



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Iztapalapa



Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Posgrado en Biotecnología

TESIS

**“Búsqueda de hongos endófitos de *Taxus sp.*
productores de compuestos bioactivos”**

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

I.B.I GERARDO DIAZ DOMINGUEZ

Matrícula: 2223801976

Contacto: ger99diaz@gmail.com

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

DIRECTOR

Jurado

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

PRESIDENTE

DRA. WYLMA DOLORES PEREZ PEREZ

SECRETARIA

DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA

VOCAL

DR. YAIR CRUZ NARVAEZ

VOCAL

Iztapalapa, Ciudad de México. 7 de noviembre de 2024

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el SNP del CONAHCyT y además cuenta con apoyo de dicho consejo cuyo número de referencia es 001465.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Francisco José Fernández Perrino.

El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de CONAHCyT (proyectos CB-2012 176960 y CF-2022 320409) y con la beca para estudios de posgrado, nivel Maestría, de Gerardo Díaz Domínguez (1243409).

Ciudad de México, a 7 de noviembre de 2024

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada “**Búsqueda de hongos endófitos de *Taxus sp.* productores de compuestos bioactivos**”, que presentó el **I.B.I. Gerardo Díaz Domínguez**.

El jurado para el examen está conformado por:

Presidente (a): Dr. Ulises Carrasco Navarro

Secretario (a): Dra. Wylma Dolores Pérez Pérez

Vocal: Dra. María Lourdes Villa Tanaca

Vocal: Dr. Yair Cruz Narváez

Agradecimientos

A CONAHCYT por otorgarme la beca para Maestría, con número de becario 1243409.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino por aceptar ser mi director de tesis y permitir que me uniera como otro miembro más de su equipo de investigación, además de todo el apoyo que me brindó en estos dos años de aprendizaje.

Al Dr. Ulises Carrasco Navarro por siempre estar al pendiente de mi proyecto, por brindarme varias ideas, además de ayudarme y brindarme una parte de todo su conocimiento, tanto académicamente como personalmente, para salir adelante.

Al Dr. Yair Cruz Narváez por el apoyo en el uso de su equipo de Espectrometría de Masas y la disposición de su tiempo para orientarme en temas que se me dificultaban.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, por brindarme un lugar donde poder realizar mis estudios e investigaciones desde la licenciatura, y ahora mi posgrado.

A mi papá, por haberme enseñado el mundo de la ciencia, de la biotecnología y cómo esto puede ayudar al planeta y a las personas, por enseñarme cómo se siente y se vive al disfrutar lo que haces, que, si te gusta tu trabajo, lo que realices, nunca será una molestia para ti. Por siempre apoyarme, creer en mi desde que yo era pequeño e impulsarme en mi vida personal y académica para siempre superarme y lograr cumplir todos mis objetivos.

A mi mamá, por cuidar de mí desde el momento en que nací, por darme todo su cariño y confianza en cada decisión que tomaba. El apoyo que me dio mi mamá fue de las cosas que me hicieron superar mis temores y retos con los que me topé en

la vida hasta este momento, gracias a su esfuerzo y cariño es que he podido salir adelante.

A mi hermana, por siempre estar para mí cuando lo necesito, por sus consejos para poder resolver problemas personales, siempre agradeceré los buenos momentos que pasamos todo el tiempo, las salidas y las buenas pláticas que nos toman horas terminar, gracias a todos los buenos momentos que paso con mi hermana, es que el estar lejos de la familia no se me hace tan pesado.

A mi novia, que siempre estuvo para mí en los momentos felices y complicados, apoyándome y alentándome para cada día ser mejor persona y llegar a convertirme en un buen investigador. Le agradezco el cariño que me da y el entusiasmo, así como el interés que muestra por mi trabajo y las cosas que me gustan.

A mi tía Montse y Dani, por estar al pendiente de mí todos mis años de carrera y maestría, por brindarme un lugar en su hogar, permitirme sentirme en casa cuando estoy con ellos, por todas las pláticas e ideas que me han brindado todos estos años y así poder acercarme más y más a la meta.

A mis amigas y colegas, Fer y Jess, que desde que llegué al laboratorio me enseñaron sus técnicas y trucos para poder realizar mis experimentos, por ser pacientes conmigo, pero, sobre todo, por brindarme su amistad y consejos para superar mis problemas personales a los que me enfrenté en el transcurso de mi maestría. A la Dra. Wyl, por apoyarme en mi proyecto y enseñarme sobre los temas y técnicas que no tenía claro, por la paciencia que tuvo al explicarme cosas y siempre preocuparse por todo para que mis experimentos salieran lo mejor posible.

A los amigos que hice en el laboratorio, Diego J., Leny, Anay, Citlali y Diego F., por compartir momentos de risa, buenas pláticas y apoyo hasta en lo más mínimo del laboratorio.

RESUMEN

Los hongos endófitos representan una fuente de investigación inmensa, tanto por los diferentes tipos de hongos aislados y estudiados, como por los diversos metabolitos que producen. La identificación de hongos endófitos y el análisis de sus compuestos, abren las puertas para poder combatir problemas a los que la humanidad se ha estado enfrentando desde hace años y que ahora se han vuelto más peligrosos. Existen muchos compuestos utilizados en la actualidad que son producidos mediante técnicas biotecnológicas, los cuáles afectan a diversos sectores de interés. Un ejemplo es la producción de algunos medicamentos para combatir el cáncer, en los que, para su obtención, se deben procesar cantidades inmensas de árboles, dejando un rendimiento muy bajo del principio activo. Esto, a su vez, aumenta considerablemente el costo monetario de estos medicamentos. Otro ejemplo sería el manejo y producción de antibióticos, para los que ya muchas bacterias presentan multiresistencia. Por tal motivo, estos compuestos, ya conocidos y producidos en grandes cantidades por las industrias farmacéuticas, pierden su eficacia.

El objetivo del presente trabajo fue ampliar el conocimiento general de los hongos endófitos, mediante el aislamiento de los microorganismos existentes en el árbol del tejo (*Taxus sp.*) para su identificación, crecimiento y evaluación de la producción de compuestos bioactivos. Con los resultados obtenidos se pudo demostrar que existe una gran variedad de hongos que coexisten con la planta hospedera, y que estos microorganismos tienen preferencia por algunas condiciones para su crecimiento, como lo es el tipo de medio de cultivo y la temperatura. Algunos de los microorganismos identificados pertenecen al género *Penicillium*, estos produjeron y secretaron compuestos con actividad antimicrobiana contra *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella sp.* Se sospechó en estos casos que la mencionada actividad fuera debida a una proteína, pero esta idea fue descartada debido al resultado negativo obtenido en un zimograma realizado contra *Micrococcus lysodeikticus*.

En el análisis de los extractos liofilizados producidos por los hongos endófitos se encontraron alrededor de 1200 compuestos, los cuales fueron ionizados positiva y negativamente, por un Equipo de Masas de Ultra Alta Resolución con Resonancia en el Ciclotrón MRMS. Varios de los compuestos pudieron analizarse y compararse, dependiendo de la intensidad en la que aparecieron (con un paralelismo en la concentración de las soluciones analizadas). Algunos de los compuestos destacados son de gran interés, ya que están presentes en la vía de síntesis de antibióticos, como lo son arisugacina, aspulvinona y bikaverina, además de la asperjinona, que sirve para el tratamiento contra el cáncer de mama.

ABSTRACT

Endophytic fungi represent an immense source of research, both for the different types of fungi isolated and studied, and for the various metabolites they produce. The identification of endophytic fungi and the analysis of their compounds open the doors to combat problems that humanity has been facing for years and that have now become more dangerous. There are many compounds used today that are produced through biotechnological techniques, which affect various sectors of interest. An example is the production of some drugs to combat cancer, in which, to obtain them, immense quantities of trees must be processed, leaving a very low yield of the active ingredient. This, in turn, greatly increases the monetary cost of these medications. Another example would be the management and production of antibiotics, for which many bacteria already have multi-resistance. For this reason, these compounds, already known and produced in large quantities by pharmaceutical industries, lose their effectiveness.

The aim of this work was to expand the general knowledge of endophytic fungi, by isolating the microorganisms existing in the yew tree (*Taxus spp.*) for their identification, growth and evaluation of the production of bioactive compounds. With the results obtained, it was possible to demonstrate that there is a great variety of fungi that coexist with the host plant, and that these microorganisms have a preference for some conditions for their growth, such as the type of culture medium and temperature. Some of the microorganisms identified belong to the genus *Penicillium*, they produced and secreted compounds with antimicrobial activity against *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* It was suspected in these cases that the aforementioned activity was due to a protein, but this idea was discarded due to the negative result obtained in a zymogram carried out against *Micrococcus lysodeikticus*.

In the analysis of the lyophilized extracts produced by endophytic fungi, around 1200 compounds were found, which were positively and negatively ionized, by an Ultra

High Resolution Mass Equipment with Resonance in the MRMS Cyclotron. Several of the compounds could be analyzed and compared, depending on the intensity in which they appeared (with a parallelism in the concentration of the analyzed solutions). Some of the highlighted compounds are of great interest, since they are present in the antibiotic synthesis pathway, such as arisugacin, aspulvinone and bikaverin, in addition to asperjinone, which is used for the treatment of breast cancer.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	15
2.1 BIODIVERSIDAD Y BIOACTIVIDAD.	15
2.2 COMPUESTOS PRODUCIDOS POR HONGOS ENDÓFITOS.	20
2.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.....	27
3. JUSTIFICACIÓN.....	39
4. HIPÓTESIS	42
5. OBJETIVOS	42
5.1 GENERAL:	42
5.2 ESPECÍFICOS:	42
6. METODOLOGÍA	43
6.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.	43
6.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.	44
6.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS CULTIVOS.	46
6.4 ANÁLISIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	49
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
7.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.	51
7.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.	54
7.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS CULTIVOS	55
7.4 ANÁLISIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	60
8. CONCLUSIONES	64
9. PERSPECTIVAS	65
10. REFERENCIAS	66
ANEXO 1	76
ANEXO 2	77
ANEXO 3.....	79
ANEXO 4.....	91

CONTENIDO DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Identificación de hongos endófitos.....	54
Figura 1. Características morfológicas de un individuo de <i>Taxus globosa</i> Schitdl (Thomas, 2019).....	43
Figura 2. Características morfológicas de un individuo de <i>Taxus globosa</i> Schitdl (Thomas, 2019).....	43
Figura 3. Hongos endófitos incubados a 28 °C.....	51

Figura 4. Hongos endófitos incubados a 24 °C.....	52
Figura 5. Placas de bioensayo para determinación de la actividad antimicrobiana.....	55
Figura 6. Gel SDS-PAGE y Zimograma contra <i>Micrococcus lysodeikticus</i>....	58
Figura 7. Compuestos ionizados positivamente, con zoom en la parte donde se observa más intensidad.....	60
Figura 8. Compuestos ionizados negativamente, con zoom en la parte donde se observa más intensidad.....	61

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos se definen como microorganismos que viven dentro de los tejidos de plantas vivas, durante todo o parte de su ciclo de vida, sin llegar a ocasionar efectos negativos en la planta hospedera. Estos hongos se distinguen de las micorrizas debido a la ausencia de estructuras externas, como hifas o micelio (Aragón y Beltrán-Acosta, 2018). Los hongos endófitos han sido encontrados en todo tipo de vegetales (plantas vasculares, musgos, pastos y algas), en los que se ha visto una asociación costo-beneficio no obstructiva, asintomática y transitoria (Sánchez-Fernández y col., 2013). Se han clasificado con base en su taxonomía, su evolución, las plantas hospederas que utilizan y sus funciones ecológicas. La primera clasificación diferencia dos grupos, la familia *Clavicipitaceae* (clavicipitáceos) y los no pertenecientes a dicha familia (no clavicipitáceos), este último grupo dividido a su vez en dos subgrupos. El primer grupo está caracterizado por tener pocas plantas hospederas y el modo de transmitirse es por medio de semillas. En el segundo grupo se incluyen varios géneros de hongos de las divisiones Basidiomycota, Ascomycota y Mucormycota, además de que poseen un amplio espectro de plantas hospederas (Galindo-Solís, 2023).

Los hongos endófitos pueden conferir diferentes beneficios a sus plantas hospederas: actúan como agentes promotores de crecimiento y también como elicitores potenciales para preparar a la planta para defenderse contra ataques de plagas o patógenos, además de mantener una interacción con otros miembros del microbioma, con el objetivo de mantener plantas sanas (Aragón, 2017). Gracias a todas sus interacciones y a los ciclos de vida de los hongos endófitos, estos microorganismos han optado evolutivamente por la producción de una abundante y diversificada gama de metabolitos secundarios, moléculas que favorecen el establecimiento de la simbiosis con la planta hospedera y que, por otra parte, presentan un gran potencial de aplicación en la salud humana y la agricultura.

