nematophagous fungi against different nematode prey of importance for the agriculture and livestock industry.

Genus/especies	Blank nematode	Predatory activity %	References
<i>Monacrosporium</i> spp.	<i>Panagrellus</i> spp.	99	Gomes et al., 1999
	<i>Meloidogyne incognita</i> (J ₂)	98	
<i>Arthrobotrys</i> spp. (26 isolates)	<i>P. redivivus</i>	100	Gomes et al. (2000)
	<i>H. placei</i>		
Three <i>A. oligospora</i> isolates: Z-2.2, Z-2.8 and Z-2.10 and 1 <i>M. eudermatum</i> isolate: Z-2.7 Z 3.3	<i>H. contortus</i>	76–96	Castañeda-Ramírez et al. (2016)
<i>D. flagrans</i> and <i>M. thaumasium</i>	Sheep gastrointestinal nematodes	EPG reductions ranging between 61.1 and 71.6	Silva et al. (2009)

mortality (11–27.7% at 72 h and 24.2–40.2% at 96 h exposure). The highest larval mortalities, 66.1 and 78%, were recorded with *P. lilacinum* at 96 and 72 h, respectively.

The organic extracts from NF *A. oligospora* (Ovi29), *A. conoides* (CL25) and *A. arthrobotryoides* (RM5.2) grown under static conditions for 72 h showed a range of mortality between 54.4 and 63.1% against *H. contortus* infective larvae. In contrast, no notable activity was found with the *P. lilacinum* (Camp1) extract grown under the same conditions (Table 5). Interestingly, we obtained similar results with the in vitro predatory activity for these strains. After 96-h incubation, these strains cultured under static conditions showed an increase in lethal activity toward nematodes, with mortality ranging from 72.1 to 89.5%. These data indicate a longer exposure time leads to greater larval mortality. On the other hand, in the case of mycelial extract from fungal cultures grown under shaking conditions for 72 h, the results were very different from those obtained under static conditions, namely 78% mortality for the *P. lilacinum* extract. Meanwhile, the other fungi caused 11–27.7% larval mortality. These findings clearly show that the *Arthrobotrys* strains produce more nematocidal compounds when cultured under static conditions. A possible explanation for this finding could be that static growth conditions restrict the oxygen source for the NF. This phenomenon could be considered hydrodynamic stress, which could trigger the synthesis of nematocidal compounds. In the case of bacterial and plant cells, an intra-cell defence mechanism associated as a response to the oxidative stress is established as a result of hydrodynamic stress (Trujillo and Valdez, 2006). Another point of interest is the fact that *P. lilacinum* (Camp1) responded in the exact opposite way when grown under static and shaking conditions compared with the other assessed fungi. We do not know if this behaviour occurs only with this strain of *P. lilacinum* in particular or whether it is a common behaviour in other strains of this species. In a previous study, *P. lilacinum* culture filtrates from different culture media caused inconsistent toxicity against nematodes. However, when this fungus was cultured in malt medium, its culture filtrates caused a high nematostatic effect in the phytoparasites *Meloidogyne* and *Heterodera* after a 2-h exposure (Cayrol et al., 1989). It is interesting that in this study, the culture filtrate obtained from other *P. lilacinum* strains was reported with high nematocidal activities under static conditions. In our study, static conditions seemed to inhibit the production of anthelmintic bioactive compounds. Clearly, different nematophagous fungal strains show different behaviour in the synthesis of nematocidal compounds depending on the culture conditions.

During the recent decades, the study of NF secretions have gained the attention of researchers searching for nematocidal bioactive compounds concerning their potential use in the control of a nematode infestation, a crucial phenomenon in agriculture and livestock industries (Degenkolb and Vilcinskis, 2016) or even for the control of public health diseases, such as breast cancer (Wang et al., 2013). Nematophagous fungi have been studied searching for secondary metabolites with nematocidal activity against

parasitic nematodes affecting animals. For example, in *A. oligospora* and *A. conoides*, a group of metabolites with anthelmintic activity against *H. contortus* have been identified and they have been called oligosporon, oligosporol A and 4'5'dihydro-oligosporon (Anderson et al., 1995). Likewise, another group of anthelmintics called rose-rpins 1–5 has been obtained from *Clonostachys candelabrum* (Ayers et al., 2010). Some bioactive metabolites against nematodes of different taxa and their nematocidal efficacy are shown in Supplementary Table 1. In this table, we can find fungi belonging to different genera/species that are classified into two taxonomic orders: Orbiliales, i.e. *Arthrobotrys* spp., and Hypocreales, i.e. *Pochonia*, *Verticillium* and *Clonostachys*. Although these fungi are all nematophagous, they have developed different physiological and mechanical strategies against nematodes. However, all of them coincide in their attack to direct their lethal metabolic products against nematodes.

