

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

“IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE LA FLORA
PANAMEÑA POR MEDIO DE LA QUIMIOTAXONOMÍA”

KATHLEEN J. HERNÁNDEZ T.

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR POR
EL TÍTULO DE MAGISTER EN CIENCIAS CON ESPECIALIZACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ
2022

Luis Cubilla Ríos, investigador de la Universidad de Panamá y Profesor del Programa de Maestría en Microbiología Ambiental de la Universidad de Panamá.

CERTIFICA QUE: KATHLEEN JOSCELYN HERNÁNDEZ TORRES

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis de Maestría con el título: IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE LA FLORA PANAMEÑA POR MEDIO DE LA QUIMIOTAXONOMÍA

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado, y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Panamá el 15 de junio de 2022.

DEDICATORIA

Dirigida a mi padre que ha sabido formarme como una mujer de buenos sentimientos, valores y hábitos, por inculcarme a siempre dar lo mejor de mí y a no rendirme a pesar de las dificultades.

AGRADECIMIENTO

En primera instancia a la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) y la Universidad de Panamá (UP), por brindarme el apoyo económico como estudiante del Programa de Maestría en Microbiología Ambiental mediante el convenio de colaboración educativa N° 68-2017.

Agradecerle al grupo de investigación del Laboratorio de Bio Orgánica Tropical (UP) a los profesores Daniel Torres, Nivia Ríos y en especial a mi tutor Luis Cubilla-Ríos, a todos gracias por su ayuda, tiempo, confianza, paciencia, dedicación y conocimientos brindados durante todo el proceso aprendizaje dentro en este trabajo de investigación.

De igual forma, deseo agradecerle a la Dra. Gesabel Navarro por su aporte efectuado en este trabajo, por sus correcciones y enseñanzas dentro del centro de investigación e información de medicamentos y tóxicos (CIIMET) de la Facultad de Medicina (UP) y a su equipo de trabajo Licda. Carolina Guevara y Lic. Samuel Escudero.

A las personas que se fueron sumando a esta investigación que por inconveniencias de la pandemia fueron de gran ayuda para lograr el éxito de la misma: Dra. Phyllis Coley, Dra. Leida Abrego, Lic. Sixto Rodríguez y Dr. Alex Martínez.

A mi familia, en especial a mi papá y mi esposo por creer en mí, ser ese soporte emocional y apoyarme en todos mis proyectos hasta el último momento.

Finalmente, a mis amigos de siempre y a los nuevos que hice en maestría, el apoyo diario junto a ustedes hizo la carga más liviana.

INDICE GENERAL

Capítulos	Páginas
Resumen	1
Introducción	3
Capítulo I	
REVISIÓN DE LITERATURA	
1.1. Taxonomía y clasificación de los hongos	7
1.2. Taxonomía molecular en hongos	8
1.3. Quimiotaxonomía	10
1.3.1. Quimiotaxonomía en hongos endófitos	11
1.3.2. Generalidades de los perfiles de huellas químicas por espectrometría de masas	13
1.3.3. Ventajas de la cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas por electropulverización	21
Objetivos	26
Capitulo II	
MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. Selección y reactivación de cepas	27
2.2. Identificación morfológica	29
2.3. Identificación molecular	30
a. Obtención del material fúngico	30
b. Extracción de ADN genómico	30
c. Amplificación de PCR a punto final	31
d. Secuenciación del ADN	32
e. Análisis filogenético	32
2.4. Desarrollo de perfiles de huellas dactilar química	34
a. Preparación de los medios de cultivos y condiciones de cultivo	34
b. Obtención de extractos orgánicos	35
c. Análisis de extractos orgánicos por UPLC-MS	36
2.5. Procesamiento de espectros de masas	39
2.6. Análisis estadístico	41
Capítulo III	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. Caracterización morfológica y molecular de los hongos	42

endófitos	
3.2. Determinación de perfiles de huellas químicas	52
3.3. Evaluación de los efectos de los tiempos de crecimiento y los medios de cultivo sobre la composición química	63
3.4. Desarrollo de protocolo técnico para identificación de hongos endófitos por quimiotaonomía	73
Capítulo VI	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	77
LITERATURA CITADA	79
ANEXO	
Anexo 1	90
Anexo 2	92
Anexo 3	93
Anexo 4	99

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Lista de bases de datos de espectros de masa más utilizados en metabolómica (Fuente: Vinaixa <i>et al</i> , 2016)	18
Cuadro 1.2. Aductos, agrupaciones y fragmentos típicos observados por electropulverización positiva LC-MS en componentes investigados (Fuente: Nielsen y Smedsgaard, 2003)	19
Cuadro 2.1 Identificación y procedencia de las cepas seleccionadas para este estudio	29
Cuadro 2.2. Características de los cebadores utilizados en la PCR	31
Cuadro 2.3. Descripción de la composición de los medios de cultivos	34
Cuadro 2.4. Parámetros del espectrómetro de masas	37
Cuadro 2.5. Condición cromatográfica seleccionada para los análisis UPLC-ESI-MS	37
Cuadro 3.1. Características de las cepas de hongos caracterizadas por morfología.	44
Cuadro 3.2. Secuencias y datos de aislamiento de las cepas para análisis filogenético	48
Cuadro 3.3. Identificación taxonómica propuesta para las cepas de hongo endófitos utilizadas en este estudio	50
Cuadro 3.4. Iones cuasimoleculares encontrados en los espectros UPLC-MS (ESI+) en las dos cepas <i>Penicillium</i> sp. identificadas en este estudio.	61
Cuadro 3.5 Iones cuasimoleculares encontrados en los espectros UPLC-MS (ESI+) en las cepas de <i>Trichoderma</i> sp.	62
Cuadro 4.1 Porcentaje de identidad obtenidos en los análisis de BLAST de GeneBank®	90
Cuadro 4.2 Morfología macroscópica frontal de las 15 cepas fungicas clasificadas por género	92

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Cebadores para la amplificación de la región de ADNr del gen espaciador transcrito interno (ITS) (Fuente: Raja <i>et al</i> , 2017)	9
Figura 1.2. Número de secuencias fúngicas enviadas anualmente al Genebank (Fuente: Begerow <i>et al</i> , 2010)	10
Figura 1.3. Espectros de HPLC-DAD de los extractos crudos de <i>A. niger</i> y <i>A. tubingensis</i> (Fuente: Xu <i>et al</i> , 2020)	15
Figura 1.4. Flujo general de trabajo para el desarrollo de perfiles de huella química en hongos filamentosos (Fuente: El-Elimat <i>et al</i> , 2013).	17
Figura 1.5. Los espectros de masas de <i>Penicillium</i> por infusión directa mediante electropulverización positiva (Fuente: Smedsgaard y Nielsen, 2005)	20
Figura 1.6. Esquema del enfoque polifásico para la identificación de especies	22
Figura 2.1. Área de muestreo de las 4 zonas geográficas estudiadas (Fuente: Hernández, 2015)	28
Figura 2.2. Aspectos metodológicos para la caracterización morfológica y molecular de las cepas estudiadas.	33
Figura 2.3. Flujo de trabajo para la obtención de espectros de masas a través del análisis de UPLC-ESI-MS.	39
Figura 2.4. Espectro de masa y cromatograma TIC de la cepa 326B1[14](128) A.	40
Figura 3.1. Características macro y microscópicas de crecimiento encontradas en diferentes cepas estudiadas.	43
Figura 3.2. Resultados de la electroforesis en el gel de agarosa al 0.9%.	46
Figura 3.3. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS de las cepas estudiada basada en el análisis de Máxima Parsimonia	51
Figura 3.4 Espectros de masa de tres cepas de <i>Pestalotiopsis</i> sp. a los 15 días de crecimiento en SDA	54
Figura 3.5. Espectros de masa de perfiles de huella química de tres cepas estudiadas en diferentes tiempos de crecimiento y medios.	56
Figura 3.6 Quimiomarcadores encontrados en la cepa 369B3-17(198) de Sarigua en el género <i>Lasiodiplodia</i> sp.	57

Figura 3.7. Quimiodiversidad del extracto fúngico de <i>Diaporthe</i> sp. a los 30 días de crecimiento en los tres medios de cultivos seleccionados.	59
Figura 3.8. Espectros de masas del género <i>Colletorichum</i> sp. (F0769-A) en ESI+	63
Figura 3.9. Variación de los porcentajes de intensidad relativa de los iones cuasimoleculares en la cepa 369B3-17(198).	64
Figura 3.10. ANOVA- Efectos de los tiempos de crecimiento en los perfiles químicos	65
Figura 3.11. Distribución de los datos según parámetros de tiempo de crecimiento	66
Figura 3.12. Espectros de masa de la cepa LSF1120-002F en los tres medios de cultivos a los 7 días de crecimiento	68
Figura 3.13. Espectros de masa de la cepa 650B1 a los 22 días de crecimiento.	69
Figura 3.14. Espectros de masas en la cepa 654B8 en ESI+ durante los cuatro tiempos de crecimiento seleccionado.	70
Figura 3.15. Distribución de los datos según parámetros de tiempo de medio de cultivo.	71
Figura 3.16. ANOVA– Efectos de los tiempos de crecimiento en los perfiles químicos	72
Figura 3.17. Protocolo Técnico para la identificación de hongos endófitos mediante UPLC-MS	73
Figura 4.1. Filogenia <i>Lasiodiplodia</i> basado en análisis de máximo Likelihood	93
Figura 4.2. Filogenia <i>Trichoderma</i> basado en análisis de máximo Likelihood	94
Figura 4.3. Filogenia <i>Fusarium</i> basado en análisis de máximo Likelihood	95
Figura 4.4. Filogenia <i>Penicillium</i> basado en análisis de máximo Likelihood	96
Figura 4.5. Filogenia <i>Purpureocillium</i> basado en análisis de máximo Likelihood	97
Figura 4.6. Filogenia <i>Colletotrichum</i> y <i>Diaporthe</i> basado en análisis de máximo Likelihood	98

Figura 4.7. Perfil de huella química F0619 <i>Lasiodiplodia</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	99
Figura 4.8. Perfil de huella química F0619 <i>Lasiodiplodia</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	100
Figura 4.9. Perfil de huella química F0728 <i>Diaporthe</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	101
Figura 4.10. Perfil de huella química F0728 <i>Diaporthe</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	102
Figura 4.11. Perfil de huella química F0891 <i>Diaporthe</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	103
Figura 4.12. Perfil de huella química F0891 <i>Diaporthe</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	104
Figura 4.13. Perfil de huella química F0871 <i>Diaporthe</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	105
Figura 4.14. Perfil de huella química F0871 <i>Diaporthe</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	106
Figura 4.15. Perfil de huella química F0769 A <i>Colletotrichum</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	107
Figura 4.16. Perfil de huella química F0769 A <i>Colletotrichum</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	108
Figura 4.17. Perfil de huella química F0769 B <i>Colletotrichum</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	109
Figura 4.18. Perfil de huella química F0769 B <i>Colletotrichum</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	110
Figura 4.19. Perfil de huella química F0649 <i>Trichoderma</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	111
Figura 4.20. Perfil de huella química F0649 <i>Trichoderma</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	112
Figura 4.21. Perfil de huella química F3818 <i>Trichoderma</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	113
Figura 4.22. Perfil de huella química F3818 <i>Trichoderma</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	114
Figura 4.23. Perfil de huella química F3621 <i>Penicillium</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	115

Figura 4.24. Perfil de huella química F3621 <i>Penicillium</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	116
Figura 4.25. Perfil de huella química F3607 <i>Penicillium</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	117
Figura 4.26. Perfil de huella química F3607 <i>Penicillium</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	118
Figura 4.27. Perfil de huella química F6322 <i>Pestalotiopsis</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	119
Figura 4.28. Perfil de huella química F6322 <i>Pestalotiopsis</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	120
Figura 4.29. Perfil de huella química F6338 <i>Purpureocillium</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	121
Figura 4.30. Perfil de huella química F6338 <i>Purpureocillium</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	122
Figura 4.31. Perfil de huella química F3476 <i>Pestalotiopsis</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	123
Figura 4.32. Perfil de huella química F3476 <i>Pestalotiopsis</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	124
Figura 4.33. Perfil de huella química F5376 <i>Pestalotiopsis</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	125
Figura 4.34. Perfil de huella química F5376 <i>Pestalotiopsis</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	126
Figura 4.35. Perfil de huella química F5405 <i>Fusarium</i> sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento	127
Figura 4.36. Perfil de huella química F5405 <i>Fusarium</i> sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento	128

ABREVIATURAS

EM	Espectrometría de Masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
LC	Cromatografía Líquida
UPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento
UPLC-MS	Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento acoplado a Espectrometría de Masas
MS	Metabolito Secundario
ESI	Ionización por Electropulverización
Q	Analizador de cuádruplo
HE	Hongos Endófitos
m/z	Relación masa-carga
M⁺	Ión molecular
µg	Microgramos
µL	Microlitros
mL	Mililitros
MeOH	Metanol
AcOEt	Acetato de Etilo
TIC	Corriente Iónica Total
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ITS	Espaciador Transcrito Interno
LSU	Codificación de la subunidad grande

RESUMEN

La quimiotaenología es una herramienta eficaz utilizada por químicos y biólogos para la clasificación, identificación y comprensión de las funciones ecológicas mediante el desarrollo de perfiles químicos de metabolitos secundarios (MS). El avance de las técnicas analíticas como la espectrometría de masas (ES), tanto en precisión como en detección han ampliado la capacidad de la identificación de patrones de producción de MS, facilitando el desarrollo de nuevos protocolos para la identificación de especies. El desarrollo de los perfiles químicos ha resultado fundamental en el desarrollo de la sistemática y taxonomía fúngica, así como avances en sus estudios biotecnológicos y ecológicos. En referencias consultadas, existe un protocolo general para la identificación de metabolitos secundarios. Sin embargo, no se han expuesto las condiciones de cultivo estándar para la obtención de metabolitos fúngicos. Dado que el metabolismo prometedor de los hongos endófitos les permite sintetizar una gran cantidad de compuestos, algunos ya conocidos y otros por conocer; facilita o permite establecer patrones químicos para cada especie. En este estudio desarrollamos un protocolo para el análisis de perfiles de huellas químicas en hongos endófitos procedentes de cuatro zonas biogeográficas, mediante técnicas de análisis por cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplado a espectrometría de masas. Se evaluaron dos parámetros importantes para las condiciones de cultivo de los hongos el medio de cultivo y el tiempo de crecimiento, resultando el medio de cultivo (agar extracto de malta y agar extracto de papa) el parámetro con mayor efecto sobre la composición química de los extractos orgánicos de hongos endófitos. A diferencia de los resultados relacionados con el tiempo de crecimiento (7 a 30 días de crecimiento) indicando que no existe un efecto significativo sobre los perfiles de huella química. El protocolo de identificación quimiotaenológico permitió desarrollar 48 perfiles de huella química para 15 hongos endófitos. Además, los resultados se complementaron con la caracterización morfológica y molecular.

SUMMARY

Chemotaxonomy is an effective tool used by chemists and biologists to classify, identify, and understand ecological functions by developing chemical profiles of secondary metabolites (SM). Advances in analytical techniques such as mass spectrometry (MS), both in precision and detection, have expanded the ability to identify patterns of MS production, facilitating the development of new protocols for species identification. The development of chemical profiles has been fundamental in the development of fungal systematics and taxonomy, as well as advances in biotechnological and ecological studies. In consulted references, there is a general protocol for the identification of secondary metabolites. However, standard culture conditions for obtaining fungal metabolites have not been reported. Given that the promising metabolism of endophytic fungi allows them to synthesize many compounds, some already known and others unknown; facilitates or allows the establishment of chemical standards for each species. In this study, we developed a protocol for the analysis of chemical fingerprint profiles in endophytic fungi from four biogeographic zones, using ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS) analysis techniques. Two important parameters for the culture conditions of the fungi were evaluated: the culture medium and the growth time, resulting in the culture medium (malt extract agar and potato extract agar) being the parameter with the greatest effect on the chemical composition of the fungi. organic extracts of endophytic fungi. Unlike the results related to growth time (7 to 30 days of growth) indicating that there is no significant effect on chemical fingerprint profiles. The chemotaxonomic identification protocol allowed the development of 48 chemical fingerprint profiles for 15 endophytic fungi. In addition, the results were complemented with morphological and molecular characterization.

INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos son microorganismos aislados de tejidos sanos de su planta hospedera, son capaces de sobrevivir dentro de las plantas sin provocarles síntomas aparentes de enfermedad (Strobel, 2003; Schulz y Boyle, 2005; Madoo *et al*, 2021). El mecanismo de interacción entre el hongo y la planta se realiza bajo procesos de señalización química especializada, que establece una cooperación entre ambas especies, lo que facilita la respuesta al estrés generado por factores abióticos como bióticos al cual está sometido su hospedero (Schulz y Boyle, 2005; Chagas *et al*, 2018; Demain y Fang, 2000). Por lo tanto, toda interacción entre la planta y los hongos endófitos, incluido el mutualismo, el parasitismo o el comensalismo, se considera dentro del término endófito (Wilson, 1995; Hyde y Soyong, 2008).

Este equilibrio químico-biológico de los hongos endófitos ha planteado el desarrollo de investigaciones en una amplia gama de vertientes como los son: su diversidad, los mecanismos de defensa, regulación de factores de virulencia, su amplio potencial en la industria farmacéutica, biotecnológica, agronómica, cosmetóloga y medio ambiental (Schulz *et al*, 2002; Hyde *et al*, 2019). Por ello, la mayoría de las investigaciones publicadas están relacionadas con la biosíntesis de compuestos (Torres-Mendoza *et al*, 2020), debido a que tienen un mecanismo muy versátil de producción de metabolitos secundarios con estructuras complejas (Cortes-Sánchez y Mosqueda-Olivares, 2013). Adicionalmente, la producción de compuestos se ve afectada por diversos factores, como la temporada de

recolección de muestras, hospedero, la condición climática y la ubicación geográfica (Shukla *et al*; 2014).

Los hongos son un grupo que presenta una gran diversidad morfológica, ecológica, metabólica y filogenética. Y para su comprensión la taxonomía cumple una enorme labor al describirlos y clasificarlos, establece un lenguaje universal para reconocimiento de información sobre propiedades bioquímicas y ecológicas, tales como reconocer especies beneficiosas para la humanidad o identificar especies patógenas en cultivos, animales y humanos (Blackwell, 2001; Larsen *et al*, 2005; Naranjo-Ortiz y Gabaldom, 2019).

En sus inicios, las delimitaciones taxonómicas en micología se realizaban por características morfológicas que depende de estructuras reproductoras, que ocasiona, delimitaciones poco precisas por la plasticidad fenotípica (Alexopoulos *et al*, 1996). Posteriormente, la revolución en las técnicas moleculares permitió establecer delimitaciones más precisas y, por ende, cambios abruptos en la clasificación taxonómica. Esta técnica mejoró los análisis filogenéticos (Shenoy *et al*, 2007). Sin embargo, la clasificación sigue siendo un proceso largo y complejo debido a la heterogeneidad del reino de los hongos (Yahr *et al* ,2016; Raja *et al*,2017; Tekpinar y Kalmer, 2019).

La espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica que detecta, con alta sensibilidad y precisión, moléculas pequeñas. Una ventaja notable de la espectrometría de masas es que puede combinarse con técnicas de separación cromatográficas como la cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC por sus siglas en ingles) para analizar muestras complejas como extractos orgánicos

obtenidos a través de cultivos de hongos para la medición basada en componentes químicos (quimiotaxonomía), ya sea como quimiomarcadores o contribuyentes al desarrollo de un perfil de huellas dactilares (Hufsky *et al* 2014, Maciá-Vicente *et al* 2018; Bayona *et al*, 2019; Spraker *et al*, 2020).

El biotipado, es un tipo de quimiotaxonomía que ha logrado desarrollarse en el campo de la identificación y clasificación de los microhongos, a través de herramientas como la espectrometría de masas (Maciá-Vicente *et al*, 2018; Calla-Quispe *et al*, 2020). Larsen *et al* (2005), mencionan que los hongos filamentosos, son muy consistentes en su producción de metabolitos secundarios a nivel de especie cuando se cultivan en condiciones estandarizadas. En otras palabras, las cepas de diferentes especies representan quimiomarcadores específicos, mientras que las cepas de la misma especie pueden presentar quimiomarcadores similares.

Una limitante en la caracterización de las huellas químicas fúngicas son los múltiples parámetros de crecimiento (temperatura, acceso a nutrientes, pH, adición de elicitores, disponibilidad de luz, tiempos de crecimientos, adición de partes de la planta o la adición de otros microorganismos, zona de aislamiento, hospedero), que pueden crear variaciones no deseadas y que conducen a una identificación ambigua (Gupta *et al*, 2021). Los parámetros más comunes que se manipulan en la fermentación son la disponibilidad de nutrientes, el pH, la temperatura y el período de crecimiento.

Los períodos de crecimiento y el medio de cultivo son parámetros importantes que definir, porque involucra cuando se producen los compuestos, no solo para obtener la máxima producción, sino también para revelar los patrones de ocurrencia en la que aparecen los compuestos (Kusari *et al*, 2012; Frisvad *et al*, 2012; Tormo *et al*, 2012; Calla-Quispe *et al*, 2020; Ortega *et al*, 2020; Westpal *et al*, 2021)

Otros desafíos en el desarrollo del perfilado químico también se ven reflejados en el número limitado de bases de datos y la disponibilidad de equipos de EM. Sin embargo, en la última década se ha ido superando esta brecha con la actualización de los equipos de cromatografía acoplado a espectros de masas y la actualización de bases de datos con espectros de masas (Bode *et al*, 2002; Hanson, 2008; Venugolapan y Srivastava, 2015; Tiwari y Bae, 2022).

Actualmente nos enfrentamos a la aparición de microorganismos patógenos nuevos, especies invasoras, microorganismos resistentes a fármacos, a los efectos del cambio climático que impactan sobre microorganismos a cambiar su rol ecológico. Lo que hace imperativo seguir avanzando en el perfeccionamiento de las técnicas de identificación para facilitar una respuesta ágil y eficiente ante los retos señalados con anterioridad. Y el avance en la metodología analítica y el perfeccionamiento de las técnicas de caracterización química, puede emplearse como otra opción para el mejoramiento de la identificación y clasificación biológica de las especies.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Taxonomía y clasificación de los hongos.

Esta ciencia se ha ido perfeccionando debido al desarrollo de nuevas herramientas bioquímicas y moleculares, con enfoques de identificación morfológica, genética y química. Tiene un papel importante para el entendimiento de la biodiversidad y la comprensión de las relaciones que se manifiestan en el ambiente (Vasilyeva y Stephenson, 2010); y por lo tanto de una impresionante importancia vinculada con el cambio climático y la preservación de las especies; así como sus roles en los ecosistemas.

Los hongos son organismos heterotróficos, con reproducción por esporas, modo de nutrición por absorción, pared celular de quitina, adaptados a colonizar diferentes ecosistemas como endófitos, patógenos y saprobios. Además, se estimaba que la diversidad de los hongos estaba considerada entre 1.5 a 3 millones de especies, pero esta diversidad fue nuevamente calculada entre 2.2 a 3.8 millones de especies, basándose en estudios realizados principalmente en el trópico (Hawksworth, 2002; Blackwell, 2011; Hawksworth y Lücking, 2017; Bhunjun *et al*, 2022).

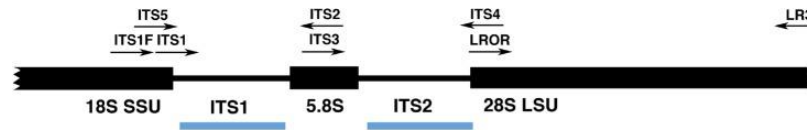
La clasificación de los hongos es primordial para la investigación científica, ya sea en la ecología, medicina, biotecnología, industria o en la agronomía y los nombres científicos son cruciales para reportar la información sobre las funciones y los comportamientos que podemos esperar al replicar ensayos con estas cepas en otras investigaciones (Stajich *et al*, 2009; Ortega, 2020).

Los inicios de la clasificación de los hongos, estaba basada solo en caracteres macro y micro morfológicos, realizando construcciones filogenéticas de acuerdo a características similares y por caracteres de la reproducción sexual y asexual. Sin embargo, debido a la naturaleza fenotípica de los hongos, era muy complicado delimitar a nivel de especies. Otras limitantes era aplicarlo en hongos pleomorfos que pueden tener diferentes modos de reproducción, o el caso de los hongos endófitos que no siempre esporulan en los medios de cultivos (Lutzoni *et al*, 2004; Naranjo-Ortiz y Gabaldon, 2019). No obstante, las herramientas morfológicas siguen siendo importantes para la utilidad de aplicaciones como en el desarrollo de cultivos en la quimiotaxonomía.

1.2. Taxonomía molecular en hongos

El impacto del avance técnico de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) y la selección de cebadores oligonucleótidos universales específicos para células fúngicas ha impulsado cambios taxonómicos importante en este reino (Groenewald *et al*, 2011). White *et al* (1990), marcó el comienzo en el uso de datos moleculares para la identificación y clasificación de los hongos y describió los cebadores de operones ribosómicos nucleares fúngicos. En la actualidad, los métodos moleculares son los más utilizados y aceptados en el campo de la micología (Guarro y Stchigel, 1999; Raja *et al*, 2017). Seifert y colaboradores (1995), examinaron las secuencias de ADN fúngico generadas con los cebadores para la subunidad grande (nrLSU-26S o 28S), la subunidad pequeña (nrSSU-18S) y toda la región espaciadora transcrita interna (ITS1, 5.8S, ITS2; aprox. 0,45–0,80 kb), y cuestionaron el concepto de que los hongos no solo pueden tipificarse

únicamente por las secuencias de ADN. Además, proponen que, para la identificación a nivel de especies, el empleo de la región la ITS (Ver figura 1.1) es la más útil, porque evoluciona más rápido y tiene mayor facilidad de amplificación.



-ITS1F (o ITS5 o ITS 1) -LR3
 -Todo la región ITS y los dos dominios de LSU
 ~1100-1150 pares de base

-ITS1F (or ITS5 o ITS1) – ITS4
 - Toda la región ITS ~ 550-600 pares de bases

Secuencia (5' → 3')

ITS1F CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
 ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG
 ITS2 GCTGCGTTCTTCATCGATGC
 ITS3 GCATCGATGAAGAACGCAGC
 ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC
 ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

Es muy rápido, muy útil para la filogenia de nivel inferior (especies), y el marcador de código de barras de ADN para la identificación de especies de hongos.

Figura 1.1. Cebadores para la amplificación de la región de ADNr del gen espaciador transcrito interno (ITS). (Fuente: Raja *et al*, 2017).

Por otro lado, Frisvasd (2015), menciona que el uso de secuencias de ADN puede percibirse también como un método quimiotaxonómico, pero a menudo se denomina simplemente clasificación molecular (taxonomía), base para hipótesis filogenéticas o caracterización genética.

A pesar de que la metodología molecular (basado en las técnicas de códigos de barras de ADN) ha ganado mayor terreno que otros métodos de identificación (Ver figura 1.2), no escapa de afrontar los retos de reducir los tiempos prolongados de respuesta, el alto costo de los insumos, la falta de automatización universal de sus procesos y la presencia de secuencias incompletas en bases de datos (Singhal *et al*, 2015; Sendid *et al*; 2013; Loff *et al*,

2014). Otros aspectos importantes son los problemas técnicos como el bajo rendimiento de la extracción de ADN, el empleo de insumos tóxicos que impacta tanto para el ambiente como para el personal operante y no menos importante, los inhibidores (metabolitos) de la PCR (Begerow *et al*, 2010).

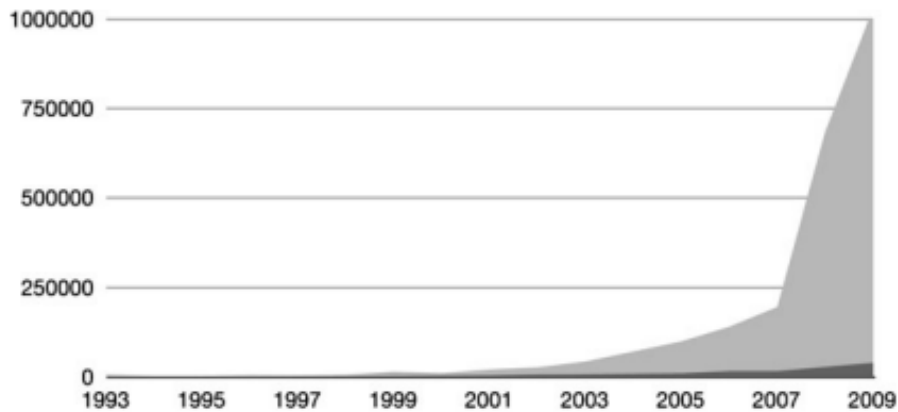


Figura 1.2. Número de secuencias fúngicas enviadas anualmente a GeneBank.

Desde el establecimiento de GenBank en 1993, la cantidad de secuencias de ADN fúngico ha ido creciendo continuamente. En gris claro todas las secuencias fúngicas; secuencias en gris oscuro ITS rDNA (Fuente: Begerow *et al*, 2010).

1.3. Quimiotaxonomía

La quimiotaxonomía, también llamada quimio sistemática, estudia los componentes químicos de los grupos taxonómicos. Esta herramienta identifica y clasifica a los organismos de acuerdo con las diferencias y similitudes confiables en sus composiciones bioquímicas (Paredes-González *et al*, 2008; Hao *et al*, 2015). Inicialmente fue empleada en el estudio de plantas para evaluar su toxicidad o su componente medicinal; ya que algunos tipos de plantas compartían cierta analogía en la estructura de los metabolitos secundarios (Marcoano y Hasegawa; 2002).

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples (García y Carril, 2011).

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos biosintetizados como respuestas a factores ecofisiológicos del ambiente externo, por lo que tienen cierto potencial para ser específicos de una serie o de una especie. (Frisvad, 2015; Chagas *et al*, 2015). Incluyen moléculas interesantes con esqueletos novedosos y actividades tóxicas, antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, antitumorales, antipalúdicas y otras, y pertenecen a diferentes clases, como alcaloides, terpenoides, flavonoides, compuestos fenólicos, esteroide entre otros. Además, para poder utilizar completamente el potencial de los metabolitos secundarios, es necesario vincularlo con el grupo genes biosintético. (Kjærbolling *et al*, 2019; Ortega *et al*, 2021)

1.3.1. Quimiotaxonomía en hongos endófitos

Los hongos son el grupo más diverso en cuanto a la producción de metabolitos especializados, se han reportado alrededor de 15,6000 metabolitos especializados (Bills *et al*, 2016) y su éxito ecológico de colonizar depende directamente de esta maquinaria metabólica que les permite producir varios compuestos complejos (Chagas *et al*, 2015; Braga *et al*, 2016).

En este sentido, los hongos endófitos generan un mayor interés ya que son organismos que penetran las barreras inmunológicas del hospedero sin causarle un daño aparente. Este grupo ecológico, ha colonizado la mayoría de las plantas

de todas las zonas geográficas y climáticas. Además, forman parte de una amplia comunidad constituida por órdenes, familias, géneros y especies que cohabitan en el nicho del hospedero, de tal forma existen evidencias significativas del intercambio equilibrado de moléculas que median la dinámica dentro del hospedero (Schulz, 2012; Frisvad *et al*, 2018; Chagas *et al*, 2018; Slama *et al*, 2021; El-Sayed *et al*, 2022).

La biotipificación (tipo de quimiotaxonomía) ha jugado un papel muy importante en la comprensión de diferentes categorías taxonómicas en hongos filamentosos que viven dentro de las plantas conocidos como hongos endófitos (Chagas *et al*, 2020). Por otro parte, en la construcción del perfil de huellas dactilares se reconoce tanto metabolitos primarios como los metabolitos secundarios, pero son los metabolitos secundarios los empleados para establecer quimiomarcadores o marcadores quimiotaxonómicos (Hao *et al*; 2015).

La quimiotaxonomía fúngica se basa en perfiles cualitativos o cuantitativos de extrolitos (moléculas de diferenciación dirigidas hacia el exterior) o perfiles cuantitativos de introlitos (todas las moléculas utilizadas dentro de la célula para el crecimiento simple) y metabolito celular (Frisvad, 2015). Por esta razón, presenta dos enfoques estudio, la primera está dirigida a cuantificar y detectar de manera precisa uno o un conjunto de compuestos conocidos en una muestra objetivo, mientras, el segundo enfoque no dirigido, identifica la mayor cantidad de compuestos posibles que se encuentren en una muestra (Stein, 2012; Tiwari *et al*, 2022).

No hay duda de que los hongos endófitos son reservorios de diferentes metabolitos secundarios, como alcaloides, ácidos fenólicos, quinonas, esteroides, saponinas, taninos y terpenoides, que facilita la identificación por medio características químicas. (Aly *et al*, 2010; Gouda *et al*; 2016. Strobel; 2018, Chen *et al*, 2022; Deshmukh, 2022).

A pesar de que existen algunas clasificaciones en géneros de Ascomycetos, aun es limitado este tipo de clasificación por metabolitos secundarios, por lo que se pierde el uso de la caracterización química como potencial uso de desarrollo biotecnológico (El- Elimant *et al*, 2013; Kelman *et al*, 2020).

1.3.2. Generalidades de los perfiles de huellas químicas por espectrometría de masas

Las técnicas de perfilado rápido en quimiotaxonomía se han utilizado durante muchos años y con los perfiles de huellas dactilares se logra determinar un elevado porcentaje de la metabolómica, que apunta a detectar todos los metabolitos en una célula u organismo. Por ello, se han hecho esfuerzos para lograr su optimización en la técnica. La toma de perfiles químicos tiene como objetivo adquirir una "huella dactilar química" del microorganismo, donde las señalizaciones pueden caracterizarse y definir quimiomarcadores (Frisvad y Thrane, 1987; Larsen *et al*, 2005; Jeweet *et al*, 2006; Frisvad, 2015; Melero, 2016; Macía-Vicente *et al*, 2018, Xu *et al*, 2019; Yang *et al*, 2021).

Inicialmente, el estudio de los metabolitos secundarios fúngicos se originó principalmente por dos condiciones: (1) comprender la regulación de los genes que producen las micotoxinas, (2) identificar los compuestos con nuevas

bioactividades primordialmente aplicables al uso farmacéutico y agrícola. Luego, los metabolitos secundarios fueron utilizados en los hongos como una herramienta prometedora para utilizarse de referencia auxiliar para solucionar problemas encontrados en la clasificación de algunas especies (Frisvad *et al*, 2008).

Los problemas fitosanitarios por hongos son un daño potencial para la economía agroindustrial, por ello, la mayoría de las aplicaciones biotecnológicas de la quimiotaxonomía están aplicadas a cepas fúngicas causantes de plagas.

Frisvad (1986) utilizó perfiles cuantitativos de metabolitos primarios mediante el empleo de cromatografía de gases para identificar carbohidratos capaces de identificar una serie de *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. cyclopium*, *P. expansum* y *P. ochraceum*).

Shukla *et al* (2014) sugieren que la producción de metabolitos en los hongos endófitos se ve afectada por diversos factores, como la temporada de recolección de muestras, tipo de hospedero (incluye dentro de este factor la condición climática) y la ubicación geográfica.

Macía-Vicente *et al* (2018) analizaron los productos naturales producidos por 822 cepas de hongos endófitos aislados de raíces de plantas, empleo el enfoque basado en UPLC-ESI-MS/MS no dirigido y logro vincular los patrones de características químicas con 10 linajes fúngicos, mayormente en hongos ascomycetos.

El desarrollo de la técnica se ha logrado en gran parte en los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Frisvad, 2012) debido al impacto directo sobre cultivos y cosechas en almacenamiento (Calla-Quispe *et al*, 2020).

Larsen *et al* (2005) demostró metabolitos marcadores que se pueden repetir en los perfiles de huellas química desarrollado con espectrometría de masas en especies del género *Penicillium* y que se basaron en huellas químicas desarrollados en equipo de menor resolución como HPLC (Smedsgaard *et al*, 2004).

El perfil de metabolitos secundarios se ha utilizado principalmente con fines taxonómicos en diferentes géneros del phylum *Ascomycota* (Frisvad *et al*, 2007). Xu *et al* (2020) utilizó como marcador químico de diagnóstico a los heterodímeros de azperazinas B y C para distinguir dos especies *Aspergillus niger* y *Aspergillus tubingensis*. En la figura 1.3 se observa la diferencia de picos mayoritarios en el cromatograma entre las dos especies de *Aspergillus*.

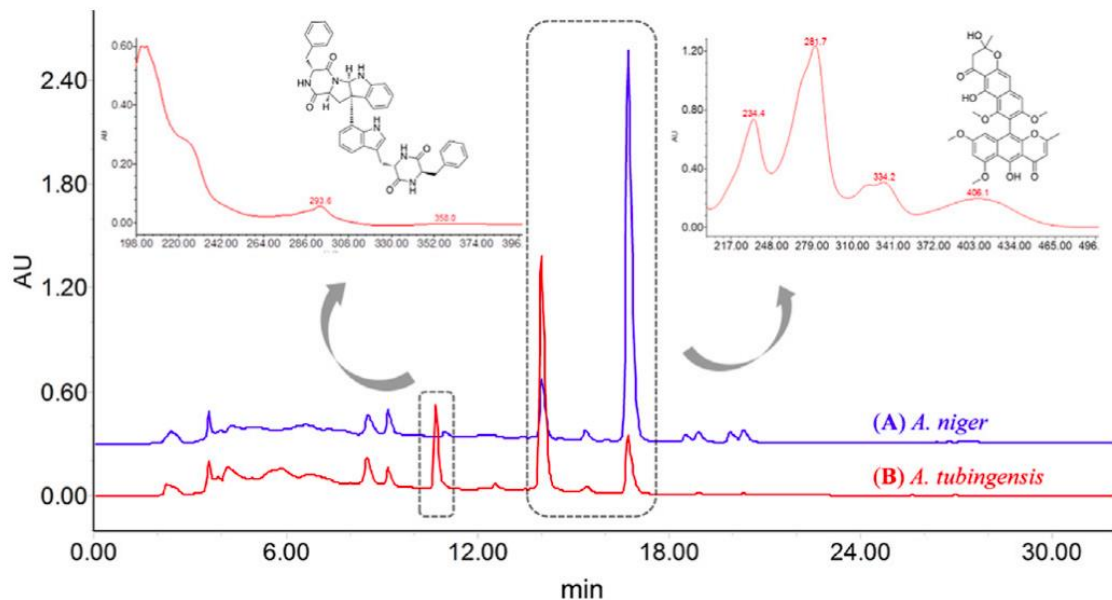


Figura 1.3. Espectros de HPLC-DAD de los extractos crudos de *A. niger* y *A. tubingensis*. (Condiciones cromatográficas: Columna: SunFire® C18, 250 mm × 4,60 mm, 5 µm; Fase móvil: MeCN–H₂O, 0–30 min, 30%–100% MeCN; Velocidad de flujo: 1 mL/min; Detección UV: 235 Nuevo México) (Fuente: Xu *et al*, 2020).

Para el desarrollo de los perfiles de huellas dactilares o el análisis de quimiomarcadores se han utilizado diferentes enfoques analíticos, entre los que podemos mencionar: cromatografía en capa fina (TLC), ionización por electropulverización (ESI), resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC), cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida-UV (LC-UV), Cromatografía líquida (LC) y espectrometría de masas (MS) (Larsen *et al*, 2005).

Gupta *et al* (2021) mencionan que existe una diversidad de enfoques para la replicación de compuestos basados en técnicas sensibles y específicas como EM que depende del objetivo del compuesto a analizar. Sin embargo, establece que para cualquier desarrollo de análisis de huella química depende de cinco importantes pasos, a saber: (1) cultivo del hongo, (2) extracción orgánica, (3) determinación del rendimiento del extracto, (4) análisis cromatográfico-espectrometría de masas y (5) análisis de data con bases de datos o referencias publicadas.

En la Figura 1.4 se observa un flujo general de trabajo establecido por El-Elimat *et al* (2013), actualmente el análisis de EM no está por separado ya que se encuentra acoplado a los equipos de cromatografía, lo que resulta en una ventaja al disminuir los tiempos de análisis y obtención rápida de los resultados.

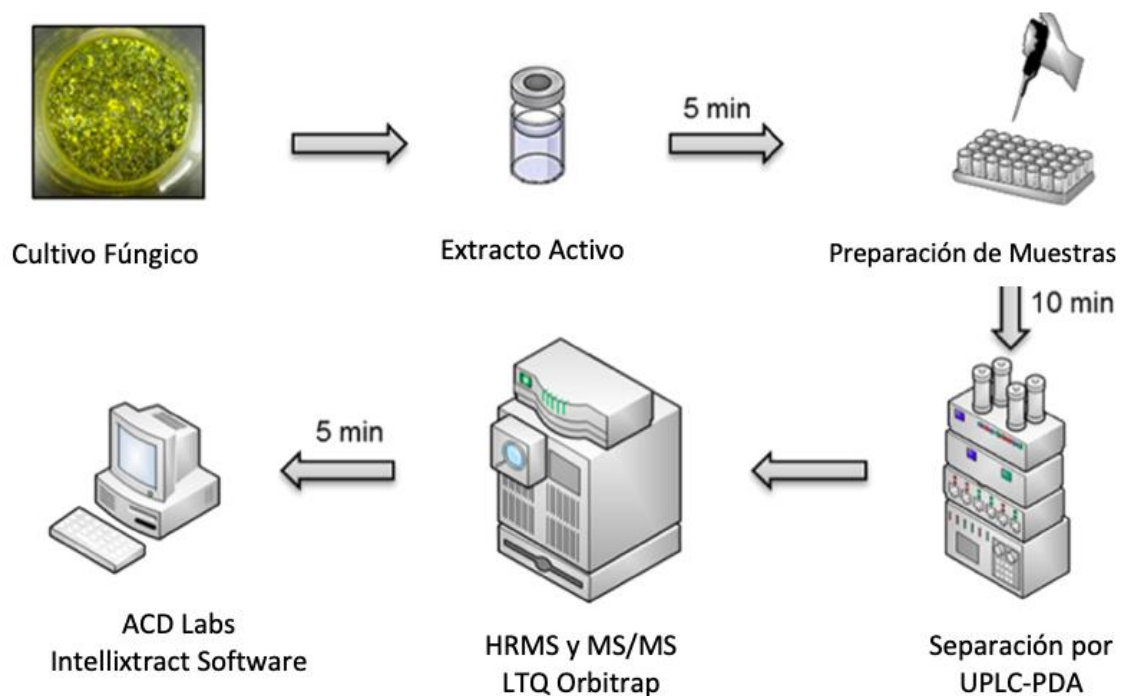


Figura 1.4. Flujo general de trabajo para el desarrollo de perfiles de huella química en hongos filamentosos. (Fuente: El-Elimat *et al*, 2013)

Sin duda la innovación en las herramientas de espectrometría de masas permitió el acoplamiento entre los equipos de cromatografía lo que permite una mejor separación de mezclas de compuestos, previo al análisis de masas, mejorando la selectividad del método, la migración de las masas, lo que favorece la detección de molécula completas, como por ejemplo microorganismos completos (García *et al*, 2012; Upton *et al*, 2017).

Alanio *et al* (2011) recomiendan la espectrometría de masas MALDI-TOF para alcanzar un mejor conocimiento sobre la epidemiología de cepas médicamente relevantes como *Aspergillus*, al proporcionar una identificación rápida y precisa por medio de perfiles químicos.

Larsen *et al* (2005), mencionan que los hongos filamentosos, son muy consistentes en su producción de metabolitos secundarios a nivel de especie cuando se cultivan en condiciones estandarizadas. En el cuadro 1.1 se contemplan las bases de datos más utilizadas para comparar espectros de masas.

Cuadro 1.1 Lista de bases de datos de espectros de masas más utilizadas en metabolómica.
(Fuente: Vinaixa *et al*, 2016).

Base de Datos	Ventajas	Contras
HMBD	-Pública -Datos espectrales de masas ~9500 en estándares químicos -Los datos espectrales son descargables	-Energías de colisión mixtas y tipos de instrumentos
METLIN	-Pública -Datos espectrales de masas seleccionadas en >13,000 de estándares químicos -Más de 63,500 espectros de MS/MS de alta resolución	-Solo datos de Q-Tof -Los datos de espectro no son descargables
LipidSearch	-Más de 1,5 millones de iones de lípidos y sus iones de fragmentos predichos -Incluye iones de aductos de lípidos y huellas de MS -Los Datos se almacenan en archivos XML	-Requiere licencia comercial -Desarrollado por Orbitrap Technology -Biblioteca MS/MS generada <i>In Silico</i> -La superposición con LipidBlast no está clara
LipidBlast	-Más de 200,000 espectros de masas en tándem que cubren 25 clases de lípidos -Disponibles públicamente -Los datos espectrales son descargables	-Biblioteca generada <i>In silico</i> usando modelado heurístico de espectros de masas en tándem -Limitación "Regla de un Tercio": desarrollado principalmente con espectros de masas en tándem con trampa de iones -No permite búsqueda por lotes de iones precursores -Superposición con LipidSearch poco clara
LipidMaps	-Más de 40,000 estructuras únicas de lípidos -Los datos espectrales son descargables	-Espectros MS/MS solo predice en modo ionización negativa o positiva -Espectros MS/MS solo disponible para un aducto por lípido
mzCloud	-Pública -Información espectral de MS/MS y MS altamente seleccionada -Los picos espectrales están anotados estructuralmente	-Bajo números de metabolitos -Datos espectrales no son descargables -Solo espectros Orbitrap
Wiley 10th	-Biblioteca de espectros de masas más grande disponible comercialmente -719,000 espectros (>950,000 espectros si se combina con NIST 14) -Más de 638,000 compuestos (>760,000 compuestos si se combinan con NIST 14) -Compatible con la mayoría de los fabricantes de equipos.	-Requiere licencia comercial -Solo espectros de masas de 70 eV EI -Mas allá de las aplicaciones metabólicas
MaConDa	-Data de bases pública de ~200 contaminantes en espectrometría de masas -Registro espectral teórico y experimental detectado en varias plataformas MS -Descargable	-No tiene base de datos MS/MS
MassBank	-Pública -Espectros de masas de diferentes configuraciones de MS -Aproximadamente 19,000 espectros MS1 y 28,000 MS2 y MS -Los datos espectrales son descargables	-No hay suficientes datos asegurados
NIST 14	-234,284 espectros de MS/MS ESI de 9344 estándares químicos -Gran número de espectros MS/MS de aductos -Los espectros MS/MS registrados usando múltiples instrumentos de alta y baja resolución -Colección seleccionada de 276,259 espectros de masas EI de 242,477 compuestos únicos. -387,463 información medida del índice de retención de Kovats o Lee de 82,337 estándares químicos	-Licencia comercial -Falta de identificadores adicionales para los recursos de bases de datos externa.
GMD	-Pública -Más de 2200 EI espectros de masas e información del índice de retención -Los datos espectrales son descargables	-Principalmente datos de materiales vegetales
FiehnLib	-Más de 2200 EI e índices de retención para >1000 metabolitos	-Licencia comercial con Agilent Technologies y LECO Corporation -Datos derivados principalmente de materiales vegetales
ReSpect	-Pública -Más de 9000 MS/MS espectros correspondientes a >3600 metabolitos: ~38% datos de literatura ~12% Q-TOF MS/MS ~50% QqQ MS/MS -Espectros combinados (Igual que Mass Bank) -Datos de registros seleccionados -Descargable	-Solo datos de Q-TOF y QqQ MS -Principalmente fitoquímicos (metabólica de plantas) -Alto grado de redundancia con MassBank
GNPS	-Pública -8853 espectros de MS/MS - MS/MS de aductos - MS/MS de estructuras no identificadas -Descargable	-Muy pocos espectros en ionización negativa -Información de los espectros limitada -Sin limpieza espectral/eliminación de ruido

Otro innegable reto es la presencia de aductos/fragmentos y ruido químico/de fondo (Brown *et al*, 2009). Este problema puede abordarse parcialmente mediante una nueva frontera de bases de datos metabólicas caracterizadas por espectros de masas bien anotados que contienen todas las especies de aductos y fragmentos para las sustancias de referencia (Ver cuadro 1.2).