Se ha observado que diversos hongos endófitos son los encargados de producir determinados metabolitos secundarios (o bien sus precursores) que presentan actividad biológica, compuestos que en principio se pensaba solamente eran sintetizados por las plantas hospederas (Strobel y col., 2004). Algunos de los metabolitos que se producen gracias a los hongos endófitos, de alta importancia económica y aplicación en el área de la salud, son el taxol (anticancerígeno producido, entre otros, por *Taxomyces andreanae*, *Alternaria sp.*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus fumigatus*), la podofilotoxina (compuesto anticancerígeno, antiviral y antioxidante que es producida por *Alternaria sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium sp.*), la camptotecina (antineoplásico producido por *Entrophospora infrequens*, *Fusarium solani* y *Neurospora sp.*), la vinblastina (anticancerígeno producido por *Alternaria sp.* y *Fusarium oxysporum*) (Cruz-Miranda, 2020), junto con la diosgenina (precursor de la progesterona y que ayuda a disminuir la concentración de colesterol, producido por *Cephalosporium sp.* y *Paecilomyces sp.*) y la azaridactina (insecticida natural, obtenida de *Eupenicillium parvum*).

Puede ocurrir que los endófitos, en ocasiones, sean confundidos con microorganismos patógenos de la planta hospedera. Estudios realizados en *Marchantia polymorpha* (Nelson y col., 2018) mostraron que hongos endófitos de dicha planta sí pueden llegar a presentar comportamiento patogénico agresivo contra la planta hospedera en pruebas *in vitro* y que, incluso, endófitos pertenecientes al mismo género y provenientes de la misma planta, presentan efectos *in vitro* completamente diferentes a los observados en la naturaleza sobre la planta hospedera (ya fuesen positivos o negativos), además de ocasionar modificaciones en su crecimiento. Gracias a trabajos en los que se ha realizado inoculación artificial de diferentes cultivos de interés agrícola y económico (como trigo, frijol y maíz), junto al logro de utilizar exitosamente diversos endófitos para la colonización, se han podido obtener nuevas clasificaciones de estos, atendiendo ahora a 1) la fuente de nutrición (materia viva o biótrosfos frente a materia muerta o necrótrofos), 2) las características asociadas con la infección (que la planta hospedera puede presentar síntomas o ser asintomática a la presencia de los

endófitos) y, unido a esta parte, 3) endófitos que se clasifican según la parte de planta huésped que se ve afectada (endófitos de raíz o foliares) (Bamisile y col., 2018).

Con la información que se tiene hasta el momento, y sabiendo que existen alrededor de 300,000 especies de plantas colonizadas con diversas variedades de hongos endófitos, está más que claro que estos microorganismos constituyen una fuente inagotable de investigación para la obtención de compuestos bioactivos aplicables en agricultura y medicina (Sánchez-Ortiz, 2016). Adicionalmente, se pueden optimizar las condiciones para estimular la producción de los compuestos mediante modificaciones de la composición del medio de cultivo, temperatura, pH, agitación y aireación, lo que da muchas posibilidades para la investigación con estos microorganismos (Temiño-García, 2020).

Las herramientas y técnicas utilizadas para su estudio han mejorado mucho con el paso de los años, razón por la cual es posible obtener una mejor identificación y caracterización de los compuestos producidos por los hongos endófitos. El uso de la espectrometría de masas permite entender mejor el metabolismo fúngico, orientando la búsqueda a moléculas con sospecha previa de su existencia (debido a un contexto biológico y/o la expresión constante de un metabolito) o a la presencia de elementos traza. Gracias a toda esta nueva información, se facilitan los estudios *in vivo* e *in vitro* y se llegan a alcanzar estudios clínicos (Gupta y col., 2021).

2. ANTECEDENTES

2.1 Biodiversidad y bioactividad.

Tejesvi y colaboradores (2008) evaluaron la actividad antioxidante y antihipertensiva de hongos endófitos provenientes de cuatro plantas medicinales: *Terminalia arjuna*, *Terminalia chebula*, *Azadirachta indica* y *Holarrhena antidysenterica*. Se aislaron varias especies de hongos, las más abundantes correspondieron a *Pestalotiopsis*. Para los análisis se tomaron treinta especies provenientes de diferentes partes de las plantas, se determinó la actividad antioxidante por inhibición del 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y la actividad antihipertensiva por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina. Los endófitos de *T. arjuna* fueron los que presentaron mejor actividad eliminadora de radicales libres, con valores de IC₅₀ para la inhibición de DPPH (concentración de extracto requerida para eliminar el 50% de radicales libres) de 14 y 27 µg de muestra prueba/mL. La mezcla contenía 5 µL de muestra prueba y 95 µL de DPPH en etanol (con el DPPH en una concentración de 300 µmol/L). Para la evaluación de la actividad antihipertensiva se evaluaron 32 extractos, y sólo cinco presentaron un porcentaje mayor al 60% de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina. Para estos extractos, los valores de IC₅₀ fueron obtenidos para concentraciones que estaban entre 21 y 37 µg de extracto/mL.

Abdel-Azeem y colaboradores (2016) aislaron hongos endófitos a partir de diez plantas medicinales provenientes de Egipto, de los cuales se obtuvieron metabolitos secundarios que fueron probados como compuestos antirreumatoides. Entre los hongos identificados destacan *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Alternaria* y *Penicillium*. Este estudio se realizó con ratas, las cuáles fueron inducidas para generar artritis. Se les administró un extracto metanólico proveniente de los endófitos y el efecto curativo se pudo observar a partir del sexto día después de la administración, mientras que la administración de un extracto de acetato de etilo no aportó ninguna mejoría a las ratas.

García-Latorre (2017) determinó la actividad fungicida, bactericida y antioxidante de los metabolitos secundarios producidos por dos hongos endófitos: uno fue *Embellisia leptinellae*, el cual fue aislado del tallo de *Ornithopus compressus*, mientras que el segundo (aislado a partir de hojas de *Biserrula pelecinus*) no pudo ser identificado. Los hongos fueron incubados en medio líquido de extracto de malta y levadura, a una temperatura de 23°C, con agitación de 140 rpm, ajustando el medio a un pH de 6.3. Al observar que la glucosa se había consumido, dejaron 48 horas más los cultivos antes de ser filtrados, separándose después la fase líquida del micelio. Los extractos utilizados en las pruebas fueron obtenidos a partir de los filtrados, los cuales fueron agitados durante un minuto y combinados a un volumen 1:1 con etil acetato, para posteriormente eliminar la fase acuosa. La fase orgánica fue evaporada en un rotavapor, a 250 mbar de presión, 120 rpm y 40°C. El extracto obtenido se diluyó en 2.5 mL de metanol.

Para la evaluación de actividad antioxidante, el autor monitorizó el cambio en la densidad óptica producido por la decoloración del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), lo que provoca un cambio de color púrpura a tonos amarillos. Para el caso del hongo no identificado los resultados que se obtuvieron fueron inconsistentes, ya que las absorbancias no mostraban relación con las concentraciones (por lo tanto, se consideró que no tenía actividad antioxidante). El endófito *E. leptinellae*, por su parte, sí demostró actividad antioxidante, aunque menor que la del ácido ascórbico.

La actividad antimicrobiana de los extractos fue probada contra *Bacillus subtilis* y *Botrytis cinérea*. Los extractos de ambas cepas fúngicas mostraron actividad antimicrobiana, solamente que el extracto proveniente de la cepa no identificada duplicó los valores de la bioactividad que los del extracto proveniente de *E. leptinellae*. La cepa no identificada mostró una actividad inhibitoria similar a la que presenta el alternariol 9-metil éter, producido por *Alternaria* sp.

Silva-Quitigüiña (2020) estudió la diversidad de hongos endófitos en plantas de la cueva de “Los Tayos”, en Morona Santiago, Ecuador. Hizo una recolección de siete

especies de plantas, de las cuales, dos fueron identificadas como *Oenocarpus bataua* y *Euterpe precatoria*; otras dos especies sólo se llegaron a identificar hasta nivel de género (*Trema sp.* y *Virola sp.*), mientras que las últimas tres no pudieron ser identificadas. De estas especies se lograron aislar 69 hongos endófitos, obtenidos de trozos sanos de hojas y tallos, que fueron clasificados en 42 morfotipos: 16 de estos fueron exclusivos de endófitos de hojas, 21 de los tallos y los restantes fueron encontrados en ambos materiales biológicos. Para las identificaciones a nivel molecular, se extrajo ADN y se amplificaron las regiones ITS de 48 de los endófitos aislados, obteniéndose similitudes por encima del 79% (llegando casi a 100%, en algunos casos). Todos los endófitos eran Ascomycetos, el género más representado fue *Xylaria*. De las hojas se obtuvieron *Xylaria*, *Fusarium*, *Sporothrix* y *Phomopsis*, mientras que en el tallo se encontraron *Colletotrichum*, *Dactylonectria*, *Hypoxylon*, *Mucor*, *Diaporthe*, *Neonectria*, *Talaromyces*, *Penicillium* y, de igual manera, *Xylaria*. Por lo tanto, al parecer existe una mayor frecuencia de colonización y una mayor diversidad de hongos endófitos en tejidos de tallos que en las hojas.

Rosado-Muñoz (2022) aisló hongos endófitos de *Bethencourtia palmensis* para evaluar diferentes actividades antagonistas contra tres plagas de importancia en la agricultura. En el trabajo experimental se lograron aislar 50 hongos endófitos, provenientes del tallo y flores de *Bethencourtia palmensis*, los cuáles se redujeron a sólo siete cepas, de acuerdo con aspectos morfológicos y de aspecto de las colonias. En cuanto a su identidad, sólo menciona que una de las cepas podría ser *Aspergillus*. Se realizaron tres bioensayos para analizar la actividad de las siete cepas de endófitos. Para la evaluación de la actividad antialimentaria de *Myzus persicae* (pulgón del melocotonero) se colocaron de diez a quince pulgones en cajas de Petri. Las cajas estaban divididas en dos partes, una contenía 10 µL de etanol (control) y la otra mitad tenía 10 µL del extracto. Después de 24 horas, se constataba el número de pulgones asentados en cada parte. En este bioensayo sólo tres cepas tuvieron buena actividad antialimentaria, con un índice de inhibición de asentamiento mayor al 70%. Para medir la actividad nematocida contra *Meloidogyne javanica* (nematodo fitopatógeno) se utilizaron placas estériles con 96 pocillos, el

control tenía 95 μL de solución de juveniles J2 y 5 μL de disolvente DMSO, mientras que en los tratamientos en vez del disolvente se utilizaban los extractos. Los resultados de esta actividad se reportaron con el porcentaje corregido de juveniles J2 muertos (si se alcanzaban valores por encima de 90% era considerado como buena actividad). Sólo tres cepas dieron buenos resultados, dos de ellas con un valor de 100% y la tercera con un aproximado de 97%, mientras que los cuatro restantes tuvieron valores inferiores al 90%. Para el último bioensayo, que fue la actividad antifúngica con *Botrytis cinerea*, se utilizaron placas de medio PDA con 96 pocillos y un revelador en cada pocillo, añadiéndose 20 μL de solución de esporas a una concentración de 1×10^7 esporas/mL. Se hicieron pruebas con los extractos en diferentes concentraciones (800, 400, 200, 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$). Si los extractos no lograban detener la germinación de las esporas de *Botrytis cinerea*, entonces éstas habrían metabolizado los extractos y el medio de cultivo cambiaría de color, por eso la razón del revelador. Para que se considerara que los extractos tienen buena actividad, se consideró que hubiera una inhibición en el crecimiento de las esporas mayor a un 50%, con respecto al control. En este caso, sólo dos cepas presentaron buenos porcentajes de inhibición de las esporas, en la concentración de extracto de 800 $\mu\text{g/mL}$ con 16.64 y 20.5% de crecimiento de esporas en comparación con el control.