The NF assessed in the present study possessed high in vitro predatory activity against *H. contortus* infective larvae. Additionally, the intracellular products obtained from mycelia of these fungi by organic extraction processes presented crucial in vitro nematocidal activity. This study opens new perspectives for future works focused on elucidating compounds responsible for this biological activity. These studies should explore these products as potential tools of control against sheep haemonchosis, and perhaps against other parasitoses caused by nematodes that affect the livestock industry.

Acknowledgements

This study did not receive any special economic support. The equipment, reagents, consumables and other materials were supplied by the laboratory of Helminthology from CENID-SAI, INIFAP; CIBIS-IMSS and the laboratory of Biological Control of CEIB, UAEM. Miss Ocampo-Gutiérrez received financial support by el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-MEXICO), Scholarship number: 332178. This study formed part of the PhD thesis work of Master in Biotechnology Ana Yuridia Ocampo-Gutiérrez at the Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México under the direction of Dr Pedro Mendoza de Gives and Dr Víctor Manuel Hernández Velázquez.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.101004>.

References

- Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., Torres-Hernández, G., López-Arellano, M.E., González-Garduño, R., 2020. *Butlerius butleri* (nematoda: diplogasteridae) feeds on *Haemonchus contortus* (nematoda: trichostrongylidae) infective larvae and free-living nematodes in sheep faecal cultures under laboratory conditions: Preliminary report. *Acta Parasitol.* <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00216-z>.