Cuadro 1.2. Aductos, agrupaciones y fragmentos típicos observados por electropulverización positiva LC-MS en componentes investigados (Fuente: Nielsen y Smedsgaard, 2003).

Estructura de iones	Masa m/z	Abundancia relativa
Fragmentos		
$[M-CO_2 + H]^+$	$M_r - 42,9918$	Compuesto dependiente
$[M-2H_2O + H]^+$	$M_r - 35,0133$	Compuesto dependiente
$[M-H_2O + H]^+$	$M_r - 17,0027$	Compuesto dependiente
Clusters		
$[M + H]^+$	$M_r + 1,0078$	Alto
$[M + Na]^+$	$M_r + 22,9898$	Medio a bajo
$[M + NH_4]^+$	$M_r + 18,0344$	Medio
$[M + CH_3CN + H]^+$	$M_r + 42,0344$	Medio
$[M + CH_3CN + Na]^+$	$M_r + 64,0163$	Poco frecuente
$[2M + H]^+$	$2 \times M_r + 1,0078$	Medio
$[2M + Na]^+$	$2 \times M_r + 22,9898$	Medio
$[2M + NH_4]^+$	$2 \times M_r + 18,0344$	Poco frecuente
$[2M + CH_3CN + H]^+$	$2 \times M_r + 64,0163$	Poco frecuente

Nota: M_r = Masa molecular monoisotópica

Smedsgaard y Nielsen (2005) realizaron estudios en el sub género *Penicillium*, por medio del análisis de conglomerados a partir de espectros de masas nominales. En la figura 1.5, indican los primeros perfiles de masa por infusión directa corregidos, correspondientes a 3 especies de *Penicillium* muy difícil de distinguir mediante la taxonomía morfológica tradicional. Por lo tanto, al examinar los cromatogramas hallaron diferencias y similitudes entre las cepas. Los espectros de masas ilustran picos base específicos (243, 252 y 303) para cada especie de *Penicillium* y los picos similares tienen diferentes intensidades lo que implica distinguir la separación y clasificación entre especies dentro de un mismo género.

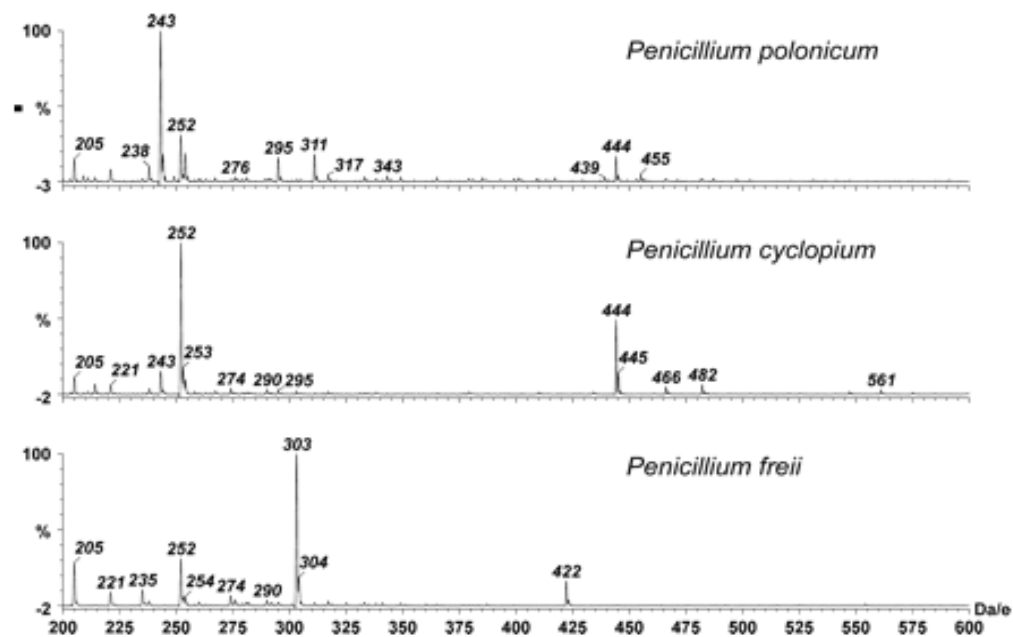


Figura 1.5. Los espectros de masas de *Penicillium* por infusión directa mediante electropulverización positiva. Se demuestran la diferencia entre tres especies que son difíciles de distinguir mediante la taxonomía fenotípica tradicional. (Fuente: Smedsgaard y Nielsen, 2005)

1.3.3. Aplicaciones del enfoque polifásico como elemento clave en la identificación de hongos

En el mundo microbiológico en especial los microhongos a menudo existen inconsistencias en la selección de las herramientas utilizadas para obtener una correcta identificación taxonómica.

La notoria capacidad de los hongos de adaptarse al cambio de las condiciones ecológicas puede causar modificaciones en la expresión de genes e influir en el desarrollo de las características morfológicas. Además, los análisis precisos de la distribución geográfica de varios ecotipos y genotipos también actúan como marcadores taxonómicos adicionales (Simões *et al*, 2013).

Smedsgaard y Nielsen (2005) indican que, al combinar las técnicas y conocimientos de la química analítica, bioquímica, ecología, biología molecular y morfológica amplia la comprensión e identificación asociadas a los hongos.

Otros investigadores como Cai *et al*, (2009); Arrua *et al*, (2012); Komárek *et al*, (2016); Akinola *et al*, (2019); Rasheed *et al*, (2019) describen esta combinación de técnicas como enfoque polifásico.

El enfoque polifásico es la integración de la información sobre los caracteres fenotípicos, genotípicos o metabolitos secundarios para comprender la diversidad taxonómica de las especies (Ver Figura 1.6).

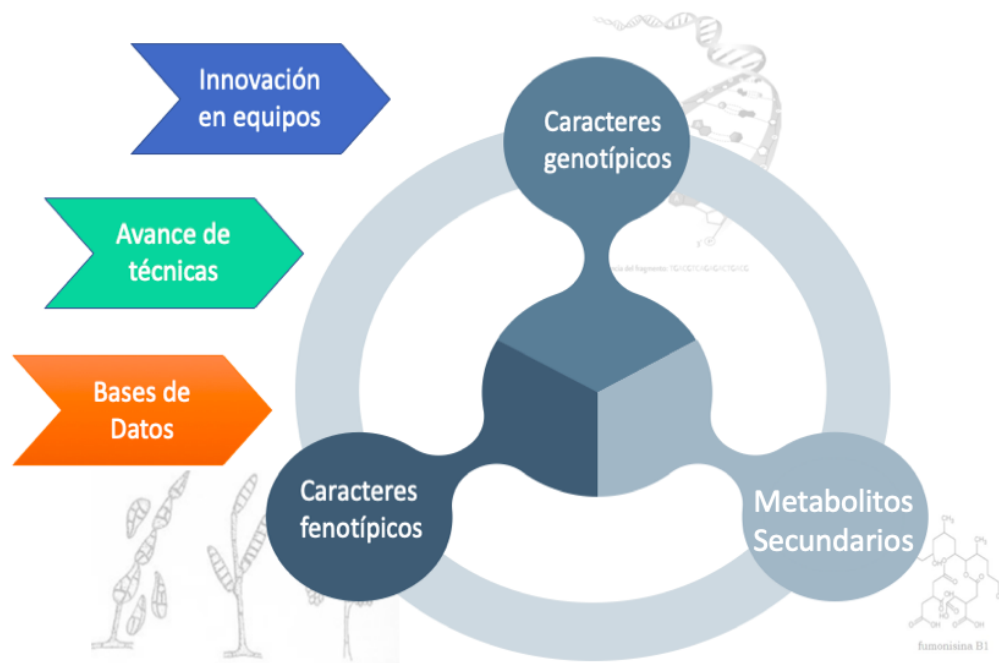


Figura 1.6. Esquema del enfoque polifásico para la identificación de hongos endófitos.
 La innovación en equipos y técnicas metodológicas aportan directamente a la actualización, globalización y mejoramiento constante de las bases de datos.

Generalmente, el primer paso comúnmente utilizado en este enfoque es la morfología, seguido del análisis espectral de metabolitos secundarios y por último la biología molecular, debido al alto costo y largo tiempo que representa la metodología (Santos *et al*, 2010).

A pesar de que el desarrollo de perfiles químicos a través de los metabolitos secundarios predice propiedades que no son completamente predichas por los marcadores genéticos, dentro del enfoque polifásico, es la herramienta menos empleada y solo la biología molecular es reconocida como la técnica estándar de oro (Frisvad *et al*, 2008; Simões *et al*, 2013, El-Elimat *et al*, 2013 y Kelman *et al*, 2020).

El empleo de metabolitos secundarios depende del desarrollo de perfiles químicos de huellas, el descubrimiento de la diversidad química y la funcionalidad de los datos son utilizados para discriminar una especie de otra.

Nielsen *et al* (2005) revisó la metodología general para el perfilado de metabolitos de hongos, destacó que los resultados del análisis de LC combinada proporcionan cromatogramas donde se mejora la especificidad del compuesto por la polaridad resultando una identificación más exacta y específica en hongos del género *Trichoderma*.

Lang *et al* (2008) menciona que existen numerosos enfoques para la replicación basadas en técnicas con guiones, y cada uno tiene sus propias ventajas en sensibilidad. Sin embargo, todos estos se ven obstaculizados por al menos una, si no varias, limitaciones, que incluyen tiempos de ejecución prolongado (30 minutos o más), mediciones de masa de baja resolución o falta de datos MS-MS confirmatorios (El-Elmat *et al*, 2013).

La cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) ha sido una de las técnicas analíticas empleadas para separar los compuestos que están presentes en extractos de productos naturales. Permite la cuantificación de una gran diversidad de analitos en matrices complejas a nivel de trazas. Además, el acoplamiento de la espectrometría de masas por electro pulverización (ESI-MS) y matriz de fotodiodos (UV) como parte integral de la estrategia acelera la identificación de picos o compuestos en común entre muestras o aquellos que son únicos. Una de las características significativas del ESI-MS es que tiene una ionización suave lo que permite producir mayor cantidad de iones

cuasimoleculares protonado, en el caso de ESI +, ampliando la gama de diferentes compuestos con una alta sensibilidad (Pramanik *et al*, 2002; Smedsgaard y Nielsen 2005, El-Elimat *et al*, 2002).

En el 2013, El-Elimat *et al*, analizaron por cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplado a un espectrómetro masas (UPLC-MS) moléculas producidas por hongos filamentosos lo que ayudó a la construcción de una base de datos mediante el registro de espectros MS/MS, utilizaron modos de ionización negativa y positiva para determinar metabolitos como la Hipotemicina que inhibe el crecimiento de células cancerosas en plantas y así agrupar especies capaces de producir este metabolito.

Esta estrategia de identificación destaca como una prometedora respuesta para la identificación de micotoxinas en productos alimenticios y productos agrícolas (Anfossi *et al*, 2016). Las micotoxinas han atraído la atención mundial debido a sus profundas consecuencias económicas negativas. Las pérdidas en los Estados Unidos y Canadá debido a las micotoxinas en las industrias de piensos y ganado son del orden de \$ 5 mil millones anuales (Rodríguez y Naehrer, 2012; Weaver *et al*, 2021).

Dado los resultados positivos desarrollados en otros países, se sugiere el desarrollo de perfiles químicos como un método capaz de solventar los problemas asociados a la sanidad agropecuaria en nuestro país, ejemplo de estos:

- (1) El Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA), reporta el temible hongo que causa el marchitamiento de los bananos y el plátano conocido como

“Mal de Panamá”. En este artículo se publica la historia de colonización de la cepa *Fusarium oxysporum* raza 4 en cultivos de banano Gros Michel y detallan los posibles perjuicios a la seguridad alimentaria además de las posibles pérdidas económicas sino se controla esta plaga.

- (2) En mismo año se reporta una extraña enfermedad que estaba causando el deterioro de los árboles de marañón del país, investigadores del IDIAP no lograron identificar la causa precisa. Tiempo después identificaron una asociación entre dos hongos *Lasidiplodia* sp. y *Colletotrichum* sp. como posibles causantes de la muerte descendente (IDIAP, 2020).

El estudio del metabolismo de hongos filamentosos provee una plataforma compleja pero interesante para comprender la funcionalidad expresada de los genes, mejorar el entendimiento de la ecología microbiana e impulsa nuevas biotecnologías de identificación amigables con el medio ambiente.

Simões *et al* (2013) y Macías-Vicente *et al* (2018) resaltan que la integración de todos los datos implicados en el comportamiento biológico de los hongos es fundamental para asegurar la continuidad de los estudios taxonómicos que a su vez ayuda a maximizar la bioeconómica y la sustentabilidad de los desarrollos biotecnológicos.

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar un protocolo de identificación quimiotaxonómica para hongos endófitos aislados de la flora panameña por medio de perfiles de huella química.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar los hongos endófitos por técnicas morfológicas y moleculares.
2. Determinar los perfiles químicos de los extractos orgánicos de los hongos endófitos mediante técnicas de análisis por UPLC-MS.
3. Evaluar los efectos de los tiempos de crecimiento y los medios de cultivo sobre la composición química de los extractos fúngicos.

Pregunta de Investigación

¿Cómo es el comportamiento del perfil de huella dactilar química de los hongos endófitos de acuerdo con el tiempo de crecimiento?

¿Qué diferencias hay en la utilización de medios de cultivo diferentes en la producción de compuestos de los hongos endófitos?

Hipótesis

El perfil químico de hongos endófitos puede ser utilizado como herramienta de identificación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección y reactivación de cepas.

Se utilizaron 15 aislados de hongos, obtenidos como endófitos foliares de diferentes plantas y cuatro ubicaciones de geográficas. Las cepas escogidas fueron aisladas durante el proyecto de colecta de especies vegetales de los Grupos Internacionales Cooperativos de la Biodiversidad (ICBG, por sus siglas en inglés) entre 2004 al 2005 y posteriormente, por el Proyecto Nagoya durante 2014 al 2016. Las colectas se realizaron en el Parque Nacional Sarigua (Herrera), Parque Nacional Cerro Hoya (Los Santos), Parque Nacional Santa Fe (Veraguas) y Zona de Manglar Remedios (Chiriquí) (Ver figura 2.1). Las muestras fueron preservadas en viales con glicerol al 10% a temperatura ambiente y a -80 °C. Actualmente, las cepas se mantienen en la colección de cultivos de la Universidad de Panamá. En el cuadro 2.1 se describe la identificación de cada muestra propuesta por ICBG.

Estos especímenes fueron seleccionados con base en los resultados obtenidos en Hernández (2015), donde las cepas mostraron actividad antagonista frente a 6 bacterias de referencias (*Listeria monocytogenes* CECT 935, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus oralis* CECT 907, *Escherichia coli* CECT 435, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 10145 y *Salmonella enterica* CECT 7159) y 2 fitopatógenos (*Aspergillus brasiliensis* y *Phytophthora palmivora*).

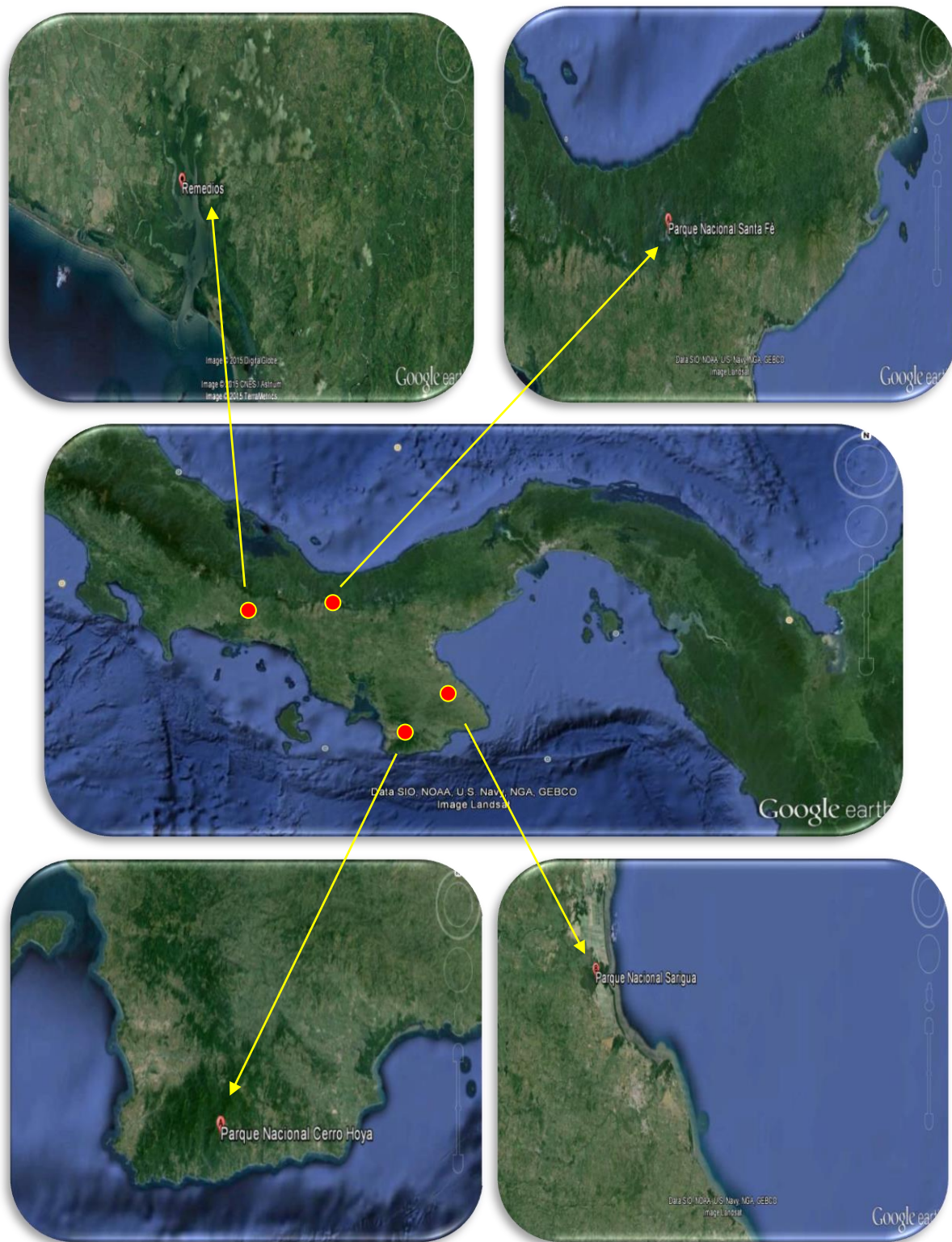


Figura 2.1. Ubicación de las 4 zonas geográficas de colecta de las plantas hospederas. (Fuente: Hernández, 2015).

Cuadro 2.1. Identificación y procedencia de las cepas seleccionadas para este estudio.

Zona Geográfica	Identificación de las muestras*	
	Muestra ID	Aislamiento ID
Sarigua	F0619	369B3-17 (198)
	F0728	369B3-1 (190)
	F0891	368B4 (11) (85)
	F0871	367B1-13(60)
Remedios	F0769-A	326B1 [14] (128) A
	F0769-B	326B1 [14] (128) B
	F0649	327B1-8
Cerro Hoya	F5405	654B8
	F3476	650B12
	F5376	650B1
Santa Fé	F6322	LSF1124-003F
	F6338	LSF1126-002F
	F3621	LSF1126-004F
	F3618	LSF1125-003F
	F3607	LSF1120-002F

*Etiquetado de muestras de acuerdo a la base de datos de ICGB y Proyecto Nagoya.

Las muestras estaban preservadas en forma de tapones de micelio inmersas en glicerol. Para la recuperación de las cepas se aplicó el protocolo descrito por Humber (1997). Después de 7 a 15 días de incubación a 26 °C. Se retiraron aseptícamente los tapones de micelio con agar de extracto de malta (MEA) y se preservaron en agua destilada estéril y en glicerol al 10% a temperatura ambiente.

2.2. Identificación morfológica

Se colocaron tres o cuatro tapones de micelio en un plato Petri con MEA, agar dextrosa Sabouraud (SDA), agar extracto de malta (PDA) y Agar V8.

Los platos se revisaban cada 2 días durante 30 días. En esta revisión se registraban medidas del diámetro, color, la esporulación, la presencia de exudados de la colonia y el espesor del medio de cultivo. Las muestras fueron montadas en un portaobjetos para observar al microscopio equipado con cámara

fotográfica marca Olympus. Para la identificación de las muestras se utilizaron las guías Soil and Seed Fungi (Watanabe, 2002), Géneros ilustrados de hongos imperfectos (Barnett y Hunter, 1972) y referencias publicadas en bases de datos públicas.

2.3. Identificación molecular

a. Obtención del material fúngico

Las cepas se inocularon en platos Petri de MEA, con períodos de incubación entre 7 a 10 días de crecimiento a 26,5 °C. Posteriormente, el micelio se transfiere asépticamente a un mortero refrigerado para triturarlo con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino; el material obtenido se almacenó a -80 °C.

b. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico (ADNg) se extrajo a partir de 125 mg de biomasa congelada como indican los protocolos de los Kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep, No. Catalogo D6005 (Zymo Research Corp, 2021) y el Kit Nucleo Spin Plant II No. Referencia 740770.50 (Macherey-Nagel, 2020). Se realizaron las extracciones de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se empleó homogeneizador TyssueLyser ID: 85300 de alta velocidad durante 10 minutos y homogeneizador Vórtex VWR No. Cat 444-1372 de baja velocidad durante 20 minutos. La calidad y concentración de DNAg se estimó en el espectrofotómetro NanoDrop UV Visible BioSpec Nano modelo SHIMADZU.

c. Amplificación por PCR a punto final

La identificación molecular se analizó mediante la secuencia de ADN fúngico de la región transcrita interna completa conservada ITS1, 5.8S, ITS2 que ha sido probado en numerosas cepas fúngicas (Raja et al; 2017).

Para la reacción en cadena de la polimerasa final (PCR de punto final) se utilizó cebadores que amplifican la región ITS descritos en el cuadro 2.2 (White et al, 1990).

Cuadro 2.2. Características de los cebadores utilizados en la PCR.

Gen	Tipo	Secuencias de cebadores	bp ¹	%GC ²	T dest. (°C)	T dest. Usada (°C)
ITS	ITS-1_for	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	19	63.2	59.5	52
	ITS-4_rev	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	20	45	52.1	52
ITS	ITS-5_for	5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	22	40.9	58.4	59
	ITS-4_rev	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	20	45	58.4	59

¹Pares de bases. ²Contenido de Guanina y Citosina. T dest: temperatura de desnaturalización.

Las amplificaciones se realizaron en el termociclador MyCycler™ BioRad.

Cada reacción se realizó con un volumen final de 25 µL con las siguientes concentraciones de reactivos: 4,0 µL de ADNg, 0,5 µL de dNTPs (10mM), 0,125 µL de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 0,6 µL/mL de cada cebador, 2,5µL de Buffer 10x PCR, 1,25 µL MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 15,225 µL de agua ultrapura estéril.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: ciclo de desnaturalización a 94 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 45 s, 52 °C por 30 s, elongación a 72 °C por 50 s, y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se evaluaron mediante la electroforesis en gel de agarosa al 0,9% a 60 V. Para confirmar el tamaño del fragmento se utilizó un marcador de 100 pb/amresco (VWR) al inicio del gel.

d. Secuenciación del ADN

La secuenciación de los productos amplificados se realizó mediante el servicio brindado por Psomagen, Inc. (Maryland, EE. UU.). Cada muestra se secuenció en ambas direcciones. Se revisó su contenido de guanina-citosina y los cromotogramas de las secuencias como criterio de control de calidad de las secuencias de ADN obtenidas de cada cebador. El programa BioEdit Sequences Alignment Editor (Edición 7.1) (North Carolina State University) se empleó para editar las secuencias ITS. Las secuencias de nucleótidos editadas o secuencias de trabajo se compararon con las secuencias de la base de datos pública de ADN (GenBank®) y se utilizó la Herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLASTn), se guardaron las secuencias que obtuvieron los mejores resultados con porcentajes de identidad >98% (Ver Anexo 1).

e. Análisis filogenético

Se obtuvieron 104 secuencias de ADN coincidentes de la base de datos de GenBank®. Las secuencias de trabajo y las secuencias coincidentes obtenidas en el BLAST se alinearon utilizando el Model test en el programa Molecular

Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 11.0.11 para el modelo evolutivo (Kumar *et al*, 2018). Las secuencias alineadas se utilizaron para construir árboles de filogenia con el método de caracteres de Máxima verosimilitud (ML), score = -6448.21, según el modelo Hasegawa-Kishino-Yano HKY+G. La fiabilidad del árbol se estimó mediante valores bootstrap ejecutados para 1000 iteraciones.

En la figura 2.2 se observa un repaso de los aspectos metodológicos empleados para la caracterización morfológica y molecular en las 15 cepas analizadas.

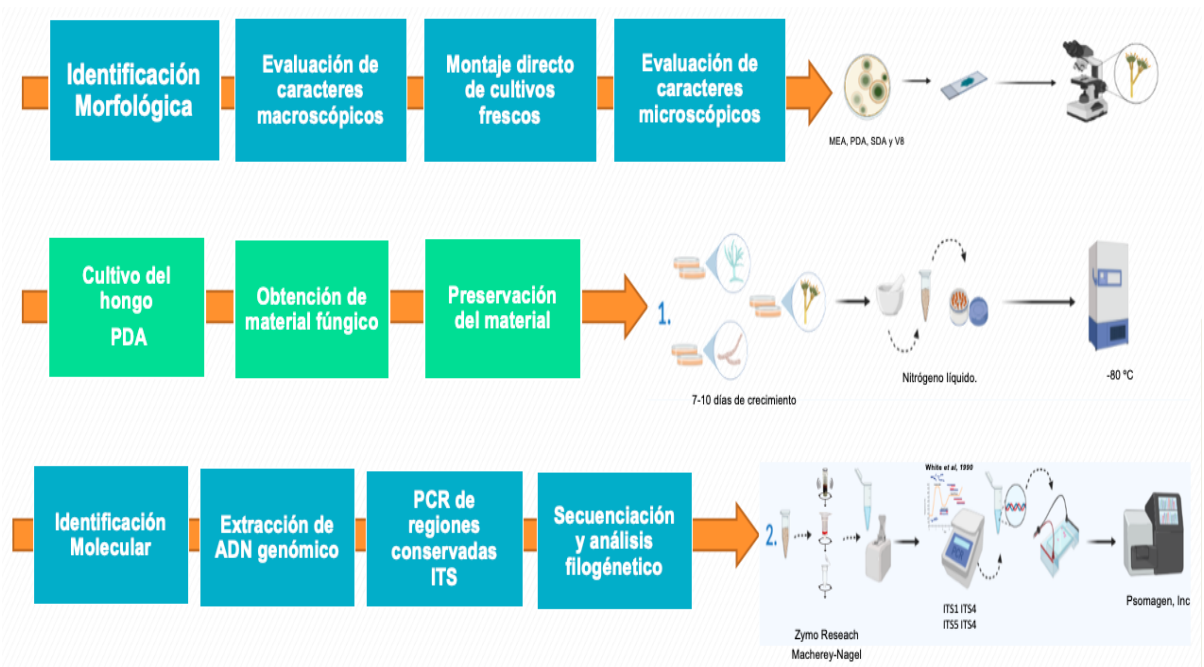


Figura 2.2. Aspectos metodológicos para la caracterización morfológica y molecular de las cepas estudiadas.

2.4. Desarrollo de perfiles de huellas dactilares químicas.

- a. Preparación de los medios de cultivos y condiciones de cultivo.

Para establecer los perfiles de huellas dactilares químicas se escogieron cuatro tiempos de crecimiento 7, 15, 22 y 30 días en tres medios de cultivos comerciales agar extracto de malta (MEA), agar extracto de patata (PDA) y agar dextrosa Sabouraud (SDA), la descripción completa de cada medio se detalla en el Cuadro 2.3.

Cuadro 2.3. Descripción de la composición de los medios de cultivos.

Medio de cultivo	Descripción	pH	Componentes	Cantidad (g)
MERCK GranuCult® Agar extracto de malta	Para la detección, el aislamiento y la enumeración, de levaduras, de mohos.	5.6 ± 0.2	Extracto de malta	30.0
			Digerido enzimático de harina de soya	3.0
			Agar-agar	15.0
BD. Difco™ Agar extracto de papa	Base de cultivo para levaduras y mohos.	5.6 ± 0.2	Fécula de patata por infusión	4.0
			Dextrosa	20.0
			Agar	15.0
BD. Difco™ Agar dextrosa Sabouraud	Cultivo de hongos y microorganismos aciduricos.	5.6 ± 0.2	Digerido péptico de tejido animal	5.0
			Digerido pancreático de caseína	5.0
			Dextrosa	40.0
			Agar	15.0

Las cepas se inocularon mediante el método de saturación recomendado por Hernández (2015). Se utilizaron etiquetados de colores en los platos Petri para

evitar confusiones por la coloración de los medios de cultivo (MEA-Naranja; PDA-Rojo; SDA-Azul). Las condiciones dentro de la cámara de incubación estuvieron a 26 °C con iluminación permanente.

Al cumplirse los tiempos de crecimiento se procedió a retirar el medio con micelio de los platos con una espátula estéril y se almacenó en trozos pequeños dentro de bolsas plásticas estériles a -20 °C hasta realizar la extracción orgánica.

De la misma forma se procesaron los controles de los medios de cultivo.

b. Obtención de extracción orgánica

Este primer paso, se basó en la metodología recomendada por Aguilar-Pérez *et al* (2020) para hongos endófitos con algunas variaciones descritas a continuación:

1. La muestra congelada se dejó reposar durante 20 minutos en un vaso químico de 1 L agregando 500 mL de acetato de etilo (EtOAc).
2. La muestra se molió utilizando un Polytron a 8000 rpm, para evitar el aumento de temperatura por agitación, el vaso de químico se colocó dentro de un baño de hielo.
3. Se filtró el homogenizado al vacío.
4. El filtrado se colocó en un embudo de separación y se obtuvo la fase orgánica, la fase acuosa se extrajo dos veces más, cada una con 100 mL de acetato de etilo, para maximizar la separación.
5. Las fases orgánicas se combinan y se introducen en un balón de evaporación para eliminar el disolvente EtOAc a presión reducida.

6. El extracto seco se disuelve en metanol (MeOH) y se transfiere a viales de vidrio color ámbar, se evapora el MeOH a presión reducida y se pesan los viales para determinar la cantidad en miligramos de cada extracto.

El mismo método de extracción orgánica fue aplicado en los medios de cultivo estériles (MEA, PDA y SDA).

A partir del extracto orgánico, se llevó a cabo la estandarización del protocolo de identificación aplicado a cada hongo estudiado.

- c. Análisis de extractos orgánicos por UPLC-ESI-MS.

Los análisis de UPLC-ESI-MS se llevaron a cabo en el sistema UPLC® modelo Waters Acquity H-Class (Waters Co.) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo modelo Xevo® TQD (Waters Co.) Las mediciones de espectrometría de masas se realizaron con fuentes de ionización por electropulverización (ESI) en modos positivo y negativo. En el cuadro 2.4 se detalla el set estándar de los parámetros del espectro de masas para ambas ionizaciones.

Cuadro 2.4. Parámetros del espectrómetro de masas.

Parámetros	ESI Modo Positivo	ESI Modo Negativo
Voltaje Capilar (kV)	3.5	2.5
Voltaje en el cono (V)	30	35
Temperatura de la Fuente (°C)	150	150
Temperatura del Gas desolvatación (°C)	450	350
Flujo del gas desolvatación (L/h)	600	400
Flujo del gas en el cono (L/h)	20	50
Energía de colisión (V)	4	3

Los análisis cromatográficos se realizaron con la columna de fase reversa Waters Co. modelo Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 µm (2,1 x 100 mm). En el siguiente cuadro 2.5 se detallan los tiempos y los eluyentes utilizados en la condición cromatográfica seleccionada para las muestras y los blancos.

Cuadro 2.5. Condición cromatográfica seleccionada para los análisis UPLC-ESI-MS.

Parámetros		Eluyentes (%)	
Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Agua Grado MS (A)	Acetonitrilo (B)
0	0,200	30	70
7,50	0,200	0	100
8,50	0,200	0	100
9,50	0,200	30	70
10,00	0,200	30	70

Para cada muestra analizada, el eluyente acetonitrilo sube desde 70% hasta 100% en 7,50 minutos, se mantiene el porcentaje hasta el minuto 9,50; luego alcanza la concentración inicial (70%) en 0,50 min.

La columna cromatográfica se mantuvo a 25 °C durante toda la corrida experimental, mientras que, el ultravioleta estuvo leyendo desde 190 a 400 nm de longitud de onda.

Previo al análisis de cada muestra en el UPLC-ESI-MS se consideraron los siguientes pasos:

- Los extractos orgánicos se disolvieron en MeOH grado LC-MS para preparar soluciones de 1,0 mg/mL en viales ámbar de grado LC-MS.
- Las soluciones se filtraron en filtros de membrana de PTFE Millex® hidrofílicos de 0,20 µL.
- Se colocan los viales en la gradilla del equipo a 10 °C.
- Se programa una alícuota de 5 µL de volumen de inyección del filtrado para los análisis cromatográficos.

En la Figura 2.3 se repasan los aspectos metodológicos implicados en la obtención de los perfiles de huellas dactilar química.

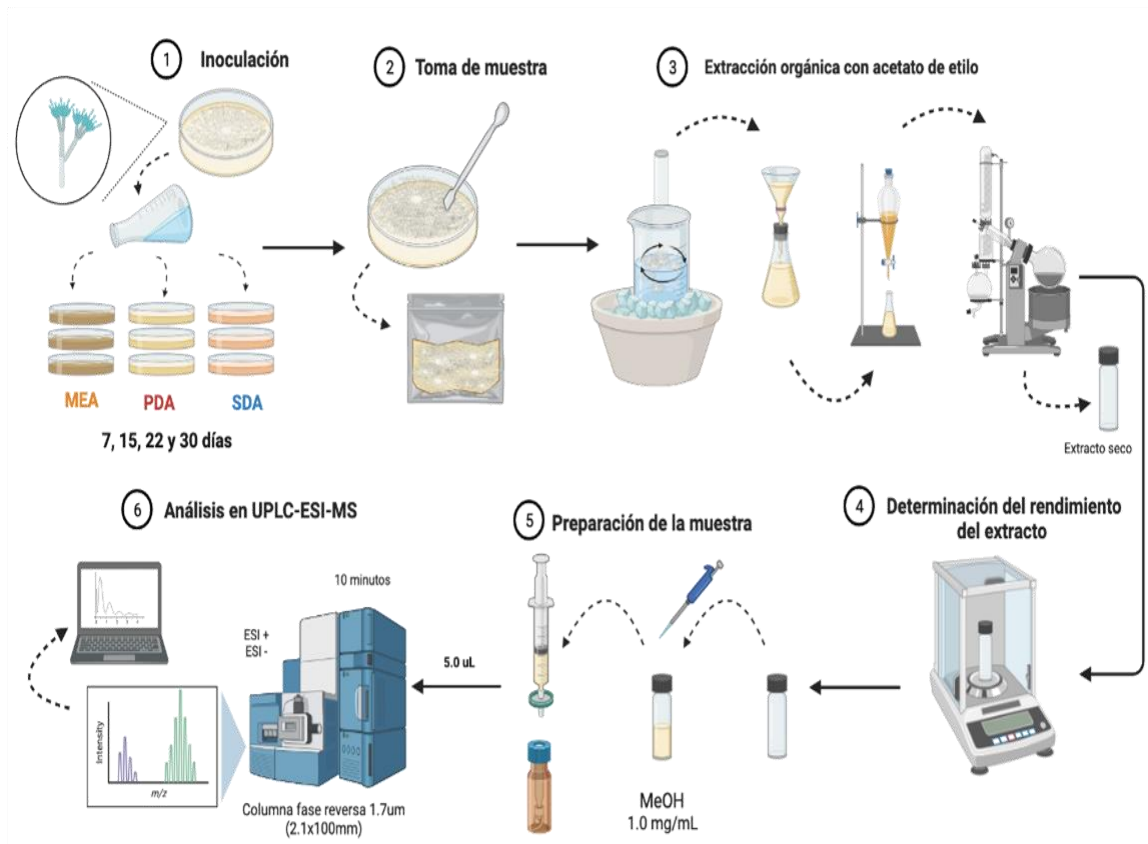
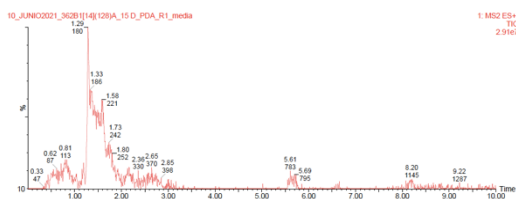


Figura 2.3. Flujo de trabajo para la obtención de los espectros de masas a través del análisis de UPLC-ESI-MS.

2.5. Procesamiento de espectros de masas.

La data de trabajo se adquirió a través del software MassLynx versión 4.2 (Waters Co). Los espectros de masa (Huella dactilar química de la muestra) de los hongos se adquirieron de acuerdo con el cromatograma generado por el detector de matriz de fotodiodos (PDA por sus siglas en ingles) en una longitud de onda de 254 nm (Ver figura 2.4).

Cromatograma de PDA (TIC)



Espectro de Masa (m/z)

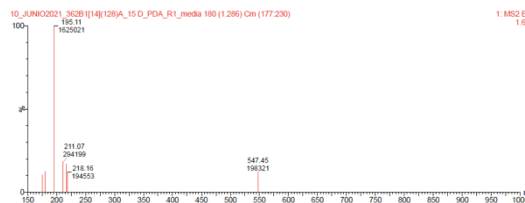


Figura 2.4. Espectro de masa y cromatograma TIC de la cepa 326B1[14](128)A.
A los 15 días de crecimiento en el medio de cultivo PDA.

Los espectros de masa se colectaron en los modos ESI positivo y negativo. Sin embargo, los espectros de masa ESI- solo fueron tomados en cuenta para confirmar los iones cuasimoleculares encontrados en ESI+.

Para analizar los perfiles de huella dactilar química se determinaron los siguientes criterios de inclusión:

- Seleccionar los picos superiores al 10% de la intensidad relativa del espectro de masa.
- Rango de visualización de la relación masa-carga programada fue desde 150 a 1000 m/z.

Los iones cuasimoleculares detectados se procesaron de forma manual, lo que permitió la selección de posibles aductos, identificación de picos de blancos, comportamiento de los picos e identificación de iones marcadores potenciales.

Para identificar los iones cuasimoleculares y comparar los espectros de masas se utilizaron las bases de datos de MassBank (<https://massbank.eu>), PubChem de

NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) y referencias bibliográficas con registro de las masas molecular, estructuras de compuestos y listados de metabolitos de perfiles químicos.

2.6. Análisis estadístico

Los procesamientos estadísticos se analizaron con el lenguaje de programación R que se ejecutaron en RStudio (versión 4.1.2-2022). Se emplearon tablas de contingencia donde se analizaron asociaciones entre varias variables. Para determinar si existe alguna diferencia entre las medias de los diferentes medios de cultivos y tiempos de crecimiento se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización morfológica y molecular de los hongos endófitos.

Las 15 cepas de hongos se lograron reactivar de forma satisfactoria con una diversidad amplia de morfologías fúngicas. El 75% de las muestras presentaron una tasa de crecimiento lento y el otro 25% obtuvo una tasa de crecimiento entre media y rápida (Guigón-López *et al*, 2010).

En la figura 3.1 se observan características macroscópicas como presencia de exudados (D), cambios en la coloración del medio de cultivo (B, F), colonias con micelios aéreos, algodonosos y polvorientos (A, E, D), mientras en las características microscópicas se observaron estructuras de identificación como hifas tabicadas (G, J), conidióforos racemosos (K) y apresorios (I), importantes para la identificación taxonómica de los hongos.

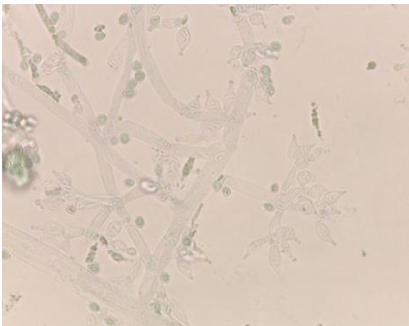
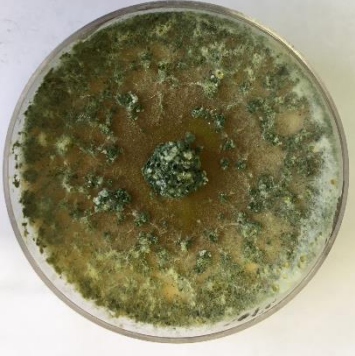
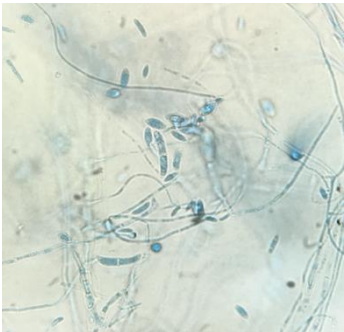
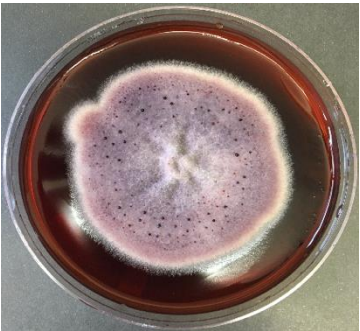
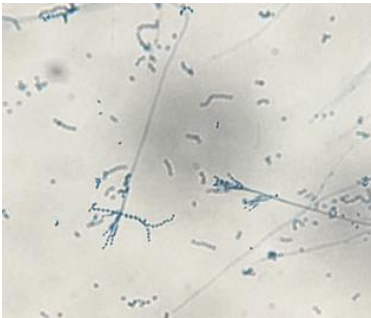
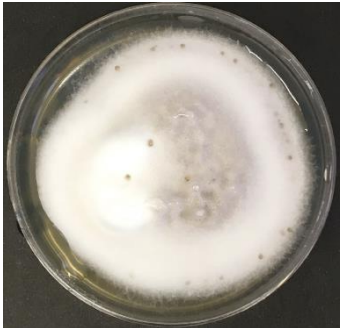
Los resultados encontrados coinciden con los datos publicados por Arnold (2007) esta autora expresa que los endófitos foliares en los trópicos están dominados por diferentes linajes de Ascomycota. Estos resultados también guardan relación con otra publicación de Arnold *et al* (2000), sobre la hiperdiversidad de los hongos endófitos que explica la dificultad de asignar especies verdaderas de acuerdo a la base morfológica de las esporas.



Figura 3.1. Características macro y microscópicas de crecimiento encontradas en diferentes cepas estudiadas. A-F) Vista superior en PDA. G) Crecimiento apical H) Ascosporas I) Apresorios J) Hifas tabicadas K) Conidióforos racemosos.

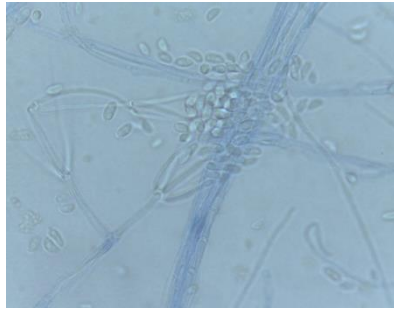
Un total de nueve cepas fueron identificadas por estructuras morfológicas presentes en los montajes directos al microscopio. Estas cepas se clasificaron en seis géneros que se encuentran descritos en el cuadro (3.1) pertenecientes al phylum Ascomycota, mientras que, las seis cepas restantes solo se encontraron conidios libres y micelio estéril, no fue suficiente para lograr una adecuada identificación.

Cuadro 3.1. Características de las cepas de hongos caracterizadas por morfología.