Barni y Cantone (2022), evaluaron la capacidad antagonista de cuatro cepas de hongos endófitos, dos de *Trichoderma* (TH2 y TH4), *Chaetomium sp.* y *Epicoccum nigrum* contra *Macrophomina phaseolina*, un hongo que causa la enfermedad de la podredumbre carbonosa, que afecta a los cultivos de soja. Los endófitos fueron aislados de cultivos sanos de soja, y fueron cultivados *in vitro* en ensayos duales. Se observó que la disponibilidad de agua en el medio fue un factor que influyó en el crecimiento de los endófitos (ya que con valores de a_w de 0.98 y 0.995, crecían muy rápido en comparación con el patógeno, mientras que con un valor de 0.90 *Macrophomina phaseolina* creció lento pero los endófitos no crecieron). La actividad de *Trichoderma* fue muy buena, llegando a observarse una inhibición del crecimiento por contacto, con los endófitos creciendo a través de la colonia inhibida. Para el ensayo *in vivo* se utilizó tierra fértil tinalizada en autoclave y semillas de

soja que fueron cosechadas en el momento. Las semillas fueron sembradas en bandejas de 48 celdas con 2 mL de suspensión de endófitos (concentraciones de 4×10^7 conidios/mL para TH2 y TH4, y $1,5 \times 10^6$ conidios/mL para *E. nigrum* y *Chaetomium sp.*) y 0.1 g de inóculo de *M. phaseolina*. Los tratamientos que se llevaron a cabo fueron cada endófito por separado y las combinaciones de TH2 + TH4 y *E. nigrum* + *Chaetomium sp.*, más un control negativo, sin hongo endófito. La evaluación de la actividad se realizó después de 14 días tras la siembra, analizando la severidad de la podredumbre carbonosa en las plántulas emergidas. A los 35 días se observó la presencia de plántulas débiles y de menor vigor, o que contaron con la presencia de coloraciones castaño-rojizas en los tallos. Por último, a los 47 días se evaluó el efecto de los endófitos en la promoción del crecimiento de las plantas. Analizando los efectos de los endófitos con respecto a la germinación, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, pero si existió mejora en el porcentaje de germinación con respecto al control. En la parte correspondiente a las plántulas emergidas después de los 14 días, los ensayos con TH2 + TH4, *E. nigrum* y TH2 fueron los que presentaron plantas más sanas: sí hubo daño por el patógeno, pero se sugiere que hay un efecto protector en el recubrimiento de las semillas en estos primeros días de germinación. Para los resultados de la evaluación después de los 35 días se confeccionó una escala de cinco grados, según el efecto que presentarían los tallos después de los tratamientos, que va desde el tallo con aspecto normal hasta tallos con coloración rojiza y plántula muy dañada. Todos los tratamientos evaluados fueron positivos, manteniendo a las plantas en el grado cero (una base de tallo con aspecto normal). Por último, después de los 47 días de experimentación, se vio que el tratamiento combinado con TH2 + TH4 fue el que mostró una altura de la planta significativamente mayor y una mayor superficie foliar con respecto al control. Los tratamientos TH2 + TH4, y TH2 y TH4, por separado, presentaron un mayor peso seco con respecto al control.

2.2 Compuestos producidos por hongos endófitos.

Suryanarayanan y colaboradores (2009) realizaron una revisión acerca de la importancia de los hongos endófitos de transmisión horizontal, en donde destacan la relevancia de su estudio para encontrar nuevas fuentes de compuestos para combatir enfermedades que afectan a gran parte de la población mundial.

Un aspecto muy importante en este punto es la investigación de compuestos producidos por endófitos no identificados. Existen muchos hongos endófitos que no son cultivables y que pueden ser productores de compuestos de gran interés y utilidad, pero al no ser cultivables en laboratorio provocan un gran conflicto para el desarrollo de la ciencia. En el artículo mencionado los autores comentan que existen técnicas para darle solución a este problema y poder estudiar a estos microorganismos, como lo es el análisis de DNA completo seguido de su clonación y la metagenómica *shotgun* para el análisis de comunidades basándonos en bibliotecas. Con ellas es posible comparar y corroborar la existencia de hongos endófitos no cultivables, así como los compuestos bioactivos presentes.

De igual manera, es importante el estudio del metaboloma de las plantas hospedadoras, ya que se pueden hacer comparaciones entre plantas con y sin endófitos, lo cual puede ayudar a entender mejor las rutas de síntesis de compuestos de interés y aplicarlo en las industrias. Junto con diversas técnicas, como el marcaje radioquímico para compuestos que están en muy bajas concentraciones, se pueden realizar mejores estudios y obtener resultados óptimos.

Se sabe que los genes de los hongos evolucionan debido a múltiples reordenamientos, duplicaciones y pérdidas, que pueden ser originadas mediante la transferencia horizontal de genes. Esto puede ser de gran ayuda en la síntesis de nuevas sustancias, por lo que el estudio de estos microorganismos es cada vez más interesante. Esto puede ser conjuntado, además, con el estudio de compuestos producidos de forma diferencial por cambios en el medio de cultivo (por ejemplo, su composición, la temperatura, el pH y hasta la presencia o no de inhibidores enzimáticos).

Zhao y colaboradores (2011) publicaron un artículo en el cual mencionan diversos hongos endófitos, productores de compuestos de gran relevancia en el sector de la salud. Además, resaltan que algunos de estos compuestos son originarios de las plantas hospederas y que antes no se sabía que podían ser producidos por otros organismos. De entre los compuestos principales asociados al estudio de los hongos endófitos posiblemente el más conocido sea el paclitaxel (taxol), el cual es de los más importantes por su gran actividad contra el cáncer de pecho, pulmón, próstata y ovario. El rendimiento en la obtención de este compuesto a partir de la corteza de *Taxus* es muy bajo, a pesar de los avances en las técnicas para la extracción y de la identificación en 1993 de *Taxus brevifolia* como un excelente productor del compuesto. El descubrimiento de hongos endófitos capaces de producir el mismo compuesto que su hospedero vegetal hizo que se extendiera el estudio de más hongos endófitos en busca de compuestos de interés. En la actualidad se sabe que, al menos, 19 especies de hongos endófitos pueden producir paclitaxel (entre ellos, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Taxomyces* y *Tubercularia*).

Otro de los compuestos que pueden producir los hongos endófitos es la camptotecina, aislada por primera vez en 1966 a partir de *Camptotheca acuminata*. Se trata de uno de los agentes antineoplásicos más eficientes, y tiene como mecanismo de acción la inhibición de la enzima intracelular topoisomerasa 1, la cual está presente en la replicación y transcripción del ADN. Gracias a estos estudios, algunas formulaciones que contienen este compuesto han sido utilizadas para combatir el cáncer de ovario. En 2005 se reportó el primer hongo endófito capaz de producir camptotecina: *Entrophospora infrequens*, aislado de *Nothapodytes foetida*, (planta comúnmente llamada mappia). Ahora se sabe que más endófitos, como *Entrophospora*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Nothapodytes*, *Camptotheca* y *Apodytes*, pueden producir camptotecina.

Como se comentó brevemente, se ha observado que distintos hongos endófitos son los principales productores de compuestos bioactivos provenientes originalmente de sus plantas hospederas. Se tiene el ejemplo de *Acremonium sp.*, *Blastomyces*

sp. y *Botrytis sp.*, que producen huperzina A, la cual proviene de la planta *Huperzina serrata*, *Cephalosporium sp.* y *Chaetomium globosum* producen diosgenina, la cual puede ser obtenida a partir de *Paris polyphylla* y *Rhizopus oryzae* produce α -irone y β -irone.

Bano y colaboradores (2016) encontraron diversas actividades biológicas y compuestos producidos por hongos endófitos que son de gran interés. De los compuestos producidos por endófitos más estudiados son los que presentan actividad antimicrobiana, los cuáles pueden ser alcaloides, péptidos, esteroides, terpenoides fenoles, quinonas y flavonoides. Como ejemplo, se tienen estudios del péptido leuesnostatina A que es producido por *Acremonium sp.* en *Taxus baccata*, compuesto que mostró actividad antimicrobiana contra *Pythium ultimum*. Otros dos antibióticos, pestalachloride A y B fueron aislados del endófito *Pestalotiopsis adusta*, con gran actividad antifúngica contra tres fitopatógenos, *Fusarium culmorum*, *Gibberella zeae* y *Verticillium alboatrum*. Algunos otros compuestos presentan actividad anticancerígena, destacándose alrededor de 19 clases químicas diferentes de metabolitos secundarios con esta actividad. Entre los más importantes están la podofilotoxina, que presenta, además, actividad antibacteriana, antioxidante y antiviral. Esta molécula se utiliza como precursor en la síntesis de medicamentos contra el cáncer. También destacan al paclitaxel, que presenta una buena actividad contra el cáncer de próstata, ovario, de mama y de pulmón. Su modo de acción se basa en estabilizar los microtúbulos, deteniendo la división celular.

También mencionan algunos de los agentes antioxidantes producidos por estos microorganismos, como la hipericina (que es utilizada como antidepresivo, ya que inhibe la monoamino oxidasa, y también es utilizada para curar lesiones, inflamaciones y sinusitis), la pestacina o la isopestacina, que juegan un papel importante en la actividad antioxidante y también en la actividad antimicótica. Por último, destacan el papel de los endófitos en el crecimiento de las plantas, al producir una alta colección de compuestos que aumentan la resistencia a patógenos y herbívoros de vida corta.

Cruz-Miranda (2020) obtuvo 22 hongos endófitos aislados de *Phlegmariurus taxifolius*. Los microorganismos eran productores de huperzina A (HupA, compuesto usado en China en el tratamiento del Alzheimer) y provenían de diferentes partes de la planta. De estos aislados, la mayor cantidad fueron obtenidos en medio de cultivo PDA, más que de medios agar extracto de malta (AEM) y agar harina de maíz (AHM). Los aislados presentaron, a nivel macroscópico, micelio algodonoso con pigmentación variada (negro, blanco, gris, rosa, verde y anaranjado), a nivel microscópico se observó micelio hialino y cenocítico en algunos de los aislados; además, se observaron estructuras características de hongos como *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*. De entre los aislados se seleccionó la denominada “cepa 17” (debido a que presentó el pico más definido y alto en el perfil cromatográfico) para su identificación morfológica y molecular, además de realizar con ella el ensayo de inhibición *in vitro* de la AChE (acetilcolinesterasa, enzima que hidroliza el neurotransmisor acetilcolina, inactivándolo), usando como referencia un estándar de huperzina A. Se observó la presencia de macro y microconidios, los primeros fueron septados y fusiformes, con célula apical alargada, mientras que los microconidios presentaron forma ovalada, con uno o dos septos. En cuanto a la parte molecular, se amplificaron y secuenciaron fragmentos de 561 pb, estableciendo un alineamiento de secuencias de nucleótidos similares a especies del género *Fusarium*. La producción de HupA fue baja en comparación con otros endófitos reportados, con una inhibición de la AChE del 16.6% y 41.6% con el extracto alcaloide en concentraciones de 50 y 100 µg/mL, respectivamente.

Saravanakumar y colaboradores (2021) realizaron extracciones de metabolitos secundarios del hongo endófito *Diaporthe sp.*, utilizando acetato de etilo, hexano y metanol con el sobrenadante del cultivo de la cepa de interés. Los extractos de solventes se concentraron utilizando un evaporador rotatorio a 45°C para luego realizar un análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas para la identificación de los compuestos. Los extractos de acetato de etilo fueron los que mostraron una bioactividad mayor, observándose un total de 20 compuestos, de los cuales 11 fueron seleccionados para el acoplamiento molecular con la proteína HSP90, que está relacionada con el cáncer de mama. Cinco de estos compuestos,

pirrolidina, cyclopentanona, 2-(1-metilpropil)-, pirrolidina-5-ona, 2-[3- éster metílico del ácido hidroxipropil]-, pirrolidin-1-propiónico y del ácido 9-octadecenoico, tuvieron capacidad catalizadora contra HSP90, debida a la formación de enlaces de hidrógeno.

Ribeiro y colaboradores (2021) publicaron una revisión bibliográfica sobre los compuestos naturales reportados en estudios acerca de la diversidad de hongos endófitos brasileños. Lograron enumerar 60 hongos endófitos brasileños capaces de producir 303 compuestos. Entre sus características más destacadas estuvieron la citotóxica, antiparasitaria, antifúngica y antibacteriana. Además, realizaron estudios estadísticos con el propósito de encontrar similitudes químicas entre las cepas estudiadas. Esto fue posible gracias a la utilización de un software que implementa métodos estadísticos multivariados, el cual permitió explorar patrones ocultos entre las muestras. Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) y un Análisis de Conglomerados Jerárquicos (HCA) utilizando los datos recabados de los compuestos producidos por los endófitos, y se lograron agrupar en tres conjuntos: compuestos terpénicos, fenólicos y aquellos que contienen nitrógeno. Los modelos de PCA destacaron a los endófitos *Colletotrichum crassipes*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium crustosum* y *Xylaria sp.*, debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios reportados, aparte de que fueron los que más abundaron en la agrupación de compuestos que contienen nitrógeno. Respecto a los compuestos de tipo terpeno, *Camarops sp.*, *Cladosporium uredinicola* y *Penicillium sp.* fueron los que más destacaron, mientras que *Phomopsis cassiae* y *Talaromyces sp.* sobresalieron en el grupo de compuestos fenólicos.

Rodríguez-Mendoza y colaboradores (2021) realizaron una compilación de la literatura científica sobre bacterias y hongos endófitos en algunas especies de la familia Cactaceae, una publicación de gran interés ya que mencionan la importancia de la coevolución de estas plantas con los microorganismos endófitos: las bacterias les facilitan el establecimiento en estratos rocosos y ayudan a la fijación de nitrógeno y fósforo, mientras que los hongos aportarían su acción antimicrobiana. Desde

inicios de los años 2000, en México y Estados Unidos se han aislado tanto bacterias como hongos endófitos de diversas especies de cactus. Arizona (EUA) y Guanajuato (México), han sido los lugares con más especies de hongos aislados, hongos como *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Phoma sp.*, Agaricomycetes, Pleosporales, Capnodiales, Hypocreales y mucha más variedad.