- Aguilar-Marcelino, L., Quintero-Martínez, M.T., Mendoza de Gives, P., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E., Torres-Hernández, G., Cid del Prado, I., 2012. Evaluation of predation of the mite *Lasioseius penicilliger* (Aracnida: Mesostigmata) on *Haemonchus contortus* and bacteria-feeding nematodes. *J. Helminthol.* 88 (1), 20–23. <https://doi.org/10.1017/S0022149X12000624>.
- Anderson, M.G., Jarman, T.B., Rickards, R.W., 1995. Structures and absolute configurations of antibiotics of the oligosporon group from the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *J. Antibiot.* 48 (5), 391–398. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.391>.
- Aswar-Netra, B., Gunaseelan, L., Porteen, M., 2016. Veterinary drug residues in environment- potential hazards. *Indian Vet. J.* 93 (7), 14–16. <https://www.researchgate.net/publication/309061183>.
- Ayers, S., Zink, D.L., Mohn, K., Powell, J.S., Brown, C.M., Bills, G., Grund, A., Thompson, D., Singh, S.B., 2010. Anthelmintic constituents of *Clonostachys candelabrum*. *J. Antibiot.* 63 (3), 119–122. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.131>.
- Barron, G.L., 1977. *The Nematode Destroying-Fungi*. Topics in Mycobiology. Canadian Biological Publications Ltd No. 1. Guelph, Ontario, Canada.
- Bernard, G.C., Egnin, M., Bonsi, C., 2017. The impact of plant-parasitic nematodes on agriculture and methods of control. In: Manjur, S.A., Mahamood, M. (Eds.), *Nematology - Concepts, Diagnosis and Control*. IntechOpen, London, pp. 121–151. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68958>.
- Beylene, T., 2016. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. *Vet. Sci. Tech.* 7, 1. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000285>.
- Braga, R.F., Araújo, J.V., 2014. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (1), 71–82. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5366-z>.
- Castañeda-Ramírez, G.S., Mendoza-de Gives, P., Aguilar-Marcelino, L., López-Arellano, M.E., Hernández-Romano, J., 2016. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region and biological characterization of nematophagous fungi from Morelos, Mexico. *J. Mycol.* 2016 (3), 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/8502629>.
- Cayrol, J.C., Djian, C., Pijarowski, L., 1989. Study of the nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paeclomyces lilacinus*. *Rev. Nematol.* 12 (4), 331–336.
- Cruz, D.G., Costa, L.M., Rocha, L.O., Retama, C.A., Vieira, R.A., Seabra, S.H., 2015. Serine proteases activity is important for the interaction of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* with infective larvae of trichostrongylides and free-living nematodes *Panagrellus* spp. *Fungal Biol.* 119 (8), 672–678. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.03.005>.
- de Lara, R., Castro, T., Castro, J., Castro, G., 2007. Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Spirulina* sp. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 42 (1), 29–36. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572007000100004>.
- Degenkolb, T., Vilcinskis, A., 2016. Metabolites from nematophagous fungi and nematocidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (9), 3799–3812. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7233-6>.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H., 1980. *Arthrobotrys corda* 1839. In: *Compendium of Soil Fungi*, vol. 1. Academic Press, London, UK, pp. 59–64.
- Drechsler, C., 1937. Some Hyphomycetes that prey on free living terricolous nematodes. *Mycologia* 29 (4), 447–552.
- Drechsler, C., 1939. Five new Zoopagaceae destructive to rhizopods and nematodes. *Mycologia* 31 (4), 388–415.
- Faro de Novaes, S., Lindner Schreiner, L., Pereira e Silva, I., Maia Franco, R., 2017. Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. *Cienc. Rural, Santa Maria* 47 (8), e20170215. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170215>.
- Gomes, A.P.S., Araújo, J.V., Ribeiro, R.C.F., 1999. Differential in vitro pathogenicity of predatory fungi of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (1), 79–83. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1999000100012>.
- Gomes, A.P.S., Ramos, M.L., Vasconcellos, R.S., Jense, J.R., Vieira-Bressan, M.C.R., Araújo, J.V., 2000. In vitro activity of Brazilian strains of the predatory fungi *Arthrobotrys* spp. on free-living nematodes and infective larvae of *Haemonchus placei*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95 (6), 873–876. <https://doi.org/10.1590/S0074-0276200000600023>.
- González-Cruz, B.J., Rodríguez-Labastida, M., González-Cortázar, M., Zamilpa, A., López-Arellano, M.E., Aguilar-Marcelino, L., González-Garduño, R., Torres-Acosta, J.F.J., Olmedo-Juárez, A., Mendoza-de Gives, P., 2018. In vitro larvicidal and in vivo anthelmintic effects of *Oxalis tetraphylla* (Oxalidaceae) hydroalcoholic extract against *Haemonchus contortus* in lambs. *J. Helminthol.* 92 (3), 309–316. <https://doi.org/10.1017/S0022149X17000499>.
- Grønvald, J., Korsholm, H., Wolstrup, J., Nansen, P., Henriksen, S.A., 1985. Laboratory experiments to evaluate the ability of *Arthrobotrys oligospora* to destroy infective larvae of *Cooperia* species, and to investigate the effect of physical factors on the growth of the fungus. *J. Helminthol.* 59 (2), 119–125. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00025694>.
- Grønvald, J., Wolstrup, J., Nansen, P., Larsen, M., Henriksen, S.A., Bjørn, H., Kirshheiner, K., Iarssen, K., Rawat, H., Krinstiansen, H.L., 1999. Biotic and abiotic factors influencing growth rate and production of traps by the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* when induced by *Cooperia oncophora* larvae. *J. Helminthol.* 73 (2), 129–136. <https://doi.org/10.1017/S0022149X99000190>.
- Haard, K., 1968. Taxonomic studies on the genus *Arthrobotrys corda*. *Mycologia* 60 (6), 1140–1159.