ID Muestra	FOTO MICRO	FOTO MACRO
<p>F0649</p> <p>F3618</p>		
<p><i>Trichoderma sp.</i> Los hongos del género <i>Trichoderma</i> tienen esporas de color verde. (Barnett y Hunter, 1972)</p>		
<p>F5405</p>		
<p><i>Fusarium sp.</i> Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados. (Leslie y Summerell, 2006)</p>		
<p>F6338</p>		
<p><i>Purpureocillium sp.</i> Ramas verticiladas con verticilos de dos a cuatro filoides, con conidios en cadenas (Luangsaard, 2011).</p>		

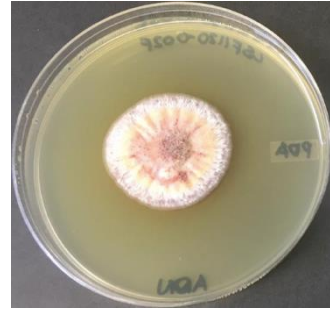
F3607

F3621



***Penicillium* sp.**

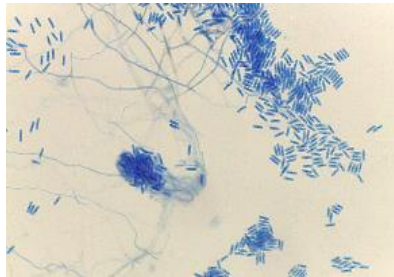
Conidios globosos a sub globoso, lisas. Conidióforos ramificados (Houbraken *et al*, 2010).



Colonia con márgenes concéntricos de color naranja y amarillo en PDA.

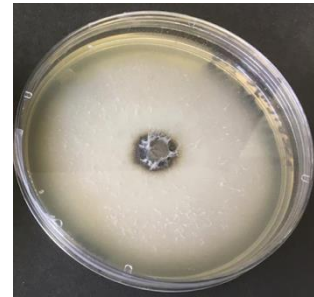
F0769-A

F0769-B



***Colletotrichum* sp.**

Las ascosporas son curvadas, redondeadas. Apresorios visibles. (Weir *et al*, 2012)



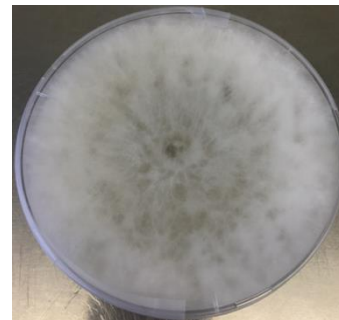
Colonia plana, dispersa y aterciopelada. Con micelio entre superficial y aéreo.

F6019



***Lasiodiplodia* sp.**

Presencia de conidios inmaduras, color oscuro (Picos-Muñoz *et al*, 2015).



Colonia con micelio aéreo y crecimiento rápido. Inicialmente son colonias blancas que se torna a gris hasta adquirir un color más oscuro.

Los resultados de la identificación molecular confirmaron los datos encontrados en la identificación morfológica. Dada la sensibilidad de la herramienta molecular, se completó la identificación de las 15 cepas fúngicas (Ver cuadro 3.3). El 36% de las muestras amplificaron con los cebadores ITS 5 - ITS 4 y el 64% amplificó con los cebadores ITS 1 – ITS 4.

En la figura 3.2. se observan los resultados de los productos PCR en la electroforesis. Las celdas del uno al quince corresponden a las cepas de hongos endófitos empleadas en este estudio: Sarigua (1-4), Remedios (5-7), Cerro Hoya (8-10) y Santa Fe (11-15). Todas las cepas mostraron el patrón de banda correspondiente al peso 600 pb.

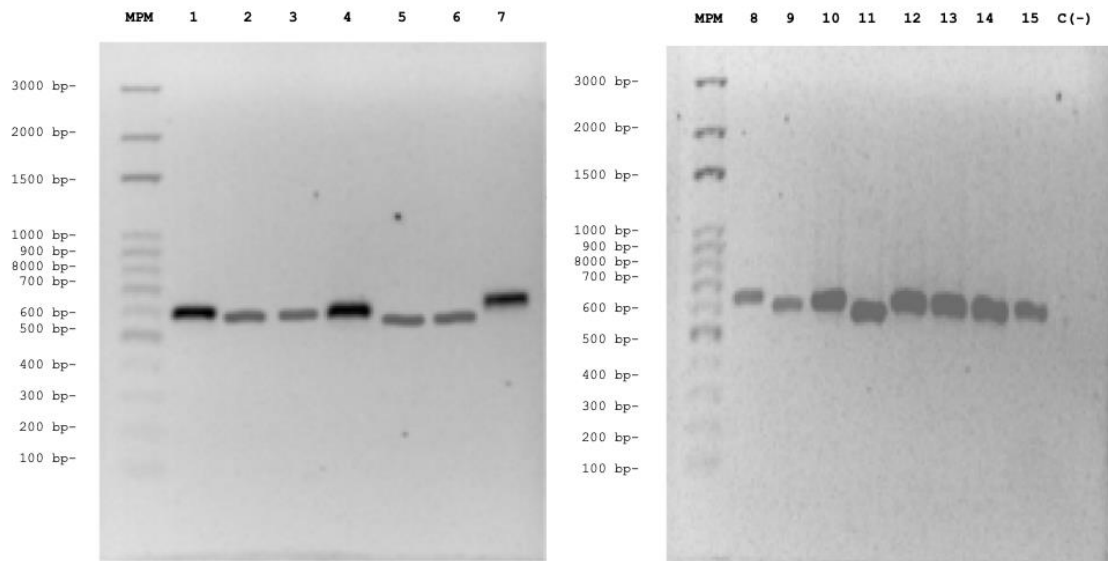


Figura 3.2. Resultados de la electroforesis en el gel de agarosa al 0.9%. Se utilizó el Buffer TBE 1X después de realizar la PCR de tiempo final para comprobar los amplificadas. Las celdas del 1 al 15 representan los amplicones ITS (600 pb). La celda 13 representa el control negativo de la PCR. El MPM es el marcador de peso molecular de 100 pb.

Se enviaron 26 productos PCR a secuenciar y se obtuvieron 48 secuencias de ADN. Sin embargo, solo se escogieron las secuencias con los mejores porcentajes de guanina-citosina para realizar los BLAST (Seifert *et al*, 1995). El cuadro 3.2. contiene el resultado de las secuencias editadas generadas por las múltiples alineaciones de secuencia con Clustal W realizadas manualmente con Bioedit y MEGA.

De igual forma, se utilizaron para proponer la identificación taxonómica de las 15 cepas analizadas (Ver cuadro 3.3). Y en la figura 3.3 se observa las relaciones evolutivas entre las cepas estudiadas.

Cuadro 3.2. Secuencias y datos de aislamiento de las cepas utilizadas para el análisis filogenético.

Data de las cepas		Datos de Secuencia	
Zona	ID Muestra	Secuencia editada	pb
Sarigua	F0619	GAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCGGGCTTCGGCTCGACTCTCCACCCCTTTGTGAACGTACCTCTGTGTGCTTGGCGGCTCCGGCCGCAAGGACCTCCAACTCCA GTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC ATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCTGTTCGAGCGTCATTAAACCCCTCAAGCTCGCTTGGAAATGGGCACCGTCTCACTGCGGACGCGCTCGAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTACGCCCTCAAGCTAGTAGAATAC ACCTCGCTTTGGAGTGGTTGGCGTCGCCCGCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAG	564
	F0728	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTGCTGGAACGCGCCCGCGCACCCAGAAAACCCCTTTGTGAACCTTATACCTACTGTTGCTCGCGCAGCGCCGGCTTTTTTGGAAAAAGCCCTTGAGACAGGGAGCAGCCCGCGG CGGCCAACCAAACTCTGTTTTCTATAGTGAATCTCTGAGTAAAAATAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGGAGGGCATGCTGTTCGAGCGTCATTCAACCCCTCAAGCTCGCTTGGTATGATGGGCACTGCCTGTAAGAAAGCAGGCCCTGAAATCTAGTGGCGAGCTCGCCAGGACCCC GAGCGTAGTAGTTACATCTCGCTCGAAGGCCCTGGCGGTGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTCTGAAAAATTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	579
	F0891	GCGTAAACAAGTCTCCGTTGGTGAACGAGCGGAGGGATCATTGCTGGAACGCGCCCGCGCACCCAGAAAACCCCTTTGTGAACCTTATACCTACTGTTGCCTCGGCGCAGGCGCGCTTTTTTGGAAAAAGCCCTTGAGACAGGGAA GCAGCCCGCGCGGCCAACCAAACTCTGTTTTCTATAGTGAATCTCTGAGTAAAAATAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCGAAT TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGGAGGGCATGCTGTTCGAGCGTCATTCAACCCCTCAAGCTCGCTTGGTATGATGGGCACTGCCTGTAAGAAAGCAGGCCCTGAAATCTAGTGGCGAGCT CGCCAGGACCCCGAGCGTAGTAGTTACATCTCGCTCGAAGGCCCTGGCGGTGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTCTGAAAAATTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	580
	F0871	AACGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGTCTCCGTTGGTGAACGAGCGGAGGGATCATTGCTGGAACGCGCCCGCGCACCCAGAAAACCCCTTTGTGAACCTTATACCTACTGTTGCCTCGGCGCAGGCGCGCTTTTTTGGAAAAAGCCCTTGAGACAGGGAA CGTCCCGGAGGAGCAGGCACGCCCGCGGCAAGTAACTCTGTTTTTAACTACTGAACTCTGAGAAAAAACAATAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA TGTGAATTGCGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCGGTATTCGGGAGGGCATGCTGTTCGAGCGTCATTCAACCCCTCAAGCTCGCTTGGTATGATGGGCACTGCCTGTAAGAAAGCAGGCCCTGAAATCTAGTGGCGAGCT AAATCTAGTGGCGAGCTCGCCAGGACCCCGAGCGTAGTAGTTAAACCCCTCGCTCGAAGGCCCTGGCGGTGCCCTGCCGTTAAACCCCGACTCTGTGAAAAATTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAATCATATC AATGGCCGGAGGAAGGGGGTCTCGGTGCTCAGCATTGGTCGGTCTA	644
	F0769	CGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTATCGAGTTACCACTCTATAACCCCTTTGTGAACATACCTACATGTTGCTTCGGCGGTGCGCCCGCGGCCCGCGCTCACGCGGGGCTCCGCGGAGGATAACCAAACTGTGATT TAACGAGCTTTCTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCTGTTCGAGCGTCATTCAACCCCTCAAGCACTGCTTGGTGTGGGGCTCTACGGTTGACGTAGGCCCCCAAACTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCTAGTAACCTTTTGTCT TCGCACTGGGATTGCGAGGGATTCTAGCCGTTAAACCCCAATTTTCTAAAGGTGACCTCGGATCAGGTA	517
Remedios	F0769 A	CCCTTTGTACTACATAGTTGCTTCGGCGGTGCGCCCGCGGCCCGCGGCGCTCACGCGGGGCTCCGCGGAGGATAACCAAACTGTGATTAAACGACCTTTCTTCTGAGTGGCACAAGCCAATAATCAAACTTTTAAACA ACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCATCCAAGTGGGATAAGTAATGTGAATTGCGAATTCAGTGAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGTATGCTGTTCGAGCGTCATTCAAC CCTCAAGCACTGCTTGGTGTGGGGCTACGGTTGACGTAGGCCCCCAAACTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTATTAACCTTTGCTCGCACTGGGATTGCGAGGGATTCTAGCCGTTAAACCCCAATTTTCTAAA GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAACCATATCAATAAGCGGAGGAACA	512
	F0649	ACAAGGTCTCCGTTGGTGAACGAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTTACAACCTCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGAC CAACCAAACTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTCTCGGCGCCTCTGATAGCGGTTTGGAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT AAGTAATGTGAATTGCGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTCCGAGCGTCATTCAACCCCTCAAGCCCTCGGCGGGTGGCGGTTGGGATCGGCCCTCCCTT AGCGGGTGGCGCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCTCGCAGTAGTTGACACTCGCATCGGAGCGCGCGCTCCACAGCCGTTAAACCCCAACTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCGCTGAACCTAAGCATAT	613

		CGTAGGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAACCCAATGTGAACGTTACCAACTGTTGCCTCGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTGCGCAGCCCCGACCAAGGCGCCCGGGAGGACCAACCAAAA CTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTCTCGGCGCCTCTGAGGCGTTTCAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGCGATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGT GAATTCGAGAATCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCGCCAGTATTCTGCGGGCATGCCTGTCGAGCGCTCATTTCAACCTCGAACCCCTCGGGGGTTCGCGGTTGGGATCGGCCCTCCCTAGCGGGTGG CCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCTCGCGAGTAGTTTGACACTCGCATCGGAGCGCGCGCTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA		
	F3618			619
		CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGCCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTTTATCGTACCTTGTGCTTCGCGGGGCCCTCACGGCCCGGGGGGCATCCGCCCGGGCCCGCCCGCC GAAGACACCATTGAACCTGTCTGAAGATTGCAGTATGAGCGATTAGCTAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGAGAAATGCGATACGTAATGGAATTGCAAAATCAGTGAATCA TCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGTTATCCGGGGGCATGCCTGTCGAGCGCTATTGCTGCCCTCAAGCAGCGCTGTGTGTTGGGCCCGCCCGGGTTCGCGGGGGCGGGCCGAAAGGCAGCGCGGCCACCG CGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCCCGCGGACCCCAATCAATCTATCCAGGTGACCTCGGATCA		543
Santa Fe	F3621			
		CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGAGGCCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTTTATTGTAACCTTGTGCTTCGCGAGGCCCGCTCACGGCCCGGGGGGCCTCTGCCCGGGCCCGCCCTGCG GAAGACACCCTTGAACGCTGTGAAGTTTGCAGTCTGAGCGAATAGCAAAATTTGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGGAATTGCAAAATCAGTGAATCA TCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGTTATCCGGGGGCATGCCTGTCGAGCGCTATTGCTGCCCTCAAGCAGCGCTGTGTGTTGGGCCCGCCCGGGTTCGCGGGGGCGGGCCGAAAGGCAGCGCGGCCACCG TCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCCCGCGGACCCCAATCAATCTATCCAGGTGACCTCGGATCA		561
	F3607			
		CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGAGGCCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTTTATTGTAACCTTGTGCTTCGCGAGGCCCGCTCACGGCCCGGGGGGCCTCTGCCCGGGCCCGCCCTGCG GAAGACACCCTTGAACGCTGTGAAGTTTGCAGTCTGAGCGAATAGCAAAATTTGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGGAATTGCAAAATCAGTGAATCA TCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGTTATCCGGGGGCATGCCTGTCGAGCGCTATTGCTGCCCTCAAGCAGCGCTGTGTGTTGGGCCCGCCCGGGTTCGCGGGGGCGGGCCGAAAGGCAGCGCGGCCACCGTG TCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCCCTGCCACCCCTCATCATCTTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCATGTATGATACCCGCTGA		573
	F6322			
		GAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTATAGAGTTTTCTAACTCCCAACCCATGTGAACCTACCTTTTGTGCTTCGCGCAGAAGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCAATAA CTCTTGTATTTTATGTAATCTGAGCGTCTATTTTAAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGCGATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGGAATTGCAAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC ACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGCATGCCTGTTGAGCGCTATTCAACCTTAAAGCCTAGCTTAGTGTGGGAATCTACTTCTTTGAGTTGAGTCTCGAAATACAACGGCGGATTTGTAGTATCTCTGAGCGTAGTAATTTT TTCTCGCTTTTGTAGGTGCTATAACTCCAGCCGCTAAACCCCAATTTTTTTGTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA		361
	F6338			
		CTGTGAACCTTACCTCAGTTGCCTCGCGGGAACGCCCGCCGCTGCCCGCGCGCGCGGACCCAGCGCCCGCCGAGGGACCCCAATTTCTTTCGATTACGCCAGCGGGCGGAATTTCTTCTGAGTTGCACAAG CAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGGAATTGCAAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGAGCCCGCCAGCATTTCTGGCG GGCATGCCTGTCCAGCGCTATTTCAACCTCGAGCCCGGGGGCCTCGGTGTTGGGGAC		601
	F3476			
		TGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTATAGAGTTTTCTAACTCCCAACCCATGTGAACCTACCTTTTGTGCTTCGCGCAGAAGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCAATA ACTCTTGTATTTATGTAATCTGAGCGTCTATTTTAAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGGAATTGCAAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC CACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGCATGCCTGTTGAGCGCTATTCAACCTTAAAGCCTAGCTTAGTGTGGGAATCTACTTCTTTGAGTTGAGTCTCGAAATACAACGGCGGATTTGTAGTATCTCTGAGCGTAGTAATTT TTTTCTCGCTTTTGTAGGTGCTATAACTCCAGCCGCTAAACCCCAATTTTTTTGTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGACTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA		568
Cerro Hoya	F5376			
		GTAAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTATAGAGTTTTCTAACTCCCAACCCATGTGAACCTACCTTTTGTGCTTCGCGCAGAAGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCAATAACTC TTGTTATTTATGTAATCTGAGCGTCTATTTTAAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGGAATTGCAAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA TTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGCATGCCTGTTGAGCGCTATTCAACCTTAAAGCCTAGCTTAGTGTGGGAATCTACTTCTTTGAGTTGAGTCTCGAAATACAACGGCGGATTTGTAGTATCTCTGAGCGTAGTAATTTTTT CTCGCTTTTGTAGGTGCTATAACTCCAGCCGCTAAACCCCAATTTTTTTGTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAG		594
	F5405			
		GAAGTAAAAATCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATTCAACTCATCAACCTGTGAACATACCTAACCCTGCTTCGCGGGAACAGACGGCCCGTGAACCGGGCCGCCCGCCAGAGG ACCCCTAACCATCTGTTTTATGTGTTCTCTGAGTAAAAACAGCAATAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTGTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGGAATTGCAAAATCAGTGAATCATCGA ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGCTATTCAACCTCAGGCCCGGGCGCTGCGGTTGGGATCGCGGAGGCCCCCTGTGGGCACACGCCCTCCCAAAATACAGTGGCGGT CCCGCCGAGCTTCCATCGCGTAGTAGCTAACACCTCGCGACTGGAGAGCGCGCGGCCACCGCTAAACACCCAACCTCTTGAAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAAAAACGGGAGGAA		

Cuadro 3.3. Identificación taxonómica propuesta para las cepas de hongo endófitos utilizadas en este estudio.

Data de las cepas		Taxonomía propuesta				
Zona	ID Muestra	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
Sarigua	F0619	Ascomycota	Dothideomycete	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae	<i>Lasiodiplodia</i>
	F0728	Ascomycota	Sordariomycete	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>
	F0891	Ascomycota	Sordariomycete	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>
	F0871	Ascomycota	Sordariomycete	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>
Remedios	F0769 A	Ascomycota	Sordariomycete	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>
	F0769 B	Ascomycota	Sordariomycete	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>
	F0649	Ascomycota	Sordariomycete	Hipocreales	Hipocreaceae	<i>Trichoderma</i>
Santa Fe	F3618	Ascomycota	Sordariomycete	Hipocreales	Hipocreaceae	<i>Trichoderma</i>
	F3621	Ascomycota	Eurotiomycete	Eurotiales	Aspergilaceae	<i>Penicillium</i>
	F3607	Ascomycota	Eurotiomycete	Eurotiales	Aspergilaceae	<i>Penicillium</i>
	F6322	Ascomycota	Sordariomycete	Xylariales	Sporocadaceae	<i>Pestalotiopsis</i>
	F6338	Ascomycota	Sordariomycete	Hipocreales	Ophiocordycipitaceae	<i>Purpureocillium</i>
Cerro Hoya	F3476	Ascomycota	Sordariomycete	Xylariales	Sporocadaceae	<i>Pestalotiopsis</i>
	F5376	Ascomycota	Sordariomycete	Xylariales	Sporocadaceae	<i>Pestalotiopsis</i>
	F5405	Ascomycota	Sordariomycete	Hipocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>

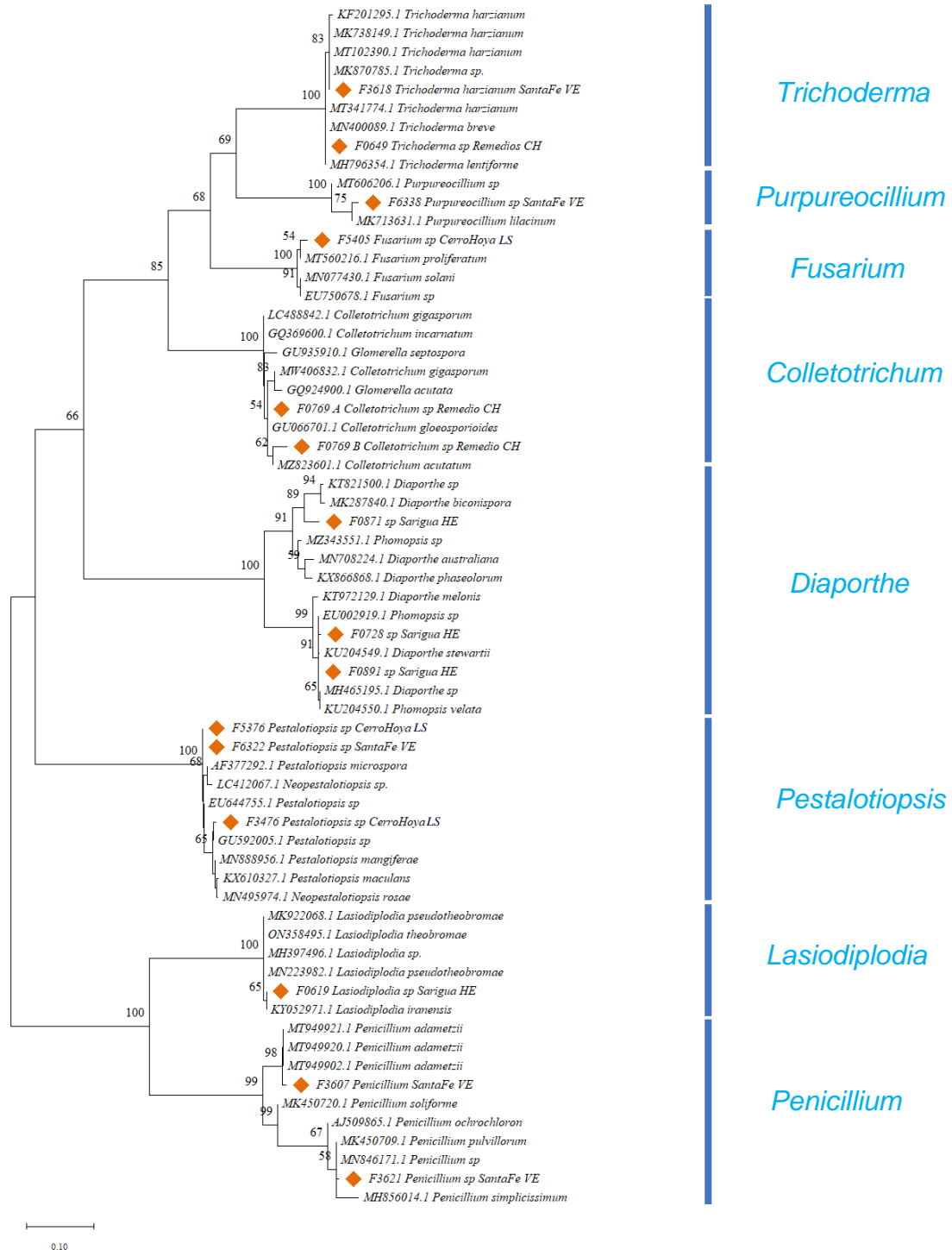


Figura 3.3. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS de las cepas estudiada basada en el análisis de Máxima Parsimonia.

El Análisis filogenético usando el método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood, ML score = -6448.21) estimado a partir de secuencias del locus ITS para las especies en estudio. Los valores de cada nodo representan el porcentaje de los árboles computados ("bootstrap") basado en 1000 repeticiones de ensamblaje al azar. Los rombos en naranja indican las secuencias obtenidas de las cepas en este estudio.

Por medio de la región ITS se confirmó la identidad de las cepas en 8 géneros, cada rama presenta más del 80%, quiere decir que esta identificación es fiable y concuerda con los 8 géneros del phylum Ascomycota (Ver Figura 3.3).

Las identificaciones morfológicas de las especies de los géneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Lasiodiplodia* y *Purpureocillium* fueron confirmadas por los análisis moleculares de las secuencias del gen ITS (Ver Anexo 3).

Estos resultados guardan relación con lo que sostiene los investigadores Yarh *et al* (2016), Raja *et al* (2017), Menolli y Sánchez-García (2020) que proponen el empleo de la región ITS para la identificación a nivel mínimo de género hasta especie. Además, se refuerza la teoría explicada por Seifert *et al* (1995); Tekpinar y Kalmer (2019) que defienden la tipificación de los hongos por medio de la combinación de diferentes regiones moleculares para obtener una identificación del hongo más confiable.

3.2. Determinación de perfiles de huellas químicas.

De las 15 cepas seleccionadas se obtuvieron 360 extractos orgánicos. Se analizaron un total de 720 espectros de masas. Por cada hongo analizado, se obtuvieron 48 espectros de masas bajo el modo de ionización por electropulverización ESI + y ESI-. Cada espectro de masa analizado tenía aproximadamente entre 15 a 20 picos de masa que conformaba el perfil químico para cada condición de cultivo.

Como indica la literatura citada por El-Elimat *et al* (2013) y por Gupta *et al* (2021), al establecer un protocolo de identificación se deben determinar los posibles quimiomarcadores. En los resultados se resaltan los quimiomarcadores determinados en ciertas cepas y se muestran datos importantes en la obtención de los perfiles de huella química.

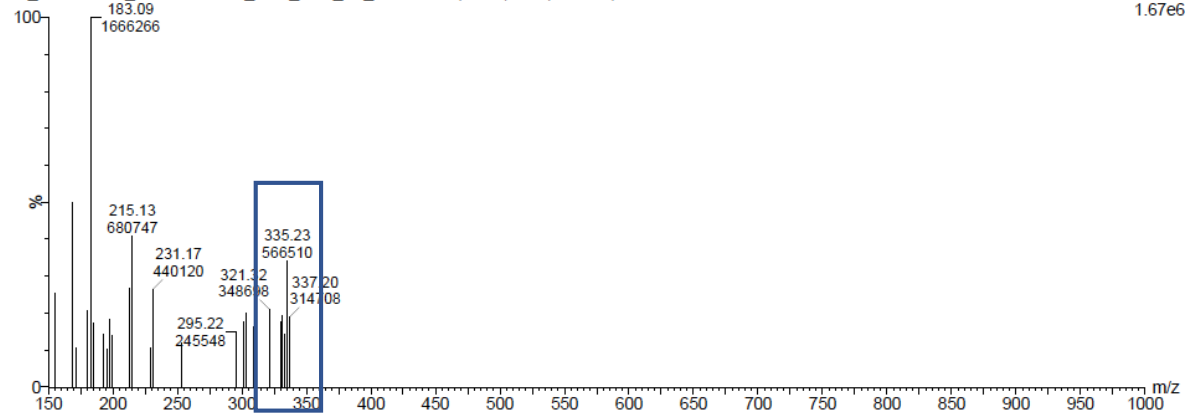
En la figura 3.4., se observa la quimiodiversidad de tres cepas de *Pestalotiopsis* (LSF1124-003F, 650B12, 650B1) a los 15 días de crecimiento en el medio SDA. Se indica el ion 335 [M+H] que a pesar de tener distintos porcentajes de intensidad se determina como quimiomarcador similar del género, ya que se repite en las tres cepas en las mismas condiciones de cultivo.

También se determinan los iones 314 [M+H], 353 [M+H] y 183 [M+H], como quimiomarcadores propios de la huella química de cada cepa. Por lo tanto, se confirma en este caso que, existe un perfil de huella dactilar con quimiomarcadores generales y específicos por cada cepa.

Estos resultados guardan relación con lo que sostienen Frisvad (1986), Smedsgard y Nielsen (2005), Hao *et al* (2015), Frisvad (2015), Xu *et al* (2020) en el desarrollo de los perfiles de masas que permite identificar compuestos con características diferenciadas o semejantes entre cepas.

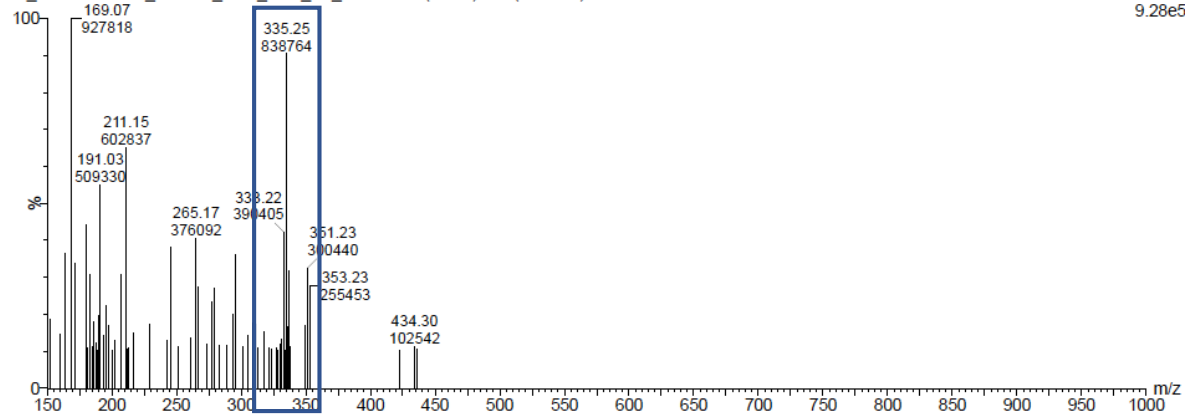
28_JUNIO2021_LSF1124-003F_15 D_SDA_R1_media 192 (1.372) Cm (170:223)

1: MS2 ES+
1.67e6



09_AGOSTO2021_650B12_15 D_SDA_R1_media 178 (1.272) Cm (169:222)

1: MS2 ES+
9.28e5



17_AGOSTO2021_650B1_15 D_SDA_R1_media 197 (1.408) Cm (172:222)

1: MS2 ES+
4.66e5

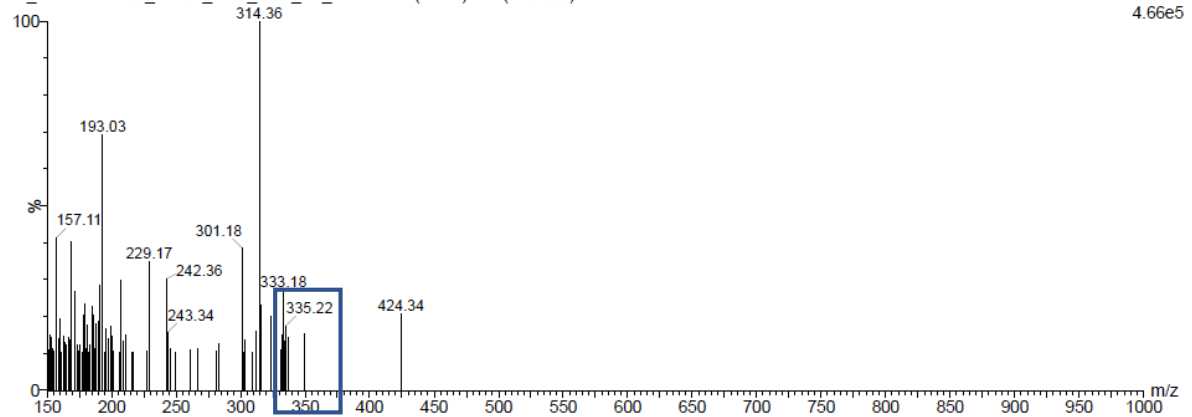


Figura 3.4. Espectros de masa de tres cepas de *Pestalotiopsis* sp. a los 15 días de crecimiento en SDA. Ion cuasimolecular identificado en azul está presente en los tres medios empleados.

Otro hallazgo interesante, se observa en los siguientes espectros de masas (Ver Figura 3.5) que muestran la presencia de los iones compartidos en géneros completamente distintos. El ion 265 [M+H] se encuentra presente en los géneros de *Purpureocillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*. Este ion se ha identificado como el posible metabolito ácido abscísico (264.32 g/mol). Este ion cuasimolecular no tuvo un patrón de repetición asociado a un determinado tiempo de crecimiento o medio de cultivo (Ver la Figura 3.5).

Según Izquierdo-Bueno *et al* (2018) el ácido abscísico es un metabolito importante para los procesos de desarrollo y respuesta adaptativa al estrés abiótico y biótico. Este resultado nos confirma que los hongos endófitos pueden seguir produciendo metabolitos asociados a la relación simbiótica con su planta hospedera sin la necesidad de estar presente en ellos.

Los autores Strobel (2003) y Shukla *et al* (2014) publican que la producción de metabolitos secundarios está afectada directamente por la relación equilibrada entre el hospedero y el hongo, pero comprender esta relación aún sigue siendo difícil de replicar dentro de ensayos in vitro de laboratorio.

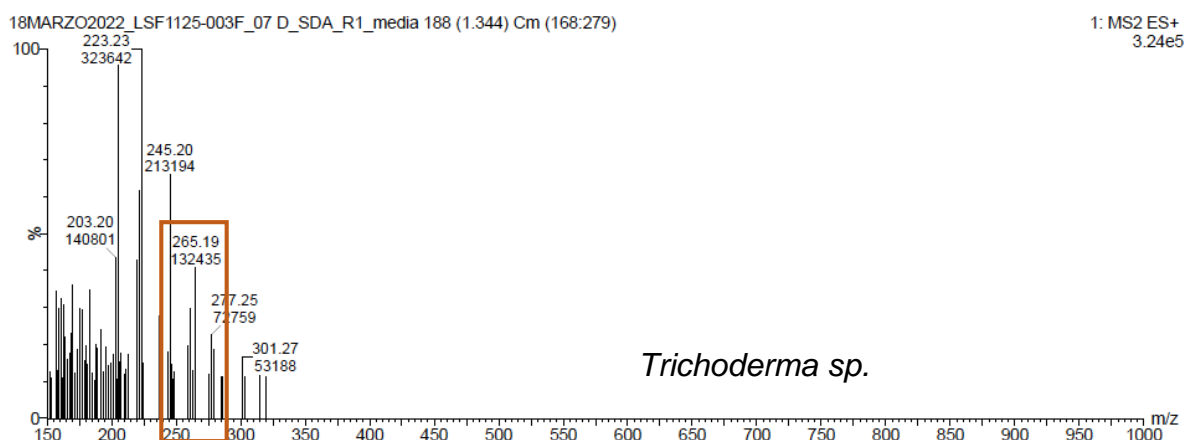
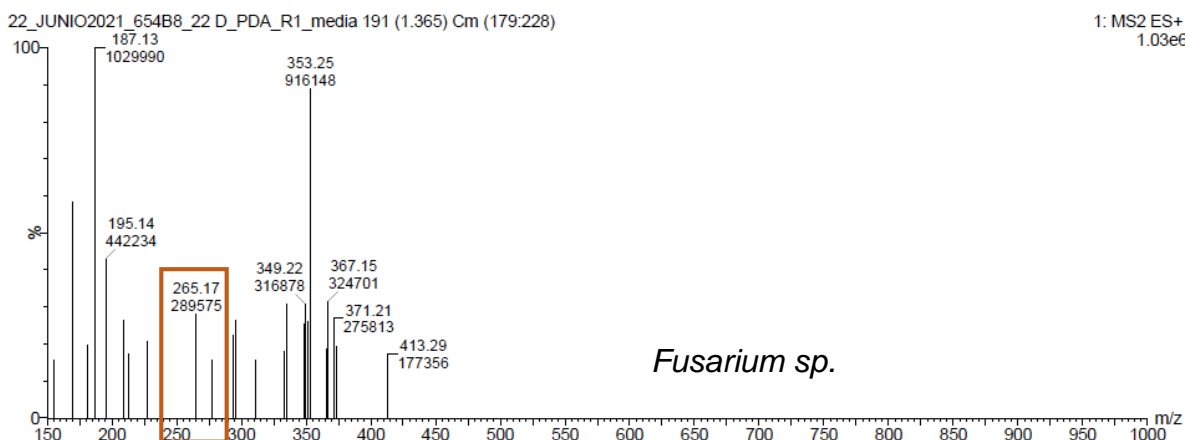
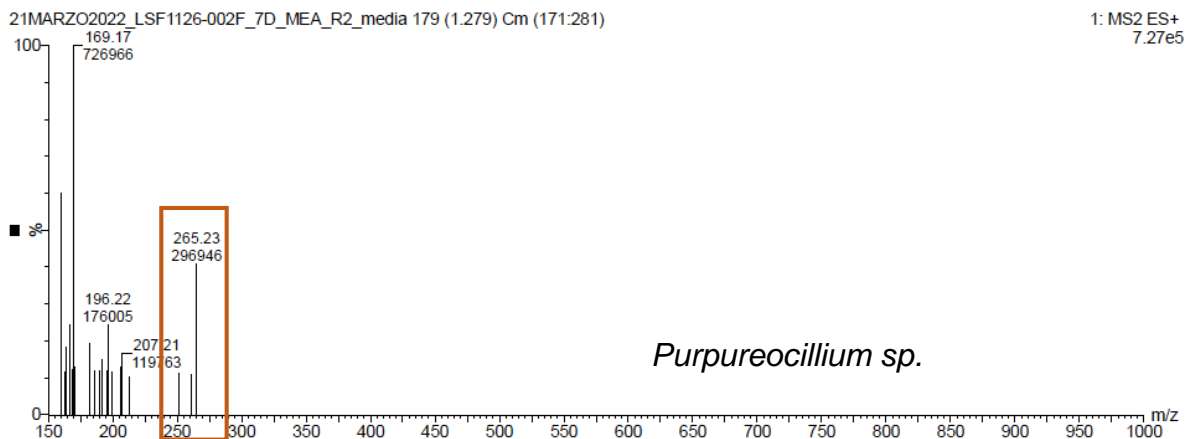


Figura 3.5. Espectros de masa de perfiles de huella química de tres cepas estudiadas en diferentes tiempos de crecimiento y medios. 1) *Purpureocillium* sp. a los 7 días de crecimiento en MEA. 2) *Fusarium* sp. a los 22 días de crecimiento en PDA. 3) *Trichoderma* sp. a los 7 días de crecimiento en MEA.

En la figura 3.6 se observan los iones cuasimoleculares 211 [M+H] y 312 [M+H] detectados en los espectros de masa de la cepa 369B3-17(198) de *Lasiodiplodia*. Estos iones se repitieron en todas las etapas de crecimiento. El ácido Jasmónico (210.2 g/mol) y JA-Treonina (311.2 g/mol) son metabolitos involucrados en la regulación del crecimiento de las plantas (Chagas *et al*, 2018). Y son considerados como quimiomarcadores del género *Lasiodiplodia*.

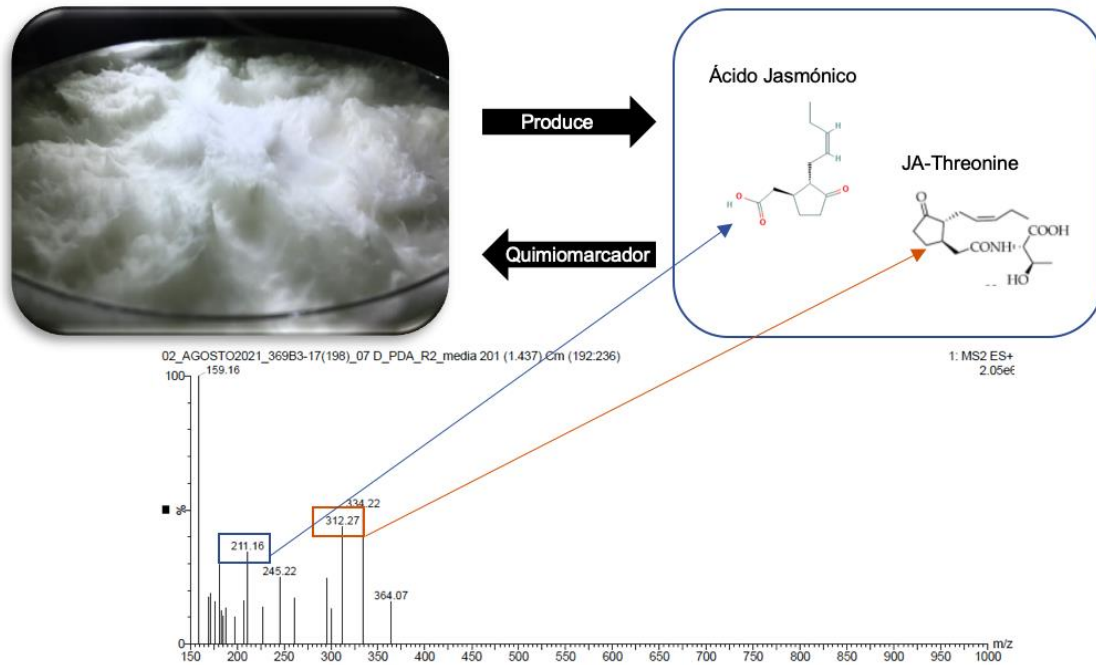


Figura 3.6. Quimiomarcadores encontrados en la cepa 369B3-17(198) de Sarigua, género *Lasiodiplodia*.

El perfil de huellas química para esta cepa se consideró muy pobre en términos de quimiodiversidad, y no reporto cambios importantes en el perfil de los diferentes medios empleados. Salvatore *et al* (2020) recopilaron una lista de 119 metabolitos descritos como parte del perfil químico de este hongo, con una variabilidad de compuestos amplia en actividades y funciones, la investigación fue realizada

probando in vitro efectos como la temperatura (25 y 37° C) y disponibilidad de nutrientes (medio extracto de levadura y medio harina de avena), esta puede ser la causa principal de la diferencia de resultados.

En otra revisión de Salvatore *et al* (2020) se examinan los estados de la producción de metabolitos secundarios que dependen de la asociación establecida con la planta hospedera ya sea como endófito o patógeno. De acuerdo a los resultados obtenidos, esta cepa tiene la capacidad de sintetizar productos bioactivos que pueden contribuir a la protección contra las adversidades biológicas y mejorar la aptitud de la planta hospedera.

Para los perfiles de huella química del género *Diaporthe* se identificaron 4 quimiomarcadores, a saber: Phomolide C, Phomolide G, Nectriapyrone y Quitina. La huella dactilar fue muy influenciada por la composición de los medios de cultivo, lo que hizo variar a los quimiomarcadores detectados.

Estos resultados guardan relación con los datos publicados por Xu *et al* (2021), que evaluó los compuestos producidos entre *Phomopsis* (estado anamorfo) y *Diaporthe* (estado teleomorfo) entre ellos los cuatro mencionados anteriormente. Cabe resaltar que los metabolitos Phomolides eran considerados parte del perfil químico de *Phomopsis* y con la innovación de las técnicas moleculares y químicas se logró diferenciar estas especies. Los resultados de los espectros a los 30 días de crecimiento en los tres medios de cultivo se pueden apreciar en la figura 3.7.

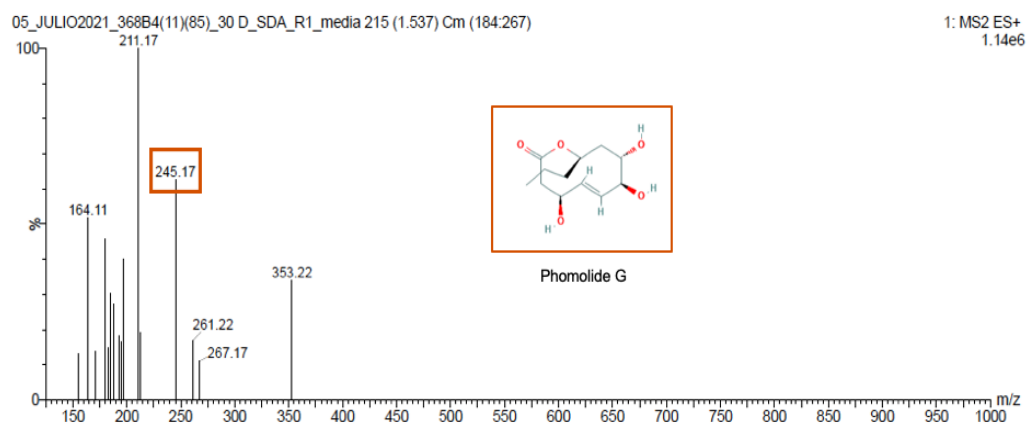
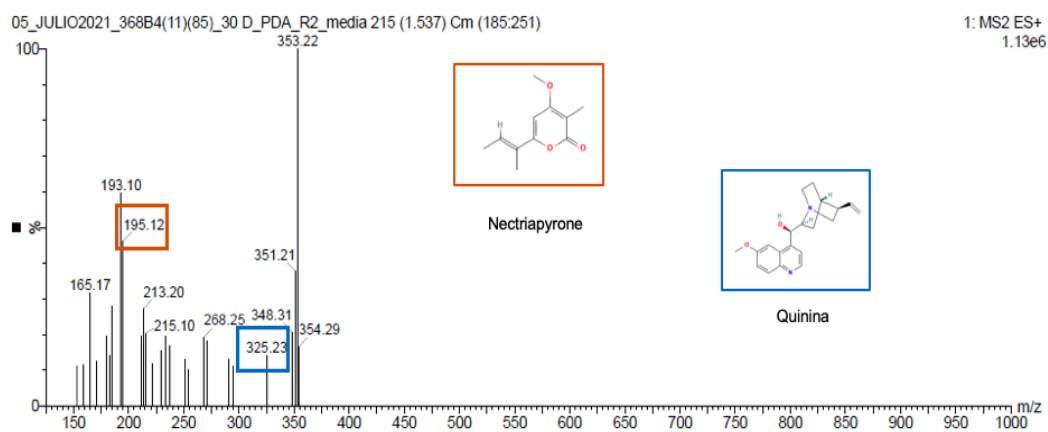
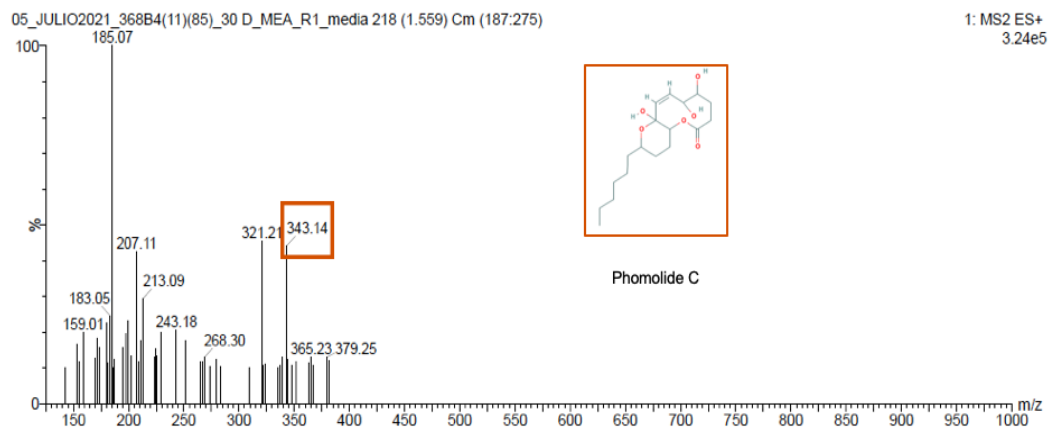


Figura 3.7. Quimiodiversidad del extracto fúngico de *Diaporthe* sp. a los 30 días de crecimiento en los tres medios de cultivos seleccionados.