En 2015, Ratnaweera y col. identificaron a *Aspergillus niger* y *Fusarium sp.* como hongos colonizadores, el primero en los cladodios del cactus *Opuntia* y el segundo en los pistilos de las flores. *Fusarium* presentó mejor actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* que *Aspergillus niger*, actividad atribuida a la equisetina. En el caso de *Cereus jamacaru*, Bezerra y col. identificaron (en 2013) 59 hongos endófitos, cuyas especies predominantes fueron *Cladosporium cladosporioides* y *Fusarium oxysporum*. Esta fue la primera ocasión en donde se reportaron 47 especies de hongos endófitos para una cactácea. Por último, Fonseca-García y col. en 2018 reportaron diversos endófitos del cactus *Myrtillocactus geometrizans* y del nopal *Opuntia robusta* como Chaetosphaeriales, Dothideomycetes, Hypocreales, Pleosporales y muchos más, diferenciando varias especies bajo la influencia de la biogeografía del hospedero, la endosfera del tallo y la época del año, ya que vieron efectos sobre especies presentes en épocas de lluvia en comparación con las encontradas en épocas de sequía.

Se ha demostrado que los hongos endófitos provenientes de cactáceas pueden tener alta utilidad en varios sectores, como el crecimiento y protección de plantas, Este es el caso del estudio realizado por Camarena-Pozos y colaboradores (2021), quienes identificaron compuestos volátiles de endófitos provenientes de *Opuntia robusta* y *Myrtillocactus geometrizans*, como el canfeno y el benzoato de bencilo. Estos compuestos presentaron resultados favorables en el crecimiento de las raíces de la herbácea *Arabidopsis thaliana* al ser inoculados en ella. Otro caso es el uso para el control de plagas, en el que Silva-Hughes y colaboradores (2015) demostraron la actividad antifúngica de *Biscogniauxia mediterránea*, endófito aislado del cactus *Opuntia humifusa*, contra el patógeno *Phomopsis obscurans* (que causa el tizón en las hojas de las fresas). También presentan un gran potencial en

el sector de la biorremediación, como describen Cardona y colaboradores (2009), quienes reportaron hongos endófitos capaces de degradar los colorantes de aguas residuales mediante exoenzimas o por bioabsorción. Además, presentan un gran potencial de investigación por su posible uso farmacológico, ya que algunas especies de cactus producen metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria y anticancerígena.

Galindo-Solís y Fernández (2022) publicaron una revisión sobre hongos endófitos y la importancia de los terpenoides en las interacciones de estos microorganismos con las plantas hospederas. Reportan que las funciones naturales de los terpenoides engloban varias interacciones benéficas y antagonistas para todos los organismos. Los terpenoides volátiles tienen un papel indispensable en las interacciones entre los hongos endófitos, la planta y todo el microbioma existente y los sesquiterpenoides desempeñan su actividad en interacciones con otros hongos, bacterias, plantas e insectos. Estos compuestos presentan actividad biológica de gran interés: tienen efecto anticancerígeno, antibacteriano, antiinflamatorio, antipalúdico y antiviral, además de que en estudios recientes se han reportado como agentes resistentes a insectos, con efecto inmunorregulador, antioxidante y útiles como neuroprotectores. A pesar de ser pocos los estudios sobre los terpenoides volátiles fúngicos se han aislado componentes bioactivos de hongos presentes en árboles medicinales, musgos, algas y manglares. Los hongos endófitos que se han reportado con producción más abundante han sido agrupados en trece órdenes, con los Eurotiales, que engloban a *Aspergillus* y *Penicillium*, como el grupo predominante. Con la información que presentan los autores, se evidencia que los hongos endófitos son una fuente casi interminable de compuestos bioactivos de importancia agrícola y medicinal. Varios endófitos son productores de fármacos terapéuticos de suma importancia, que fueron descubiertos por primera vez en plantas medicinales, como lo son podofilotoxina (metabolito anticancerígeno, producido por varias plantas y utilizado en medicina tradicional en el Medio Oriente), camptotecina (compuesto que pertenece a los fármacos quimioterapéuticos más importantes, alcaloide indol-terpeno que se extrae de la corteza de *Camptotheca acuminata*), ácido fusídico (antibiótico aislado de una cepa de *Fusidium coccineum*,

es un triterpenoide que detiene la síntesis de proteínas), alcaloides de Vinca (quimioterapéuticos antimitóticos, utilizados en el tratamiento de neoplasias hematológicas y linfáticas) y paclitaxel (diterpenoide antimitótico, originalmente aislado de la corteza del tallo del tejo occidental, *Taxus brevifolia*).

2.3 Actividad antimicrobiana de los hongos endófitos.

Rodrigues y colaboradores (2000) aislaron hongos endófitos a partir de *Spondias mombin*, la cual es una planta comúnmente usada en la medicina tradicional brasileña debido a sus propiedades antimicrobianas. Además, se ha demostrado que extractos obtenidos a partir de sus hojas tienen propiedades antivirales y antibacterianas. Los hongos endófitos utilizados para el estudio fueron los identificados como *Guignardia*, *Pestalotiopsis guepinii* y *Phomopsis sp.*, debido a que fueron las cepas más abundantes encontradas durante los aislamientos. Los extractos crudos de estas cepas fueron analizados contra 14 microorganismos, entre ellos actinomicetos, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como levaduras y hongos filamentosos. Demostraron actividad inhibitoria contra *Cladosporium elatum*, *Mycotypha sp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium canadensis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Actinomyces sp.* y *S. aureus*, además de que pudieron inhibir el crecimiento de todos los actinomicetos.

Liang y colaboradores (2012) aislaron e identificaron hongos endófitos provenientes de *Ophiopogon japonicus*. Consiguieron 30 endófitos, de los cuales 22 provenían de las raíces, mientras que el resto provenía de los tallos. Utilizaron los extractos crudos de micelio de los endófitos y los caldos de las fermentaciones para el análisis de la actividad antimicrobiana, la cual fue probada contra *S. aureus* (Gram positiva), *E. coli* (Gram negativa) y *Cryptococcus neoformans* (patógeno). Lograron observar que los extractos de micelio tenían una mejor actividad antimicrobiana en comparación con el caldo de cultivo. Se obtuvo muy buena actividad contra *S. aureus* y *C. neoformans*, pero contra *E. coli* ninguno de los hongos funcionó, lo cual es interesante ya que en otros estudios se ha demostrado que extractos poco concentrados de *Ophiopogon japonicus* inhiben el crecimiento de *E. coli*. De entre los endófitos que pudieron identificar, destacan *Fusarium oxysporum* y *Fusarium*

poae, con los cuales se hicieron pruebas adicionales, por su gran capacidad inhibitoria contra fitopatógenos (debida a su gran cantidad de componentes bioactivos). Endófitos del género *Fusarium* pueden producir pentaketidos, los cuales muestran actividad fuerte contra *Candida albicans*. Otros hongos de este género, aislados de *Tripterygium wilfordii*, producen compuestos antimicrobianos y otros aislados de *Cinnamomum kanehirae* pueden producir beauvericina.

González-Díaz (2015) comprobó la capacidad antagonista de hongos endófitos aislados de *Piper aduncum* contra *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* y *E. coli*. Las pruebas se realizaron en cajas de Petri con medio PDA, con la finalidad de que al ser un medio no selectivo y con alta cantidad de nutrientes pudieran crecer de forma adecuada tanto hongos como bacterias. Cada caja Petri fue dividida para sembrar, en un lado, la cepa de los hongos endófitos, y en el otro lado, sembrar las bacterias. De estas últimas, se inoculó 1 mL de una suspensión 0.5 en la escala de Mc Farland, las placas se incubaron a 29°C durante ocho días. Se observó que la cepa aislada, a la cual el autor denominó como “T2-M2-4-Rojo” fue la que presentó una mejor actividad antagónica contra los microorganismos anteriormente mencionados, con excepción de *S. choleraesuis*, mostrando un efecto de retraso en el crecimiento y, en algunos casos, hasta exterminando a las bacterias. Este efecto sobre las bacterias es algo ya estudiado y reportado por otros autores, quienes han comentado que todo ello es debido a que los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos tienen la capacidad de generar la lisis de las membranas celulares de las bacterias, causando la muerte de estas. Por el lado contrario, para las cepas que no presentaron una buena actividad bactericida, el autor menciona que puede ser debido a que las bacterias deshidratan los medios de cultivo de forma rápida, impidiendo que los endófitos tomen los nutrientes necesarios y causando que el hongo no pueda mantenerse con vida.

Malhadas y colaboradores (2017) evaluaron la actividad antimicrobiana de tres hongos endófitos: *Penicillium commune*, *Penicillium canescens* y *Alternaria alternata*, los cuáles fueron aislados de las hojas de *Olea europea* (olivo). La actividad de estos microorganismos fue evaluada contra dos bacterias Gram

negativas (*E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), tres bacterias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *S. aureus*) y tres levaduras (*Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*). La actividad antimicrobiana fue evaluada en cajas de Petri de 9 cm de diámetro, con medio PDA adicionado con extracto de las hojas de la planta hospedera, medio que fue inoculado con 10 µL de suspensión de esporas (1×10^6 esporas/mL) de los endófitos. Para inocular las bacterias, primero llegaron a una concentración de 10^6 UFC/mL. A cada placa, previamente inoculada con los hongos endófitos, se le agregaron 5 mL de la suspensión de bacteria. Las placas que fueron inoculadas con levadura fueron incubadas a 25°C durante 48 horas, mientras que las que contenían bacterias fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Como controles positivos, utilizaron fluconazol (25 µg/mL) para las levaduras y cloranfenicol (30 µg/mL) para las bacterias.

Al finalizar las pruebas antimicrobianas se pudo constatar que *P. canescens* y *P. commune* fueron los endófitos con la mejor actividad inhibitoria. *P. commune* tuvo la mejor bioactividad contra *C. parapsilosis*, *B. cereus* y *P. aeruginosa*. En el caso de *P. canescens*, inhibió de manera más efectiva a *S. aureus*, *E. coli*, y *B. subtilis*, mientras que *A. alternata* inhibió el crecimiento de *B. subtilis*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, en comparación con el cloranfenicol.

Palanichamy y colaboradores (2018) aislaron 42 hongos endófitos a partir de 11 plantas medicinales diferentes provenientes de Tamil Nadu, India, y evaluaron la bioactividad de los metabolitos secundarios producidos por estos microorganismos. La mayoría de los hongos aislados fueron *Alternaria sp.* y *Fusarium sp.*, y sus metabolitos secundarios fueron extraídos mediante un proceso líquido-líquido con acetato de etilo. 15 de estos extractos mostraron actividad antimicrobiana contra potenciales patógenos humanos, como lo son *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* y *Corynebacterium diphtheriae*, utilizando el método de pozos en agar, como control positivo estreptomycinina y como control negativo acetato de etilo. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Los extractos crudos provenientes de los hongos de *Vitex negundo*, *Ocimum basilicum* y *Justicia*

gendarussa fueron los que inhibieron a los cinco patógenos contra los que se evaluaron las cepas de los endófitos.

Duplat-Torres (2019) logró aislar hongos endófitos de las hojas del frailejón plateado (*Espeletia argentea*). En el trabajo experimental, el autor logró obtener cerca de 250 hongos endófitos aislados (finalmente 51, tras descartar aquellos que tenían características morfológicas similares). A estos endófitos se les evaluó la actividad antagónica frente a tres patógenos: *Phytophthora infestans*, *Fusarium sp.* y *Fusarium keratoplastikum* y se hizo búsqueda de compuestos bioactivos. 27 de los endófitos causaron inhibición del crecimiento de *Fusarium sp.*, mientras que 42 lo hicieron con *F. keratoplastikum* y también con *P. infestans*. Sin embargo, la mayoría de los resultados no fueron estadísticamente significativos: tan solo cinco cepas mostraron una inhibición de más del 50% de crecimiento y sólo hubo presencia de halos de inhibición en el caso de *P. infestans*. La inhibición hacia las dos especies de *Fusarium* se dio por contacto directo con el patógeno o por competencia, por lo que en esos casos se descartó la búsqueda de metabolitos secretados al medio. Dicha búsqueda sí se realizó con las cinco cepas que mostraron halo de inhibición contra *P. infestans*. Se caracterizaron morfológicamente a nivel macro y microscópico, llegándose a identificar probablemente como pertenecientes al filo Ascomycota, aunque no se pudo clasificar a nivel de género debido a que no se observaron estructuras reproductoras. En cuanto a la búsqueda de metabolitos secundarios, no se llegaron a identificar los compuestos producidos por los endófitos, más bien sólo se logró estandarizar el método para la extracción y detección de los metabolitos producidos por hongos en medio de cultivo sólido mediante una cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento, acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. Compararon los cromatogramas obtenidos para los endófitos aislados con los resultados del hongo *Mycogone rosea*, que tiene actividad inhibitoria contra el patógeno *Botrytis cinerea*, y llegaron a identificar preliminarmente fracciones de compuestos con actividad antimicrobiana, detectándose que sí hay producción de metabolitos secundarios por parte de los hongos endófitos.