- Hsueh, Y.P., Mahanti, P., Schroeder, F.C., Sternberg, P., 2013. Nematode trapping fungi eavesdrop on nematode pheromones. *Curr. Biol.* 23 (1), 83–86. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.035>.
- Kepeñeci, I., Oksal, E., Saglam, D., Atay, T., Tülek, A., Evlice, E., 2015. Identification of Turkish isolate of the entomopathogenic fungus, *Purpureocillium lilacinum* (syn: *Paeclomyces lilacinus*) and its effect on potato pests, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: gelechiidae) and *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: chrysomelidae). *Egypt. J. Biol. Pest. Co.* 25 (1), 121–127. <https://www.researchgate.net/publication/290955180>.
- Lejambre, L.F., Ractiliffe, L.H., Whitlock, J.H., Crofton, H.D., 1970. Polymorphism and egg-size in the sheep nematode, *Haemonchus contortus*. *Evolution* 24 (3), 625–631. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1970.tb01796.x>.
- Liébano, H.E., 2004. Diagnóstico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes en México. Diagnóstico coproparasitológico de los nematodos gastroentéricos. Libro Técnico N°1. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. INIFAP, México.
- Lipke, N.P., 2018. What we do not know about fungal cell adhesion molecules. *J. Fungi* 4 (2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/jof4020059>.
- López-Llorca, L.V., Maciá-Vicente, J.G., Jansson, H.B., 2008. Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In: Ciancio, A., Mukerji, K.G. (Eds.), *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. Integrated Management of Plant Pests and Diseases. Springer, Dordrecht. Alicante, Spain, pp. 51–76.
- Mendoza-de Gives, P., Davies, K.G., Clark, S.J., Behnke, J.M., 1999. Predatory behaviour of trapping fungi against *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitology* 119 (1), 95–104. <https://doi.org/10.1017/S0031182099004424>.
- Mendoza-de Gives, P., Zavaleta-Mejía, E., Herrera-Rodríguez, D., Quiróz-Romero, H., 1994. In vitro trapping capability of *Arthrobotrys* spp. on infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Nacobbus aberrans*. *J. Helminthol.* 68 (3), 223–229. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00014383>.
- Niciura, S.C.M., Cruvinel, G.G., Moraes, C.V., Chagas, A.C.S., Esteves, S.N., Benavides, M.V., Amarante, A.F.T., 2019. In vivo selection for *Haemonchus contortus* resistance to monepantel. *J. Helminthol.* 94, 1–5. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000221>.
- Nordbrink-Hertz, B., Hans-Borge, J., Tunlid, A., 2006. Nematophagous Fungi. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, first ed. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0004293>.
- Nordbrink-Hertz, B., Hans-Borge, J., Tunlid, A., 2011. Nematophagous fungi. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000374.pub3>.
- Ojeda-Robertos, N.F., Aguilar-Marcelino, L., Olmedo-Juárez, A., Luna-Palomera, C., Peralta-Torres, J.A., López-Arellano, M.E., Mendoza-de-Gives, P., 2019. In vitro predatory activity of nematophagous fungi isolated from water buffalo feces and from soil in the Mexican southeastern. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 28 (2), 314–319. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019011>.
- Olmedo-Juárez, A., Rojo-Rubio, R., Zamilpa, A., Mendoza-de Gives, P., Arece-García, J., von Son-de Fernex, E., 2017. In vitro larvicidal effect of a hydroalcoholic extract from *Acacia cochliacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes. *Vet. Res. Commun.* 41 (3), 227–232. <https://doi.org/10.1007/s11259-017-9687-8>.
- Pereira de Oliveira, G.P., de Almeida-Martins, B., Lima, M.T.N.S., Takahashi, J.A., 2019. Modulation of fungal Metabolome by biotic stress. In: Satyanarayana, T., Deshmukh, S., Deshpande, M. (Eds.), *Advancing Frontiers in Mycology and Mycotechnology*. Springer, Singapore, pp. 599–626. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9349-5_24.
- Pramer, D., Stoll, N.R., 1959. Nemin: a morphogenic substance causing trap formation by Predaceous fungi. *Science* 129 (3354), 966–967. <https://doi.org/10.1126/science.129.3354.966>.
- Qamar, M.F., Maqbool, A., Ahmad, N., 2011. Economic losses due to haemonchosis in sheep and goats. *Sci. Int.* 23 (4), 321–324.
- Saumell, C., Fusé, L., Iglesias, L., Fernández, S., Fiel, C., 2008. Enfoque bioecológico del potencial de los hongos nematófagos en el control biológico de trichostrongilídeos de rumiantes. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)* 89 (2), 45–54.
- Scholler, M., Rubner, A., 1994. Predacious activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. *Microbiol. Res.* 149 (2), 145–149. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(11\)80110-2](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(11)80110-2).
- Silva, A.R., Araújo, J.V., Braga, F.R., Frassy, L.N., Talavera, A.O., Carvalho, R.O., Castrejon, F.V., 2009. Biological control of sheep gastrointestinal nematodiasis in a tropical region of the southeast of Brazil with the nematode predatory fungus *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium*. *Parasitol. Res.* 105, 1707–1713. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1613-8>.
- Su, H., Zhao, Y., Zhou, J., Feng, H., Jiang, D., Zhang, K.-Q., Yang, J., 2015. Trapping devices of nematode-trapping fungi: formation, evolution, and genomic perspectives. *Biol. Rev.* 92 (1), 357–368. <https://doi.org/10.1111/brv.12233>.
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparij, O.F.J., 1986. Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico, second ed. Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium.
- Tian, B., Yang, J., Zhang, K.Q., 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61 (2), 197–213. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00349.x>.
- Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A., 2006. El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48 (3–4), 269–280.