Para el caso de las cepas de *Penicillium*, se reportaron aductos de ácido penicílico, ácido carólico y citrinina, la mayoría de estos compuestos son toxinas producidas por este género. En el cuadro 3.4 se observan los resultados de la cepa LSF1120-002 y LSF1126-004F, se puede distinguir la quimiodiversidad de ambas cepas, donde solo se observa similitud en el compuesto de citrinina.

Autores como Frisvad reportan desde 1986 perfiles químicos en *Penicillium*, principalmente por el hecho de las pérdidas económicas que han sido reportadas por la producción de micotoxinas de este género.

Los posibles compuestos detectados por esta técnica son acordes a los resultados reportados por Nielsen y Smedsgarrd (2003), Smedsgarrd y Nielsen (2005), Frisvad *et al* (2008) y Houbraken *et al* (2010).

La diferencia entre los posibles metabolitos encontrados indica que las dos cepas de *Penicillium* poseen características diferentes como se observó en la morfología de cada cepa (Ver Anexo 2).

El perfil químico de la cepa de *Trichoderma* (327B1-8), fue más constante en la presencia de los iones marcadores a través de todos los tiempos de crecimiento. En el cuadro 3.5 se observa las diferencias de los posibles quimiomarcadores, indicando que pueden tratarse de dos especies diferentes dentro de este género.

Cuadro 3.4. Iones cuasimoleculares presentes en los espectros UPLC-MS (ESI+) en las dos cepas *Penicillium* sp. identificadas en este estudio.

LSF1120-002F						
Medio de cultivo	Tiempo de crecimiento				Posible identidad*	
	7	15	22	30	Masa ^b	Metabolito
MEA	171 (M+H ⁺)	171 (M+H ⁺)	171 (M+H ⁺)	171 (M+H ⁺)	170.06	Ácido penicílico
	183 (M+H ⁺)	-	-	-	182.06	Ácido carólico
	171 (M+H ⁺)	-	-	359 (2M+H ⁺)	170.06	Ácido penicílico
PDA	-	-	183 (M+H ⁺)	-	182.06	Ácido carólico
	-	-	207(M-CO₂+H⁺)	-	250.08	Citrinina
SDA	-	-	390 (M+H ⁺)	390 (M+H ⁺)	389.19	Roquefortina C

LSF1126-004F						
Medio de cultivo	Tiempo de cultivo				Posible identidad*	
	7	15	22	30	Masa ^b	Metabolito
MEA	-	-	525 (2M+Na⁺)	-	250.08	Citrinina
PDA	-	404 (M+H ⁺)	404 (M+H ⁺)	404 (M+H ⁺)	403.08	Ochratoxina A
	-	-	-	334 (M+H ⁺)	333.15	Rugulosuvina
SDA	-	-	334 (M+H ⁺)	-	333.15	Rugulosuvina

^aIones de moléculas protonadas, aductos de sodio, potasio y otros.

^{*}Iones encontrados en espectros ESI-MS de análisis de metabolitos fúngicos puros disponibles en referencia. (Smedsgaard y Frisvad, 1996).

^b tiempo de cultivo en días ^c Masa calculada

Para la identificación de los posibles compuestos se utilizaron las caracterizaciones propuestas por Kan *et al* (2011). En 1980, Itoh *et al* publicaron el metabolito Koninginina que tiene actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, mientras que Vinale *et al* (2010) también reportaron el ácido harziánico como promotor del crecimiento vegetal y antifúngico por la cepa

Trichoderma harzianum. Estos respectivos metabolitos guardan relación con los encontrados en este análisis.

Cuadro 3.5 Iones cuasimoleculares presentes en los espectros UPLC-MS (ESI+) en las cepas de *Trichoderma* sp.

327B1-8						
Medio de cultivo	Tiempo de cultivo				Posible identidad*	
	7	15	22	30	Masa ^b	Metabolito
MEA	220 (M+H ⁺)	220 (M+H ⁺)	220 (M+H ⁺)	220 (M+H ⁺)	219.11	Trans-Zeatin
	220 (M+H ⁺)	220 (M+H ⁺)	220 (M+H ⁺)	-	219.11	Trans-Zeatin
PDA	264 (M+H-H ₂ O ⁺)	-	-	264 (M+H-H ₂ O ⁺)	281.11	2-0-Methyladenosine
SDA	249 (M+H ⁺)	249 (M+H ⁺)	249 (M+H ⁺)	249 (M+H ⁺)	248	Sorbicillinol
	264 (M+H-H ₂ O ⁺)	264 (M+H-H ₂ O ⁺)	264 (M+H-H ₂ O ⁺)	264 (M+H-H ₂ O ⁺)	281.11	2-0-Methyladenosine

LSF1125-003F						
Medio de cultivo	Tiempo de cultivo				Posible identidad*	
	7	15	22	30	Masa ^b	Metabolito
MEA	-	237 (M+H-H ₂ O ⁺)	237 (M+H-H ₂ O ⁺)	237 (M+H-H ₂ O ⁺)	254.11	Phomalone
	366 (M+H ⁺)	-	-	-	365	Ácido Harzianico
PDA	-	307 (M+Na ₂ ⁺)	-	-	284.19	Koninginin A
	237 (M+H-H ₂ O ⁺)	237 (M+H-H ₂ O ⁺)	237 (M+H-H ₂ O ⁺)	-	254.11	Phomalone
SDA	265 (M+H ⁺)	265 (M+H ⁺)	-	-	264.13	Ácido abscísico
	-	-	-	237 (M+H-H ₂ O ⁺)	254.11	Phomalone

+Iones de moléculas protonadas, aductos de sodio, potasio y otros.

*Iones encontrados en espectros ESI-MS de análisis de metabolitos fúngicos puros disponibles en referencia. (Morais et al, 2022; Kang et al, 2010).

^a tiempo de cultivo en días ^b Masa calculada

3.3. Evaluación de los efectos de los tiempos de crecimiento y los medios de cultivo sobre la composición química.

La distribución de la mayoría de los iones cuasimoleculares abarcaban las etapas de crecimiento desde 7 a 30 días y los perfiles químicos dependen de las condiciones de cultivo a las que está sometido el hongo (Frisvad, 2012).

En la figura 3.8 se observan los iones cuasimoleculares en los perfiles químicos determinados para el género *Colletotrichum*. Los picos 195, 335 y 351 (señalados con una flecha azul) se mantienen, a través, de todos los periodos con cambios en el porcentaje de intensidad relativa para las condiciones de ESI+.

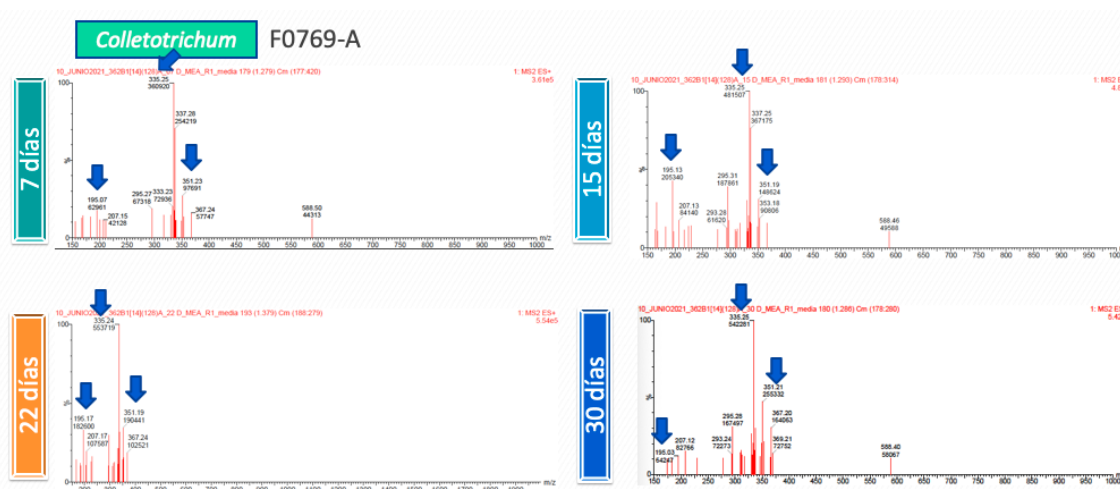


Figura 3.8. Espectros de masas del género *Colletotrichum* sp. (F0769-A) en ESI+. Espectros obtenidos en el medio de cultivo MEA a los cuatro tiempos de crecimiento.

Comparando los resultados de los perfiles químicos de la cepa 369B3-17(198), se observan variaciones en los porcentajes de la intensidad relativa de los iones cuasimoleculares. El ion cuasimolecular 312 en el medio MEA y PDA a los 7 días de crecimiento inicia como un pico minoritario y alcanza el mayor porcentaje de intensidad relativa a los 30 días de crecimiento, y se identificó como el pico

mayoritario al final del periodo de incubación, con la diferencia que en SDA a los 30 días de crecimiento desaparece el ion cuasimolecular (Ver figura 3.9)

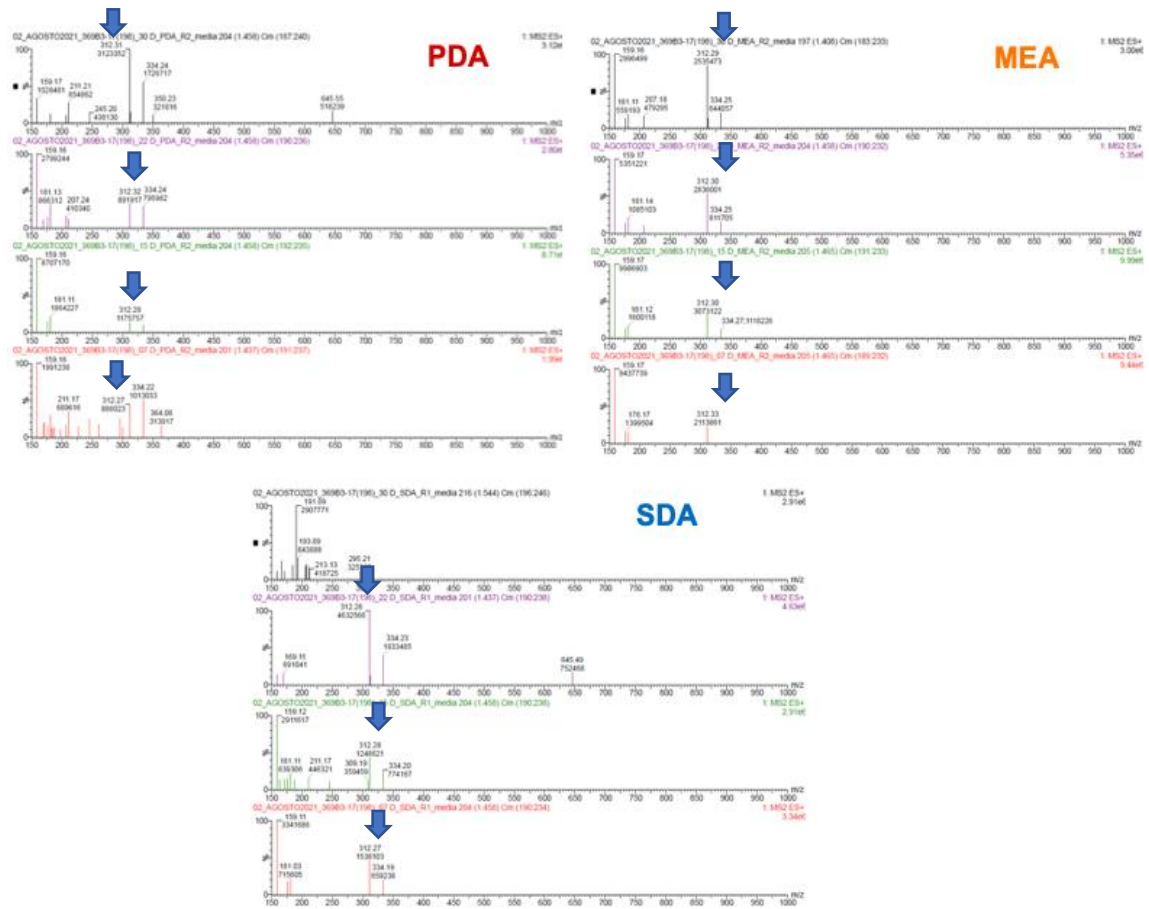


Figura 3.9. Variación de los porcentajes de intensidad relativa de los iones cuasimoleculares en la cepa 369B3-17(198).

Durante los cuatro tiempos de crecimiento en los tres medios de cultivos empleados en este estudio.

Según datos publicado por Sivori (1999), los tiempos de crecimiento tempranos por ejemplo cinco a siete días de incubación, se espera que los hongos no produzcan tantos metabolitos, ya que están en la fase de adaptación al medio. Y los tiempos de incubación largos (hasta más de 30 días) pueden ser pocos

quimiodiversos por la disminución de los nutrientes o la presencia de enzimas extracelulares que detiene el metabolismo del hongo (Smedsgaard y Nielsen, 2005). Sin embargo, los datos expresan una quimiodiversidad constante durante los 7 a 22 días de crecimiento. A los 30 días de crecimiento hay una variación de iones o disminución de iones.

Para comprender la influencia de los tiempos de crecimiento sobre la composición química de los extractos fúngicos se realizó la prueba estadística de ANOVA de un factor y se obtuvieron los siguientes datos: El valor de F es 0.90 y la significancia es de 0.45; los cuales nos indican que no hay diferencias significativas entre la composición química de los extractos fúngicos analizados y sus tiempos de cultivos. En la figura 3.10 se observa con mayor detalle las medias obtenidas en los 4 tiempos de crecimiento.

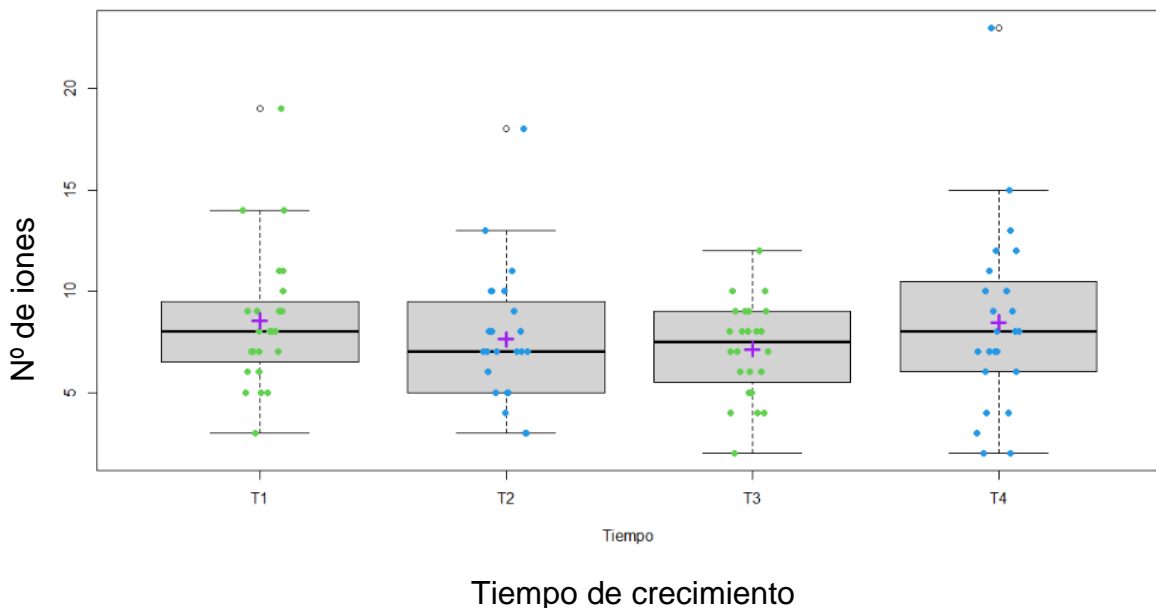


Figura 3.10. ANOVA- Efecto de los tiempos de crecimiento en los perfiles químicos. (F=0.446)^{NS} T1) Tiempo de crecimiento a los 7 días T2) Tiempo de crecimiento a los 15 días T3) Tiempo de crecimiento a los 22 días T4) Tiempo de crecimiento a los 30 días.

Por lo tanto, se concluye que los tiempos de crecimiento no afectan los perfiles de huella química.

Esto se debe principalmente a que los iones marcadores se pueden mantener durante todas las etapas de crecimiento del hongo. Además, las variaciones que se observan en el tiempo de crecimiento 4 puede darse por la formación de nuevos productos debido a la biosíntesis de componentes ya presentes en el medio (Frisvad, 2012).

También se realizó una prueba de Shapiro-Will para confirmar la normalidad de los datos en tiempos de crecimiento y la prueba de homogeneidad de Fligner-Killeen que se detalla en la figura 3.11. Estas pruebas son necesarias para cumplir con los requisitos del ANOVA de un factor.

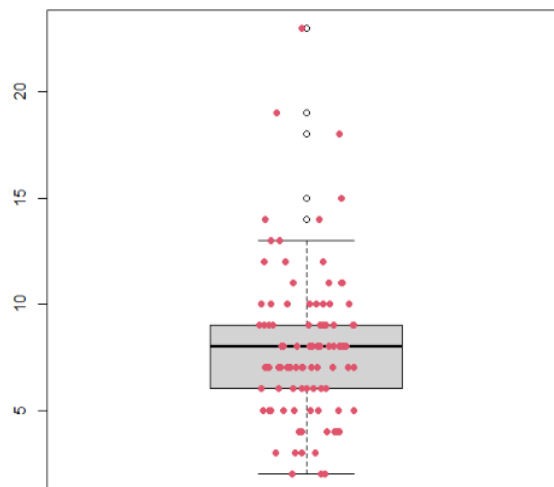


Figura 3.11. Distribución de los datos según parámetro de tiempo de crecimiento. Test de Fligner-Killeen verifica la homogeneidad de las variaciones de los grupos basados en rango. Fligner-Killeen: med chi-squared = 3.4981, df = 3, p-value = 0.321.

En cuanto, a los efectos del medio de cultivo sobre la producción de compuestos químicos; aunque ha sido un tema muy debatido por varios investigadores, no se ha llegado a un consenso sobre cuales medios son óptimos para la producción de metabolitos (Frisvad, 2012).

En las figuras 3.12, 3.13 y 3.14 se observa algunos ejemplos de la influencia de los diferentes medios de cultivo en los perfiles de huella química.

En la figura 3.12, se observa la similitud en los perfiles obtenidos en los medios PDA y MEA de la cepa *Penicillium* (LSF1120-002F) a los 7 días de crecimiento, se marca con una flecha azul los quimiomarcadores que se repiten en ambos casos, mientras que para SDA se observa una notable diferencia en la quimiodiversidad del perfil huella química por la presencia de otros iones cuasimoleculares.

La cepa *Fusarium* (654B8) tiene el posible metabolito Fusarochromanone [292+H⁺], este metabolito también fue descrito por Nielsen y Smedsgaard en el 2003 en cepas de *Fusarium* (Ver figura 3.13).

Como se puede observar en los siguientes espectros de masas la huella química difiere de acuerdo a los medios de cultivo utilizado, lo que afecta la composición química de los extractos fúngicos (Frisvad, 2012; Tormo *et al*, 2012; Gupta *et al*, 2021; Whestphal *et al*, 2021).

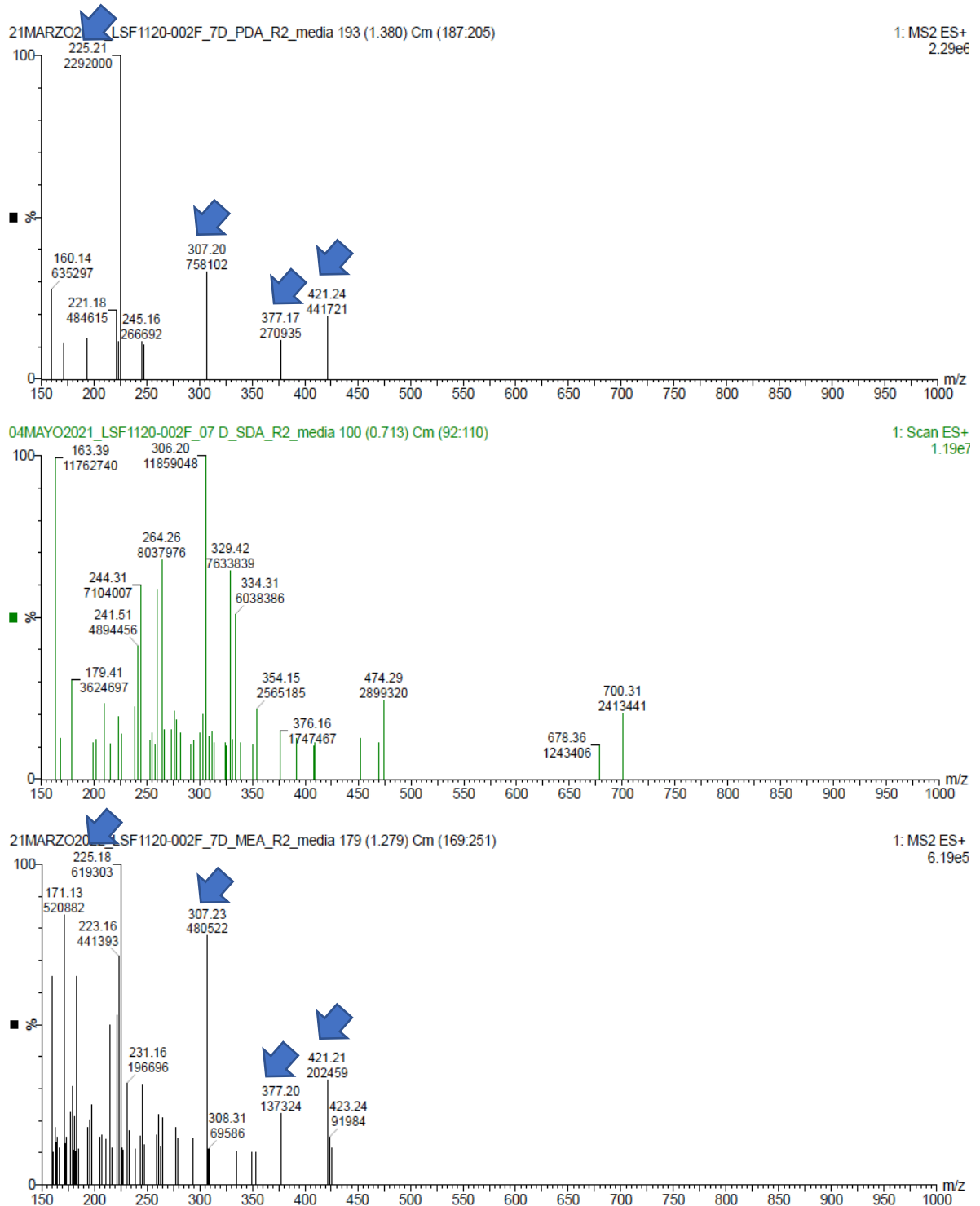


Figura 3.12. Espectros de masa de la cepa LSF1120-002F en los tres medios de cultivos a los 7 días de crecimiento.

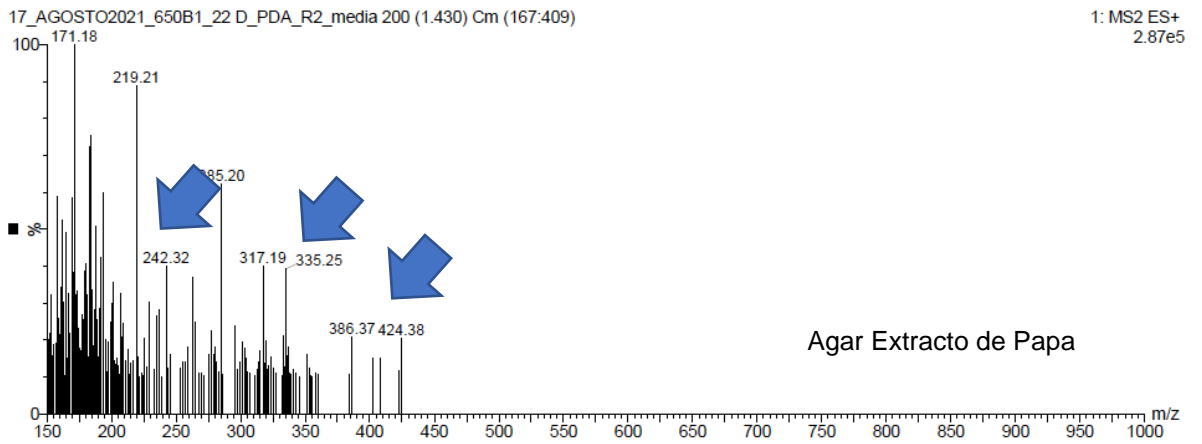
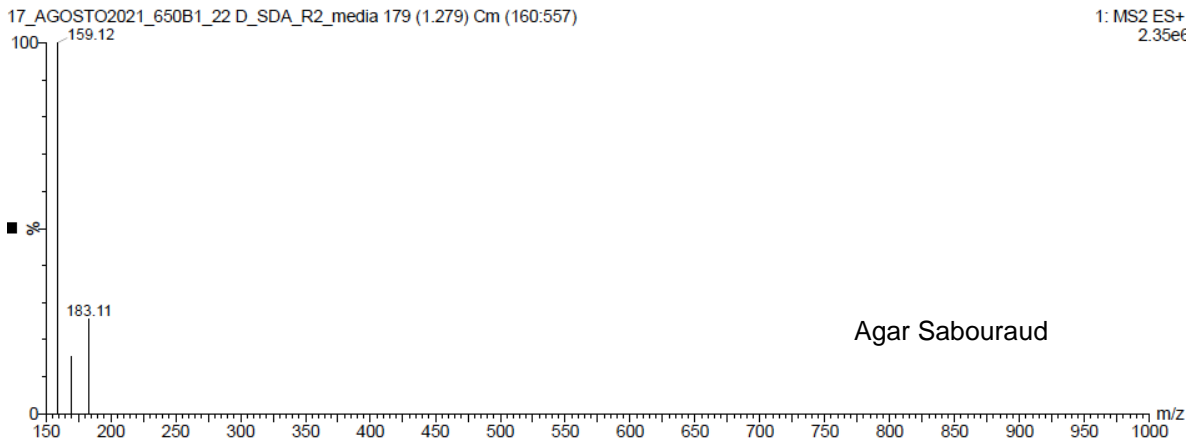
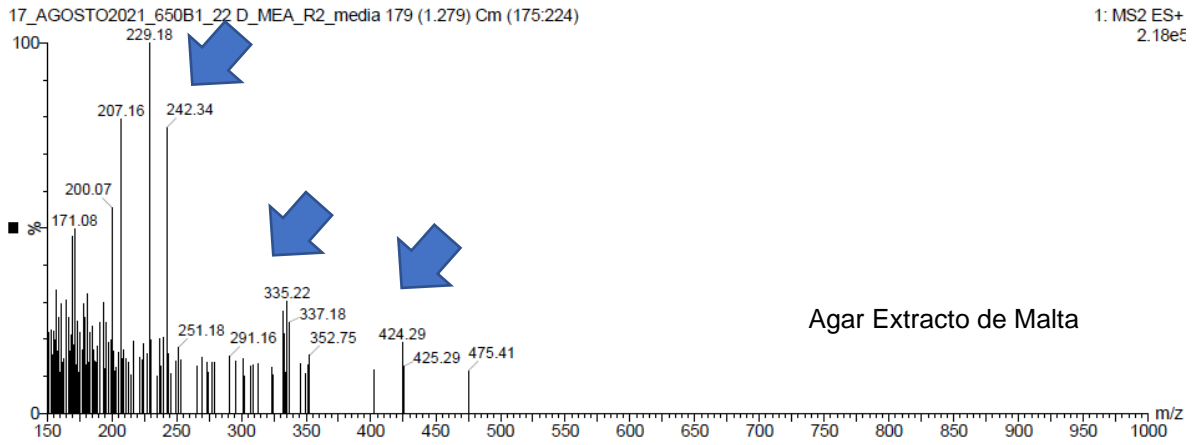


Figura 3.13. Espectros de masa de la cepa 650B1 a los 22 días de crecimiento. En los tres medios de cultivos MEA, SDA y PDA.

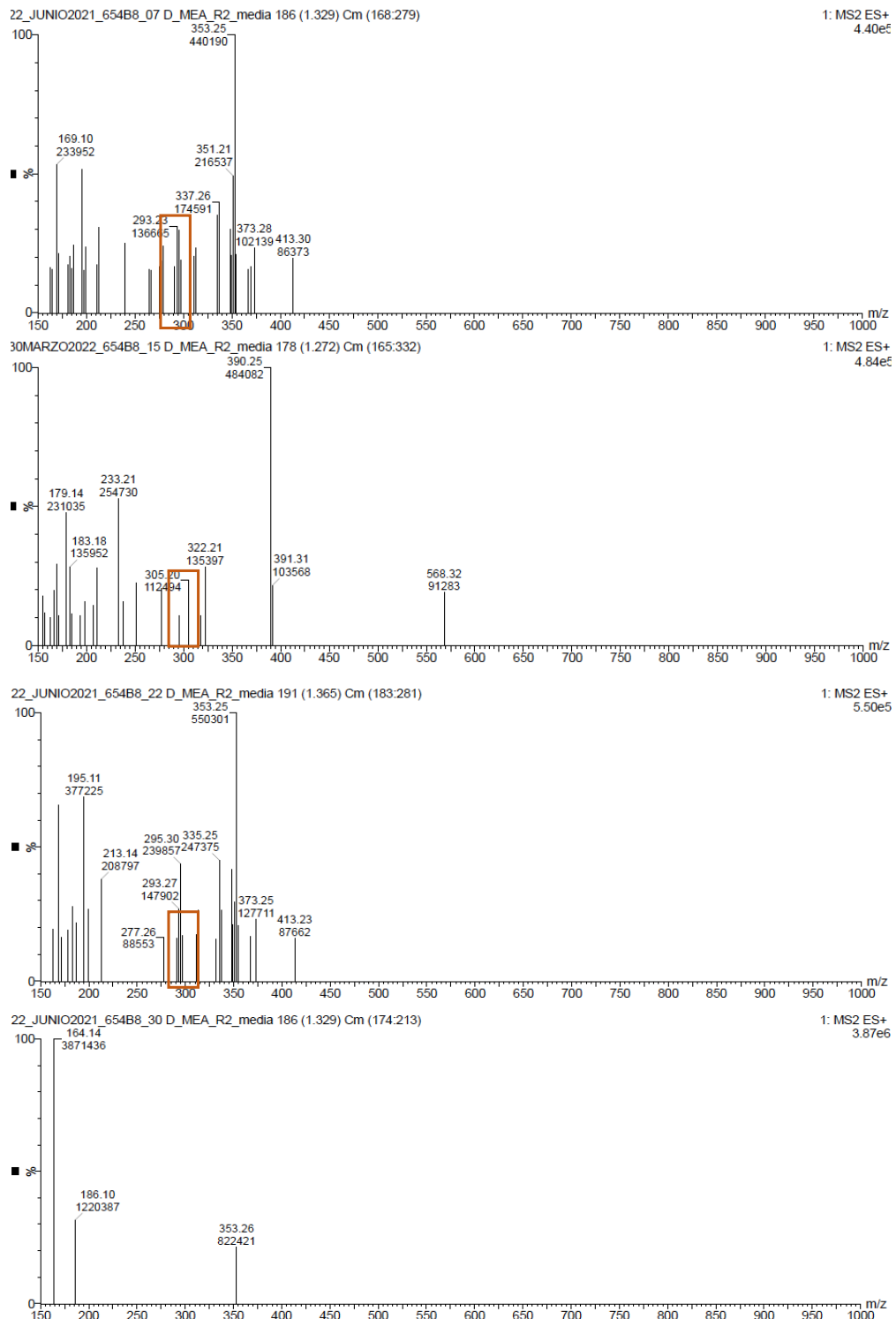


Figura 3.14. Espectros de masas en la cepa 654B8 en ESI+ durante los cuatro tiempos de crecimiento seleccionado. Desarrollado en el medio de cultivo MEA.

Se evaluó el conjunto de datos del medio de cultivo con el análisis estadístico ANOVA de un factor, por lo cual fue necesario comprobar si los datos cumplen con la homogeneidad (Prueba de Fligner-Killen) y normalidad (Prueba de Shapiro Will) de varianza para la aplicación de esta (Ver figura 3.15).

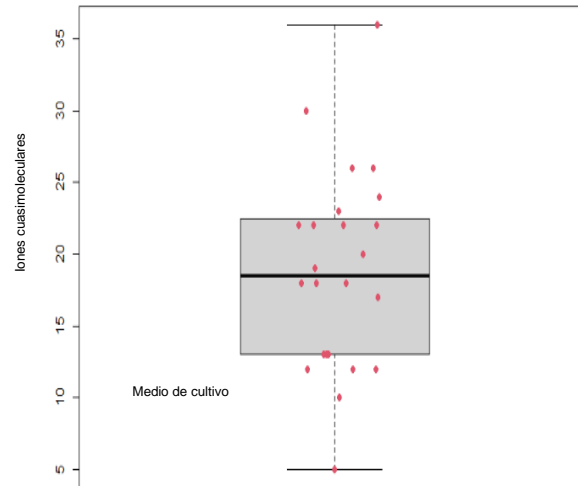


Figura 3.15 Distribución de los datos según parámetro de medio de cultivo. Test de Fligner-Killen verifica la homogeneidad de las variaciones de los grupos basados en rango. Fligner-Killeen: med chi-squared = 1.1309, df = 2, p-value = 0.5681.

El resultado obtenido en la prueba de ANOVA de un factor, aplicada a los datos del medio de cultivo ($F = 3.70$ y $p = 0.04$); indican que los medios de cultivo si poseen una influencia sobre la composición de los perfiles químicos.

El medio SDA no presenta los mejores resultados para el desarrollo de los perfiles químicos para el protocolo que se desarrolló (Ver Figura 3.16). Sin embargo, los hallazgos obtenidos con los medios PDA y MEA muestran una mayor y constante quimiodiversidad de metabolitos en los hongos endófitos estudiados.

Los resultados obtenidos en este estudio con respecto a la relación entre perfil de huella química y medio de cultivo son respaldados con los reportado por Westphal *et al* (2021) que mencionan a la elección del medio PDA porque aumenta la producción de metabolitos secundarios, considerándolo como posible medio estándar en el desarrollo de cultivos para quimio taxonomía. Por otro lado, MEA al tener una composición y resultados similares al PDA se consideran ambos para el protocolo de los perfiles de huella química.

El medio de cultivo SDA no obtuvo resultados favorables. A pesar de que ha resultado exitoso en cultivos de hongos dermatofitos para la extracción de proteínas empleadas para la identificación por MALDI-TOF-MS (Azrad *et al*,2019). Generalmente los rendimientos o controles de calidad que se utilizan son cepas de dermatofitos tales como *Trichophyton*, *Epidermophyton* y el hongo ambiental *Fusarium*, esto indica que es un medio desarrollado para el área clínica. Si se toma en cuenta este resultado se recomienda no incluir este medio de cultivo para la identificación de hongos endófitos por UPLC-MS.

Por otro lado, los autores Andersen *et al* (2003); Frisvad *et al* (2008) y Cilerdzic *et al* (2018) recalcan la importancia de emplear medios de cultivo comerciales porque contienen el registro de los componentes y cantidades exactas de los azúcares, extracto de levadura o extractos digestivos, minerales y trazas de metales agregados al medio, lo que también influye en el desarrollo de los perfiles químicos.

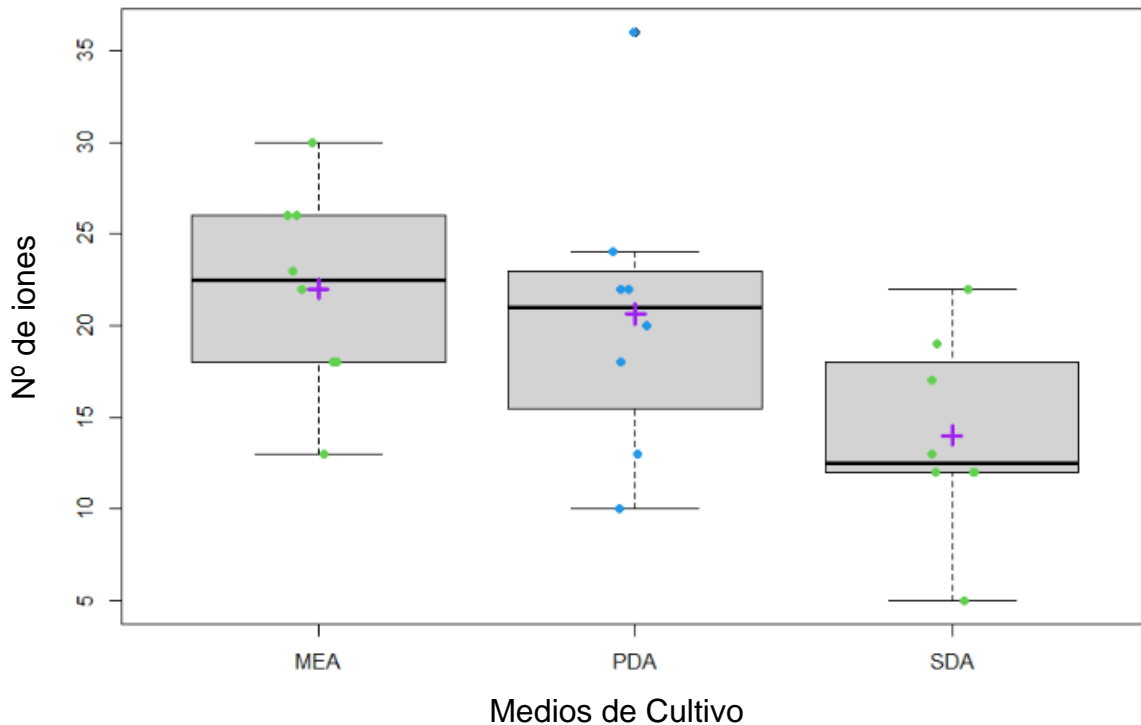


Figura 3.16. ANOVA - Efecto de los medios de cultivo en los perfiles químicos. (F=0.04) *
 Por lo tanto, al explorar una población en busca de características como la producción de uno o varios metabolitos se pueden usar medios específicos para maximizar el metabolito objetivo.

3.4. Desarrollo de protocolo técnico para la identificación de hongos endófitos por quimiotaonomía.

El resultado de los análisis quimiotaonomicos ha demostrado que la técnica UPLC-MS proporciona, una separación óptima para la identificación de los picos asociados al metabolismo de las cepas fúngicas. Los espectros de masas (ESI+ y ESI -) establecen los perfiles de huella química que a su vez facilita identificar los marcadores taxonómicos en cada hongo endófito.

No cabe duda de que los resultados obtenidos con los medios de cultivo y tiempo de crecimiento dieron prioridad para establecer los criterios de aceptabilidad o rechazo para el protocolo (Ver Figura 3.17). Dichos criterios no fueron nada fácil de afrontar teniendo en cuenta la amplia variedad de compuestos o picos y sus muy diferentes intensidades, por lo que desarrollar cada perfil depende de ambas variables (Medio de cultivo y Tiempo de crecimiento) en conjunto para aumentar la eficacia en la identificación de la cepa (Ver Anexo 4 para observar los perfiles químicos de las 15 cepas fúngicas).

Es interesante notar que los picos de los solventes, a pesar de su baja concentración en la muestra, la presencia es constante por lo que se puede confundir con los picos identificados para cada género. Por lo tanto, el análisis comparativo de picos puede ser muy útil cuando se buscan marcadores quimiotaxonómicos.

El siguiente protocolo ha contribuido a un mayor conocimiento en la identificación/caracterización de hongos endófitos y algunas ventajas son las siguientes:

- 1) Corto período de tiempo (minutos), que abarca desde el proceso de preparación de las muestras hasta comparación del perfil establecido.
- 2) La fiabilidad de los resultados obtenidos de acuerdo con el equipo utilizado (UPLC-MS).

En la siguiente figura 3.17 se observan los tópicos importantes para la aplicación del protocolo utilizado en el desarrollo de perfiles de huella química de los 15 hongos endófitos.

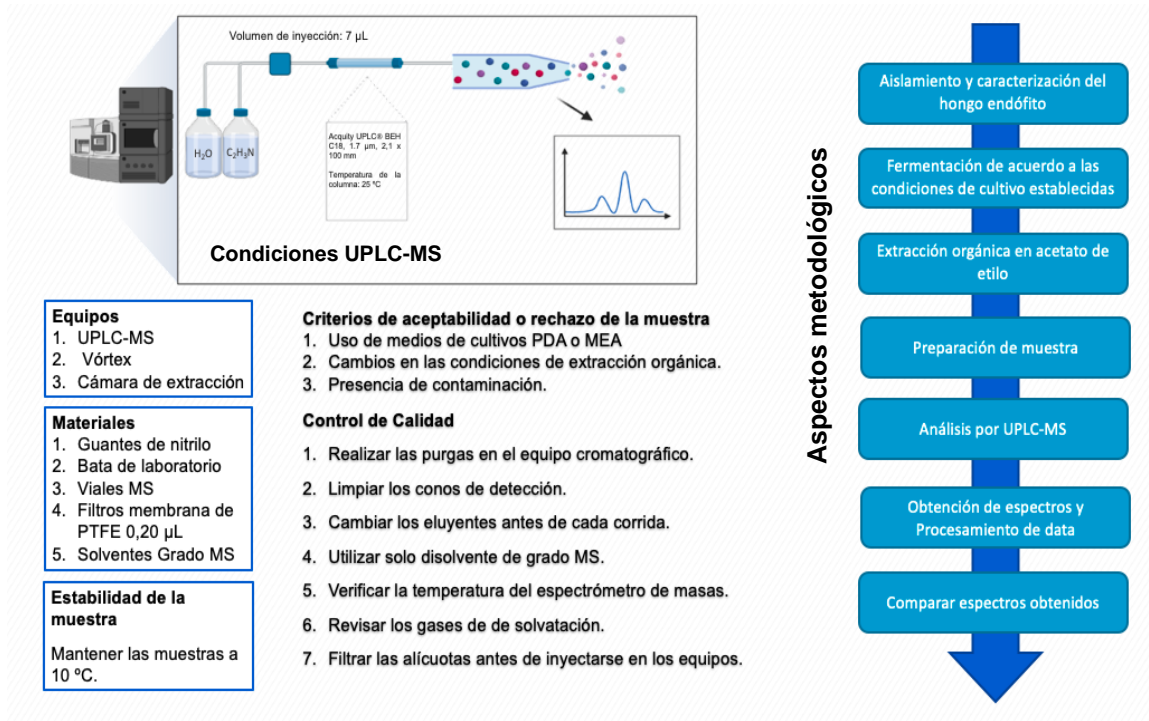


Figura 3.17. Protocolo Técnico para la identificación de hongos endófitos mediante UPLC-MS En esta figura se observan los tópicos importantes para la aplicación del protocolo utilizado en el desarrollo de perfiles de huella química de los 15 hongos endófitos.

Algunas desventajas se observaron en los perfiles de huella química para *Colletotrichum* y *Purpureocillium*, debido a que, no se logró corroborar los iones cuasimoleculares en las bases de datos utilizadas, esto puede deberse al hecho de que aún es una técnica en desarrollo y constante actualización, sin olvidar la plasticidad fenotípica de estos hongos para utilizar distintas rutas de biosíntesis, dificultando así la identificación de los marcadores quimiotaxonómicos.

En términos de aplicación biotecnológica es importante mejorar proyectos enfocados en los protocolos de quimiotaxonomía, ya que permitió minimizar el desperdicio de recursos y tiempo, ayuda a conocer mejor los metabolitos marcadores y permite el desarrollo de bioprocesos novedosos, eficientes y amigables con el medio ambiente (Jewett *et al*, 2006; El-Elimat *et al*, 2013; Melero *et al*, 2016; Quiles-Melero *et al*, 2021).

No hay duda de que la espectrometría de masas tiene un grado de sensibilidad muy alto para identificar metabolitos secundarios (Chen *et al*, 2017; Calla-Quispe *et al*, 2020). Ahora bien, no hay que dejar de lado las herramientas moleculares y morfológicas, ya que el empleo de estos tres componentes, crean una sinergia para el mayor entendimiento en la clasificación e identificación de las especies de hongos endófitos.

CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un protocolo técnico mediante el análisis de perfiles de huella química por masas a través del UPLC-MS para la identificación de 15 cepas de hongos endófitos.
2. Se caracterizó el 60% de las muestras morfológicamente y el 100% de las muestras por molecular lo que brinda soporte a los resultados obtenidos en los perfiles de huella química.
3. Se determinó los perfiles de huella química para *Trichoderma*, *Purpureocillium*, *Penicillium*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotiopsis*, *Diaporthe*, *Colletotrichum* y *Fusarium*. La metodología quimiotaxonómica empleada por medio de iones cuasimoleculares coincide con metabolitos secundarios reportadas en perfiles químicos de *Trichoderma*, *Penicillium*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotiopsis*, *Diaporthe* y *Fusarium*.
4. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al efecto del tiempo de crecimiento en la variación de los perfiles químicos de los hongos estudiados, mientras que los medios de cultivos influyen directamente en la quimiodiversidad de las cepas fúngicas demostrando efectos en la producción de metabolitos secundarios.

RECOMENDACIONES

Para la identificación molecular se recomienda que las cepas identificadas por el locus ITS se realice nuevamente la secuenciación, pero con otros locus; la región β -tubulina puede utilizarse para comparar los resultados y confirmar la especie.

Corroborar los iones cuasimoleculares encontrados por análisis de fragmentación MS-MS, que contienen la información acerca de la secuencia o conformación de la molécula. De este modo podemos identificar la molécula con un mayor nivel de confianza.

Realizar estudios de metabolómica en diversos medios y escogiendo los periodos de crecimiento entre 7 hasta 15 días para estandarizar los quimiomarcadores por cada cepa fúngica.

LITERATURA CITADA

- Adam, G., Wiesenberger, G., & Güldener, U. (2015). *Fusarium* mycotoxins and their role in plant–pathogen interactions. *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*, Volume 2, 199-233.
- Aguilar-Pérez, M. M., Torres-Mendoza, D., Vásquez, R., Rios, N., & Cubilla-Rios, L. (2020). Exploring the Antibacterial Activity of *Pestalotiopsis* spp. under Different Culture Conditions and Their Chemical Diversity Using LC–ESI–Q–TOF–MS. *Journal of Fungi*, 6(3), 140.
- Akinola, S. A., Ateba, C. N., & Mwanza, M. (2019). Polyphasic assessment of aflatoxin production potential in selected *Aspergilli*. *Toxins*, 11(12), 692
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*, IV edition. John Wiley & Sons, New York: 1-868.
- Aly, A. H., Debbab, A., Kjer, J., & Proksch, P. (2010). Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal diversity*, 41(1), 1-16.
- Altschul, S; Gish, W; Miller, W; Meyer, E; & Lipman D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Anfossi, L., Giovannoli, C., & Baggiani, C. (2016). Mycotoxin detection. *Current opinion in biotechnology*, 37, 120-126.
- Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology letters*, 3(4), 267-274.
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal biology reviews*, 21(2-3), 51-66.
- Arrúa Alvarenga, A. A., Moreno Martínez, E., Quezada Viay, M. Y., Moreno Lara, J., Vázquez Badillo, M. E., & Flores Olivas, A. (2012). *Aspergillus* aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(5), 1.
- Azrad, M., Freidus, V., Kassem, R., & Peretz, A. (2019). Identification of dermatophytes by MALDI-TOF MS technology in the clinical laboratory. *International Journal of Mass Spectrometry*, 440, 32-36.
- Barnett H & Hunter B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. EE. UU. Burgess Publ. Co. 241pp.
- Barthélemy, M., Guerineau, V., Genta-Jouve, G., Roy, M., Chave, J., Guillot, R., & Touboul, D. (2020). Identification and dereplication of endophytic *Colletotrichum* strains by MALDI TOF mass spectrometry and molecular networking. *Scientific reports*, 10(1), 1-16.
- Bayona, L. M., Verpoorte, R., Klinkhamer, P. G., & Choi, Y. H. (2019). *Thin-Layer Chromatography, Metabolomics*.
- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., & Maier, W. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(1), 99-108.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kausserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in-silico approach reveals potential PCR biases. *BMC microbiology*, 10(1), 1-9.

Bhunjun, C. S., Niskanen, T., Suwannarach, N., Wannathes, N., Chen, Y. J., McKenzie, E. H., ... & Lumyong, S. (2022). The numbers of fungi: are the most speciose genera truly diverse? *Fungal Diversity*, 1-76.

Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., & Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, 3(7), 619-627.

Brown, M., Dunn, W. B., Dobson, P., Patel, Y., Winder, C. L., Francis-McIntyre, S., & Kell, D. B. (2009). Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. *Analyst*, 134(7), 1322-1332.

Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P. W. J., Weir, B., Waller, J., Abang, M. M., ... & Shivas, R. G. (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 39(1), 183-204

Chen, H.P.; Liu, J.K. (2017). Secondary metabolites from higher fungi. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Springer: Cham, Switzerland. Volume 106, pp. 1–201.

Chen, S., Cai, R., Liu, Z., Cui, H., & She, Z. (2022). Secondary metabolites from mangrove-associated fungi: source, chemistry, and bioactivities. *Natural Product Reports*.

Cicaloni, V., Salvini, L., Vitalini, S., & Garzoli, S. (2022). Chemical Profiling and Characterization of Different Cultivars of *Cannabis sativa* L. Inflorescences by SPME-GC-MS and UPLC-MS. *Separations*, 9(4), 90.

Ćilerdžić, J. L., Sofrenić, I. V., Tešević, V. V., Brčeski, I. D., Duletić-Laušević, S. N., Vukojević, J. B., & Stajić, M. M. (2018). Neuroprotective potential and chemical profile of alternatively cultivated *Ganoderma lucidum* basidiocarps. *Chemistry & Biodiversity*, 15(5), e1800036.

Chagas, F. O., Carballo-Rodríguez, A. M., & Pupo, M. T. (2015). Endophytic fungi as a source of novel metabolites. In *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*, Volume 2 (pp. 123-176). Springer, New York, NY.

Chagas, F. O., de Cassia Pessotti, R., Carballo-Rodríguez, A. M., & Pupo, M. T. (2018). Chemical signaling involved in plant–microbe interactions. *Chemical Society Reviews*, 47(5), 1652-1704.

Calla-Quispe, E., Fuentes-Rivera, H. L., Ramírez, P., Martel, C., & Ibañez, A. J. (2020). Mass spectrometry: A rosetta stone to learn how fungi interact and talk. *Life*, 10(6), 89.

Carvalho, C. R. D., Ferreira, M. C., & Rosa, L. H. (2021). Ecology of Neotropical Endophytic Fungi. In *Neotropical Endophytic Fungi* (pp. 1-9). Springer, Cham.

Chen, W., & Hu, Q. (2021). Secondary metabolites of *Purpureocillium lilacinum*. *Molecules*, 27(1), 18.

Cortés-Sánchez, A. D. J., & Mosqueda-Olivares, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*, 12(2), 64-90.

- Crozier, J. A. Y. N. E., Thomas, S. E., Aime, M. C., Evans, H. C., & Holmes, K. A. (2006). Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathology*, 55(6), 783-791.
- Cruz, J. S., da Silva, C. A., & Hamerski, L. (2020). Natural products from endophytic fungi associated with Rubiaceae species. *Journal of Fungi*, 6(3), 128.
- Dai, G., Shen, Q., Zhang, Y., & Bian, X. (2022). Biosynthesis of Fungal Natural Products Involving Two Separate Pathway Crosstalk. *Journal of Fungi*, 8(3), 320.
- Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. History of modern biotechnology I, 1-39.
- Deshmukh, S. K., Dufossé, L., Chipa, H., Saxena, S., Mahajan, G. B., & Gupta, M. K. (2022). Fungal Endophytes: A Potential Source of Antibacterial Compounds. *Journal of Fungi*, 8(2), 164.
- Ding, G., Li, Y., Fu, S., Liu, S., Wei, J., & Che, Y. (2009). Ambuic acid and torreyanic acid derivatives from the endolichenic fungus *Pestalotiopsis* sp. *Journal of Natural Products*, 72(1), 182-186.
- El-Elimat, T., Figueroa, M., Ehrmann, B. M., Cech, N. B., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2013). High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *Journal of natural products*, 76(9), 1709-1716.
- Fredenhagen, A., Derrien, C., & Gassmann, E. (2005). An MS/MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products. Different fragmentation patterns for [M+H]⁺ and [M+Na]⁺ ions. *Journal of natural products*, 68(3), 385-391.
- Frisvad, J. C. (1986). Profiles of primary and secondary metabolites of value in classification of *Penicillium viridicatum* and related species. In: Samson RA, Pitt JI (eds) *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Plenum, New York, pp 311-325.
- Frisvad, J. C., Filtenborg, O., & Thrane, U. (1989). Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 18(3), 331-335.
- Frisvad, J. C., Larsen, T. O., De Vries, R., Meijer, M., & Houbraeken, J. Caban es FJ, Ehrlich K, Samson RA. (2007). Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Stud Mycol*, 59, 31-37.
- Frisvad, J. C., Andersen, B., & Thrane, U. (2008). The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*, 112(Pt 2), 231-240.
- Frisvad, J. C. (2012). Media and growth conditions for induction of secondary metabolite production. In *Fungal Secondary Metabolism* (pp. 47-58). Humana Press, Totowa, NJ.
- Frisvad, J. C. (2015). Fungal chemotaxonomy. In *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Volume 2* (pp. 103-121). Springer, New York, NY.
- Figueroa, M., Jarmusch, A. K., Raja, H. A., El-Elimat, T., Kavanaugh, J. S., Horswill, A. R., ... & Oberlies, N. H. (2014). Polyhydroxyanthraquinones as quorum sensing inhibitors from the guttate of *Penicillium restrictum* and their analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of natural products*, 77(6), 1351-1358.

- Galindo-Solís, J. M., & Fernández, F. J. (2022). Endophytic Fungal Terpenoids: Natural Role and Bioactivities. *Microorganisms*, 10(2), 33.
- Gangadevi, V., & Muthumary, J. (2008). Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. *Mycologia balcanica*, 5(1), 1-4.
- García, A. Á., y Carril, E. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G. D., Bravo-Luna, L., ... & Lorito, M. (2010). Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 87-96.
- Gupta, P., Verma, A., Rai, N., Singh, A. K., Singh, S. K., Kumar, B., ... & Gautam, V. (2021). Mass Spectrometry-Based Technology and Workflows for Studying the Chemistry of Fungal Endophyte Derived Bioactive Compounds. *ACS chemical biology*, 16(11), 2068-2086.
- Groenewald, J. Z., Groenewald, M., & Crous, P. W. (2011). Impact of DNA data on fungal and yeast taxonomy. *Microbiology Australia*, 32(2), 100-104.
- Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 12(3), 454-500.
- Guo LD, Huang GR, Wang Y, He WH, Zheng WH, Hyde K. (2003). Identificación molecular de cepas de morfotipo blanco de hongos endófitos de *Pinus tabulaeformis*. *Investigación micológica*, 107, 680 – 8
- Hanson, J. R. (2008). *Chemistry of fungi*. Royal Society of Chemistry.
- Hasegawa M., Kishino H., and Yano T. (1985). Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160-174.
- Hernández, J. J., Carabeo-Pérez, A., & Guerra-Rivera, G. (2021). Métodos moleculares avanzados para el monitoreo de muestras ambientales: una propuesta para Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 9(2), 1-14.
- Hernández, K. (2015). Comparación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de hongos endófitos aislados de plantas de cuatro zonas de vida de la República de Panamá. [Tesis de licenciatura]. Universidad de Panamá.
- Hyde, K. D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., Niego, A. G. T., ... & Stadler, M. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, 97(1), 1-136.
- Hyde, K. D., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers*, 33(163), e173.
- Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages? *Current opinion in microbiology*, 8(3), 301-306.
- Houbraken, J. A., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2010). Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*, 44(1), 117-133.

- Hufsky, F., Scheubert, K., & Böcker, S. (2014). New kids on the block: novel informatics methods for natural product discovery. *Natural product reports*, 31(6), 807-817.
- Hutwimmer, S., Wang, H., Strasser, H., & Burgstaller, W. (2010). Formation of exudate droplets by *Metarhizium anisopliae* and the presence of destruxins. *Mycologia*, 102(1), 1-10.
- Humber, R. A. (1997). Fungi: preservation of cultures. In *Manual of techniques in insect pathology* (pp. 269-279). Academic Press.
- IDIAP. (2020). Informe de la Memoria Anual 2020. <http://www.idiap.gob.pa/publicaciones-memorias/>
- Jewett, M. C., Hofmann, G., & Nielsen, J. (2006). Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. *Current opinion in biotechnology*, 17(2), 191-197.
- Kang, D. J., Kim, J. Y., Choi, J. N., Liu, K. H., & Lee, C. H. (2011). Chemotaxonomy of *Trichoderma* spp. using mass spectrometry-based metabolite profiling. *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(1), 5-13.
- Kaltashov, I. A., & Abzalimov, R. R. (2008). Do ionic charges in ESI MS provide useful information on macromolecular structure? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(9), 1239-1246.
- Kelman, M. J., Renaud, J. B., Seifert, K. A., Mack, J., Yeung, K. K. C., & Sumarah, M. W. (2020). Chemotaxonomic Profiling of Canadian *Alternaria* Populations Using High-Resolution Mass Spectrometry. *Metabolites*, 10(6), 238.
- Kjærboelling, I., Mortensen, U. H., Vesth, T., & Andersen, M. R. (2019). Strategies to establish the link between biosynthetic gene clusters and secondary metabolites. *Fungal Genetics and Biology*, 130, 107-121.
- Kolainis, S., Koletti, A., Lykogianni, M., Karamanou, D., Gkizi, D., Tjamos, S. E., ... & Aliferis, K. A. (2020). An integrated approach to improve plant protection against olive anthracnose caused by the *Colletotrichum acutatum* species complex. *PloS one*, 15(5), e0233916.
- Komárek, J. (2016). A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*, 51(3), 346-353.
- Koc, A. (2015). Effect of plant growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on lipid peroxidation and total phenolics of strawberry under salt stress. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(6), 992-998.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & biology*, 19(7), 792-798.
- Lang, G., Mayhudin, N. A., Mitova, M. I., Sun, L., van der Sar, S., Blunt, J. W., ... & Munro, M. H. (2008). Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. *Journal of Natural Products*, 71(9), 1595-1599.
- Larsen, T; Smedsgarrd, J; Nielsen, K; Hansen, M y Frisvad, J. (2005). Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Nat. Pro. Rep. Vol 22*, pp: 672-695.
- Leslie J F & Summerell B A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Ed. Wiley-Blackwell.

- Loff, M., Mare, L., de Kwaadsteniet, M., & Khan, W. (2014). 3M™ Molecular Detection system versus MALDI-TOF mass spectrometry and molecular techniques for the identification of *Escherichia coli* 0157: H7, *Salmonella* spp. & *Listeria* spp. *Journal of microbiological methods*, 101, 33-43.
- Luangsaard, J., Houbraeken, J., van Doorn, T., Hong, S. B., Borman, A. M., Hywel-Jones, N. L., & Samson, R. A. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS microbiology letters*, 321(2), 141-149.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C. J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., ... & Vilgalys, R. (2004). Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American journal of botany*, 91(10), 1446-1480.
- Martín, J. F., García-Estrada, C., & Zeilinger, S. (Eds.). (2014). *Biosynthesis and molecular genetics of fungal secondary metabolites*. Springer.
- Maehara, S., Simanjuntak, P., Kitamura, C., Ohashi, K., & Shibuya, H. (2011). Cinchona alkaloids are also produced by an endophytic filamentous fungus living in Cinchona plant. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 59(8), 1073-1074.
- Maciá-Vicente, J. G., Ferraro, V., Burruano, S., & Lopez-Llorca, L. V. (2012). Fungal assemblages associated with roots of halophytic and non-halophytic plant species vary differentially along a salinity gradient. *Microbial ecology*, 64(3), 668-679.
- Maciá-Vicente, JG, Shi, YN, Cheikh-Ali, Z., Grün, P., Glynou, K., Kia, SH, ... & Bode, HB (2018). Quimiotaxonomía basada en la metabolómica de hongos endófitos de la raíz para el descubrimiento de productos naturales. *Microbiología ambiental*, 20 (3), 1253-1270.
- Mattoo, A. J., & Nonzom, S. (2021). Endophytic fungi: Understanding complex cross-talks. *Symbiosis*, 83(3), 237-264.
- Meena, H., Hnamte, S., & Siddhardha, B. (2019). Secondary metabolites from endophytic fungi: chemical diversity and application. In *Advances in Endophytic Fungal Research* (pp. 145-169). Springer, Cham.
- Melero, I. Q., Peláez, T., López, A. R., & García-Rodríguez, J. (2016). Aplicación de la espectrometría de masas en micología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34, 26-30.
- Menolli, N., & Sanchez-Garcia, M. (2020). Brazilian fungal diversity represented by DNA markers generated over 20 years. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2), 729-749.
- Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA), (10 de abril 2022). Marchitamiento de los bananos y platanos por fusarium. <https://mida.gob.pa/marchitamiento-de-los-bananos-y-platanos-por-fusarium-raza-4/>
- Mishra, S., Bhardwaj, P. y Sharma, S. (2022). Información metabolómica sobre compuestos bioactivos derivados de endófitos. *Fronteras en microbiología*, 416.
- Morais, E. M., Silva, A. A. R., Sousa, F. W. A. D., Azevedo, I. M. B. D., Silva, H. F., Santos, A. M. G., ... & Araújo, F. D. D. S. (2022). Endophytic *Trichoderma* strains isolated from forest species of the Cerrado-Caatinga ecotone are potential biocontrol agents against crop pathogenic fungi. *PLoS one*, 17(4), e0265824.

- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy, and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101-2137.
- Nielsen, K. F., & Smedsgaard, J. (2003). Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A*, 1002(1-2), 111-136.
- Nielsen, K. F., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., & Lund, F. (2003). Chemical Identification of Fungi: Metabolite Profiling and. *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*, 19.
- Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Zafari, D., & Thrane, U. (2005). Trichothecene production by *Trichoderma brevicompactum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(21), 8190-8196.
- Oberlies, N. H., Knowles, S. L., Amrine, C. S. M., Kao, D., Kertesz, V., & Raja, H. A. (2019). Droplet probe: Coupling chromatography to the in-situ evaluation of the chemistry of nature. *Natural product reports*, 36(7), 944-959.
- Ortega, H. E., Torres-Mendoza, D., & Cubilla-Rios, L. (2020). Patents on endophytic fungi for agriculture and bio-and phytoremediation applications. *Microorganisms*, 8(8), 1237.
- Okamoto, T., Kishimoto, S., & Watanabe, K. (2022). Isolation of Natural Prodrug-Like Metabolite by Simulating Human Prodrug Activation in Filamentous Fungus. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 70(4), 304-308.
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(1), 54-74
- Polizzotto, R., Andersen, B., Martini, M., Grisan, S., Assante, G., & Musetti, R. (2012). A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines. *Journal of microbiological methods*, 88(1), 162-171.
- Pramanik BN, Ganguly AK, Gross ML. (2002). Espectrometría de masas por electropulverización aplicada. Nueva York, Estados Unidos: Marcel Dekker.
- Quiles-Melero, I., & García-Rodríguez, J. (2021). Antifúngicos de uso sistémico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 38(2), 42-46.
- Ramos, A. E. F., Evanno, L., Poupon, E., Champy, P., & Beniddir, M. A. (2019). Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Natural product reports*, 36(7), 960-980.
- Rana, K. L., Kour, D., Sheikh, I., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, V., ... & Saxena, A. K. (2019). Biodiversity of endophytic fungi from diverse niches and their biotechnological applications. *Advances in endophytic fungal research*, 105-144.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 80(3), 756-770.

- Rasheed, U., Wu, H., Wei, J., Ou, X., Qin, P., Yao, X., ... & Liu, B. (2019). A polyphasic study of *Aspergillus* section Flavi isolated from corn in Guangxi, China-a hot spot of aflatoxin contamination. *International journal of food microbiology*, 310, 108307.
- Richards, T. A., Leonard, G., & Wideman, J. G. (2017). What defines the “kingdom” fungi? *Microbiology spectrum*, 5(3), 5-3.
- Rodrigues, I., & Naehrer, K. (2012). A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins*, 4(9), 663-675.
- Sánchez Hernández, L., Arias Mota, R. M., Rosique Gil, J. E., & Pacheco Figueroa, C. J. (2018). Diversidad del género *Trichoderma* (Hypocraceae) en un Área Natural Protegida en Tabasco, México. *Acta botánica mexicana*, (123), 167-182.
- Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... & Ruiz, B. (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *The Journal of antibiotics*, 63(8), 442-459.
- Santos C., Paterson RR, Venâncio A., Lima N. (2010). Caracterizaciones fúngicas filamentosas por espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización asistida por matriz. *J. Appl. Microbiol.* Vol 108, pp: 375–385.
- Salvatore, M. M., Alves, A., & Andolfi, A. (2020). Secondary metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*: Distribution, chemical diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Toxins*, 12(7), 457.
- Salvatore, M. M., Andolfi, A., & Nicoletti, R. (2020). The thin line between pathogenicity and endophytism: The case of *Lasiodiplodia theobromae*. *Agriculture*, 10(10), 488.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K., & Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological research*, 106(9), 996-1004.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(6), 661-686.
- Seifert, K. A., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (1995). A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous Ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 760-767.
- Şenyuva, H. Z., Gilbert, J., & Öztürkoğlu, Ş. (2008). Rapid analysis of fungal cultures and dried figs for secondary metabolites by LC/TOF-MS. *Analytica Chimica Acta*, 617(1-2), 97-106.
- Sharma, L., Bohra, N., Rajput, V. D., Quiroz-Figueroa, F. R., Singh, R. K., & Marques, G. (2020). Advances in entomopathogen isolation: a case of bacteria and fungi. *Microorganisms*, 9(1), 16.
- Shenoy, B. D., Jeewon, R., & Hyde, K. D. (2007). Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity*.
- Shukla, S; Habbu, P; Kulkarni, V; Jagadish, J; Pandey, A and Sutariya, V. (2014). Endophytic microbes: A novel source for biologically/pharmacologically active secondary metabolites. *Asian Journal of Pharmacology and toxicology*. Vol: 02, pp: 1-16.
- Simões, M. F., Pereira, L., Santos, C., & Lima, N. (2013). Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: Concepts and applications. *Management of microbial resources in the environment*, 91-117.

- Sivori, A. S. (1999). Estudio e identificación de enzimas extracelulares en *Ascobolus gamundii* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Smedsgaard, J., & Frisvad, J. C. (1996). Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 25(1), 5-17.
- Smedsgaard, J. (1997). Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of Chromatography A*, 760(2), 264-270.
- Smedsgaard, J., & Nielsen, J. (2005). Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *Journal of experimental botany*, 56(410), 273-286.
- Slama, H. B., Chenari Bouket, A., Alenezi, F. N., Pourhassan, Z., Golińska, P., Oszako, T., & Belbahri, L. (2021). Potentials of Endophytic Fungi in the Biosynthesis of Versatile Secondary Metabolites and Enzymes. *Forests*, 12(12), 1784.
- Spraker, J. E., Luu, G. T., & Sanchez, L. M. (2020). Imaging mass spectrometry for natural products discovery: A review of ionization methods. *Natural product reports*, 37(2), 150-162.
- Sridhar, KR (2019). Diversidad, ecología y significado de los endófitos fúngicos. *Endófitos y metabolitos secundarios*, 61-100.
- Stein, S. (2012). Mass spectral reference libraries: an ever-expanding resource for chemical identification.
- Stewart, A. V., Barcellos, G., & Brilman, L. (2022). Use of endophytic fungi in turf grasses; difficulties in delivering to the market. *International Turfgrass Society Research Journal*.
- Stajich, JE, Berbee, ML, Blackwell, M., Hibbett, DS, James, TY, Spatafora, JW y Taylor, JW (2009). Cartilla: los hongos. *Biología actual*: CB, 19 (18), R840.
- Strobel, G. A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and infection*, 5(6), 535-544.
- Suárez, C., & Holguín, M. S. (2011). Evaluación de medios de cultivo sintéticos y cereales para la producción de semilla de setas comestibles. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(1), 130-140.
- Suwan, S., Isobe, M., Kanokmedhakul, S., Lourit, N., Kanokmedhakul, K., Soyong, K., & Koga, K. (2000). Elucidation of high micro-heterogeneity of an acidic-neutral trichotoxin mixture from *Trichoderma harzianum* by electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 35(12), 1438-1451.
- Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tekpinar, A. D., & Kalmer, A. (2019). Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia*, 109(1-2), 187-224.

- Torres-Mendoza, D., Ortega, H. E., & Cubilla-Rios, L. (2020). Patents on endophytic fungi related to secondary metabolites and biotransformation applications. *Journal of Fungi*, 6(2), 58.
- Torres, M., Ribeiro, MA, Oliveira, JAS, Meurer, EC y Schwan-Estrada, KR (2021). Caracterización química parcial de los extractos de levadura *Lachancea thermotolerans* CCMA 0763. *African Journal of Microbiology Research*, 15 (7), 388-395.
- Tiwari, P., & Bae, H. (2022). Endophytic Fungi: Key Insights, Emerging Prospects, and Challenges in Natural Product Drug Discovery. *Microorganisms*, 10(2), 360.
- Tan, Q., Schnabel, G., Chaisiri, C., Yin, L. F., Yin, W. X., & Luo, C. X. (2022). *Colletotrichum* Species Associated with Peaches in China. *Journal of Fungi*, 8(3), 313.
- Ulrich, S., Lang, K., Niessen, L., Baschien, C., Kosicki, R., Twarużek, M., ... & Ebel, F. (2022). The Evolution of the Satratoxin and Atranone Gene Clusters of *Stachybotrys chartarum*. *Journal of Fungi*, 8(4), 340.
- Varjas, V., Lakatos, T., Tóth, T., & Kovács, C. (2021). First report of *Colletotrichum godetiae* causing Anthracnose and twig blight on persian walnut in Hungary. *Plant Disease*, 105(3), 702-702.
- Vasilyeva, L. N., & Stephenson, S. L. (2010). The problems of traditional and phylogenetic taxonomy of fungi. *Mycosphere*, 1(1), 45-51.
- Venugopalan, A., & Srivastava, S. (2015). Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 33(6), 873-887.
- Vinaixa, M., Schymanski, E. L., Neumann, S., Navarro, M., Salek, R. M., & Yanes, O. (2016). Mass spectral databases for LC/MS and GC/MS based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 78, 23-35.
- Villa, Neilyn & Kageyama, Koji & Asano, Takahiro & Suga, Haruhisa. (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia*. 98. 410-22.
- Wang Y, Guo LD, Hyde KD. (2005). Colocación taxonómica de morfotipos estériles de hongos endófitos de *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) en el noreste de China según secuencias de ADNr. *Diversidad fúngica* 20, 235 -60.
- Weaver, A. C., Weaver, D. M., Adams, N., & Yiannikouris, A. (2021). Co-Occurrence of 35 Mycotoxins: A Seven-Year Survey of Corn Grain and Corn Silage in the United States. *Toxins*, 13(8), 516.
- Weir, B. S., Johnston, P. R., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73, 115-180
- Westphal, K. R., Heidelbach, S., Zeuner, E. J., Riisgaard-Jensen, M., Nielsen, M. E., Vestergaard, S. Z., ... & Sondergaard, T. E. (2021). The effects of different potato dextrose agar media on secondary metabolite production in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 347, 109171.
- Wilson, D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 274-276.

- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp 315–322.
- Xie, J., Wei, J. G., Wang, K. W., Luo, J., Wu, Y. J., Luo, J. T., ... & Yang, X. B. (2020). Three phytotoxins produced by *Neopestalotiopsis clavispora*, the causal agent of ring spot on *Kadsura coccinea*. *Microbiological Research*, 238, 126531.
- Xu, J., Ebada, S. S., & Proksch, P. (2010). *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. *Fungal Diversity*, 44(1), 15-31.
- Xu, C., Xu, K., Yuan, X. L., Ren, G. W., Wang, X. Q., Li, W., ... & Zhang, P. (2020). Characterization of diketopiperazine heterodimers as potential chemical markers for discrimination of two dominant black aspergilli, *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*. *Phytochemistry*, 176, 112399.
- Xu, T. C., Lu, Y. H., Wang, J. F., Song, Z. Q., Hou, Y. G., Liu, S. S., ... & Wu, S. H. (2021). Bioactive secondary metabolites of the genus *Diaporthe* and anamorph *Phomopsis* from terrestrial and marine habitats and endophytes: 2010–2019. *Microorganisms*, 9(2), 217.
- Yang, X. L., Zhang, J. Z., & Luo, D. Q. (2012). The taxonomy, biology, and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. *Natural product reports*, 29(6), 622-641.
- Yang, M. Y., Wang, Y. X., Chang, Q. H., Li, L. F., Liu, Y. F., & Cao, F. (2021). Cytochalasans and azaphilones: suitable chemotaxonomic markers for the *Chaetomium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(21), 8139-8155.
- Yadav, A. N., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., & Yadav, A. (2022). Endophytic fungal communities and their biotechnological implications for agro-environmental sustainability. *Folia Microbiologica*, 1-30.
- Yahr, R., Schoch, C. L., & Dentinger, B. T. (2016). Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: impacts of barcoding approaches. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1702), 20150336.
- Zhao, X. M., Wang, Z. Q., Shu, S. H., Wang, W. J., Xu, H. J., Ahn, Y. J., ... & Hu, X. (2013). Ethanol and methanol can improve huperzine A production from endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* ES026. *PLoS one*, 8(4), e61777.
- Zhang, H. W., Song, Y. C., & Tan, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports*, 23(5), 753-771.
- Zhong, J.J.; Xiao, J.H. (2009). Secondary metabolites from higher fungi: Discovery, bioactivity, and bioproduction. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 113, 79–150
- Zhou X, Li Q, Zhao J, Tang K, Lin J, Yin Y. (2007). Comparison of rapid DNA extraction methods applied to PCR identification of medicinal mushroom *Ganoderma* spp. *Prep Biochem Biotechnol.* 2007;37(4):369-80.

ANEXO 1

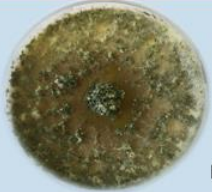
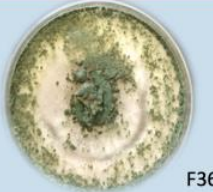
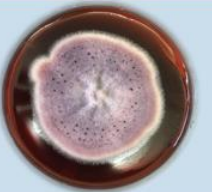


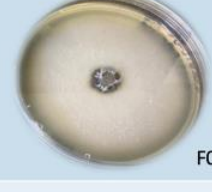


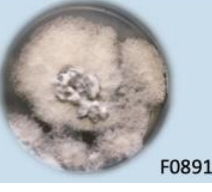

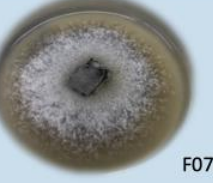
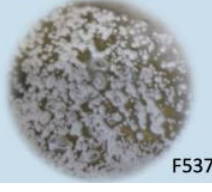
Cuadro 4.1. Porcentajes de identidad obtenidos en los análisis de BLAST de GenBank®

Sample ID	Cepa de referencia de GenBank®	Porcentaje de Identidad Blastn (%)	Acceso de NCBI
F0619	<i>Lasiodiplodia iranensis</i> _MN046826.1	100	MN046826.1
	<i>Lasiodiplodia iranensis</i> _MK282705.1	99.65	MK282705.1
	<i>Lasiodiplodia iranensis</i> _OL375425.1	99.65	OL375425.1
	<i>Lasiodiplodia iranensis</i> _OL375424.1	99.65	OL375424.1
	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> _MN223982.1	99.65	MN223982.1
F0728	Fungal endophyte_KF436389.1	99.81	KF436389.1
	<i>Diaporthe</i> sp._MH465211.1	99.81	MH465211.1
	<i>Diaporthe</i> sp._MH465195.1	99.62	MH465195.1
	<i>Diaporthe</i> sp._MH465222.1	99.81	MH465222.1
	<i>Diaporthe stewartii</i> _KU204549.1	99.81	KU204549.1
F0891	Fungal endophyte_KF435647.1	99.81	KF435647.1
	<i>Diaporthe</i> sp._MH465195.1	99.83	MH465195.1
	<i>Diaporthe</i> sp._MH465211.1	100	MH465211.1
	<i>Diaporthe stewartii</i> _KU204549.1	99.82	KU204549.1
	<i>Diaporthe melonis</i> _KT972129.1	98.80	KT972129.1
F0769-A	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> _GU066701.1	99.81	GU066701.1
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> _KU529859.1	99.61	KU529859.1
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> _KU377507.1	99.61	KU377507.1
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> _MT466515.1	99.42	MT466515.1
	Fungal sp._KM265535.1	99.81	MK311219.1
F0769-B	<i>Colletotrichum acutatum</i> _MZ823601.1	98.05	MZ823601.1
	<i>Colletotrichum acutatum</i> _KX347475.1	98.04	KX347475.1
	<i>Colletotrichum acutatum</i> _KX347453.1	98.04	KX347453.1
	<i>Colletotrichum gigasporum</i> _MW406832.1	98.04	MW406832.1
	<i>Colletotrichum gigasporum</i> _LC488842.1	97.66	LC488842.1
F0649	<i>Trichoderma harzianum</i> _MT341774.1	100	MT341774.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> _MG575487.1	100	MG575487.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> _MW579427.1	100	MW579427.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> _AF443925.1	100	AF443925.1
	<i>Trichoderma lixii</i> _OK175851.1	99.84	OK175851.1
F3618	<i>Trichoderma harzianum</i> _MT102390.1	99.84	MT102390.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> _KF201295.1	99.84	KF201295.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> _MH651386.1	99.68	MH651386.1
	<i>Trichoderma harzianum</i> _MK738147.1	99.60	MK738147.1
	<i>Trichoderma citrinoviride</i> _MH651380.1	99.68	MH651380.1

F3621	<i>Penicillium ochrochloron</i> _AJ509865.1	99.26	AJ509865.1
	<i>Penicillium ochrochloron</i> _KU702698.1	99.62	KU702698.1
	<i>Penicillium ochrochloron</i> _MK789684.1	98.90	MK789684.1
	<i>Penicillium ochrochloron</i> _KJ188697.1	98.52	KJ188697.1
	<i>Penicillium pulvillorum</i> _MK450709.1	99.45	MK450709.1
F3607	<i>Penicillium adametzii</i> _MT949921.1	99.64	MT949921.1
	<i>Penicillium adametzii</i> _MT949920.1	99.64	MT949920.1
	<i>Penicillium adametzii</i> _MT949902.1	99.64	MT949902.1
	<i>Penicillium adametzii</i> _OK584585.1	99.27	OK584585.1
	<i>Penicillium</i> sp._MF942970.1	99.63	OK584601.1
F3476	<i>Pestalotiopsis</i> sp._GU592005.1	99.48	GU592005.1
	<i>Pestalotiopsis</i> sp._HQ832816.1	99.48	HQ832816.1
	<i>Pestalotiopsis</i> sp._MH397482.1	99.48	MH397482.1
	<i>Pestalotiopsis</i> sp._EU644755.1	99.31	EU644755.1
	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i> _MN888956.1	99.48	MN888956.1
F6322	<i>Neopestalotiopsis clavispора</i> _MT151848.1	99.13	MT151848.1
	<i>Neopestalotiopsis clavispора</i> _MN519192.1	99.13	MN519192.1
	<i>Pestalotiopsis</i> sp._EU644755.1	99.48	EU644755.1
	<i>Pestalotiopsis</i> sp._MH397482.1	99.48	MH397482.1
	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i> _MN888956.1	99.48	MN888956.1
F5376	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i> _MN888956.1	99.65	MN888956.1
	<i>Pestalotiopsis</i> sp._EU644755.1	99.47	EU644755.1
	<i>Pestalotiopsis</i> sp._MH397482.1	99.65	MH397482.1
	<i>Pestalotiopsis</i> sp._HQ832816.1	99.65	HQ832816.1
	<i>Pestalotiopsis</i> sp._GQ254681.1	99.65	GQ254681.1
F6338	<i>Purpureocillium lilacinum</i> _MK713631.1	99.17	MK713631.1
	<i>Purpureocillium lilacinum</i> _MT529584.1	98.89	MT529584.1
	<i>Purpureocillium lilacinum</i> _MT420635.1	98.89	MT420635.1
	<i>Purpureocillium lilacinum</i> _MK390498.1	98.89	MK390498.1
	<i>Penicillium</i> sp._MN497369.1	98.89	MN497369.1
F5405	<i>Fusarium proliferatum</i> _MT560216.1	98.78	MT560216.1
	<i>Fusarium proliferatum</i> _MK828121.1	98.44	MK828121.1
	<i>Fusarium solani</i> _MN077430.1	98.44	MN077430.1
	<i>Fusarium solani</i> _KU712219.1	98.44	KU712219.1
	<i>Fusarium solani</i> _MH782046.1	98.26	MH782046.1
F0871	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i> _MG980311.1	94.29	MG980311.1
	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i> _KU663478.1	94.68	KU663478.1
	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i> _KM100721.1	94.67	KM100721.1
	<i>Diaporthe hongkongensis</i> _MW341277.1	93.78	MW341277.1
	<i>Diaporthe</i> sp._MN341295.1	94.48	MN341295.1

ANEXO 2

Cuadro 4.2. Morfología macroscópica frontal de las 15 cepas fúngicas clasificadas por género.

Género	Morfología macroscópica frontal		Género	Morfología macroscópica frontal	
<i>Trichoderma</i>	 F0649	 F3618	<i>Fusarium</i>	 F5405	
<i>Penicillium</i>	 F3607	 F3621	<i>Lasiodiplodia</i>	 F0619	
<i>Colletotrichum</i>	 F0769-A	 F0769-B	<i>Purpureocillium</i>	 F6338	
Géneros no identificados morfológicamente					
 F0891	 F3476	 F0728	 F5376	 F0871	 F6322

ANEXO 3



Figura 4.1. Filogenia de *Lasiodiplodia* basado en análisis de Máximo Likelihood. Estimado a partir de secuencias del locus ITS, utilizando a *Penicillium pulvillorum* como grupo externo.



Figura 4.2. Filogenia de *Trichoderma* basado en análisis de Máximo Likelihood. Estimado a partir de secuencias del locus ITS, utilizando a *Penicillium pulvillorum* como grupo externo.

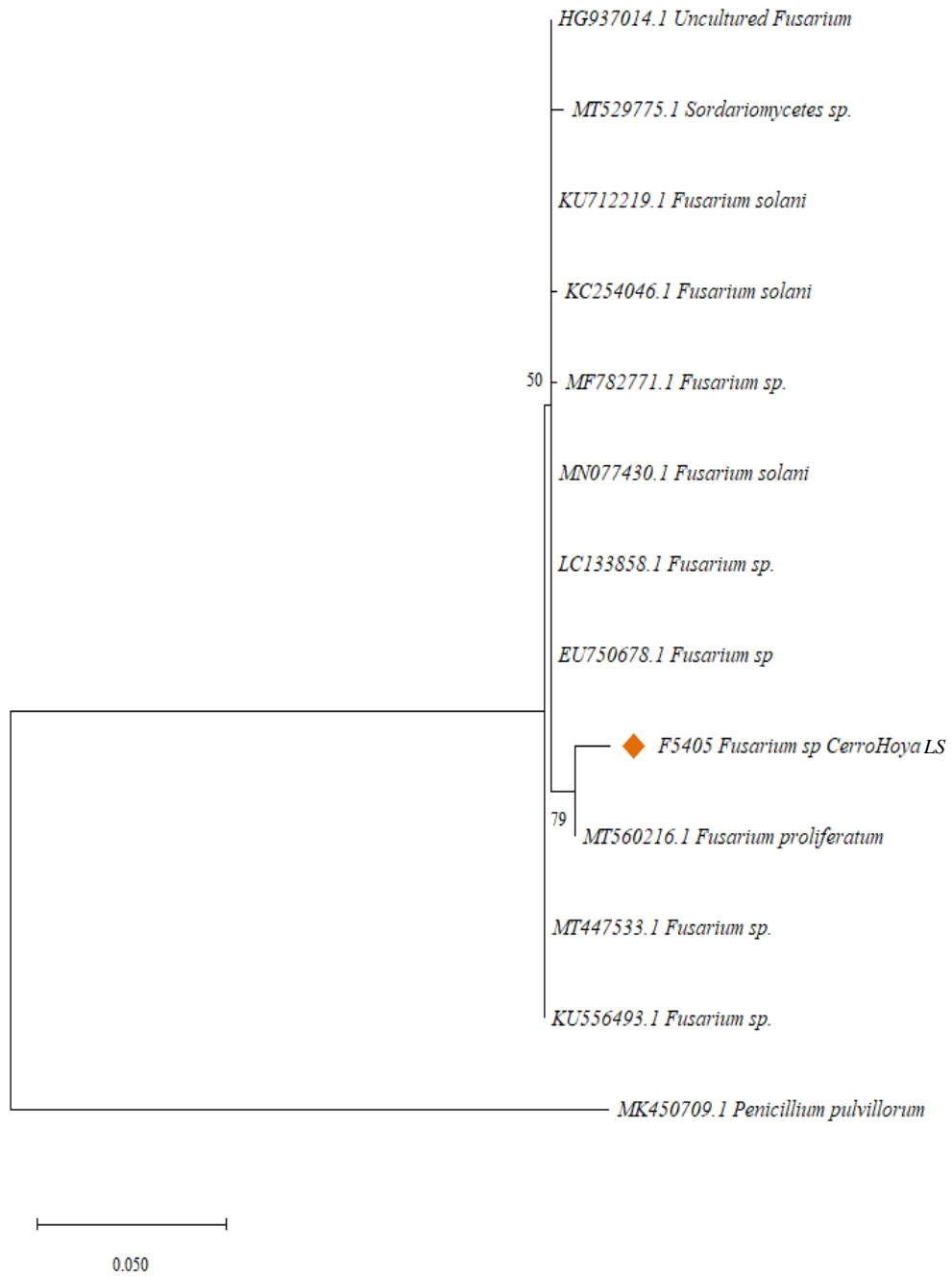


Figura 4.3. Filogenia de *Fusarium* basado en análisis de Máximo Likelihood. Estimado a partir de secuencias del locus ITS, utilizando a *Penicillium pulvillorum* como grupo externo.

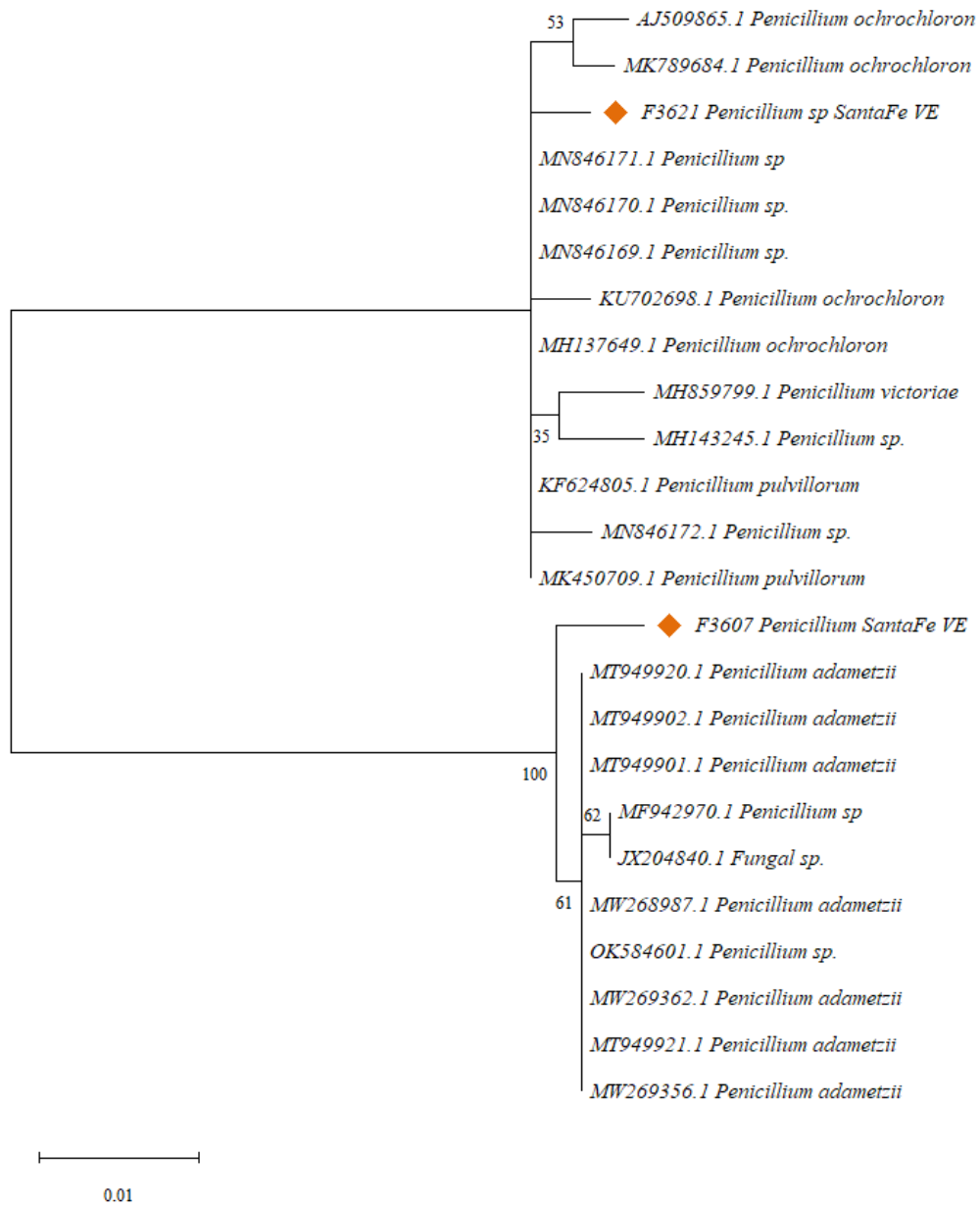


Figura 4.4. Filogenia de *Penicillium* basado en análisis de Máximo Likelihood. Estimado a partir de secuencias del locus ITS.