Mosquera y colaboradores (2020) aislaron 14 hongos endófitos provenientes de *Mammea americana* y *Moringa oleifera*, microorganismos en los cuáles se reportó actividad antimicrobiana ante cepas sensibles y resistentes de *E. coli* y *S. aureus*. La actividad antimicrobiana más fuerte fue obtenida con tres extractos etanólicos, uno de *Penicillium* sp. y dos de *Cladosporium* sp. El extracto correspondiente a *Penicillium* sp. tuvo una mejor actividad antagónica frente a *E. coli*, mientras que el extracto correspondiente a *Cladosporium* sp. tuvo una mejor actividad contra *S. aureus*. Además, se realizaron pruebas de citotoxicidad y se demostró que los hongos endófitos no ocasionaron daño celular. Se hicieron identificaciones a nivel de morfoespecie, permitiendo el aislamiento e identificación de endófitos de *M. americana*: *Bipolaris* sp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. y *Mycelia sterilia*, microorganismos que fueron reportados por primera vez en trabajos realizados con esta planta. Para el caso de *M. oleifera*, ya se habían reportado diferentes endófitos en otros trabajos, que coinciden con los ahora identificados como *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp. y *Mycelia sterilia*.

Pincay y colaboradores (2020) evaluaron la capacidad antagónica de *Clonostachys* sp. y *Alternaria* sp., aislados de plantas de mora (*Rubus glaucus*), sobre el hongo *Botrytis cinerea*, que es causante de la enfermedad “moho gris”, uno de los principales problemas fitosanitarios sobre los cultivos de mora (que llega a ocasionar pérdidas económicas y afecta a alrededor del 92% de los productores de este fruto). En el caso de *Alternaria* sp. se comprobaron los postulados de Koch, para confirmar que no se trataba de un hongo endófito con actividad patógena. Para ello, se inocularon tres tallos sin hojas y se incubaron a 26°C durante 15 días. Después del tiempo de incubación, se observó que no hubo síntomas de necrosamiento debido a infección. La metodología que se utilizó para observar la actividad antagónica de los endófitos fue colocar en cajas de Petri con PDA discos de 5 mm en dos extremos diferentes, uno con un endófito y en el otro extremo *B. cinerea*, para que después de 14 días en el caso de *Alternaria* sp. (y 20 días para *Clonostachys* sp., el tiempo que tardaron en crecer) se pudiera evaluar la actividad en la escala de Bell *et al.* (1982). En dicha escala, se hace uso de cinco niveles de referencia según el crecimiento de los hongos en comparación con el patógeno.

Después de 12 días de incubación, los hongos endófitos consiguieron una inhibición del crecimiento radial de *B. cinerea*, llegando a resultados de 55.2% con *Alternaria sp.* y 54.6% para *Clonostachys sp.* (aunque en este último caso, una incubación mayor, 20 días, permitió obtener una inhibición de 65.5%). Con los valores obtenidos se ubicaron a los endófitos en las categorías II y III de la escala de Bell. El aislado de *Clonostachys sp.* fue ubicado en la categoría II, la cual indica que el antagonista llega a sobrepasar dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo (ya que presentó, a pesar de su crecimiento lento, una ventaja sobre los esclerocios de *B. cinerea*). En cuanto a *Alternaria sp.*, fue dispuesto en la categoría III, la cual representa la situación donde el antagonista y el patógeno colonizan la mitad del medio de cultivo y parece que ninguno domina al otro, debido a que no tuvo un crecimiento bueno, no presentó grandes cantidades de conidios y permitió que el patógeno creciera sin ningún problema (por lo tanto, no se le consideró como un hongo antagonista). Los autores mencionan que es recomendable realizar las pruebas en campo para analizar cómo influye el medio en el desarrollo de los hongos antes de utilizarlos como biocontroladores.

Pinhelo da Costa y colaboradores (2021) evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos de 19 hongos endófitos aislados a partir de hojas de *Brugmansia suaveolens*, de los cuales se pudieron identificar a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium avenaceum*, *Aspergillus oryzae*, *Nectria rigidiuscula*, *Fusarium sp.*, *Microdiplodia sp.*, *Paraconiothyrium sp.* y *Eurothiomycetes sp.* Estos extractos fueron obtenidos mediante fermentación en medio sumergido con adición de hojas secas. La evaluación de la actividad antimicrobiana fue realizada contra *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, las cuales estuvieron en suspensión de 1×10^8 bacterias/mL. Las células fueron inoculadas en placas con agar Mueller-Hinton y se esparcieron por toda la superficie del medio, para posteriormente colocar un pequeño papel de filtro en el centro de las placas, al cual se le agregó 10 μ L de extracto con concentración de 250 μ g/mL. Como control negativo no se agregó extracto y los controles positivos fueron antibióticos comerciales, como gentamicina y ampicilina. Las cajas se mantuvieron durante 24 horas a 37°C; después del tiempo de incubación, se pudo observar que las cepas denominadas como BS9 y BS17

fueron las que presentaron una mejor actividad antimicrobiana contra *Proteus mirabilis*. De igual manera, estas dos cepas junto con la BS1 fueron las que presentaron mejor actividad contra *Klebsiella pneumoniae*.

Depetris (2021) obtuvo 66 aislados de hongos endófitos provenientes de *Paspalum*: 22 de *Paspalum dilatatum* y 44 de *Paspalum notatum*. 44 de los endófitos aislados se identificaron morfológica y molecularmente, llegando a contabilizarse diez géneros diferentes: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Cercospora*, *Bipolaris*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Acremonium*. Para evaluar la actividad antagónica, se hizo uso de las cepas identificadas como *Trichoderma amazonicum* y *Acremonium strictum* (debido a que fueron las especies más frecuentes y con un potencial mayor) y se enfrentaron con las cepas patógenas *Alternaria alternata* y *Bipolaris sp.* La evaluación se hizo en cajas de Petri con medio PDA y cultivos duales: ambas cepas (patógena y no patógena) se sembraron a 2 cm del borde de la placa y se incubaron a 28°C durante siete días para *T. amazonicum* y quince días para *A. strictum*. El porcentaje de inhibición que presentó *T. amazonicum* contra las dos cepas patógenas fue mayor al 60%, situándolo en el nivel tres (fuerte) de las categorías de inhibición del crecimiento (CIC), mientras que *A. strictum* presentó un 34% contra *Alternaria alternata* y casi un 23% contra *Bipolaris sp.*, ubicándose en la categoría dos (moderada) y uno (débil), respectivamente, de las CIC. Para la evaluación de la actividad antagónica debida a metabolitos volátiles, se colocaron placas con PDA inoculadas cada una ya sea con micelio del patógeno o micelio del endófito a evaluar, las cajas se ponían frente a frente con flujo laminar, para luego sellarlas con Parafilm. Se incubaron a 28°C durante siete días, para evitar contaminaciones. *T. amazonicum* presentó una inhibición de casi 29% contra *Alternaria alternata* y un 19% contra *Bipolaris sp.*, ubicándose en la categoría dos y uno, respectivamente, de las CIC. En el caso de *A. strictum*, presentó un 4.71% y casi un 12% contra *Alternaria alternata* y *Bipolaris sp.*, respectivamente, ubicándose en ambos casos en la categoría uno. Respecto a la evaluación antimicrobiana mediante la técnica de excavación-placa cultivo, se vio el potencial antagónico contra la enfermedad causada por el hongo *Claviceps paspali* (ergot). Para ello, por un lado, se cosecharon inflorescencias con exudado

mucilaginoso y viscoso característico de la enfermedad. Por otro, en cajas de Petri con PDA y los endófitos inoculados (con siete días de crecimiento para *A. strictum* y tres días para *T. amazonicum*), se hicieron cuatro huecos en el medio, cerca del micelio de los hongos para, dentro del hueco colocar 20 μ L del inóculo del ergot. *T. amazonicum* después de cuatro días presentó colonias en todas las placas, aunque cerca de las zonas de inóculo del patógeno aparecieron algunas pequeñas áreas de inhibición (tal vez debido a la esporulación del hongo endófito), mientras que en el caso de *A. strictum* el crecimiento se apreció hasta sobre el patógeno, no se observaron halos de inhibición. Estos resultados indican que *T. amazonicum* tiene un gran potencial *in vitro* como control biológico contra los patógenos utilizados, además de inhibir a *Claviceps paspali* (tal vez por micoparasitismo y/o competencia por recursos). En el caso de *A. strictum* sería interesante el análisis de producción y liberación de metabolitos secundarios (tal vez en este caso también se dé actividad de competencia por los recursos entre el endófito y los patógenos).

Navarro-de-la-Fuente y colaboradores (2022), por su parte, obtuvieron 20 aislados fúngicos de *Manilkara zapota*, provenientes de la fruta y las hojas. Estos microorganismos se identificaron morfológicamente utilizando claves taxonómicas y realizando comparación de las ITS del ADN ribosomal, llegando a identificarse siete géneros de ascomicetos: *Pestalotiopsis*, *Geotrichum*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Neopestalotiopsis*, *Daldinia* y *Epicoccum*, y dos géneros de basidiomicetos: *Sistotrema* y *Stereum*. Se evaluaron 40 extractos crudos correspondientes a biomasa y caldo de cultivo de los 20 hongos aislados, para detectar actividad antibacteriana (concentración de 1 mg de bacteria/mL) Se apreció una inhibición en el crecimiento de *E. coli* y *Enterococcus faecalis* debida a la biomasa de *Stereum* sp., lo mismo que ocurrió con ambos extractos de *Curvularia* sp. y *Sistotrema* sp. (los cuatro extractos en las mismas condiciones de experimentación). Por el contrario, estos extractos fueron inactivos contra *S. aureus*. También se reportó que los únicos extractos que inhibieron el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* (bacteria fitopatógena) fueron los de *Curvularia* sp. Todos los demás extractos fúngicos fueron inactivos frente a *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y las bacterias fitopatógenas *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *C. michiganensis*,

Rhizobium radiobacter y *Xanthomonas albilineans*. Para las pruebas de actividad antifúngica, concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) se utilizó el extracto crudo de biomasa de *Curvularia sp.*, ya que fue el que presentó mejores resultados en la actividad antibacteriana. Para el cálculo de la CMI, el extracto presentó buena actividad contra *E. faecalis*, moderada contra *C. michiganensis* y baja con *E. coli*. En cuanto a la CMB se determinó una concentración de 500 µg/mL contra *C. michiganensis* y *E. faecalis*, mientras que fue inactiva frente a *E. coli*. Respecto de la actividad antifúngica, con una concentración de 1000 µg/mL presentó un efecto inhibitorio variado (29-35%) sobre *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium solani* (hongos fitopatógenos) después del cuarto día de inoculación.

Trujillo-Ortigoza (2022) evaluó la actividad antimicrobiana de hongos endófitos aislados de *Fernandezia lanceolata* contra dos patógenos, *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.* Se utilizaron 44 cepas de los aislados obtenidos con cultivos duales en medio PDA, que fueron incubados durante ocho días a 25°C. Después del tiempo de incubación, sólo 14 presentaron inhibición contra *Fusarium sp.*, y dos de estos endófitos presentaron una inhibición en el crecimiento del patógeno mayor al 51%. En el caso de *Colletotrichum sp.*, de los 44 endófitos evaluados, 40 de ellos mostraron actividad antagónica contra el patógeno, y cuatro cepas presentaron una actividad de inhibición entre el 70 y el 97%. Estos resultados demuestran que los hongos endófitos aislados de las raíces de estas orquídeas presentan buena actividad antagónica contra *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.*, lo que da pie a más investigación para llegar a producir algún producto de biocontrol para cultivos de interés.