- Tsotetsi, A.A.M., Mbatia, P.A., 2003. Parasitic helminths of veterinary importance in cattle, sheep and goats on communal farms in the northeastern Free State, South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 74 (2), 45–48. <https://doi.org/10.4102/jsava.v74i2.503>.
- Valcárcel-Sancho, F., Rojo-Vázquez, F.A., Olmeda, A.S., Arribas, N., Márquez, S.L., Fernández, P.N., 2009. *Atlas de Parasitología Ovina*, first ed. Servet Diseño y Comunicación, España.
- van den Hoogen, J., et al., 2019. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* 572 (7768), 194–198. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1418-6>.
- Wang, B.-B., Zhang, N., Gong, P.-T., Li, J.-H., Yang, J., Zhang, H.-B., Zhang, X.-C., Cai, K.-Z., 2019. Morphological variability, molecular phylogeny, and biological characteristics of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *J. Basic Microbiol.* 59 (6), 553–664. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800610>.
- Wang, B.-L., Chen, Y.-H., He, J.-N., Xue, H.-X., Yan, N., Zeng, Z.-J., Bennett, J.W., Zhang, K.-Q., Niu, X.-M., 2018. Integrated metabolomics and morphogenesis reveal volatile signaling of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (9) e02749-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02749-17>.
- Wang, Y., Sun, L., Yi, S., Huang, Y., Lenaghan, S.C., Zhang, M., 2013. Naturally occurring nanoparticles from *Arthrobotrys oligospora* as a potential immunostimulatory and antitumor agent. *Adv. Funct. Mater.* 23 (17), 2175–2184. <https://doi.org/10.1002/adfm.201202619>.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, T.J., White, J. (Eds.), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc, New York, pp. 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Yadav, C.L., Uppal, R.P., Kalra, S., 1993. An outbreak of haemonchosis associated with anthelmintic resistance in sheep. *Int. J. Parasitol.* 23 (3), 411–413. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(93\)90019-u](https://doi.org/10.1016/0020-7519(93)90019-u).
- Yang, C.-T., Vidal-Diez de Ulzurrun, G., Gonçalves, A.P., Lin, H.-C., Chang, C.-W., Huang, T.-Y., Chen, S.-A., Lai, C.-K., Tsai, I.J., Schroeder, F.C., Stajich, J.E., Hsueh, Y.-P., 2020. Natural diversity in the predatory behavior facilitates the establishment of a robust model strain for nematode-trapping fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 117 (12), 6762–6770. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919726117>.
- Yu, Z.F., Mo, M.H., Zhang, Y., Zhang, K.Q., 2014. Taxonomy of nematode-trapping fungi from orbiliaceae, ascomycota. *Fungal diversity Research series*. In: Zhang, K.Q., Hyde, K. (Eds.), *Nematode-Trapping Fungi*. Fungal Diversity Research Series. Springer, pp. 41–210. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8730-7_4. Dordrecht. Kunming, Yunnan, China.
- Zhang, Y., Zhang, K.Q., Hyde, K., 2014. The ecology of nematophagous fungi in natural environments. In: Zhang, K.Q., Hyde, K. (Eds.), *Nematode-Trapping Fungi*. Fungal Diversity Research Series. Springer, pp. 211–229. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8730-7_4. Dordrecht. Kunming, Yunnan, China.