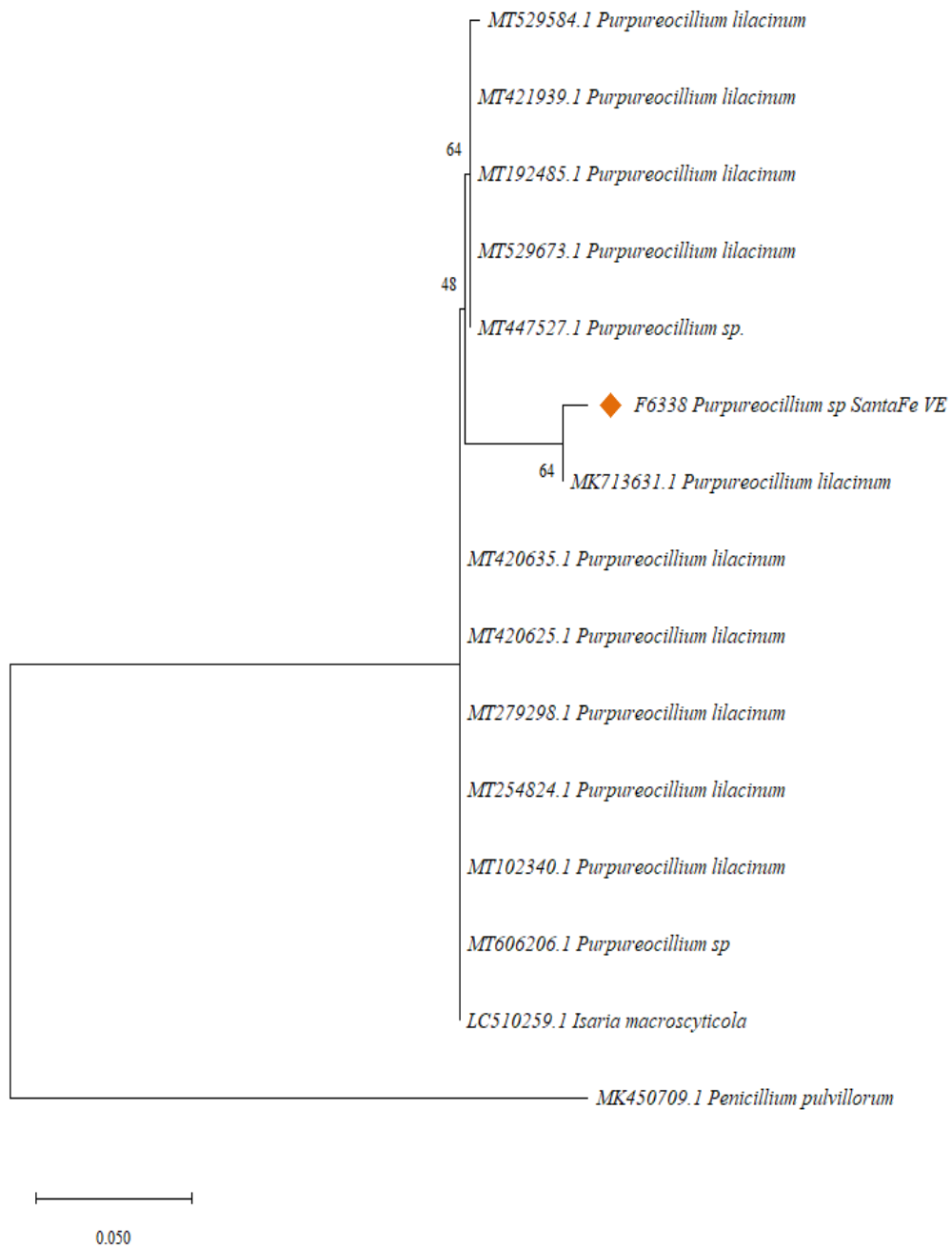


Figura 4.5. Filogenia de *Purpureocillium* basado en análisis de Máximo Likelihood. Estimado a partir de secuencias del locus ITS, utilizando a *Penicillium pulvillorum* como grupo externo.

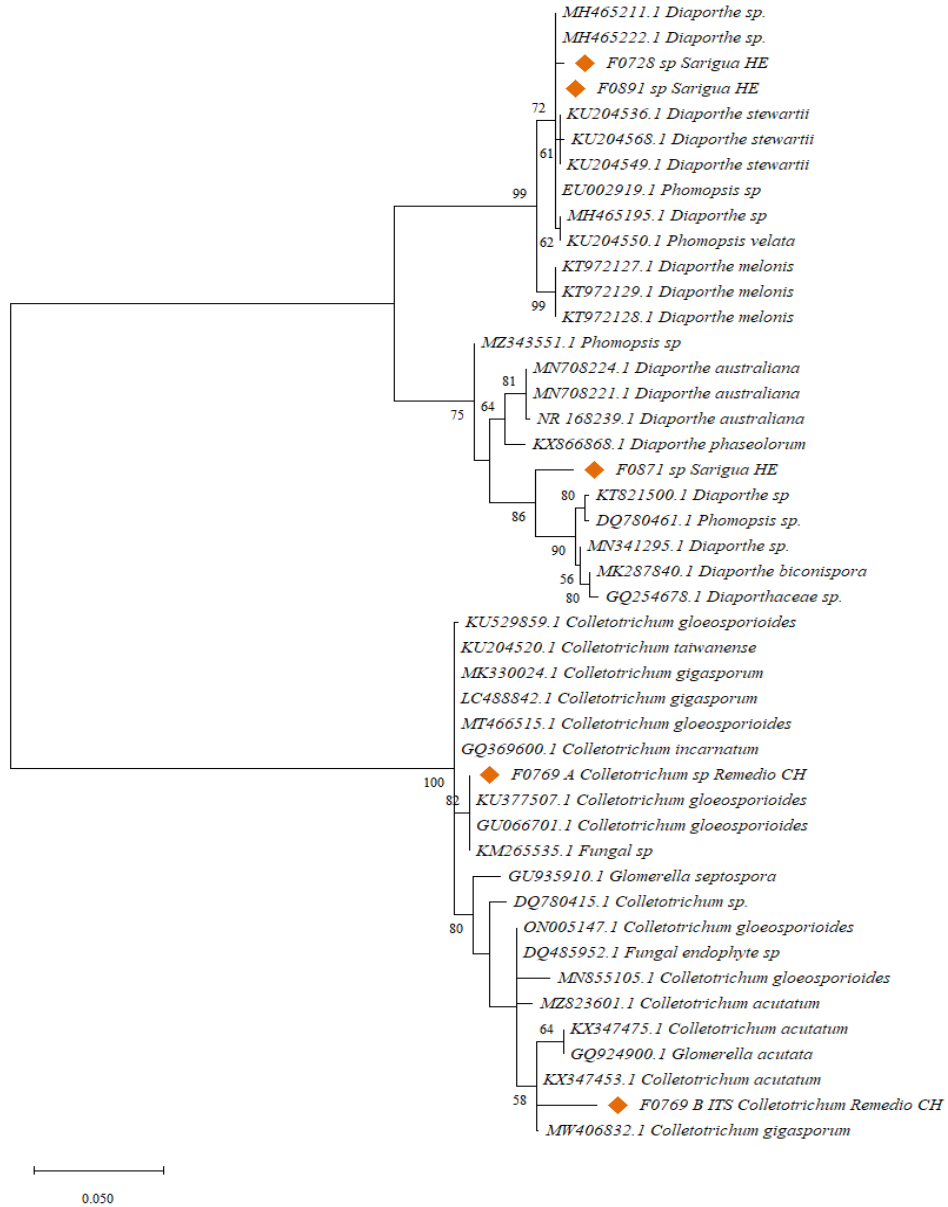


Figura 4.6. Filogenia de *Colletotrichum* y *Diaporthe* basado en análisis de Máximo Likelihood. Estimado a partir de secuencias del locus ITS.

ANEXO 4

Perfiles de huella química de los hongos endófitos en ESI +.

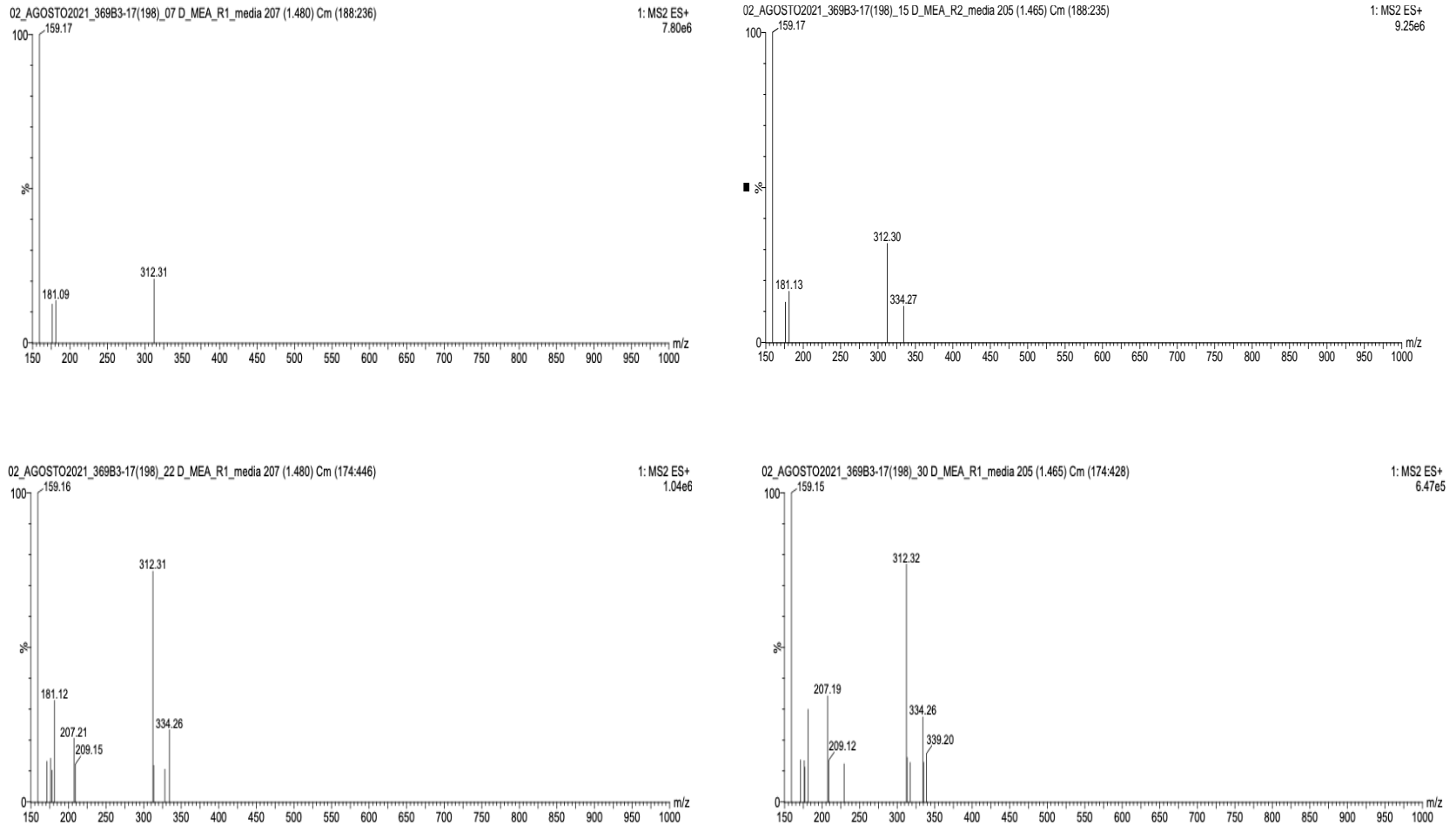


Figura 4.7. Perfil de huella química F0619 *Lasiodiplodia sp._MEA* a los 4 tiempos de crecimiento.

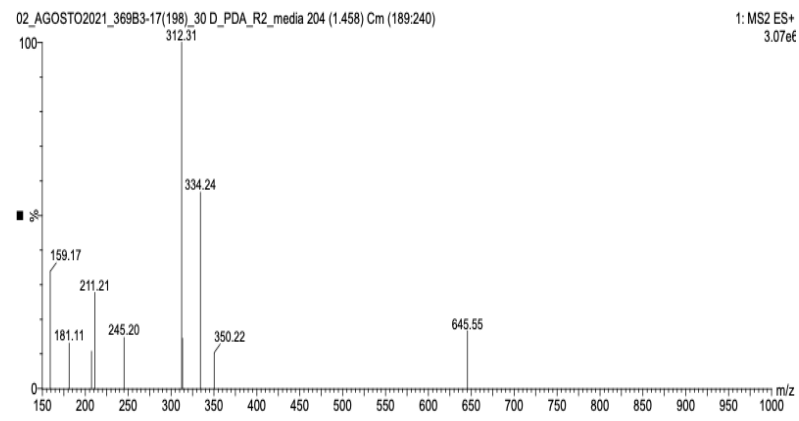
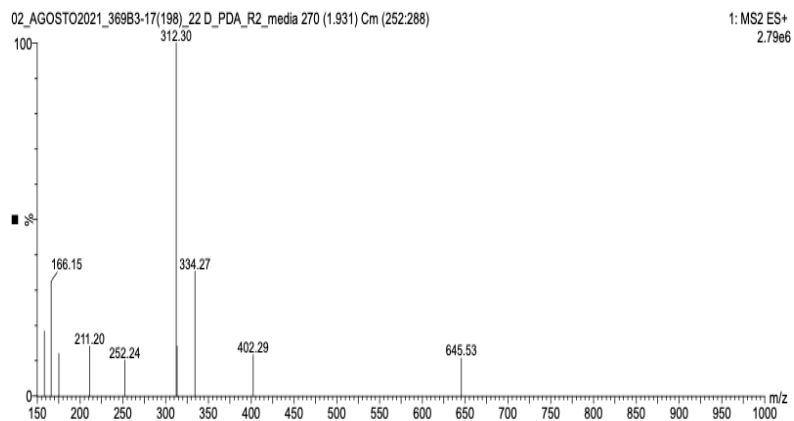
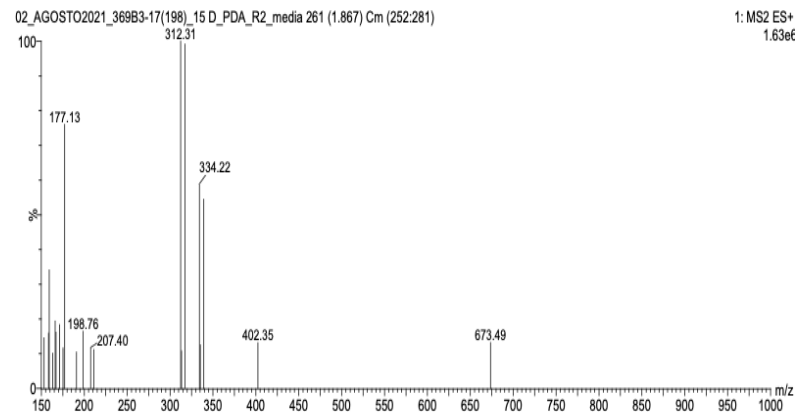
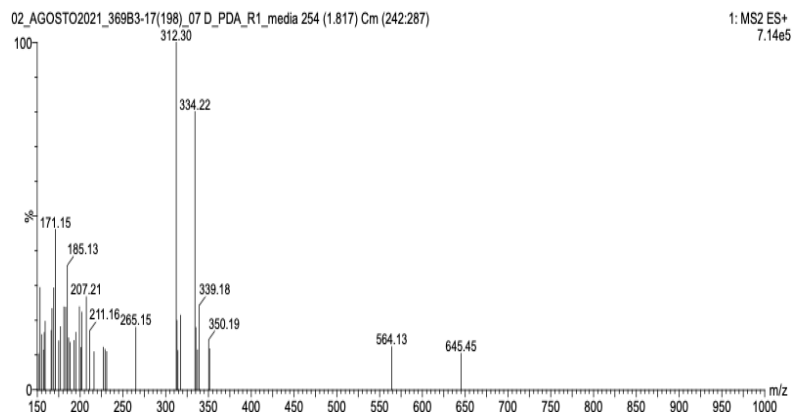


Figura 4.8. Perfil de huella química F0619 - *Lasiodiplodia* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

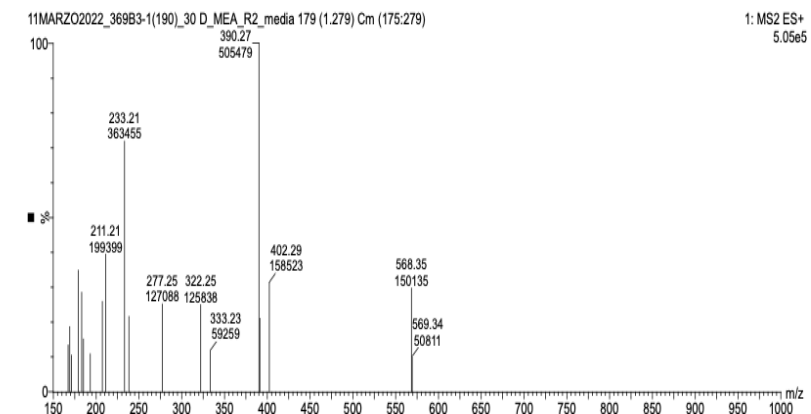
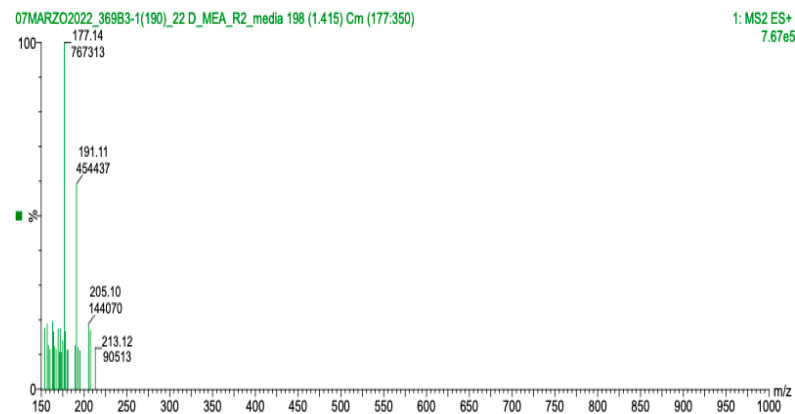
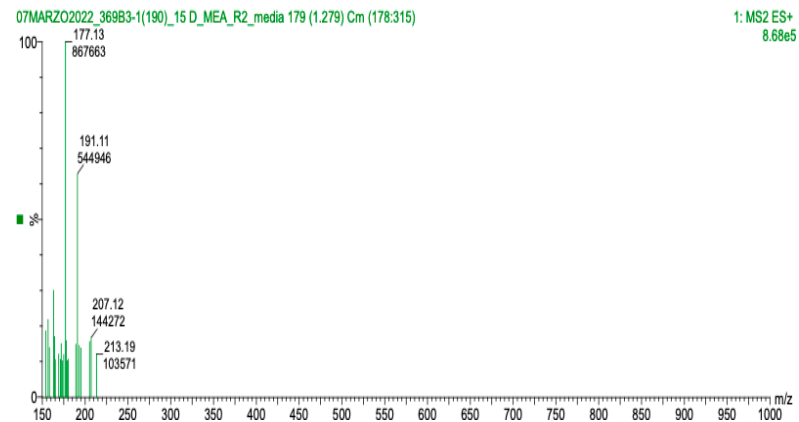
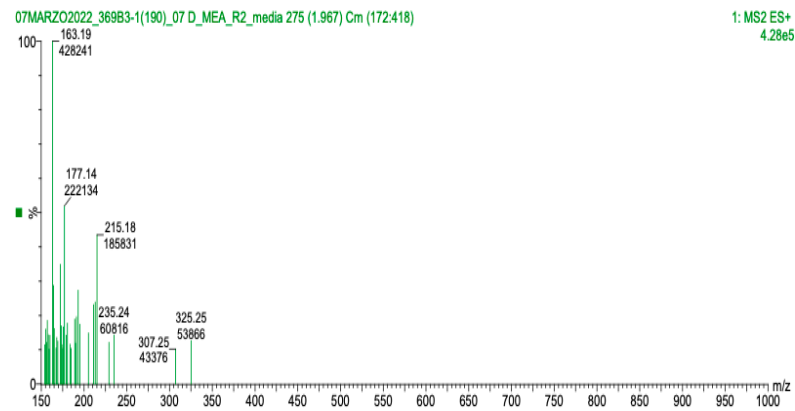


Figura 4.9. Perfil de huella química F0728 - *Diaporthe* sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

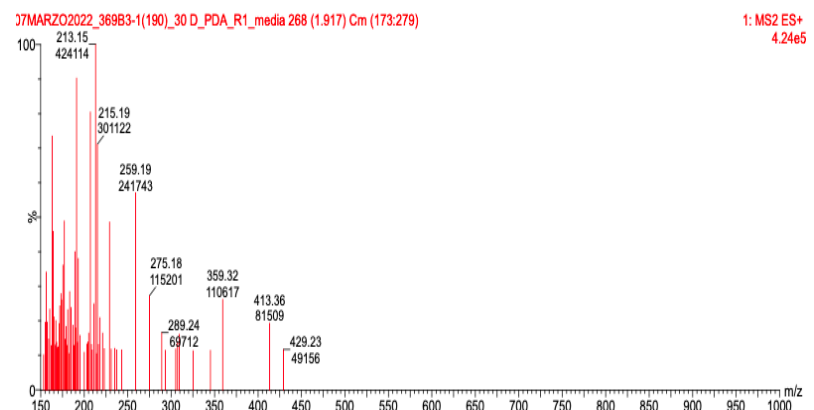
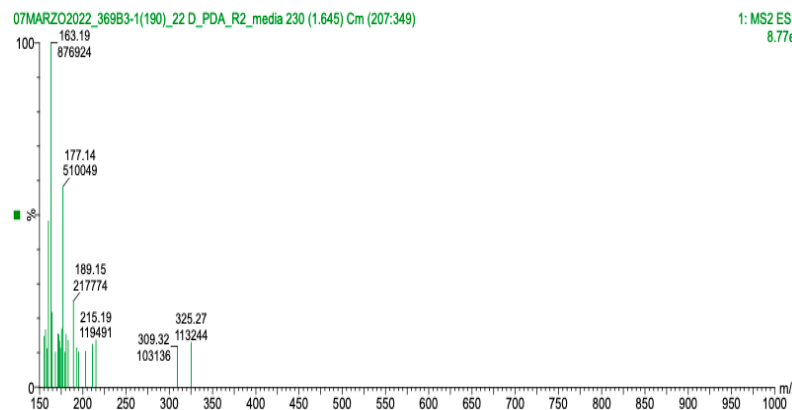
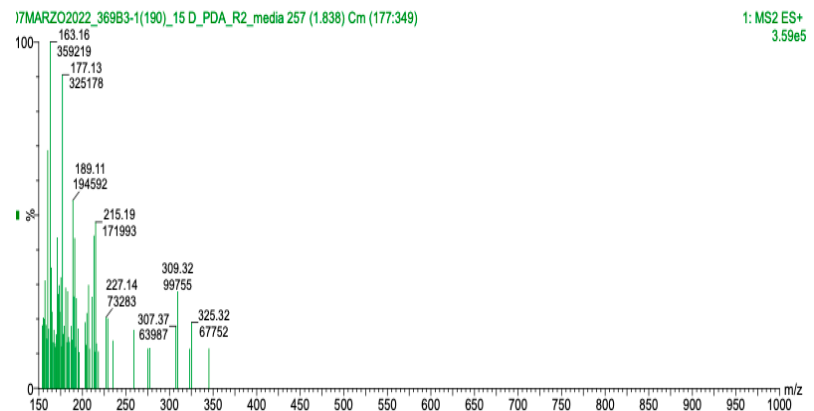
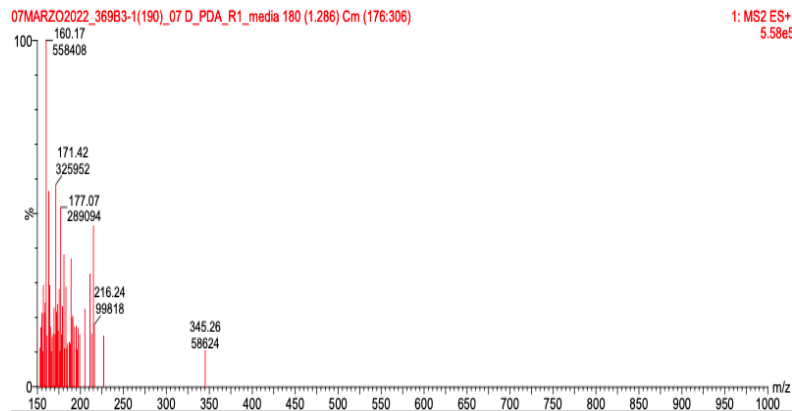


Figura 4.10. Perfil de huella química F0728 - *Diaporthe* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

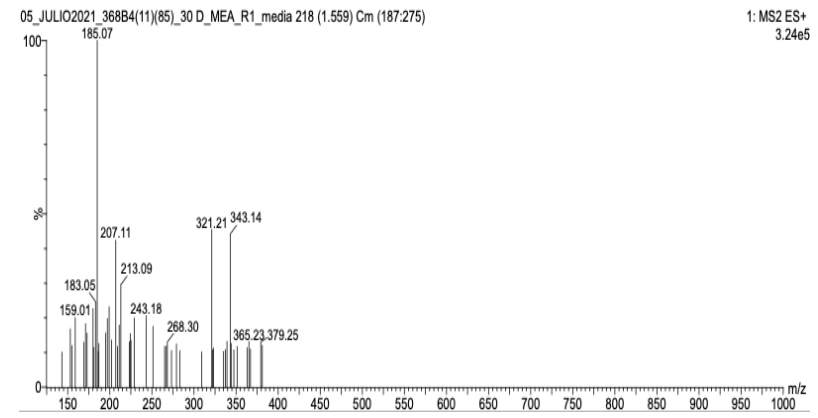
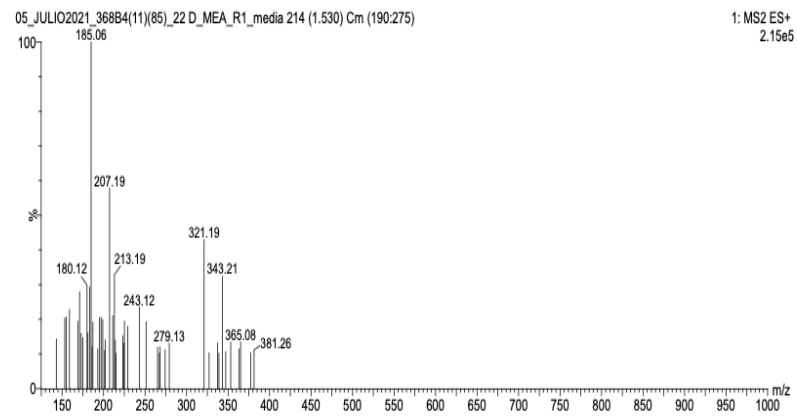
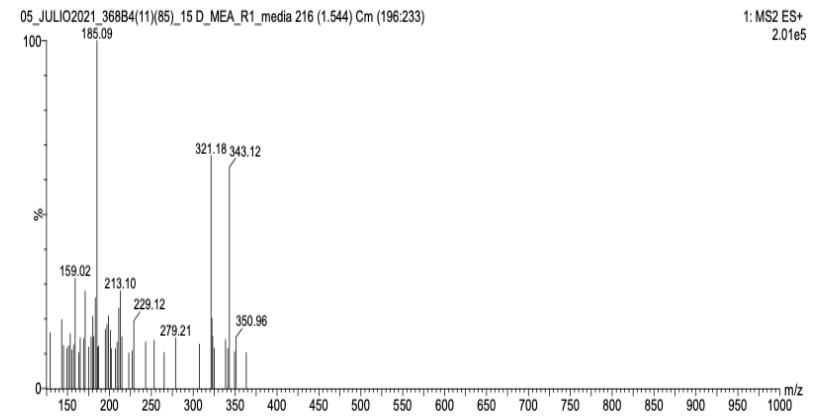
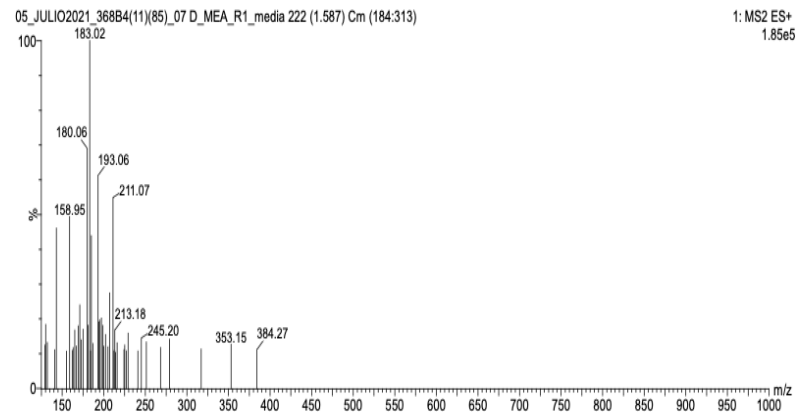


Figura 4.11. Perfil de huella química F0891 - *Diaporthe* sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

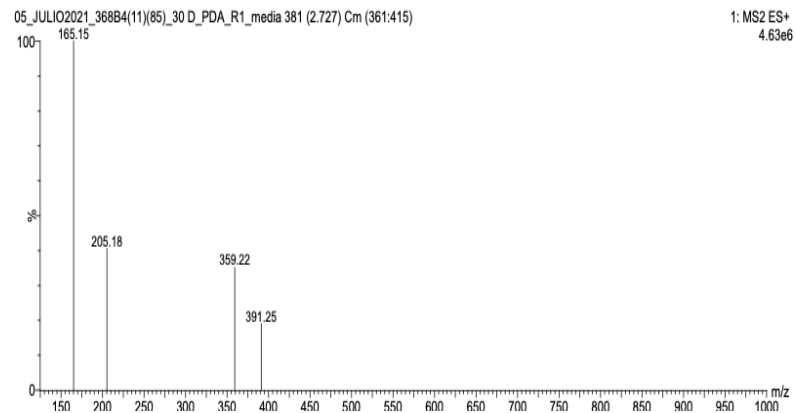
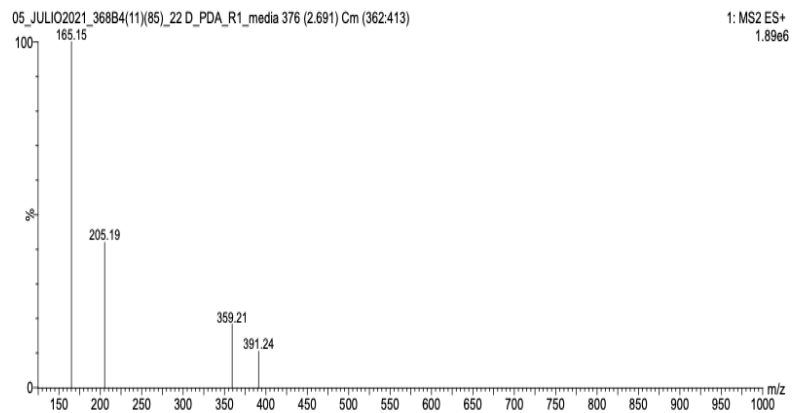
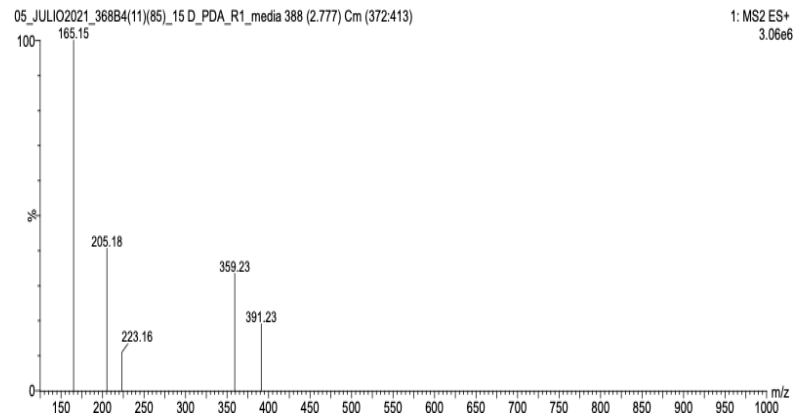
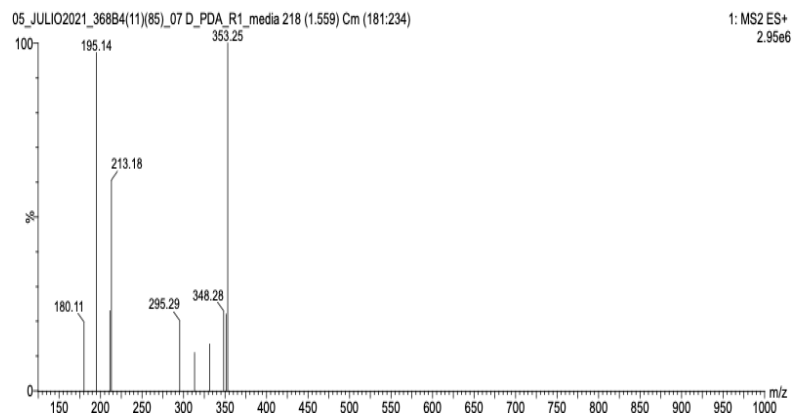


Figura 4.12. Perfil de huella química F0891 - *Diaporthe* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

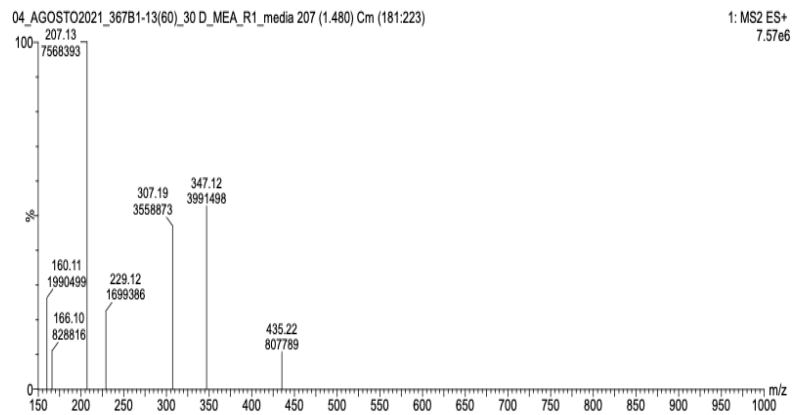
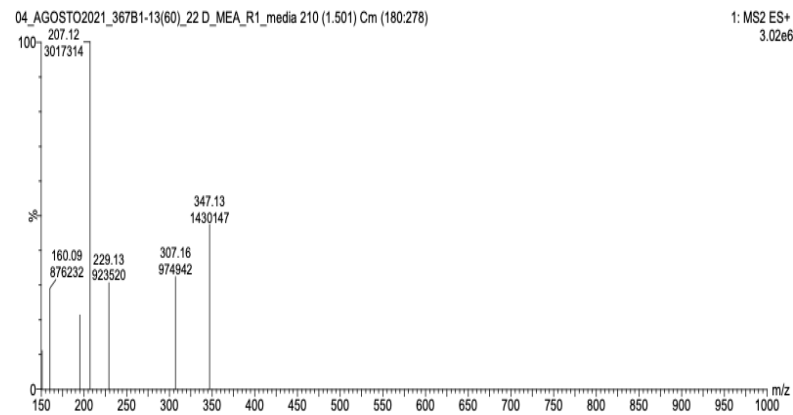
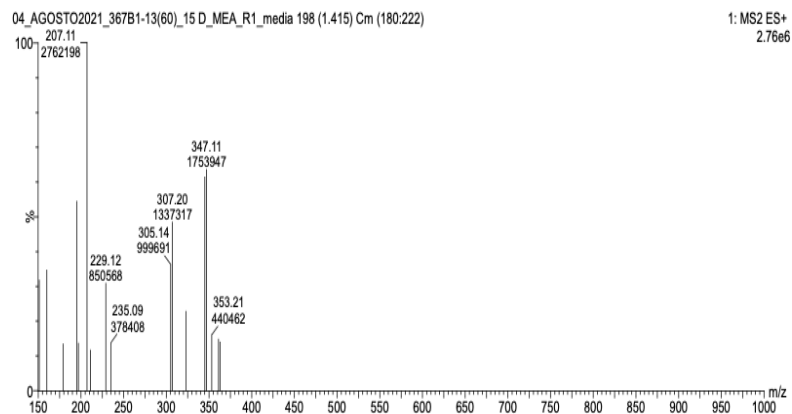
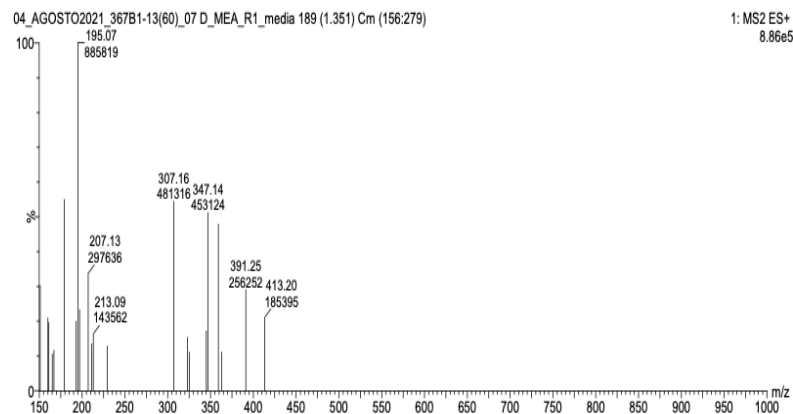


Figura 4.13. Perfil de huella química F0871 *Diaporthe* sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

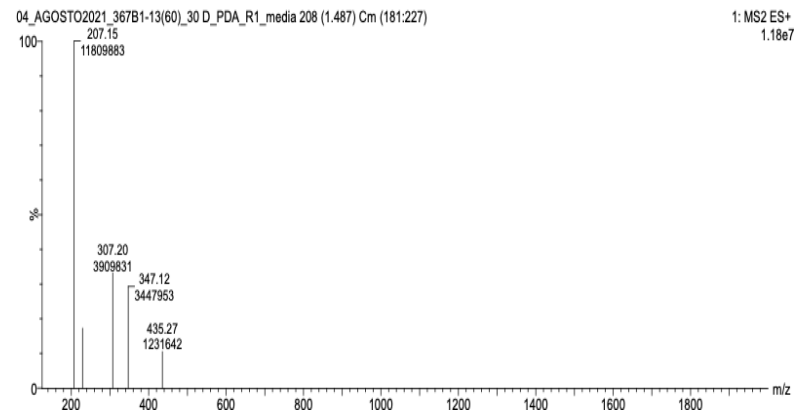
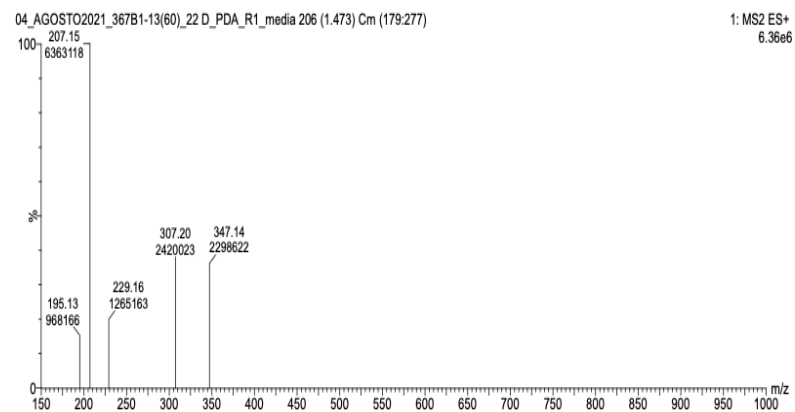
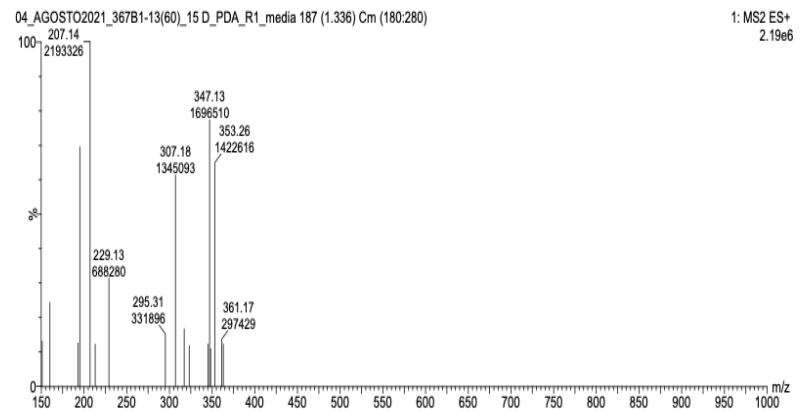
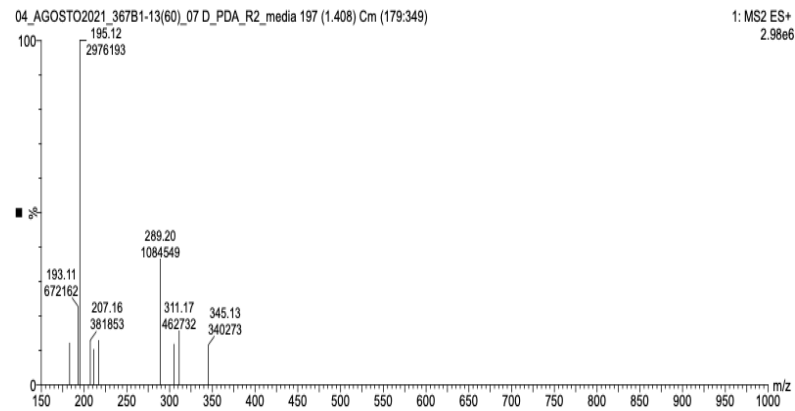


Figura 4.14. Perfil de huella química F0871 - *Diaporthe* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

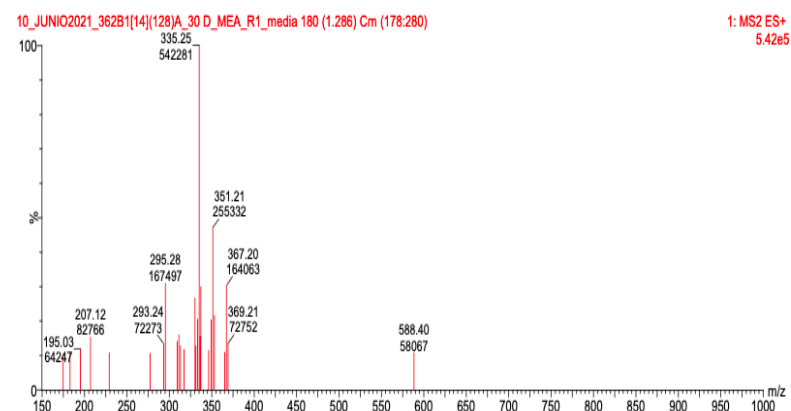
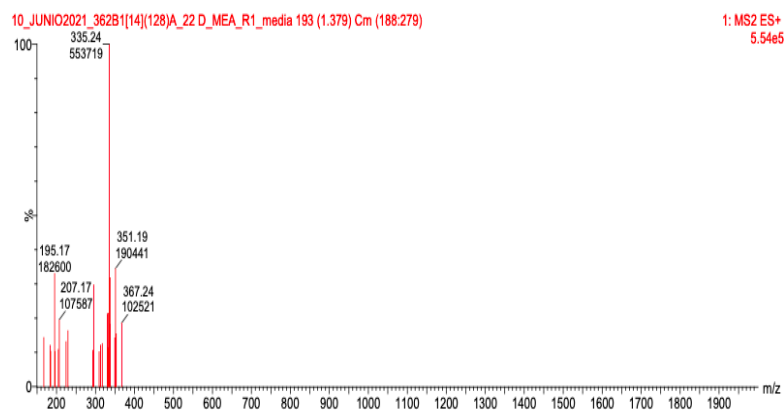
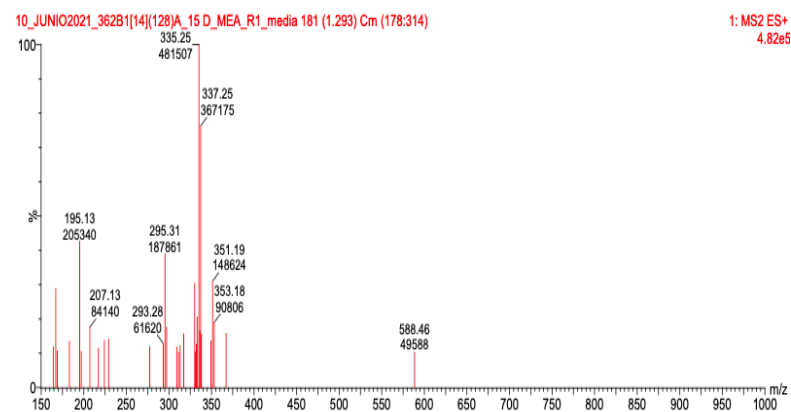
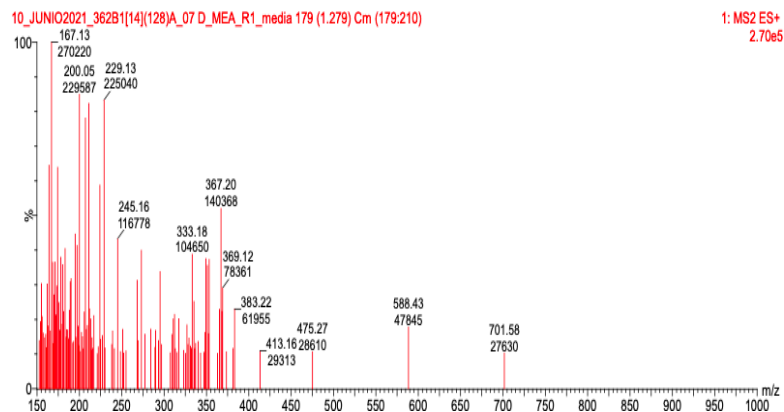


Figura 4.15. Perfil de huella química F0769 A *Colletotrichum* sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