Camacho-Luna y colaboradores (2022) obtuvieron 100 aislados de endófitos a partir de hojas de *Ageratina pichinchensis*, la cual es una planta medicinal endémica de México (comúnmente conocida como axihuitl). Los aislados fueron clasificados en 55 morfoespecies. Posteriormente fue evaluada su actividad antagónica contra tres patógenos: *Stemphyllium vesicarium*, *Fusarium proliferatum* y *F. oxysporum*, encontrándose actividad considerable en doce de las morfoespecies. Estos doce

morfotipos fueron seleccionados para realizar la identificación a nivel molecular y los ensayos de actividad antagónica en cultivo dual y de alimento envenenado. Se hizo la identificación de los aislados, obteniéndose los siguientes resultados: *Remotididymella anthropophila*, *Phomopsis* sp., dos correspondientes a *Diaporthe* sp., *Diaporthe caatingaensis*, *Fusarium* sp., *Nigrospora oryzae*, otros dos de *Alternaria alternata*, *Alternaria* sp., *Trichoderma longibrachiatum* y *Phomopsis* sp. Algunas de las especies que se identificaron han sido también reportadas para otras especies de plantas del género *Ageratina*, por ejemplo, para *Ageratina adenophora* se han aislado endófitos del género *Phomopsis* y para *Ageratina altissima* se ha reportado la presencia de *Phomopsis magnoliae* y *N. oryzae*. Respecto de la actividad antagónica en cultivo dual, los hongos endófitos seleccionados inhibieron el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* en un 37 a 80% (los aislados de *T. longibrachiatum* y *N. oryzae* presentaron la mayor actividad antagónica, un 79% de inhibición contra ambas especies de *Fusarium*). En cuanto a la experimentación con alimento envenenado, se reportó que *N. oryzae* si presenta actividad antagónica sobre el crecimiento contra las dos especies de *Fusarium* (pero no por producción de algún compuesto, sino por competencia por espacio y nutrientes), mientras que en el caso de *T. longibrachiatum* sí hubo inhibición del crecimiento de *Fusarium* debida a la producción de compuestos con actividad antibiótica.

García-Latorre (2022) seleccionó diferentes hongos endófitos provenientes de dehesas extremeñas, con el fin de producir *in vitro* metabolitos secundarios con potencial actividad protectora de plantas frente el estrés biótico y abiótico. Los extractos fueron probados tanto en condiciones *in vitro* como de invernadero, para el biocontrol de tres microorganismos: *Phytophthora cinnamomi*, *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae*. Al estar inoculadas con los microorganismos, las plantas iban a presentar síntomas de enfermedad, tales como secado de la planta, presentar color amarillento, hojas podridas y algunas manchas de color negro. Para saber qué tanto se vio afectada la planta con la presencia de los microorganismos y también qué tanto los hongos endófitos ayudaron en la parte del biocontrol, se implementó una escala de cinco niveles para referirse al daño encontrado en las

plantas: 0 – planta sana, 1 – signos de enfermedad débiles, 2 – síntomas de enfermedad marcados, 3 – senescencia, 4 – muerte.

Para el estudio de la actividad antimicrobiana con *Phytophthora cinnamomi*, este patógeno fue inoculado en plantas de *Lupinus luteus*, debido a su alta susceptibilidad planta-patógeno. La inoculación del patógeno se realizó aplicando un sustrato de zoosporas, 100 mL por cada L de suelo, con concentración de 2×10^4 esporas, mientras que los extractos fueron pulverizados y esparcidos sobre las plantas hasta que se consiguió un mojado homogéneo. Después del estudio, se observó que todos los endófitos provocaron una reducción significativa del efecto del patógeno sobre la planta, siendo *Fusarium avenaceum* y *Pseudopithomyces chartarum*, los que ayudaron mejor a que las plantas presentaran menos síntomas de enfermedad, reduciendo los daños en un 72% y 65% respectivamente.

En el caso de *Botrytis cinérea*, este patógeno se inoculó en el garbanzo *Cicer arietinum*, debido a que este cultivo es de suma importancia en tierras de secano. En este caso, primero se inocularon los extractos, de igual manera, pulverizándolos y agregando un mL sobre la planta con concentración de 3 mg/mL. Cuando la planta se secó, al día siguiente se le inoculó el patógeno, 5 mL por cada planta con concentración de 2×10^4 esporas/mL. Para este estudio se utilizó una escala diferente, tomando en cuenta los porcentajes de severidad ((# de hojas con síntomas/# de hojas totales) \times 100) con seis niveles: 0 – 0% de daños, 1 – 1 a 20%, 2 – 21 a 40%, 3 – 41 a 60%, 4 – 61 a 80% y 5 – 81 a 100%. Se observó que los extractos de *Fusarium avenaceum*, *Mucor hiemalis*, *Purpureocillium lilacinum* y *Epicoccum nigrum* fueron los que protegieron mucho mejor a las plantas de este patógeno, teniendo un aumento significativo en el peso seco de las partes aéreas sanas de las plantas.

Para *Pseudomonas syringae*, la planta que fue seleccionada para su inoculación fue *Solanum lycopersicum*. Su tratamiento fue parecido al de la planta anteriormente mencionada, y cuando se secó se inoculó con un mL del patógeno [10^8 unidades formadoras de colonias]. Las plantas infectadas presentaron folíolos con manchas

de color negro, rodeadas con un halo clorótico, algunas perdieron el vigor y otras murieron. Todas las plantas tratadas con los extractos presentaron una diferencia significativa en el tratamiento de su enfermedad con respecto a las no tratadas, pero entre todos los tratamientos con los extractos no hubo diferencia significativa. El extracto que demostró una mejor actividad protectora sobre la planta fue el denominado por el equipo de trabajo como E138, ya que con este extracto se obtuvo un peso aéreo y un peso seco total de la planta mucho mayor, en comparación con los demás tratamientos.

Galindo-Solís (2023) obtuvo 130 morfotipos diferentes de hongos endófitos aislados de cuatro árboles/arbustos: *Krameria cystisoides*, *Taxus globosa*, *Taxus baccata* y *Salvia ballotiflora* (de una muestra de rama y hojas de esta última fueron aislados doce morfotipos, lo cual es el primer reporte de hongos endófitos en esta especie). Como novedad, el autor utilizó extracto metanólico de la planta hospedera para suplementar los medios de aislamiento y observar si estas condiciones favorecían el crecimiento de los endófitos, como así fue. Tras el análisis de las secuencias de ITS se identificaron hongos de los géneros *Periconia sp.* y *Alternaria sp.*, aislados de *Taxus globosa*. A partir de *Taxus baccata* se aislaron *Fusarium sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria sp.* En el caso de *Salvia ballotiflora* se identificaron *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp.* y *Fusarium sp.*, y, por último, en *Krameria cystisoides*, se identificaron, *Cladosporium cladosporioides*, *Xylariaceae sp.*, *Penicillium sp.*, *Dothiorella sp.*, *Periconia sp.* y *Cladosporium sp.* Algunas cepas aisladas de los endófitos fueron probadas para evaluar su actividad antimicrobiana sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. faecalis* y *Bacillus sp.*

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la constante búsqueda para la mejora de la calidad de vida de la población mundial (además de la presencia de varias enfermedades que afectan no sólo a los humanos, sino también a los cultivos y ecosistemas en general), existe la necesidad de obtener compuestos bioactivos con potencial impacto en diversos sectores. Con el incremento a nivel mundial de bacterias multirresistentes a antibióticos, uno de los objetivos necesarios es no sólo encontrar nuevos antibióticos, sino además que cuenten con mecanismos de acción diferentes a los conocidos hasta ahora. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en colaboración con la Universidad de Tübingen (Alemania), publicaron en 2021 una lista llamada “problemas sanitarios urgentes de dimensión mundial”, en la que se incluyen aquellas bacterias que adquirieron y van aumentando en su farmacorresistencia. Las bacterias se organizan en tres prioridades (crítica, elevada y media) y las que encabezan la lista son *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*, las cuales son resistentes a vancomicina, meticilina y clarotromicina. Buscando nuevas alternativas, Tejesvi y col. reportaron el descubrimiento de un nuevo péptido en 2013, el cual fue nombrado “trtesin”, producido por *Fusarium tricinctum*, endófito de la planta *Rhododendron tomentosum*. Trtesin es un péptido de 52 aminoácidos, que al ser purificado presentó actividad contra *Staphylococcus carnosus*, *Candida albicans* y *Candida utilis*, además de contra *Fusarium oxysporum*, bacterias con alta resistencia a antibióticos. La investigación para producción de nuevos fármacos a partir de hongos endófitos es viable, ya que trtesin tiene homología cercana con un péptido antifúngico que fue patentado por Pioneer Hi-Bred Seeds (Altier y col. 2009), y que, añadido en plantas transgénicas, las defiende contra hongos patógenos y bacterias.

Según el INEGI, en 2023 se registraron poco más de 90 mil defunciones atribuidas a tumores malignos, lo que corresponde aproximadamente a un 8% de las defunciones totales en México. Desde hace décadas se ha buscado el modo de poder combatir estas enfermedades y ahora se dispone de tratamientos con

diferentes medicamentos, los cuales han dado resultados prometedores. Un ejemplo es el uso de taxol, nombre comercial de un compuesto antimitótico usado como medicamento de quimioterapia y cuyo nombre común es paclitaxel. La función de este fármaco radica en la estabilización de microtúbulos, formados por proteínas, los cuáles conforman el huso mitótico (estructura para organizar y mover cromosomas en la mitosis celular) y así provocar la pérdida de su función. La problemática existente con este medicamento es que la extracción a partir de la fuente natural (corteza de los árboles de algunas especies del género *Taxus*) es complicada y no deja buenos rendimientos, requiriendo procesar aproximadamente 750 árboles adultos para conseguir un kilogramo de paclitaxel, lo que conlleva a tener un medicamento con un alto costo. Además, su síntesis química es muy compleja y no resulta comercialmente rentable (Centelles e Imperial, 2010). Por ello es imprescindible encontrar otras fuentes biológicas para la producción de este tipo de compuestos, como lo pueden ser los hongos endófitos, quienes son grandes candidatos para la producción de agentes antitumorales.

Debido al estilo de vida que llevamos los mexicanos, una de las enfermedades más recurrentes en el país es la hipertensión. La hipertensión arterial se debe al aumento de la presión de la sangre en las arterias, lo que es causado en parte por la diabetes, el consumo de tabaco y alcohol en exceso, el sedentarismo, la obesidad y la alimentación inadecuada, el uso de medicamentos de tipo esteroideo y ciertas condiciones genéticas. La Secretaría de Salud estima que más de 30 millones de personas en México viven con esta enfermedad y que, aproximadamente, el 46% de esta población no lo sabe. Según datos del INEGI de 2020, el 24.9% de la población de hombres y 26.1% de las mujeres padecen hipertensión, ocasionando casi 50 mil fallecimientos (Secretaría de Salud, 2023). El tratamiento para esta enfermedad está basado en fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueadores de canales de calcio y beta bloqueadores. La actividad antihipertensiva de hongos endófitos es un campo que no ha sido explorado en su totalidad, hay evidencia que demuestra la eficacia de extractos de hongos endófitos que inhiben la enzima convertidora de angiotensina en diferentes concentraciones. Por ello, estudiar esta actividad biológica brindaría información para nuevas y

mejores fuentes de producción de fármacos contra la hipertensión, mejorando así la calidad de vida de la población mexicana.

Por otra parte, el crecimiento de la población mundial ha provocado que el uso de los pesticidas químicos se haya incrementado enormemente para satisfacer las necesidades alimenticias de la población. El uso desmedido de los pesticidas genera varios problemas que afectan a diferentes sectores: envenenamientos de personas, problemas ambientales, resistencia a los plaguicidas y, como consecuencia, hasta puede darse el resurgimiento de plagas. La azaridactina es un biopesticida de gran importancia en el mundo, obtenido a partir de extractos de Neem (*Azadirachta indica*), que es una planta tropical. Este plaguicida combate enfermedades y plagas importantes económicamente, provocadas por insectos, ya sea repeliéndolos, inhibiendo su alimentación y/o interrumpiendo su crecimiento y reproducción (Adhikari y col., 2020). Aunque la producción de estos pesticidas es sencilla, económica y no tóxica, es importante buscar fuentes alternas para la producción de la azaridactina, con técnicas mejores y más económicas, además de no agotar la fuente original del compuesto.

Con el objetivo de aportar soluciones a las dificultades con las que se enfrenta la humanidad, más el compromiso de querer mantener los ecosistemas sanos y, adicionalmente, contribuir a la poca información sobre la producción de compuestos provenientes de la actividad metabólica de los hongos endófitos, el presente trabajo de investigación pretende llegar a la identificación de hongos endófitos aislados de *Taxus sp.*, determinar los compuestos que producen y evaluar su actividad biológica.