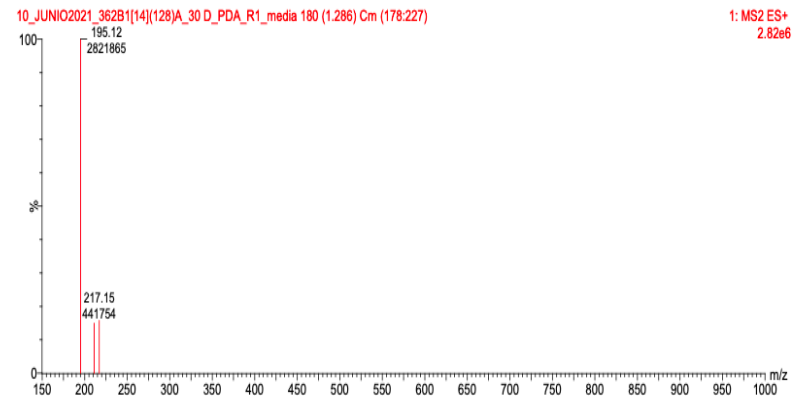
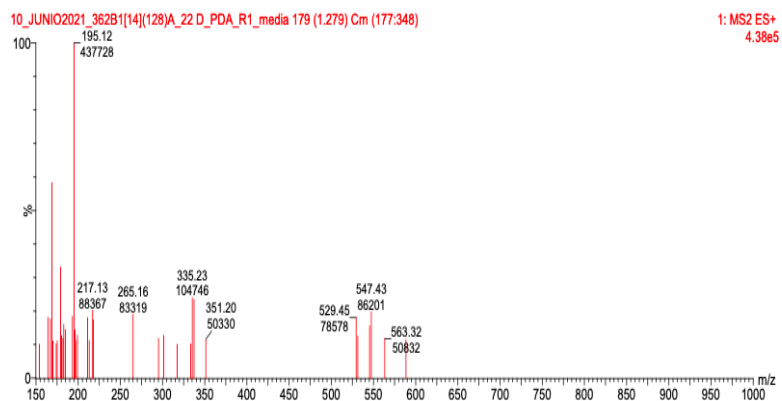
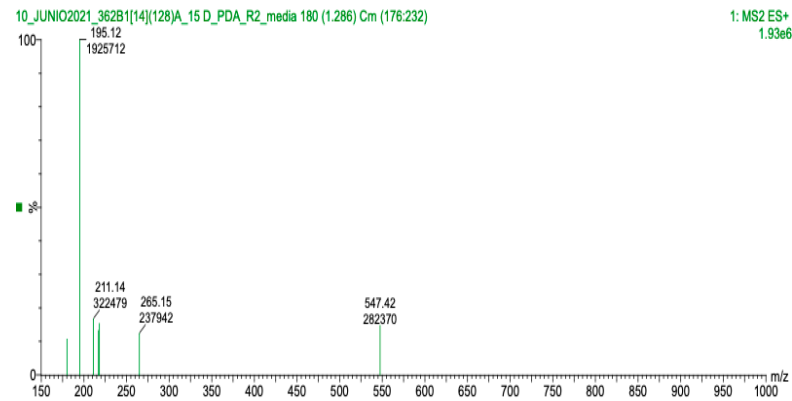
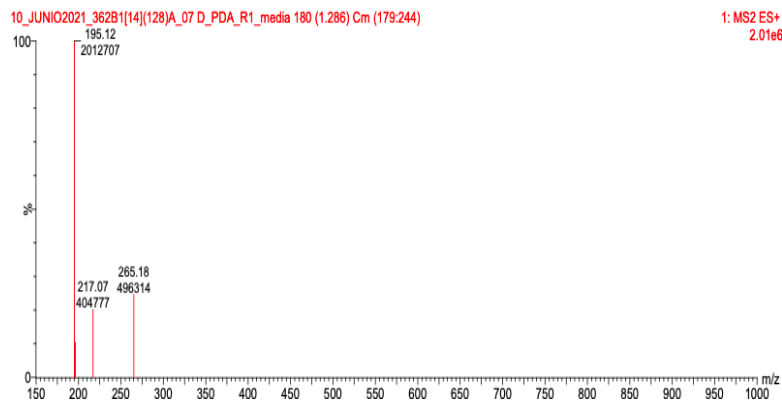


Figura 4.16. Perfil de huella química F0769 A *Colletotrichum* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

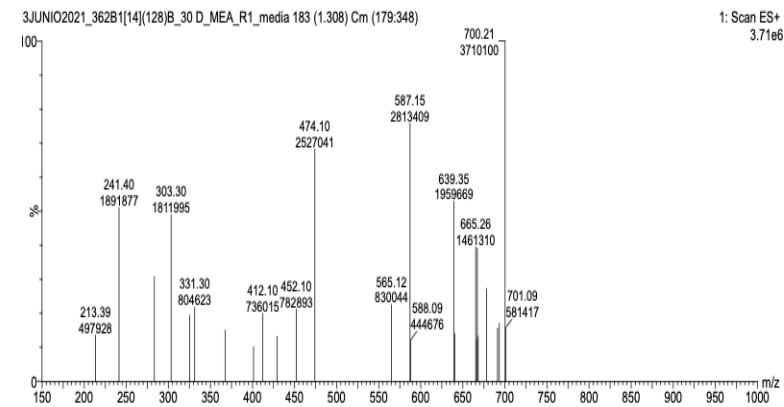
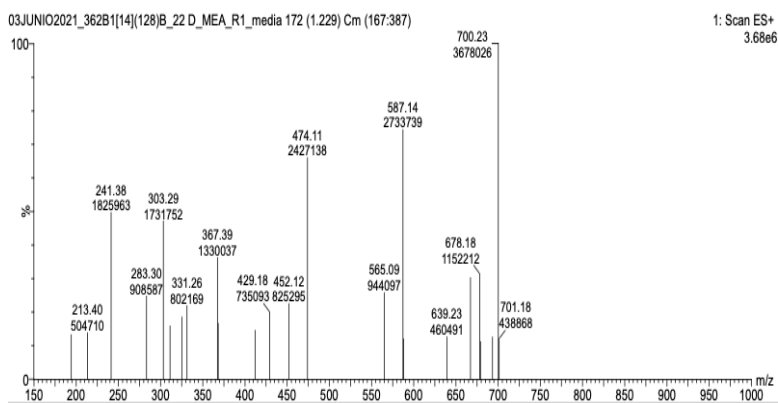
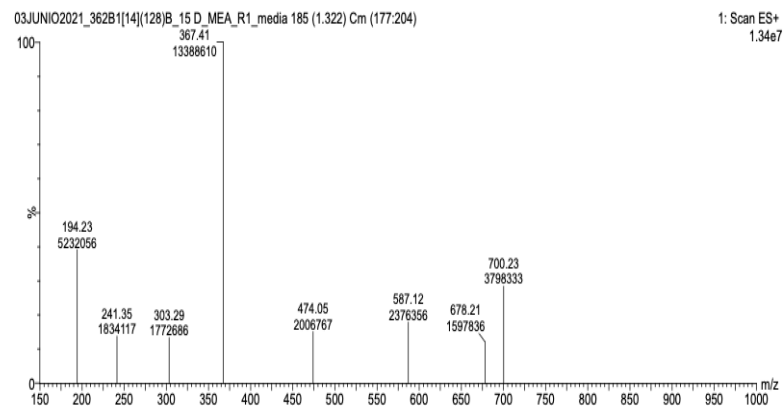
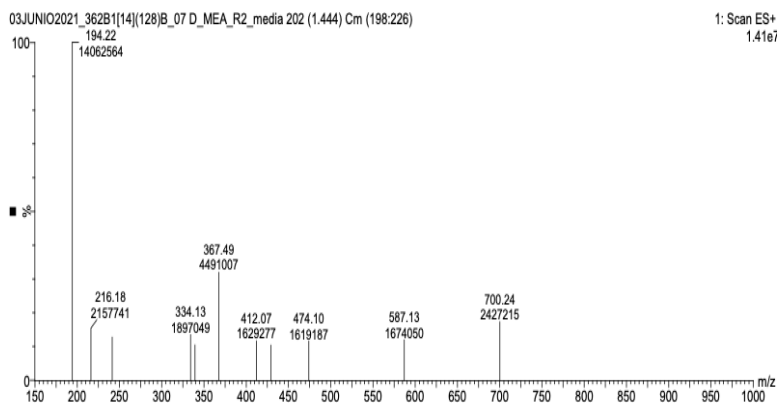


Figura 4.17. Perfil de huella química F0769 B *Diaporthe* sp. MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

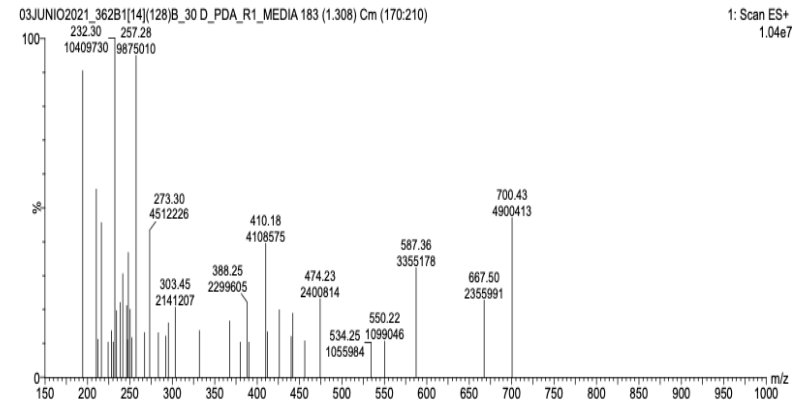
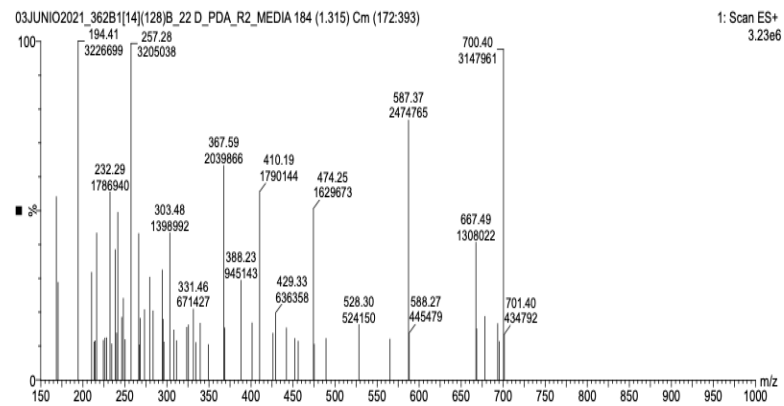
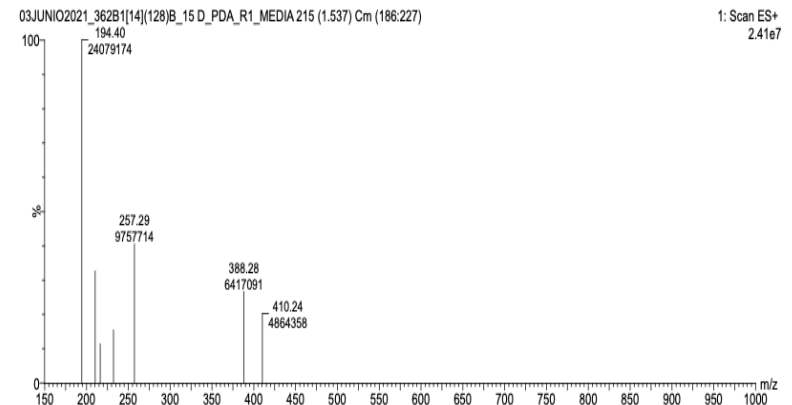
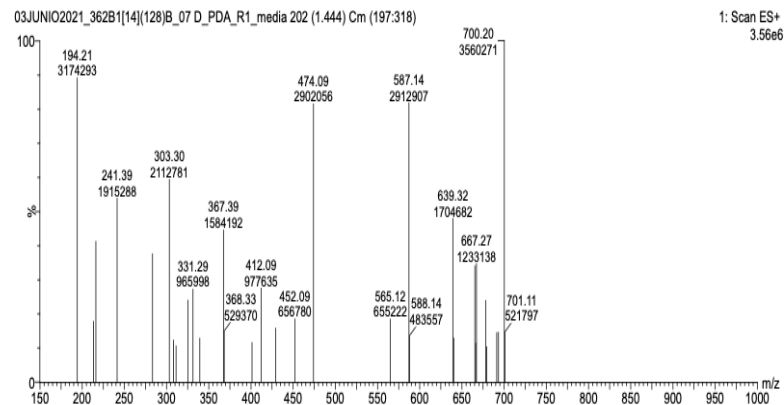


Figura 4.18. Perfil de huella química F0769 B *Diaporthe* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

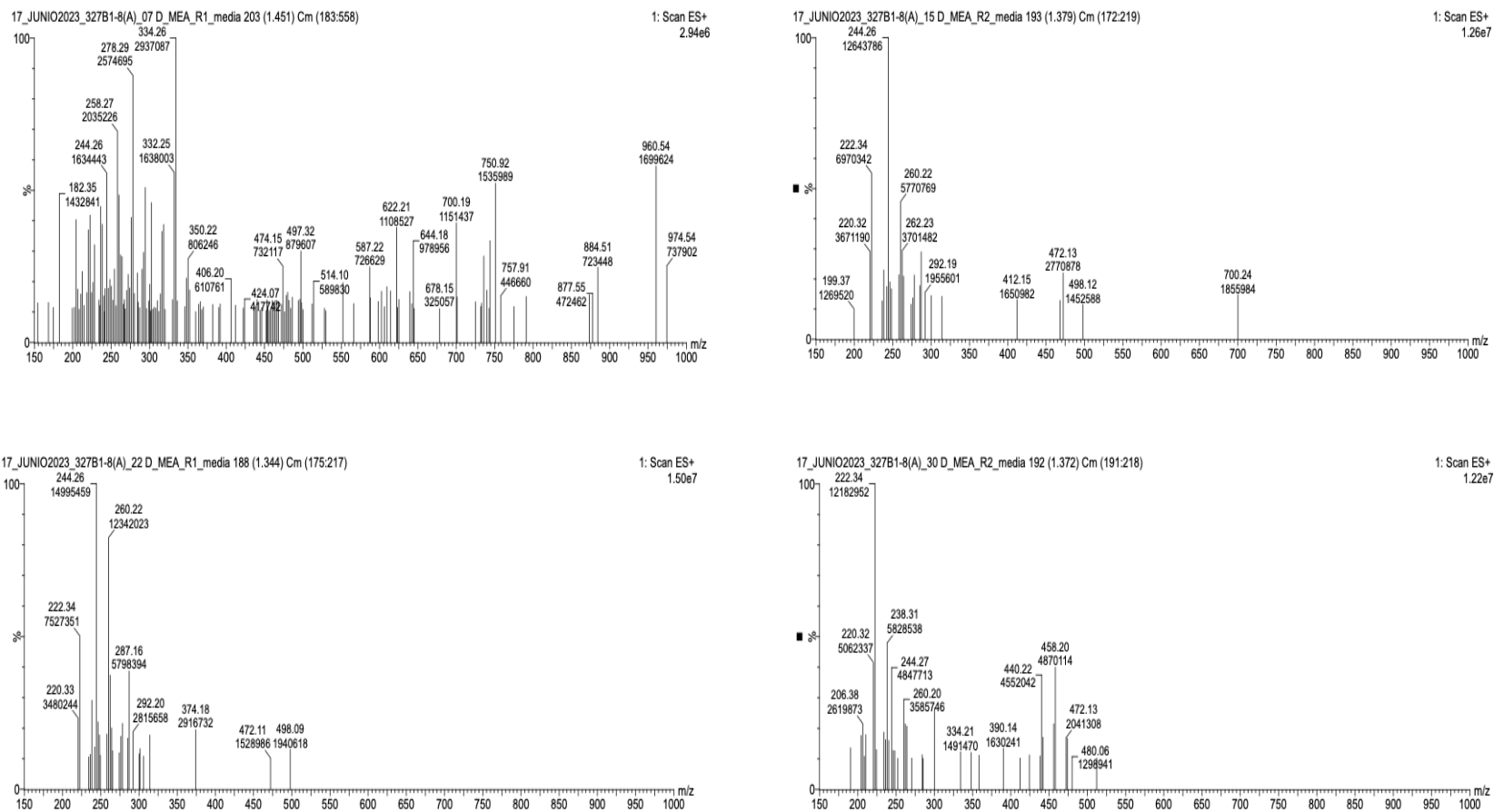


Figura 4.19. Perfil de huella química F0649 *Thichoderma* sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

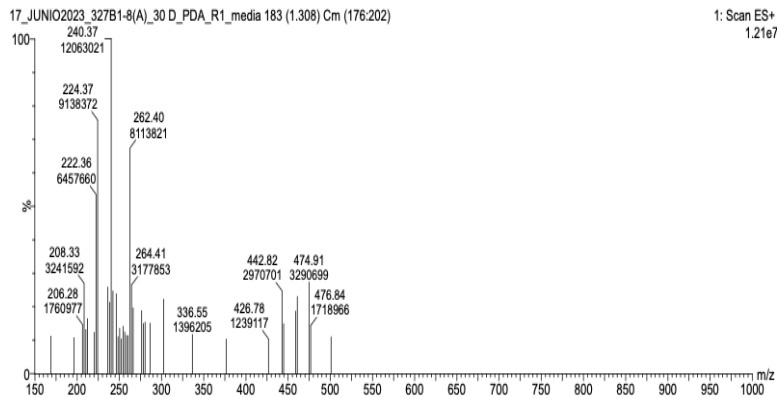
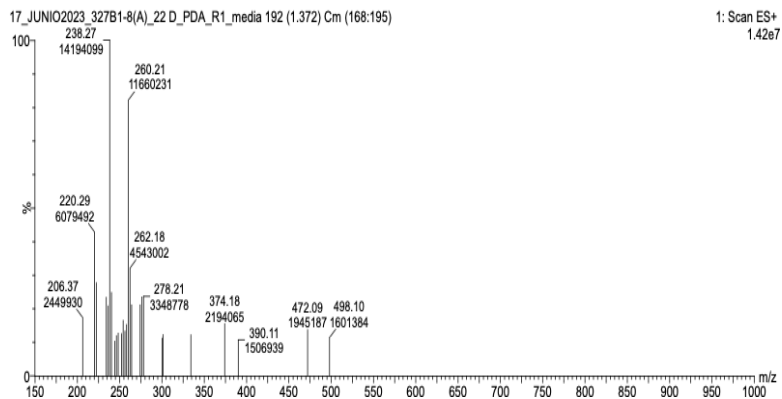
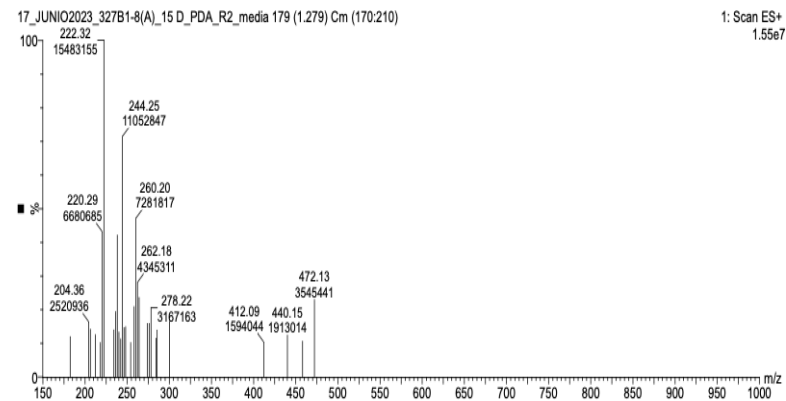
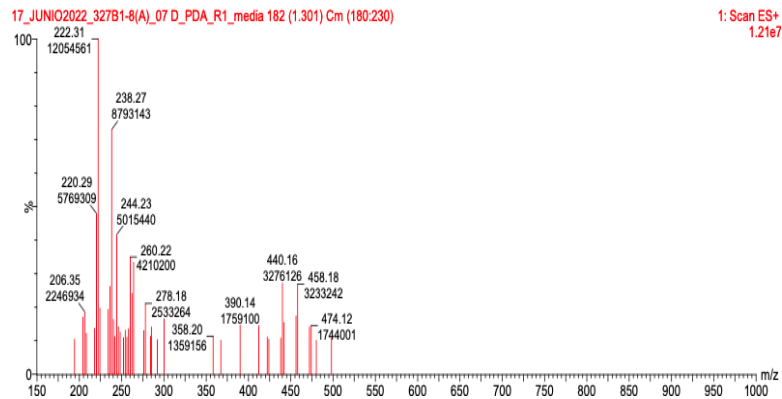


Figura 4.20. Perfil de huella química F0649 *Thichoderma* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

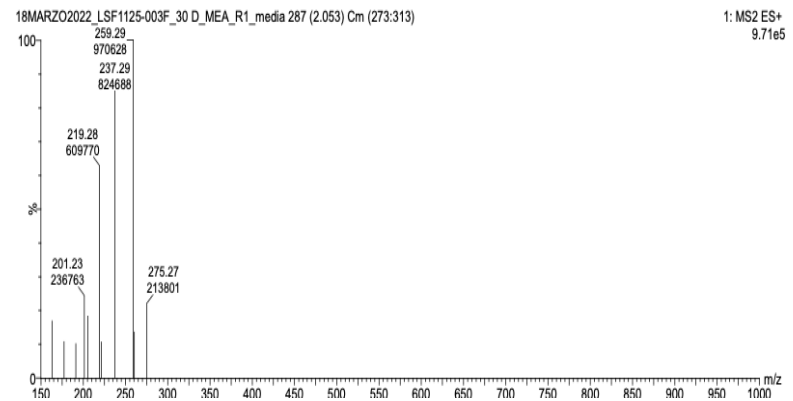
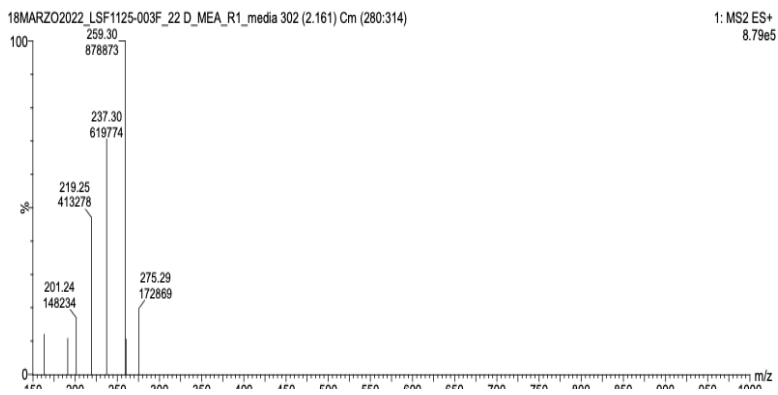
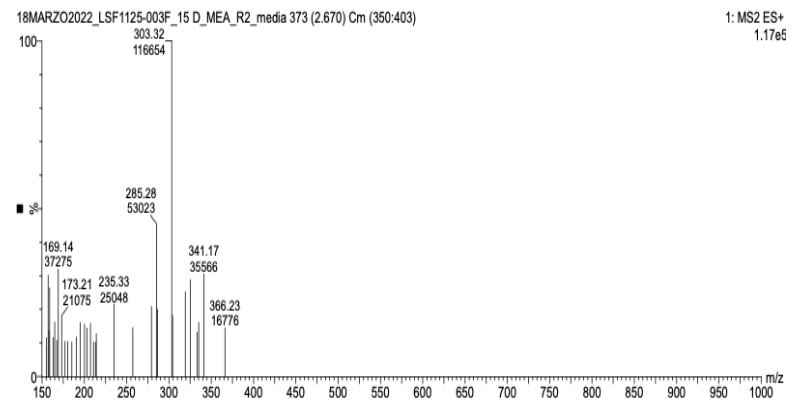
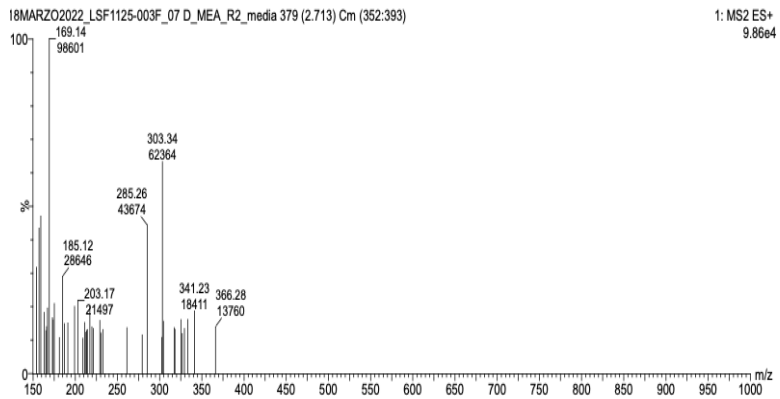


Figura 4.21. Perfil de huella química F3818 *Thichoderma* sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

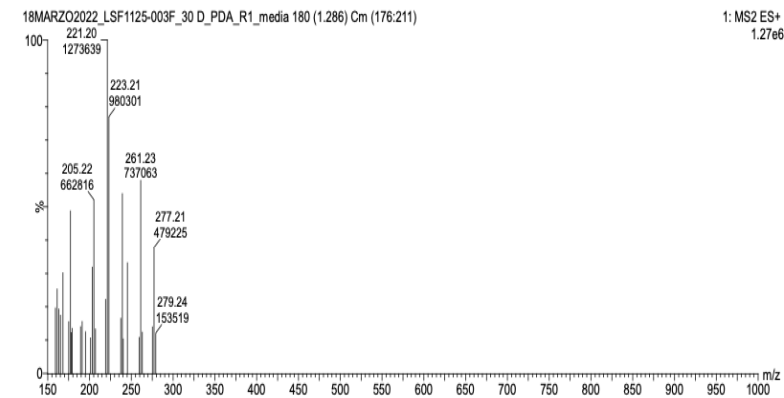
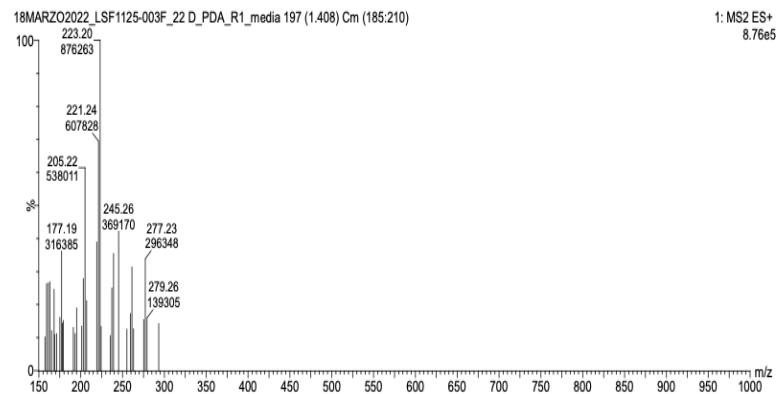
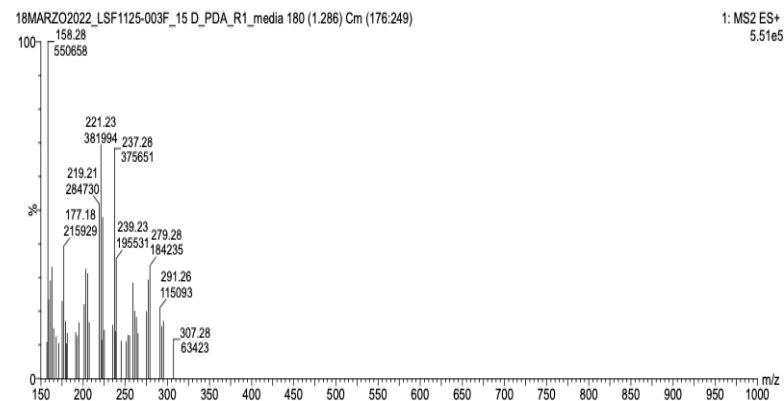
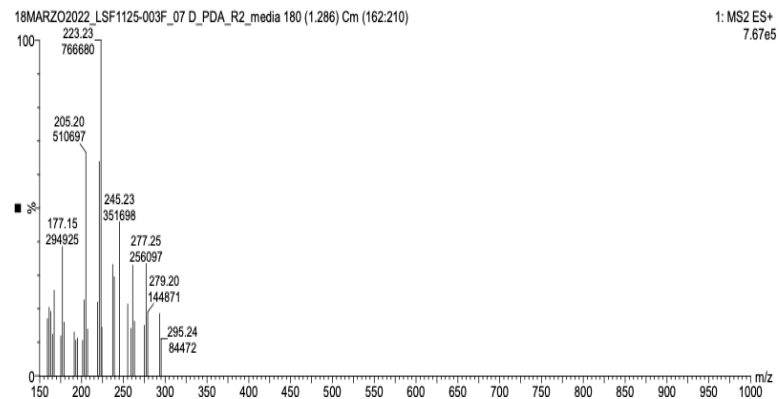


Figura 4.22. Perfil de huella química F3818 *Thichoderma* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

F3621 – *Penicillium* sp. - MEA

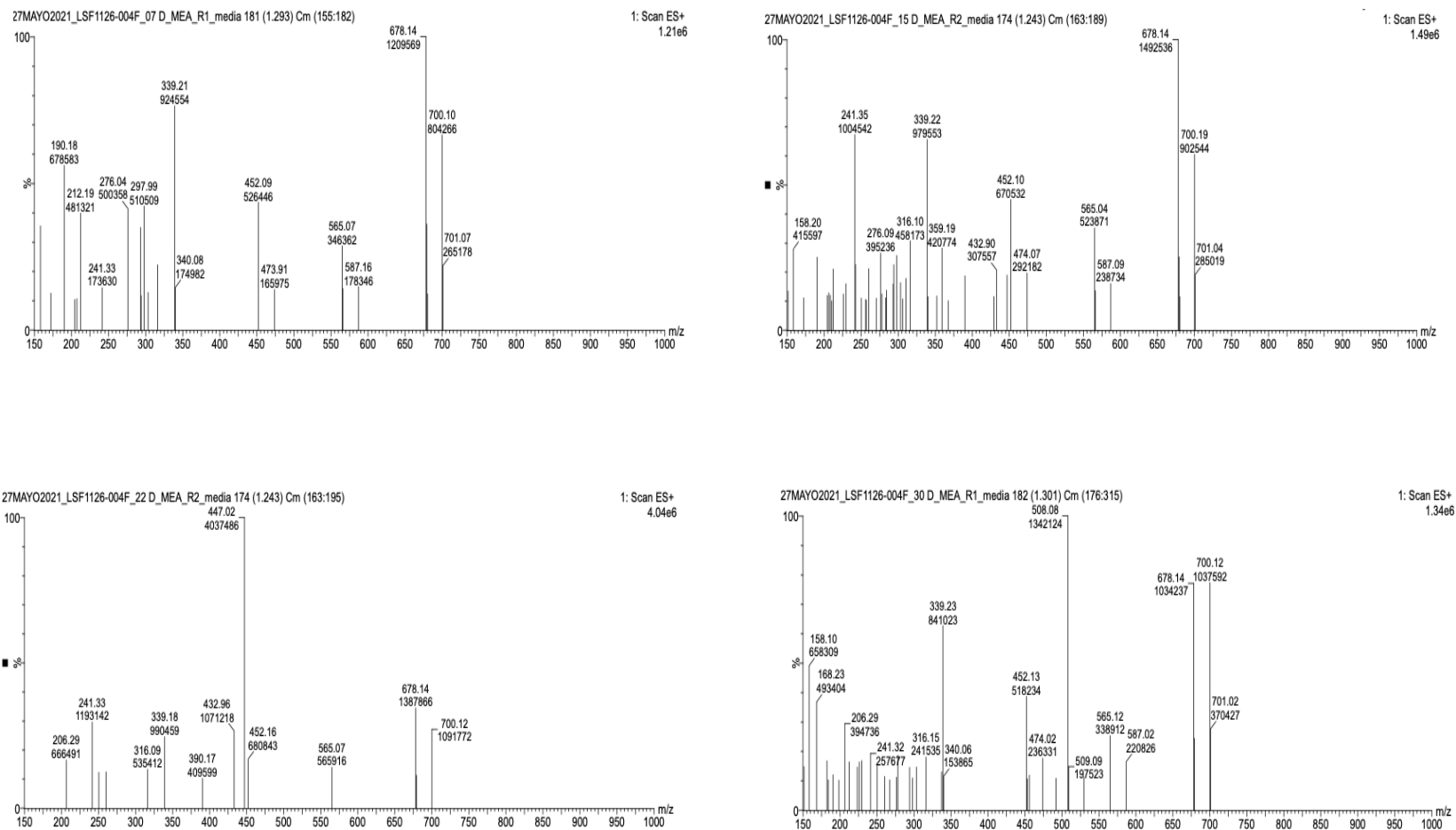


Figura 4.23. Perfil de huella química F3621 *Penicillium* sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

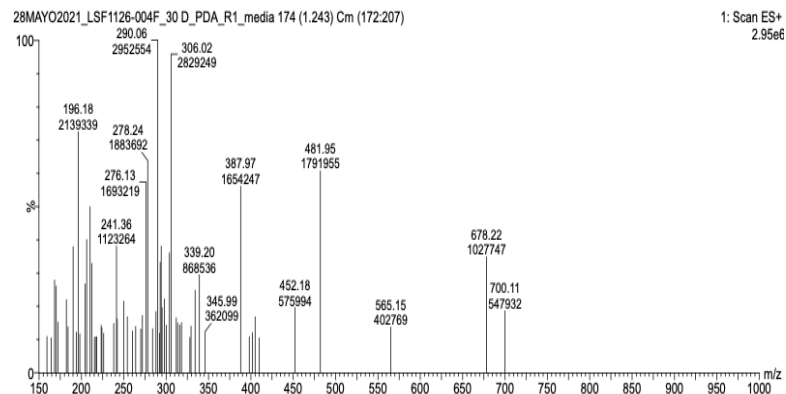
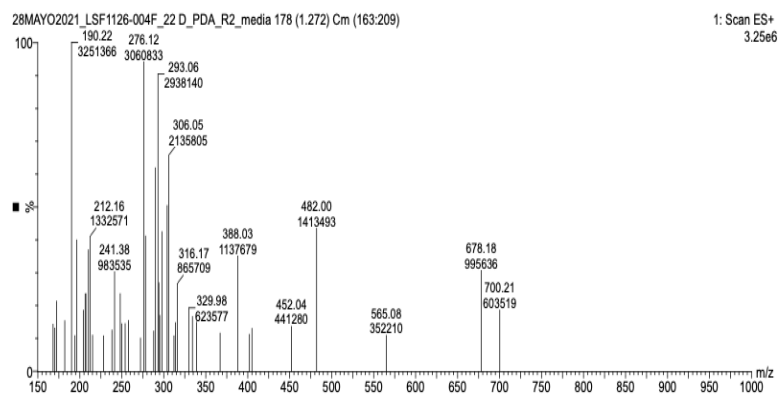
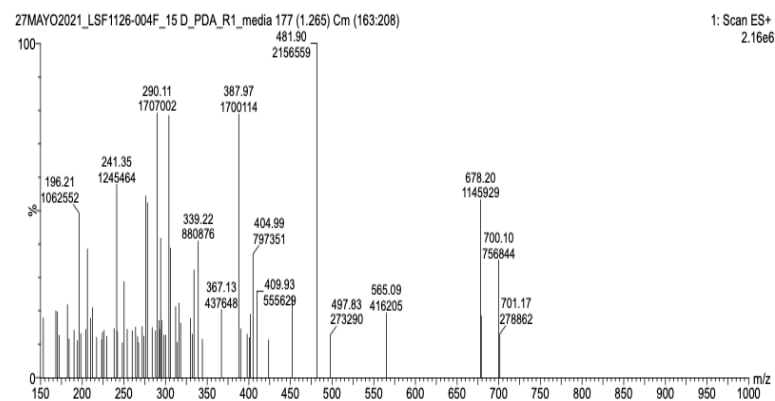
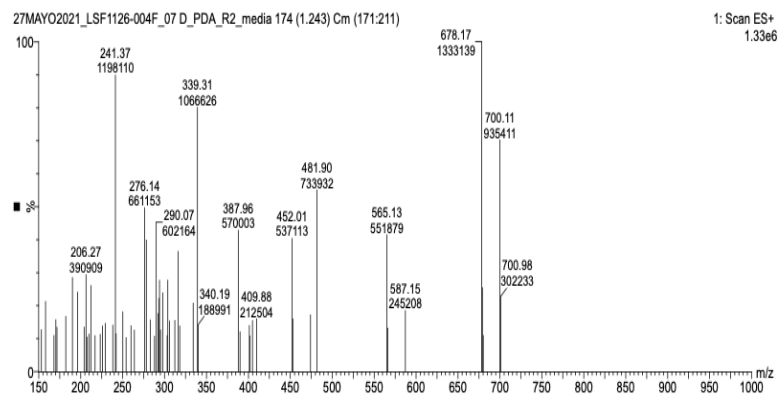


Figura 4.24. Perfil de huella química F3621 *Penicillium* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

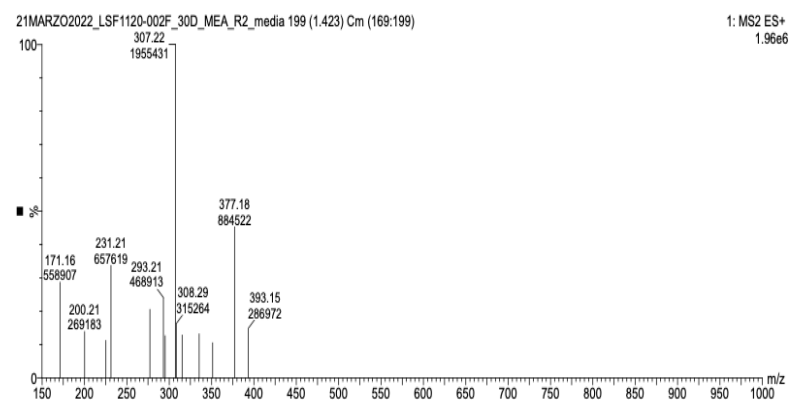
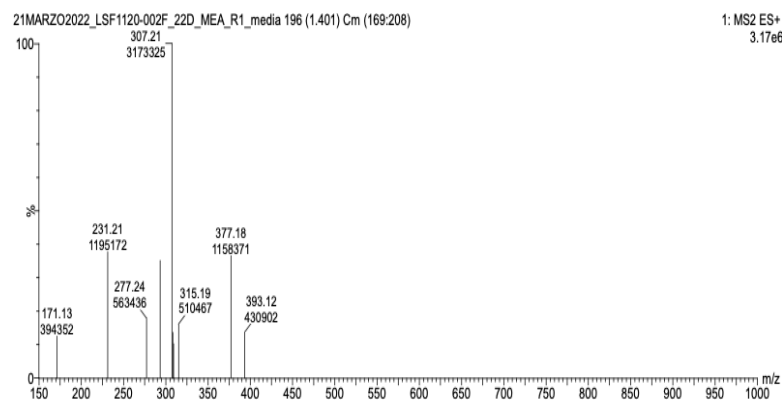
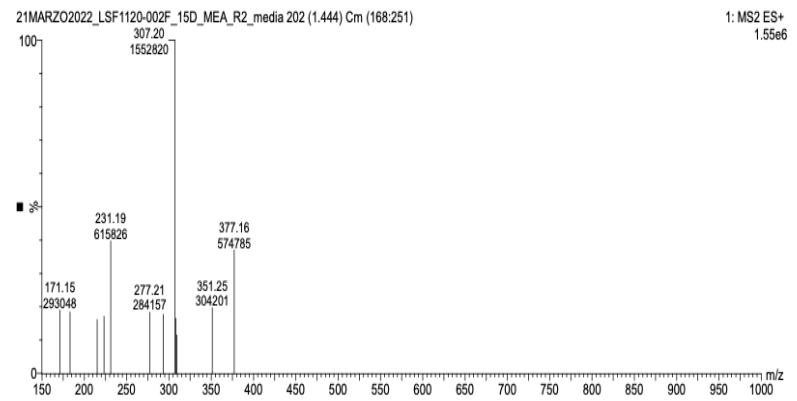
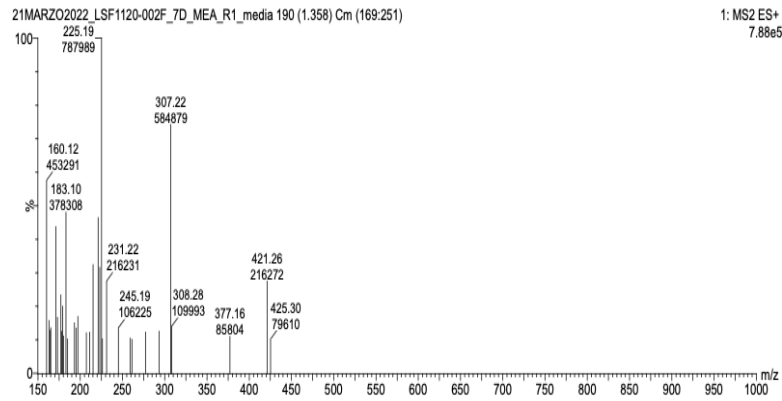


Figura 4.25. Perfil de huella química F3607 *Penicillium* sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

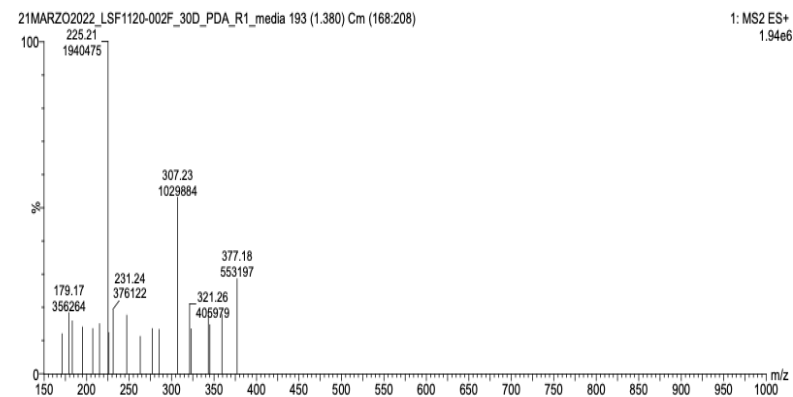
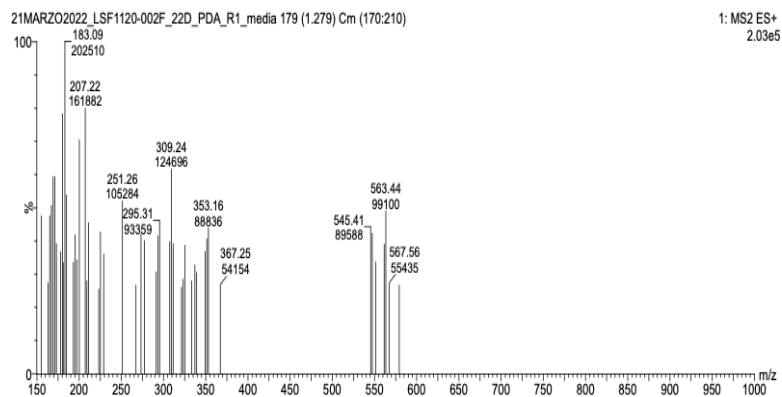
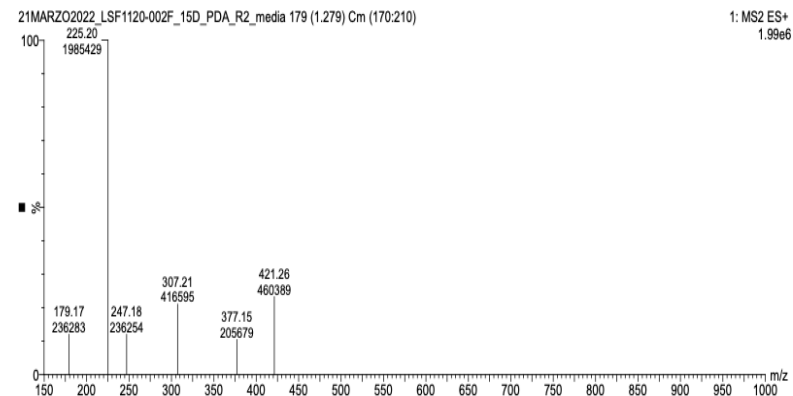
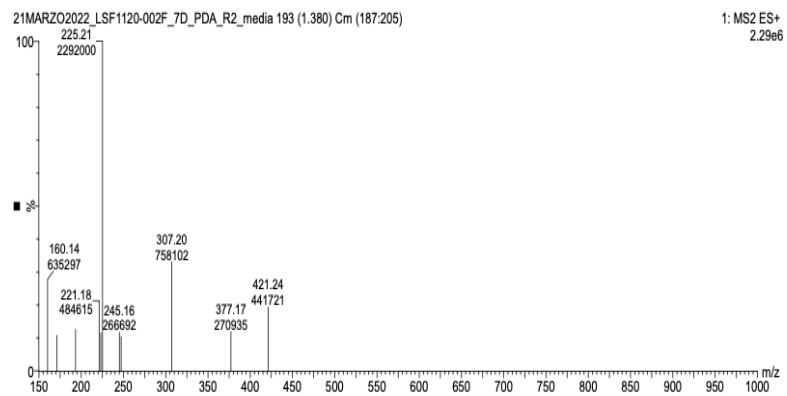


Figura 4.26. Perfil de huella química F3607 *Penicillium* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