4. HIPÓTESIS

Los diferentes hongos endófitos que serán aislados de *Taxus sp.*, producirán compuestos bioactivos de interés.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Ampliar el conocimiento acerca de los hongos endófitos, su diversidad y su bioactividad, usando como modelo de planta hospedera *Taxus sp.*

5.2 Específicos:

5.2.1 Realizar el aislamiento y crecimiento de hongos endófitos de *Taxus sp.*

5.2.2 Identificar molecularmente los hongos endófitos aislados.

5.2.3 Producir compuestos bioactivos de los endófitos aislados.

5.2.4 Evaluar la actividad biológica de los compuestos producidos.

5.2.5 Análisis de actividad antimicrobiana debida a proteína o metabolitos secundarios.

5.2.6 Identificar por espectrometría de masas los compuestos producidos.

6. METODOLOGÍA

6.1 Aislamiento de microorganismos.

La recolecta de muestras de *Taxus globosa* (tejo chino) se realizó tomando en cuenta las características morfológicas de hojas y frutos descritas en diferentes estudios, que, junto con datos obtenidos de censos preliminares de la población de árboles juveniles y adultos en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, se pudieron elegir, con ayuda de ubicación satelital, las coordenadas con mejor accesibilidad. Los especímenes fueron seleccionados según las características morfológicas de la especie (Figuras 1 y 2). Se tomaron muestras de hojas y ramas, de una altura aproximada de 3 m de cada árbol, utilizando tijeras para jardín previamente esterilizadas en flama y sanitizadas con etanol al 70%.



Figuras 1 y 2. Características morfológicas de un individuo de *Taxus globosa* Schltidl (Thomas, 2019).

Se realizó un tratamiento de lavado a las hojas y trozos de corteza de *Taxus sp.*, que consistió en lavar primero con una solución jabonosa durante diez minutos con agitación, posteriormente se hicieron dos lavados con agua destilada, se pasó el material biológico a etanol al 70% (v/v) durante tres minutos, manteniéndose con agitación suave y, finalmente y ya dentro de una campana de flujo laminar, se enjuagó el material con agua destilada.

A continuación, se colocaron tres pedazos de hoja en cada caja de Petri y lo mismo se realizó con los trozos de corteza. Se inocularon 12 cajas de Petri con PDA y antibiótico (100 µg/mL de gentamicina y 100 µg/mL de ampicilina), 12 cajas con agar

nutritivo y antibiótico (mismas concentraciones descritas anteriormente) y, por último, 12 cajas con agar nutritivo sin antibiótico. La mitad de las cajas se introdujeron en una incubadora a 28°C y la mitad restante se incubaron a 24°C, distribuyendo los medios de cultivo en ambas temperaturas. Después de una semana de incubación, se seleccionaron cepas con características morfológicas visualmente diferentes para su aislamiento y la evaluación de sus actividades biológicas. Se realizaron tres aislamientos mediante siembra por estría de cada cepa seleccionada.

Una vez obtenidos los cultivos axénicos de las cepas, se realizaron gliceroles al 40% (p/v) para su mantenimiento y conservación. Para ello, se cortaron pequeños pedazos de micelio con palillos esterilizados y se colocaron en tubos de 1.5 mL, agregándose posteriormente un mililitro de glicerol al 40%. A cada caja de Petri de cultivo aislado se le agregaron aproximadamente 5 mL de solución salina con Tween al 80% para la colecta de esporas. Se tomaron aproximadamente 700 µL en tubos de 1.5 mL y se adicionaron 700 µL de glicerol al 80%. En cajas de 60 mm con medio PDA complementado con jugo de verduras V8[®], se depositaron 20 µL del concentrado de esporas colectado. Se sembraron dos cajas por cada cepa de hongo, una para observar el crecimiento de las colonias y la otra para observar el crecimiento masivo.

6.2 Identificación de los hongos endófitos.

Para la identificación de los endófitos se realizó la extracción de ADN genómico, según el protocolo de Cerón-Moreno (2020). El micelio producido se recogió con palillo estéril, y se colocó en un mortero frío, se añadió nitrógeno líquido y se molió. En tubos Eppendorf de 1.5 mL fríos se colocó alrededor de 1/3 de su volumen con el micelio macerado, se le adicionó a cada uno 800 µL de buffer de extracción (EDTA 50 mM y SDS al 0.2%) y se incubó a 68°C durante 30 min. Inmediatamente después, se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 100 µL de acetato de potasio 5 M pH 4.2, se mezcló y se colocó en hielo durante 30 min, para posteriormente centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min. Se tomaron 700 µL del sobrenadante y se adicionaron 700 µL de isopropanol, se

mezcló suavemente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se resuspendió el pellet con 400 μ L de TE (EDTA 1 mM pH 8.0 y Tris-HCl 10 mM pH 8.0) y se agregaron 40 μ L de acetato de sodio (NaAc) 3 M pH 7.0. La mezcla se calentó a 68°C durante 1 h. Pasado el tiempo, se agregó 1 mL de etanol absoluto y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó dos veces el pellet con 800 μ L de EtOH 70%, centrifugando a 14,000 rpm durante 5 min. El ADN se resuspendió en 100 μ L de TE con 1 μ L de RNAsa, en una concentración de 10 μ g/mL. La mezcla se mantuvo a 37°C durante 1.5 h. Después se añadieron 300 μ L de TE y 300 μ L de CIA (cloroformo-alcohol isoamílico, 24:1), se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se recogió la fase acuosa y se añadió 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 más 700 μ L de etanol absoluto frío, para centrifugar a 14,000 rpm durante 20 min. El ADN se lavó con 800 μ L de EtOH 70%, se dejó secar y resuspendió en 30 μ L de H₂O libre de nucleasas. Se conservó a -20°C.

Para evaluar la calidad de las muestras de ADN genómico extraídas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, en el que se cargaron 5 μ L de la muestra de ADN con 3 μ L de buffer de carga con Gel Red como intercalante.

Una vez obtenido el ADN de las muestras, se diseñaron PCRs utilizando cebadores (concentración de 10 μ M) para las regiones ITS fúngicas, los cuales amplifican segmentos de varios hongos, tanto basidiomicetos como ascomicetos (Gardes y Bruns. 1993), y cebadores para el factor de elongación 1 α (EF-1 α) (las secuencias de los cebadores se encuentran en el Anexo 1). Se siguió el manual diseñado por el fabricante para la enzima Taq DNA Polymerase (recombinante) de Thermo Scientific. Para los volúmenes de los reactivos se utilizó: MgCl₂ 2 μ L [25 mM], Oligo 1 0.5 μ L [10 μ M], TaqPol 0.25 μ L [5 U/ μ L], dNTPs 1 μ L [10 mM], Buffer 2.5 μ L [100 mM de Tris -HCl (pH 8.8), 500 mM de KCl y 15 mM de MgCl₂], Oligo 2 0.5 μ L [10 μ M], H₂O 12.25 μ L, DNA 1 μ L. Para la PCR se diseñó un protocolo considerando el tipo de polimerasa y los cebadores usados. La etapa de inicio se realizó a una temperatura de 95°C durante 3 min, la desnaturalización en cada ciclo se realizó a una temperatura de 94°C durante 30 seg, el alineamiento se completó a 50.1°C, en el caso de los cebadores para ITS, y a 58°C, y en el caso de los cebadores para el

factor de elongación. En ambos casos se usó un tiempo de alineamiento de 40 seg. Para la extensión se usaron 72°C durante un minuto. Se aplicaron 35 ciclos y un paso de elongación final de 72°C durante 5 min.

Para comprobar la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La purificación de los productos de PCR se realizó mediante columnas, siguiendo el manual del fabricante para el Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience. Jena, Alemania). Para ello, se cortaron las bandas de interés del gel de agarosa, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se agregó buffer de disolución de agarosa (aprox. 600 µL), más 200 µL de isopropanol frío. Se calentó a 60°C hasta que se disolviera la agarosa y se pasó, aproximadamente un mililitro, a una columna previamente montada y activada. La activación se realizó colocando 100 µL de buffer de activación en la columna de giro. Después de esperar un minuto, se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 segundos, se descartó el líquido y se lavó con 700 µL de buffer de lavado por 30 segundos, se centrifugó de nuevo durante dos minutos y se descartó el líquido. La columna se pasó a un tubo nuevo y se agregaron 30 µL de H₂O libre de nucleasas para eluir el ADN, se centrifugó durante un minuto y se corrió un nuevo gel de agarosa al 0.8%, para ver la integridad y calidad de la limpieza de la muestra. 60 µL de cada una de las muestras a concentración de 10 ng/µl, fueron enviadas a la compañía Macrogen (Geumcheon-gu, Seoul) para la determinación de sus secuencia nucleotídica. Se utilizaron los programas bioinformáticos de NCBI (National Center of Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Fungi DB (<https://fungidb.org/>) para realizar BLAST de cada una de las secuencias obtenidas y poder identificar las cepas aisladas. En el caso de NCBI, se utilizó la opción “nucleotide BLAST”, optimizada para una función “megablast”. Para el análisis de las secuencias en Fungi DB, se utilizó la función “BLAST para secuencias genómicas”, usando como referencia toda la base de hongos en la biblioteca.

6.3 Evaluación de la actividad biológica de los cultivos.

Para la evaluación de la actividad biológica, se liofilizaron los medios de producción en donde se cultivaron los hongos. Se observó que en las dos temperaturas

probadas había crecimiento de los hongos: algunos conidiaban y los restantes no. Por ello, se realizaron dos procesos diferentes para la obtención de liofilizados.

Los hongos que condiaron fueron inoculados en placas de 60 mm con medio PDA complementado con jugo de verduras V8[®]. Se inocularon 20 μ L de los tubos de conservación de esporas y pasadas las 72 horas de crecimiento se levantaron las esporas con 5 mL de una solución de NaCl al 0.9% con 200 μ L de Tween 80. Con 4 mL del concentrado de esporas obtenido se inoculó el medio de producción, el cual consistía en 50 mL de caldo dextrosa y papa, complementado con jugo de verduras V8[®] en matraces de 250 mL. Pasadas las 72 horas de incubación a la temperatura correspondiente, con agitación de 200 rpm, se filtró el medio y se recolectaron 20 mL en tubos cónicos de 50 mL, los cuales se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron.

En el caso de los hongos que no conidiaban, se inocularon placas de 60 mm con medio PDA complementado con jugo de verduras V8[®] con 40 μ L de los tubos para conservar micelio. Después de 72 horas de crecimiento se levantó la biomasa con una solución de NaCl al 0.9% con 200 μ L de Tween 80 y se inocularon 4 mL de lo recuperado en matraces de 250 mL con caldo dextrosa y papa para la obtención de biomasa húmeda. Después de otras 72 horas, se filtró la biomasa y se pesó, para posteriormente inocular el medio de producción. Cada matraz de 250 mL (con el medio de producción, que fueron 50 mL de caldo dextrosa y papa) fue inoculado con 0.747 g de biomasa húmeda (debido a que fue lo mínimo de biomasa que produjeron todos los hongos por igual). Pasadas 72 horas, se filtró el medio, tomando 20 mL en tubos cónicos de 50 mL, para congelarlos con nitrógeno líquido y liofilizarlos.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana, se utilizaron tres bacterias de interés clínico: *Kocuria rhizophila* (Gram-positiva), *Listeria monocytogenes* (Gram-positiva) y *Salmonella spp* (Gram-negativa). Las pruebas se realizaron en placas de bioensayo, una por cada bacteria, cada placa con 220 mL de medio Agar Soya Tripticaseína (TSA). Una vez solidificado el medio, se esparcieron en cada placa 2

mL de cada bacteria ($DO_{600} = 0.1$, un aproximado de 1×10^8 unidades formadoras de colonias/mL) con un hisopo previamente esterilizado. Se dejaron pasar 15 min para que el inóculo quedara adherido al agar y poder colocar pequeños círculos de papel de filtro esterilizado, intercalados para la buena observación y medición de los posibles halos. Cada disco de papel filtro se humedeció con 20 μ L de extracto, en cuatro intervalos de 5 μ L para evitar el desborde de la muestra. Se utilizaron como control positivo dos antibióticos, gentamicina y penicilina a una concentración de 10 μ g/mL cada uno, y como control negativo se usó el medio de cultivo en el cual se incubaron los hongos para la obtención de los extractos, medio caldo dextrosa y papa complementado con jugo de verduras V8[®]. Una vez dispuestas las muestras, cada placa se mantuvo a 4 °C durante una hora para favorecer la difusión. A continuación, la placa con *Kocuria rhizophila* se incubó a 28°C, mientras que las de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* se incubaron a 30°C. Después de 20 horas se observaron halos definidos y un buen contraste entre el halo y el crecimiento bacteriano.