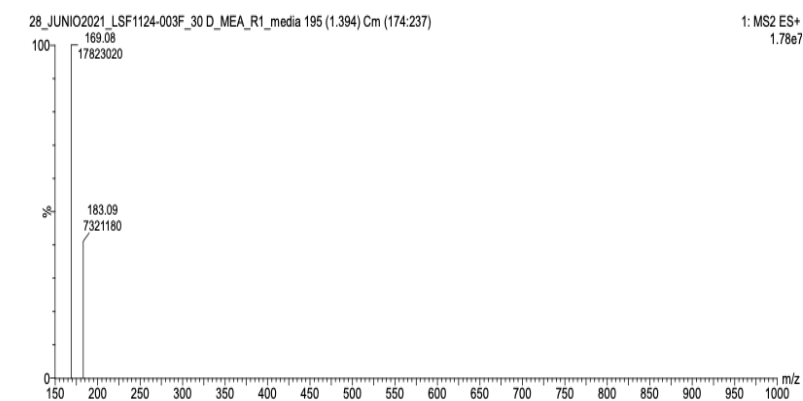
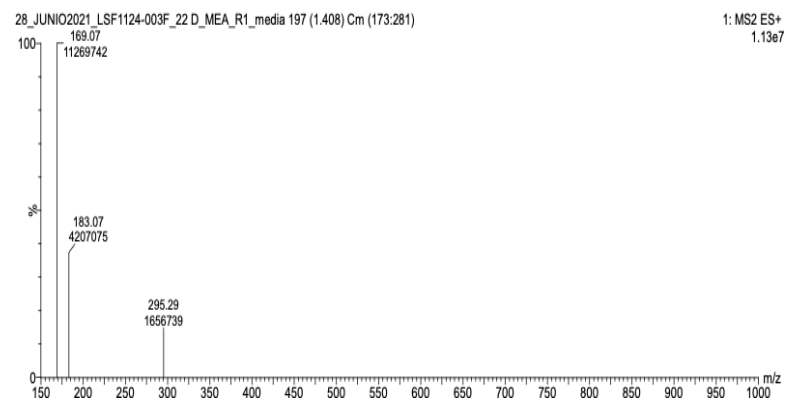
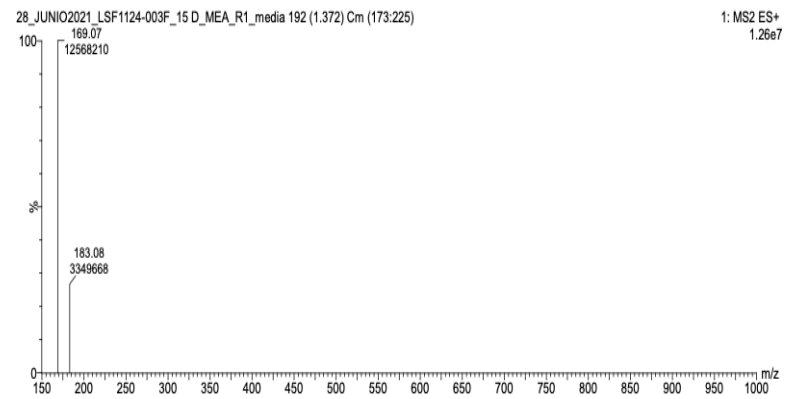
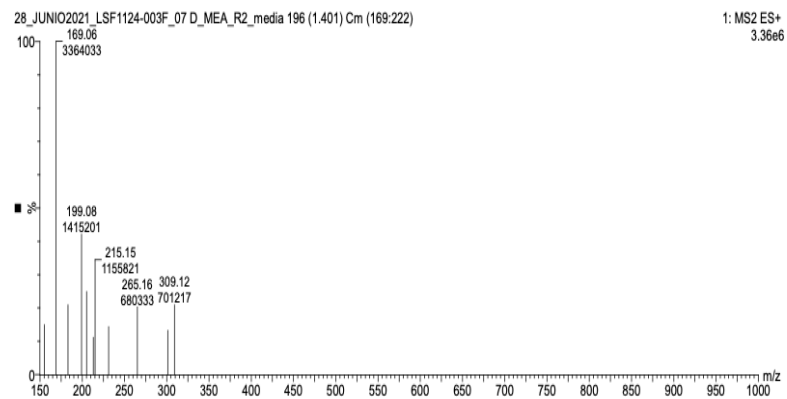


Figura 4.27. Perfil de huella química F6322 *Pestalotiopsis* sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

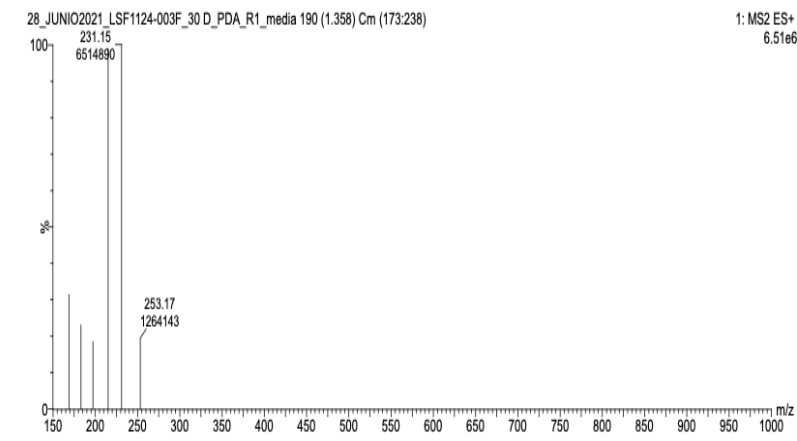
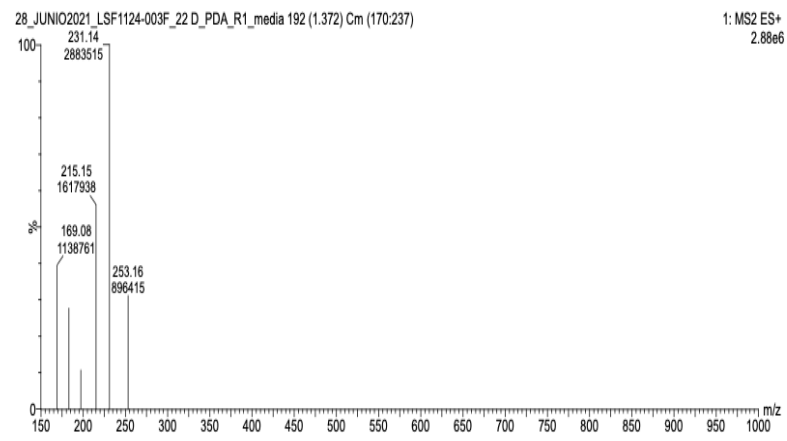
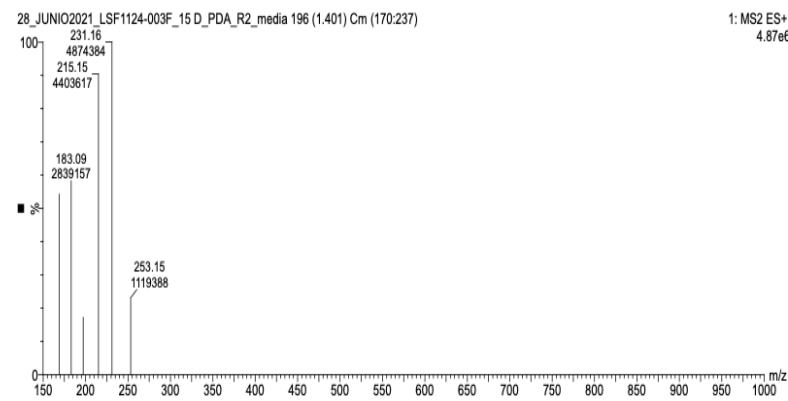
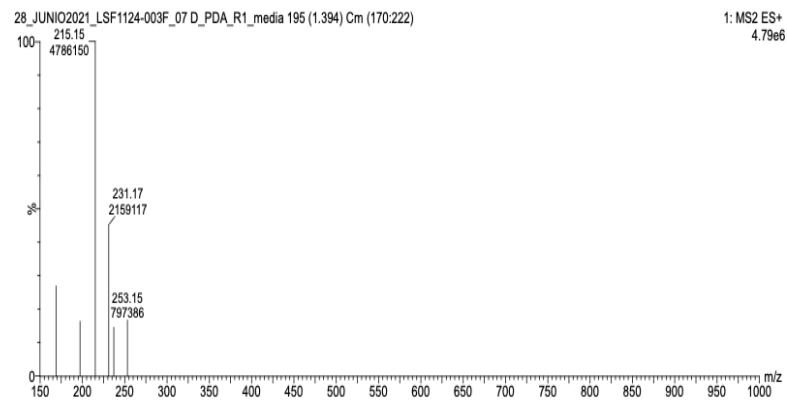


Figura 4.28. Perfil de huella química F6322 *Pestalotiopsis* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

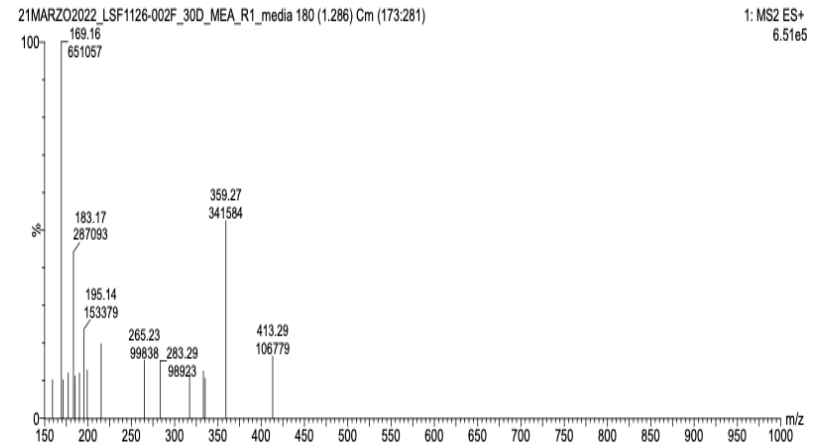
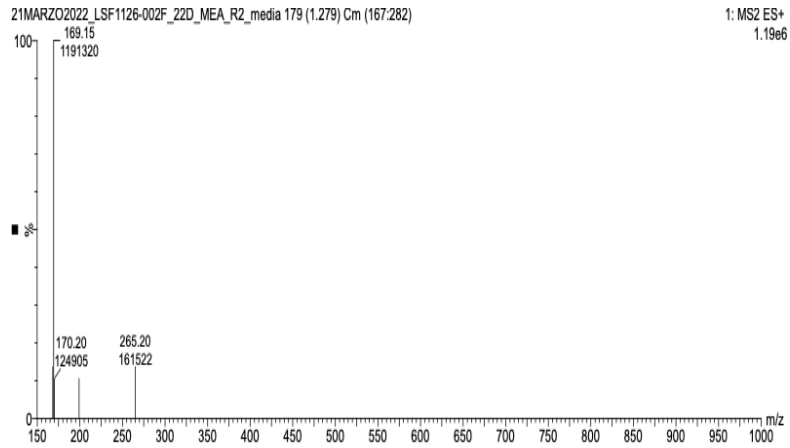
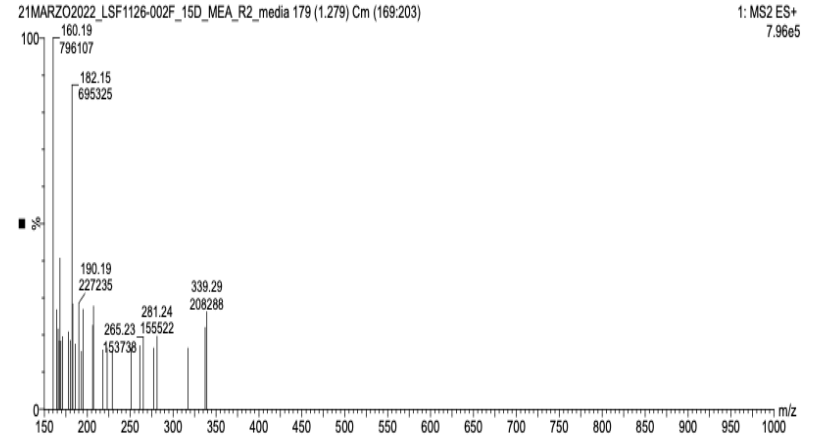
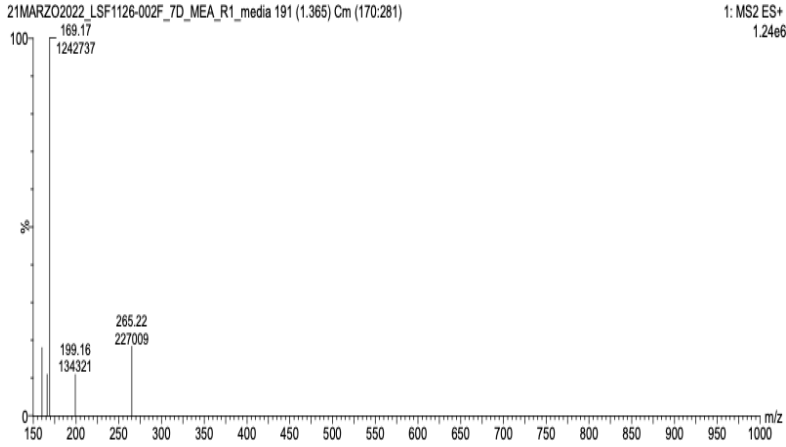
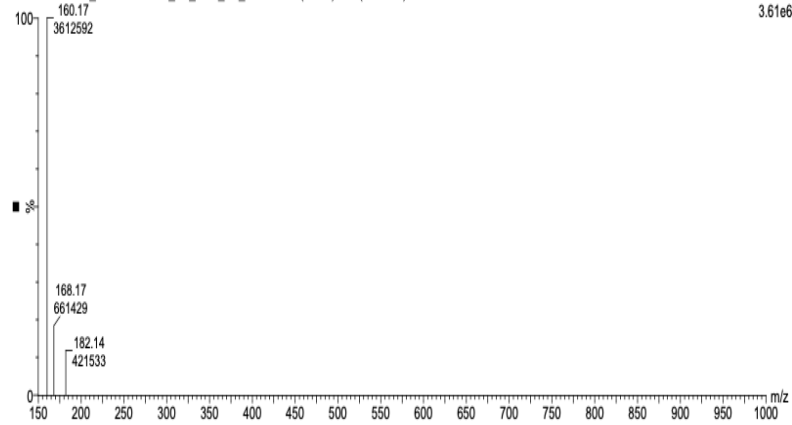
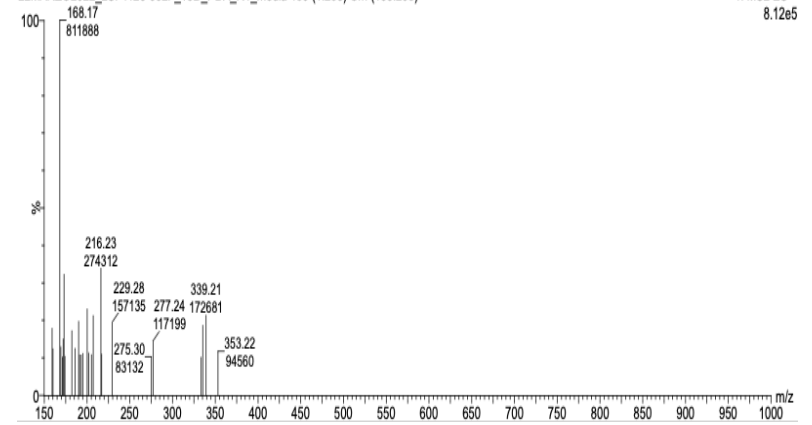


Figura 4.29. Perfil de huella química F6338 *Purpureocillium* sp. MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

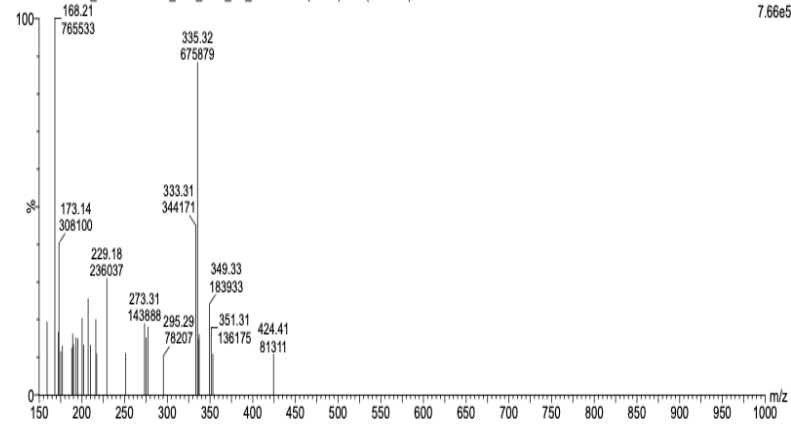
22MARZO2022_LSF1126-002F_7D_PDA_R2_media 197 (1.408) Cm (156:244)



22MARZO2022_LSF1126-002F_15D_PDA_R1_media 180 (1.286) Cm (165:208)



22MARZO2022_LSF1126-002F_22D_PDA_R1_media 179 (1.279) Cm (170:211)



22MARZO2022_LSF1126-002F_30D_PDA_R1_media 180 (1.286) Cm (175:218)

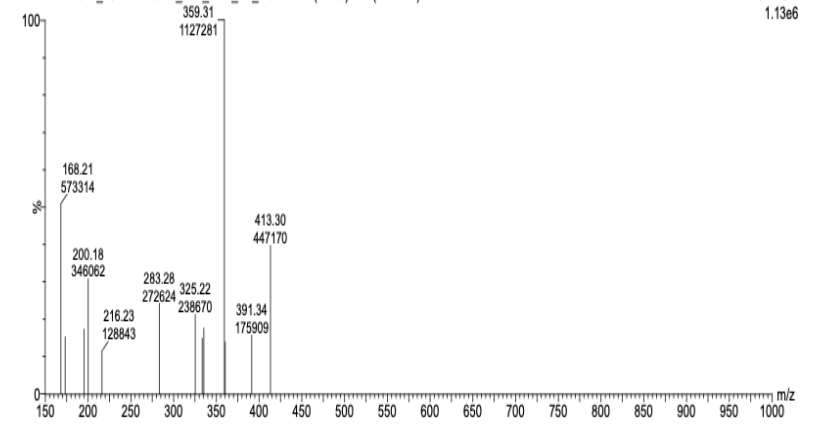


Figura 4.30. Perfil de huella química F6338 *Purpureocillium* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

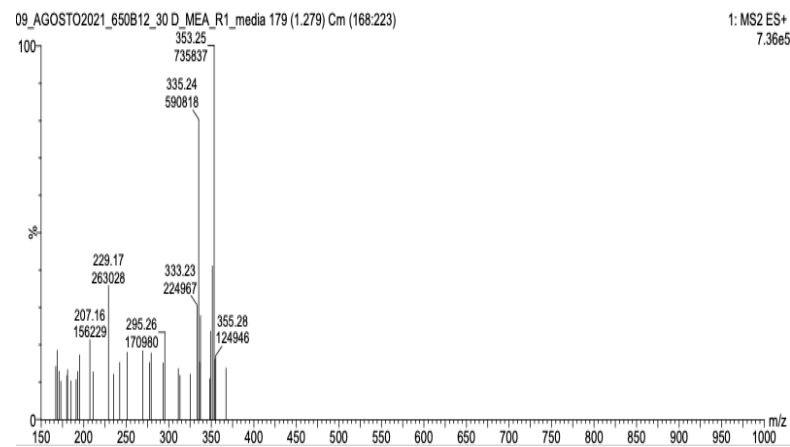
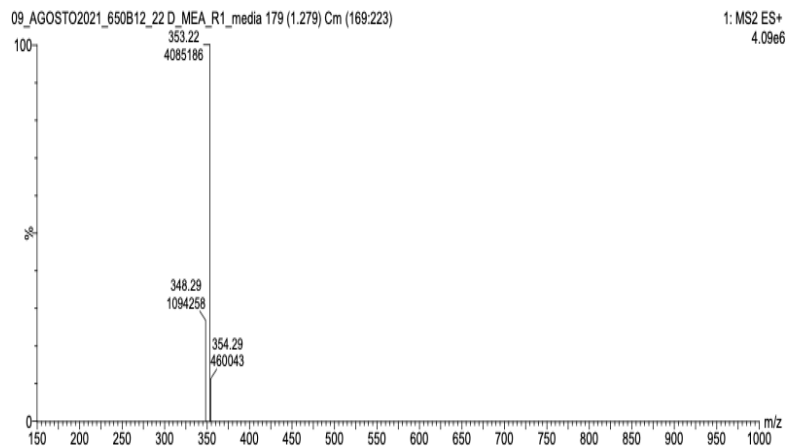
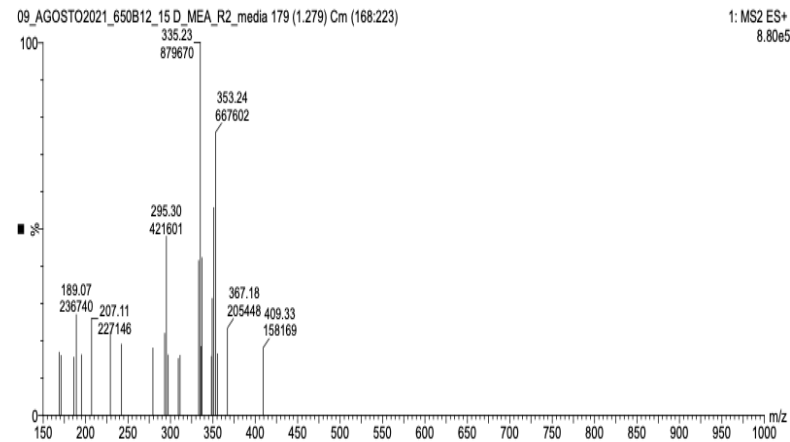
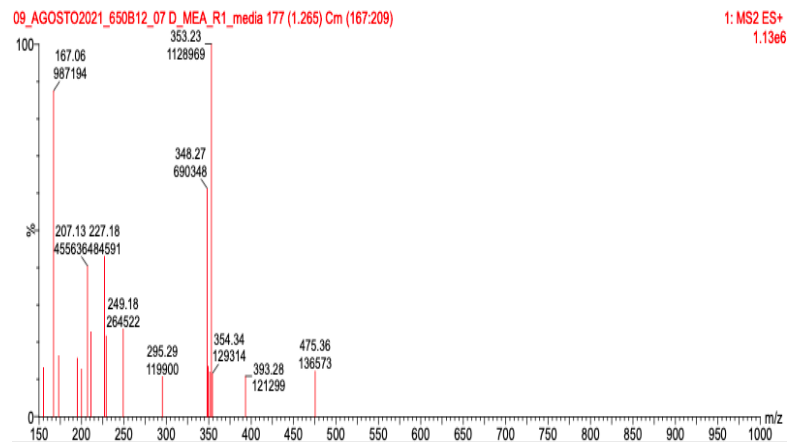


Figura 4.31. Perfil de huella química F3476 *Pestalotiopsis* sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

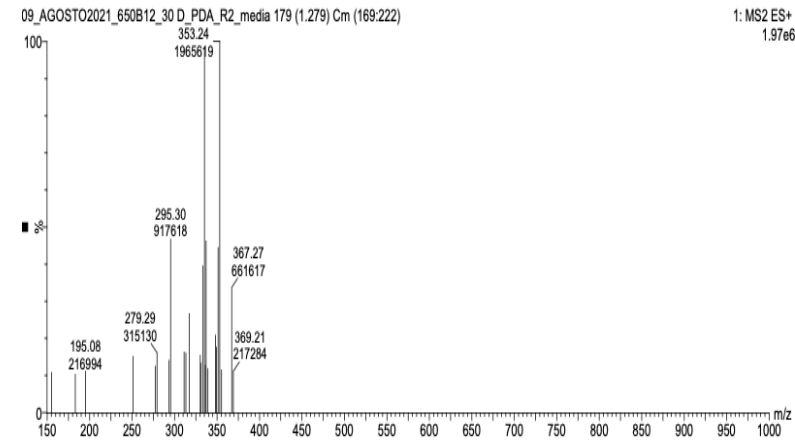
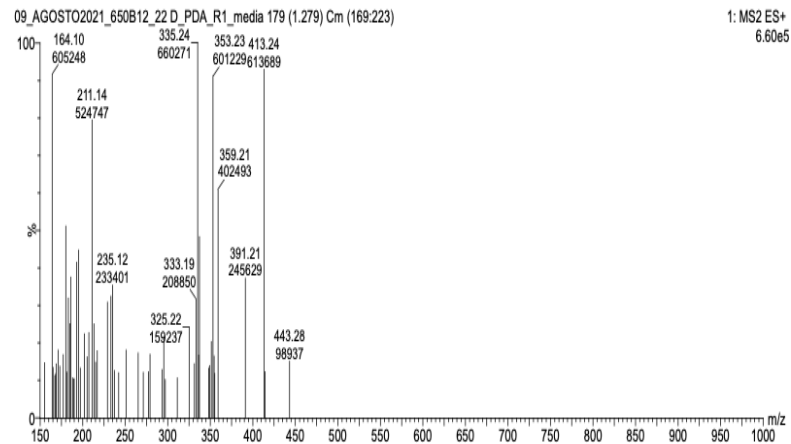
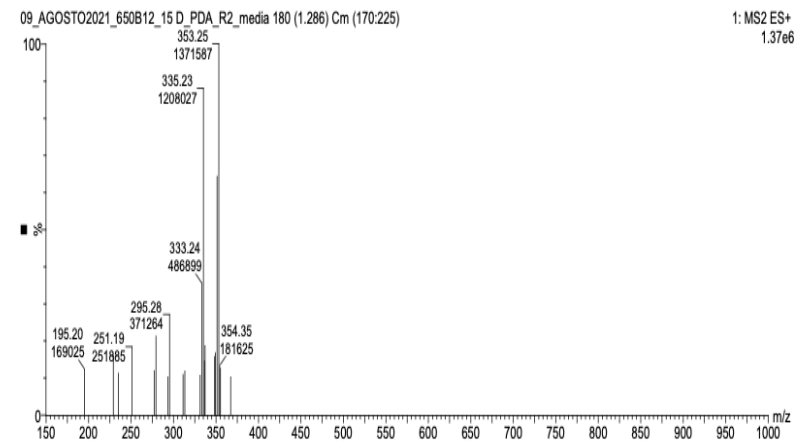
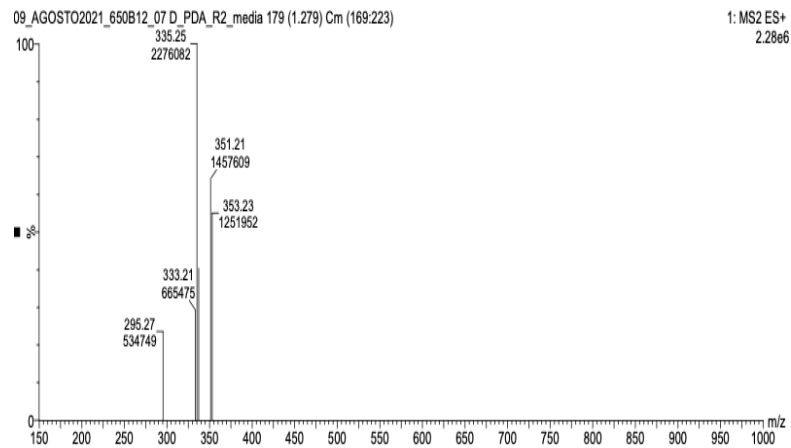


Figura 4.32. Perfil de huella química F3476 *Pestalotiopsis* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

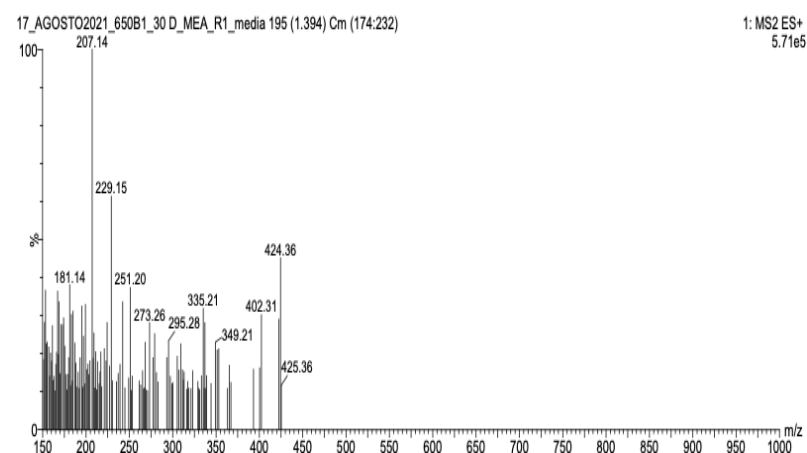
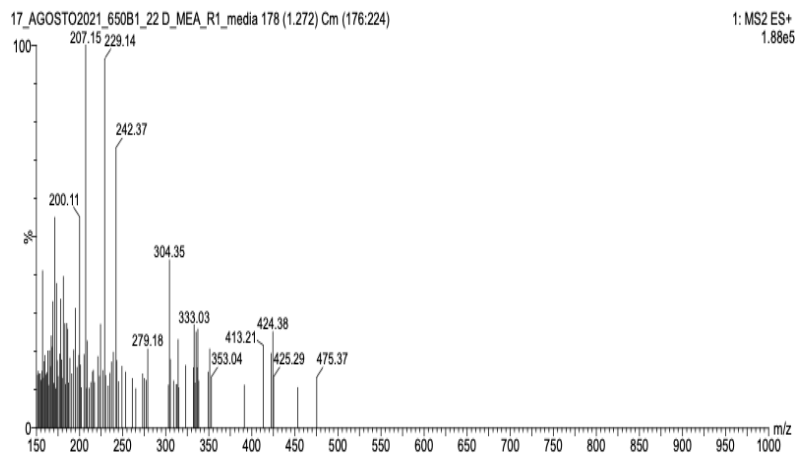
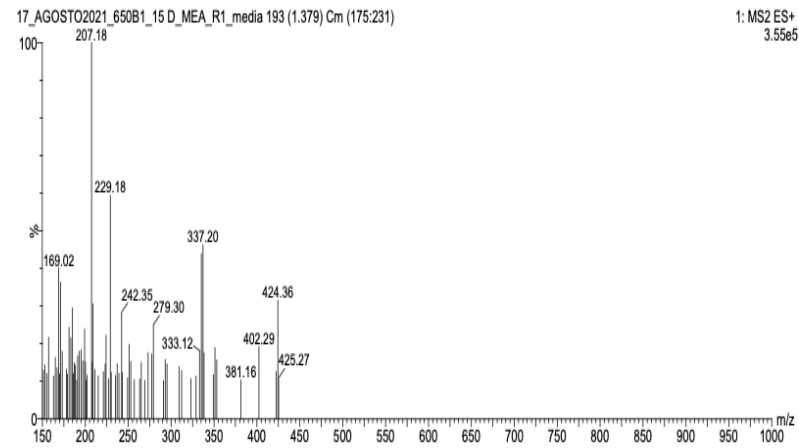
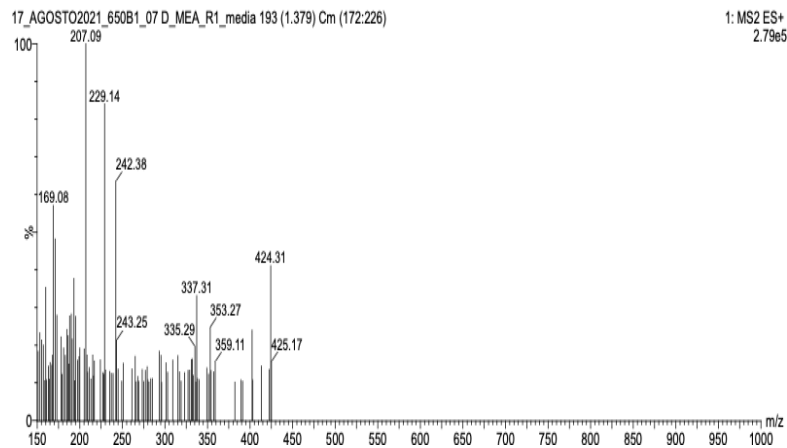


Figura 4.33. Perfil de huella química F5376 *Pestalotiopsis* sp._MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

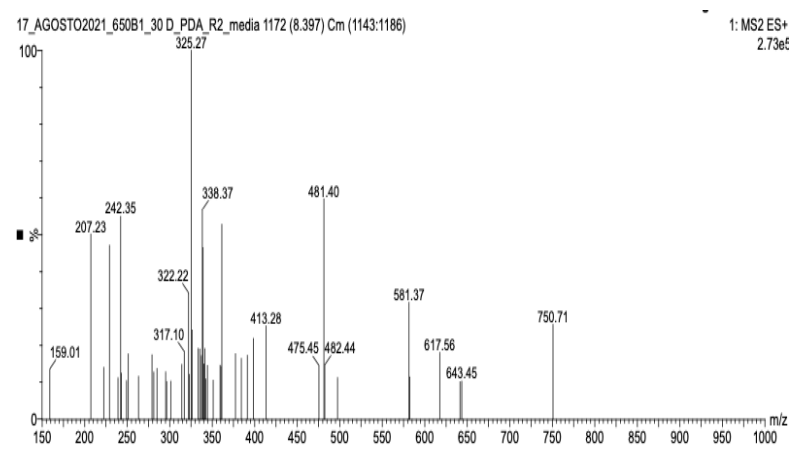
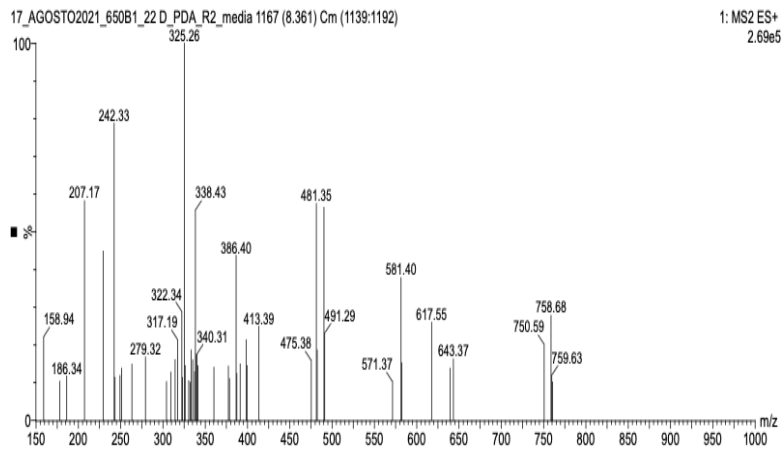
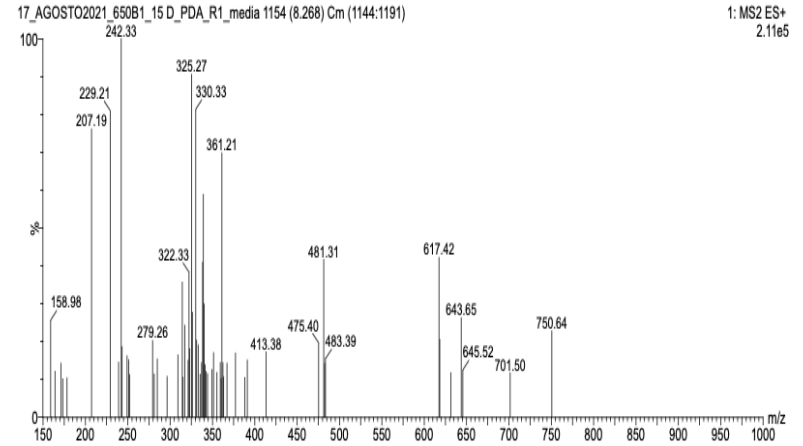
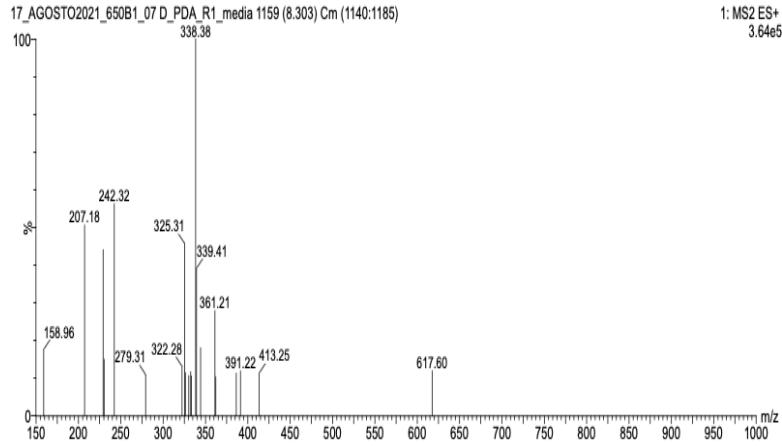


Figura 4.34. Perfil de huella química F5376 *Pestalotiopsis* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento.

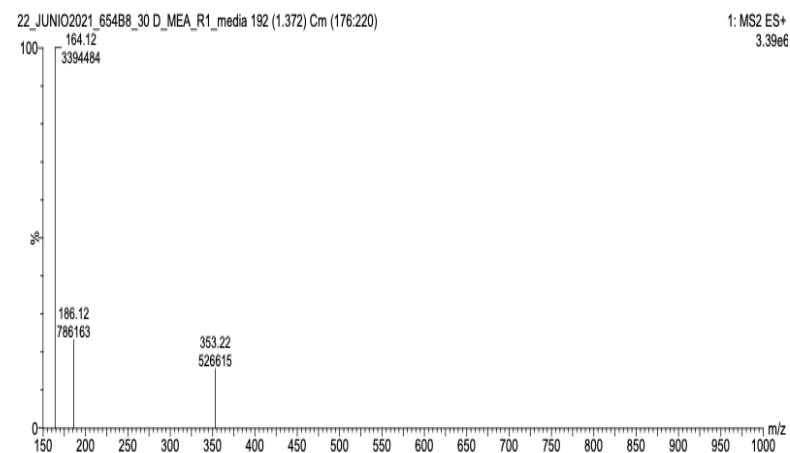
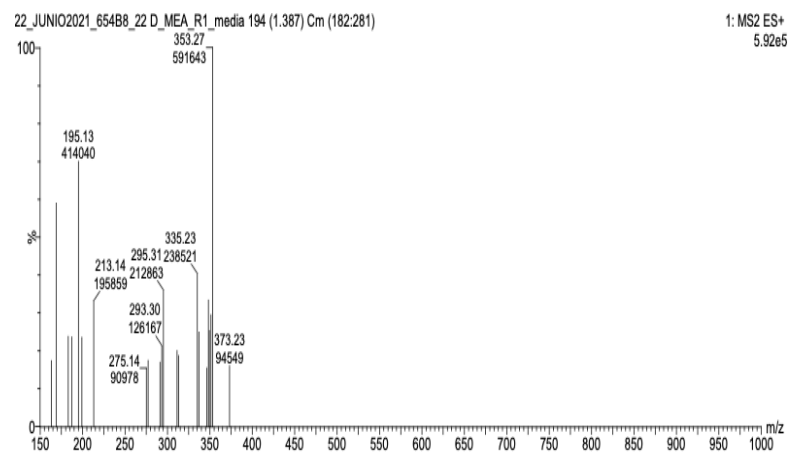
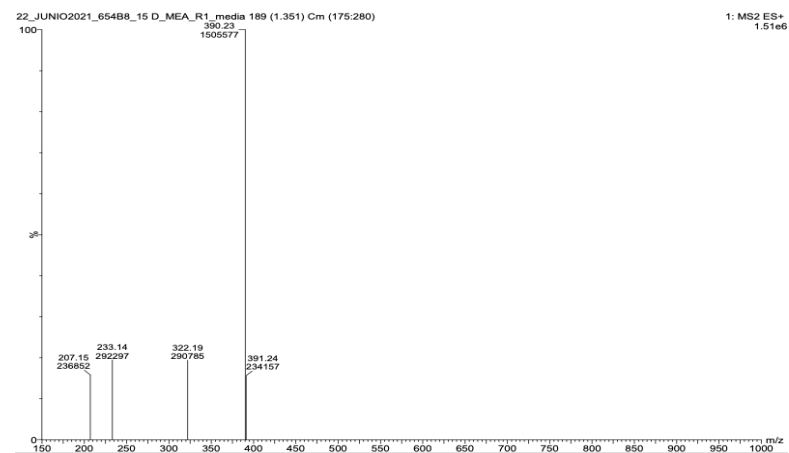
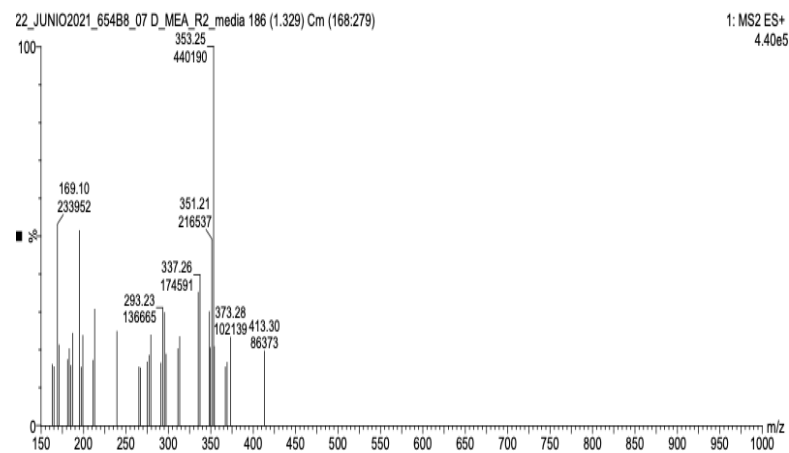


Figura 4.35. Perfil de huella química F5405 *Fusarium* sp. MEA a los 4 tiempos de crecimiento.

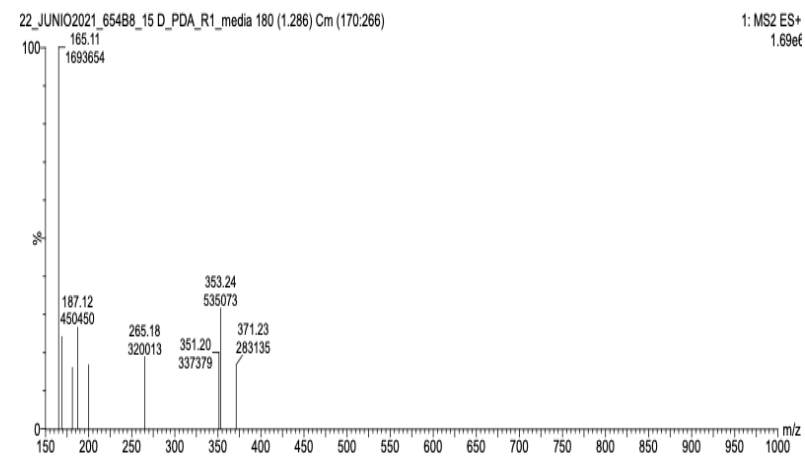
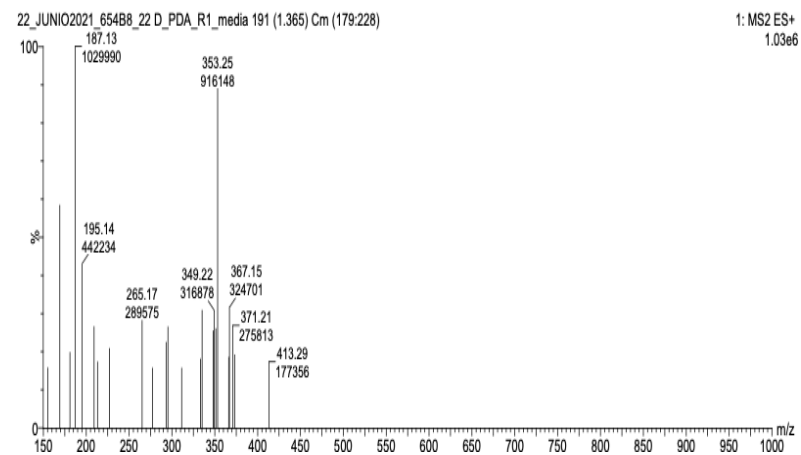
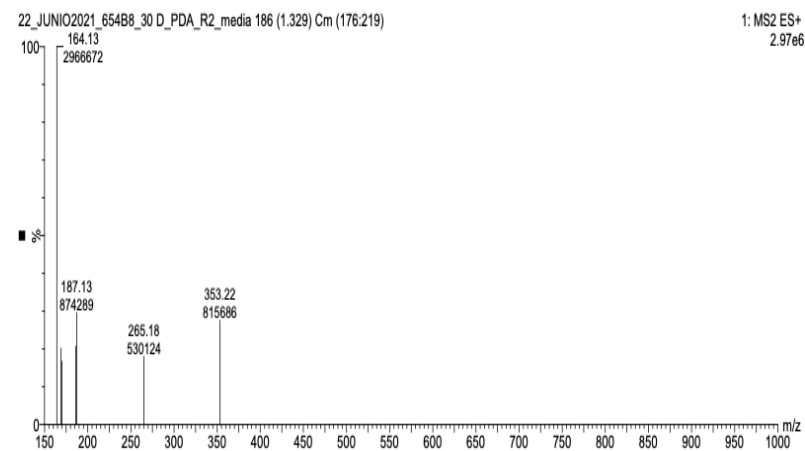
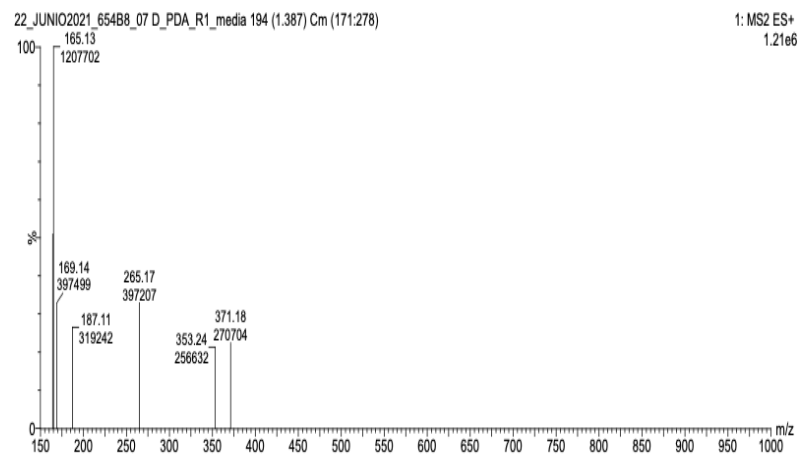


Figura 4.36. Perfil de huella química F5405 *Fusarium* sp._PDA a los 4 tiempos de crecimiento