Posteriormente, se realizó un gel SDS-PAGE y un zimograma contra *Micrococcus lysodeikticus*, para analizar si la actividad antimicrobiana presente es debida a una proteína o a un metabolito secundario. En este experimento sólo se utilizaron aquellas muestras que presentaron actividad contra las tres bacterias (concretamente, las muestras G, J y K), las muestras -R, +R y Escarlata también presentaron actividad antimicrobiana, pero solo contra *Kocuria rhizophila*, razón por la cual, sus extractos no fueron utilizados para el experimento del zimograma, esto se decidió debido a que *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.* son bacterias altamente peligrosas, las cuales afectan diferentes sectores industriales y de la salud, por lo tanto, fue de prioridad tratar de identificar si la inhibición de su crecimiento era debida a una proteína proveniente de los extractos que mostraron la actividad antimicrobiana. Se siguió la metodología presentada por Hurtado (2019) y la preparación de cada una de las soluciones se encuentra en el Anexo 2. Se preparó el gel concentrador y el gel separador, para correr ambos geles, un SDS-PAGE y un zimograma por separado (con la diferencia de agregar 0.2% de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* en el gel de corrida del zimograma). Para

preparar el gel concentrador se utilizaron 5.7 mL de agua MilliQ, 1.7 mL de acrilamida, 2.5 mL de Tris-HCl, 100 μ L de SDS al 10%, 75 μ L de APS y 20 μ L de TEMED. Para el gel de corrida se utilizaron 3.4 mL de agua MilliQ, 4 mL de acrilamida, 2.5 mL de Tris-HCl, 100 μ L de SDS al 10%, 75 μ L de APS y 10 μ L de TEMED, y en el caso del zimograma, 0.2% de células. Se cargaron 35 μ L de los extractos mezclados con 15 μ L de buffer de carga (receta), como referencia se cargaron también 15 μ L de marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards más otros 15 μ L de Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range (Bio-Rad, California, E.U.A). El gel SDS-PAGE se corrió a 135 V, durante dos horas en cámara electroforética Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad, California, E.U.A.), para posteriormente teñir el gel con una solución de tinción Coomassie Blue durante 20 min con agitación moderada. Para el desteñido, el gel se dejó durante 24 horas en agua MilliQ con agitación moderada. Transcurrido ese tiempo, se visualizaron los resultados con el Molecular Imager Gel- Doc XR+ System (Bio-Rad, California, E.U.A), utilizando software Image Lab versión 5.1 con la placa Molecular Imager Gel Doc EZ system simple tray White (BIO-RAD), eligiendo la opción para proteínas con tinción de Coomassie. Para el zimograma, el gel se corrió de igual manera a 135 V durante dos horas. Transcurrido el tiempo, el gel se lavó con agua MilliQ dos veces, durante 30 min, se incubó con buffer de renaturalización (100 mM Tris-HCl, pH 8.0 con 1% v/v Triton X-100) a 37°C durante 12 horas y se tiñó con 0.01% de KOH y 0.1% de azul de metileno durante 15 min. Se destiñó con agua MilliQ con agitación y, para finalizar, se visualizó con el Molecular Imager Gel-Doc XR+ System (Bio-Rad, California, E.U.A), utilizando software Image Lab versión 5.1 con la placa Molecular Imager Gel Doc EZ system simple tray White (BIO-RAD).

6.4 Análisis de compuestos bioactivos por espectrometría de masas.

Los compuestos secretados por los hongos se concentraron por liofilización, lo que permitió su identificación gracias al Equipo de Masas de Ultra Alta Resolución con Resonancia en el Ciclotrón MRMS, en el Laboratorio de Posgrado e Investigación de Operaciones Unitarias de Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias

Extractivas (ESIQIE) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Se llevó a cabo un análisis no dirigido, para observar qué compuestos son los que están presentes en el liofilizado. Las muestras fueron tratadas para su correcta inyección en el espectrómetro de masas, tomando 500 μ L de los liofilizados resuspendidos con el agua que aún contenían las muestras, adicionándoles 500 μ L de solución metanol/agua (50/50) para centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos y posteriormente filtrarlas por membrana. Una vez preparadas todas las muestras, se inyectaron una por una (50 μ L) al equipo de espectrometría de masas con una jeringa Hamilton, a un caudal de 120 μ l/h por ESI positivo y negativo (4500 V, 2499.3 nA, capilar; -500 V, 32.025 nA, desplazamiento de la placa final) para tener una eficiencia óptima de ionización. Las condiciones para la obtención de los datos fueron: 42.99 m/z bajo, 3000 m/z alto, 100 escaneos promedio, 0.31 Accum (s) y resolución de 2 M. El gas fuente fue ajustado a: nebulizador a 1 bar, gas seco 8 L/min y temperatura seca de 180 °C. Finalmente, se leyeron las muestras ionizadas positiva y negativamente para su interpretación, utilizando el MS Software MetaboScape (BRUKER, Massachusetts, EUA).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Aislamiento de microorganismos.

Se observó crecimiento de hongos endófitos en todas las placas con material biológico cultivado. Del total, debido a las diferencias morfológicas que presentaban y su capacidad de reproducción en condiciones de laboratorio, se conservaron 20 endófitos diferentes. Los hongos endófitos que se incubaron a 28°C (Figura 3) mostraron un crecimiento más rápido, en comparación con los incubados a 24°C (Figura 4). Durante el proceso de obtención de cultivos axénicos, al ir realizando los pases, se fueron perdiendo cepas, probablemente debido a la ausencia de algún componente que le pueda brindar el vegetal hospedero. Esto se ha observado en diversos trabajos y puede deberse a que, como la planta es quien provee los nutrimentos y protección a los hongos endófitos, además de la enorme interacción que tienen estos organismos al ayudarse mutuamente, mantener las cepas de endófitos en condiciones de laboratorio resulta muy complicado (Abello y Kelemu, 2007). La utilización del jugo de verduras como un compuesto de enriquecimiento en los medios de cultivo mostró grandes resultados, ya que adicionar un néctar mixto de diversas verduras (como zanahoria, tomate y espinacas) permitió aportar nutrientes y vitaminas que ya no podrían conseguir de su interacción con la planta hospedera. Otro ejemplo de medio de cultivo adicionado para el crecimiento de endófitos fue el realizado por Galindo-Solís (2023), quien agregó extracto metanólico de la planta hospedera, lo que permitió que los endófitos pudieran mantenerse más tiempo en las placas con medio de cultivo. El inconveniente es que no prolonga mucho el tiempo de vida de los endófitos, como máximo una semana.

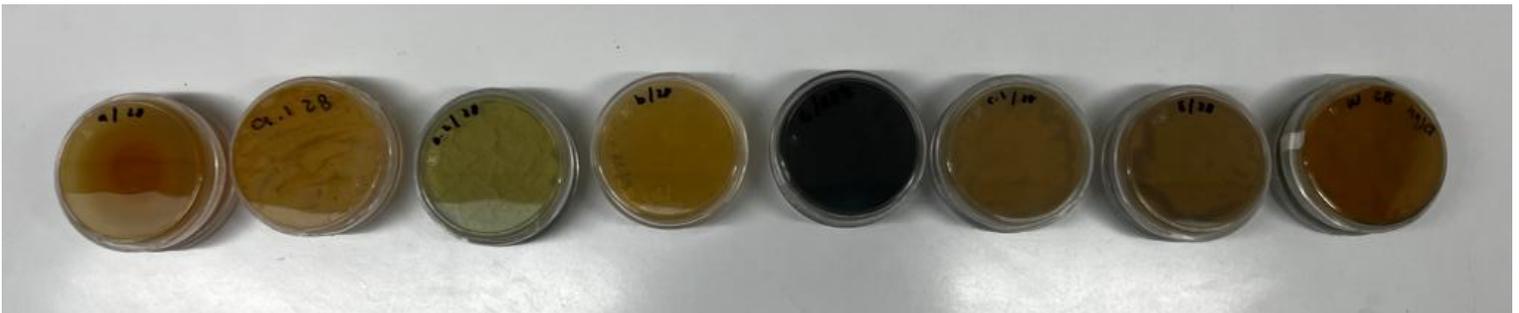
De las 20 cepas de hongos aisladas, ocho corresponden a hongos endófitos incubados a 28°C (cuatro de los cortes de hoja y cuatro de corteza) y doce a hongos endófitos incubados a 24°C (seis provenientes de hojas y seis de corteza). Se observaron algunos endófitos morfológicamente similares y que aparecen en ambas temperaturas de incubación, mientras que otros se encontraron en una sola condición. Las mejores condiciones en las que puede crecer y mantenerse vivo un hongo endófito probablemente son las que más se asemejen a las de su planta

hospedera. Existen hongos endófitos provenientes de zonas muy frías, como aquellos que viven en las raíces de las plantas antárticas, y les confieren una ventaja frente a condiciones estresantes. Fardella y colaboradores (2014) aislaron endófitos provenientes de las raíces de *Deschampsia antártica*, una planta vascular proveniente de la Antártida, los cuáles fueron incubados a temperaturas de entre 4 y 18°C. Dichos hongos fueron inoculados en *Puya berteroniana*, *Flourensia thurifera* y *Senna cumingi*, para ver si aportaban características de resistencia a bajas temperaturas en dichas plantas. Se vio una mayor resistencia a las condiciones adversas (entre un 75 y 100%) por parte de las plantas inoculadas con los endófitos, en comparación con las que solo fueron tratadas con agua.

El ejemplar de *Taxus* que albergaba las muestras usadas en el presente trabajo se desarrolla habitualmente en zonas templadas, con temperaturas de entre 15 y 35°C, lo que explica el haber podido cultivar los hongos endófitos a 24 y 28°C. De las dos, la temperatura superior permitió un mejor crecimiento de las cepas, algo que es relativamente común en la Naturaleza.

Para la conservación de las cepas de los endófitos se obtuvieron un total de 80 gliceroles, además de 40 cajas de Petri de 60 mm con medio PDA más jugo de verduras.

Figura 3. Hongos endófitos incubados a 28°C.





Cepa A



Cepa A.1



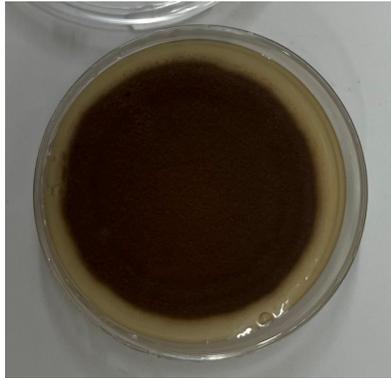
Cepa A.2



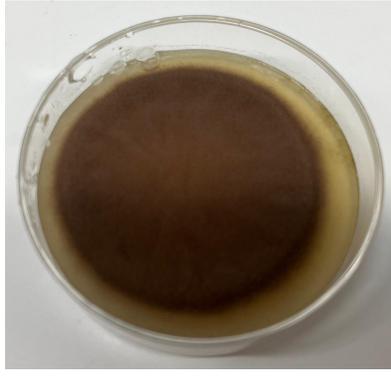
Cepa B



Cepa C



Cepa C.1

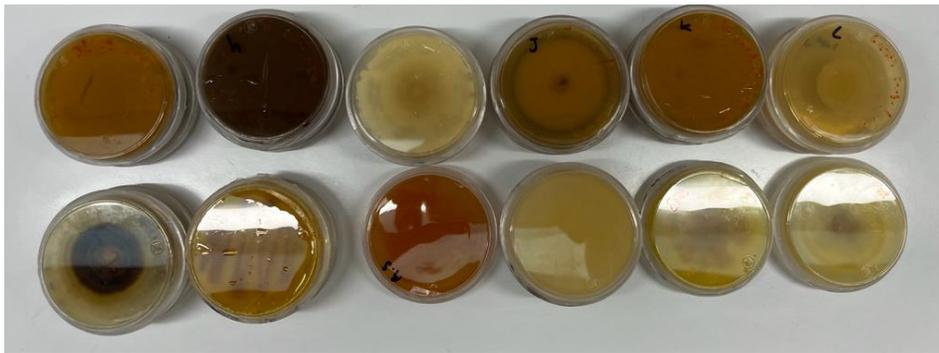


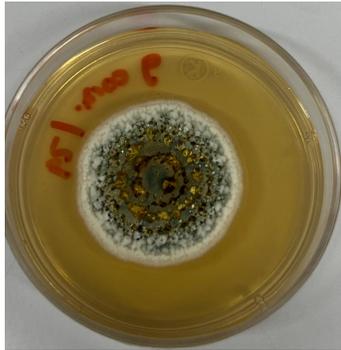
Cepa E



Cepa W

Figura 4, Hongos endófitos incubados a 24°C.





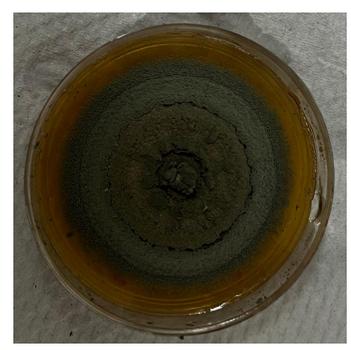
Ceba G



Ceba H



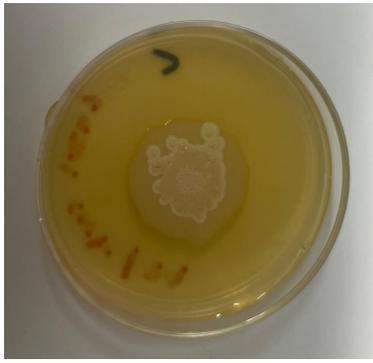
Ceba I



Ceba J



Ceba K



Ceba L



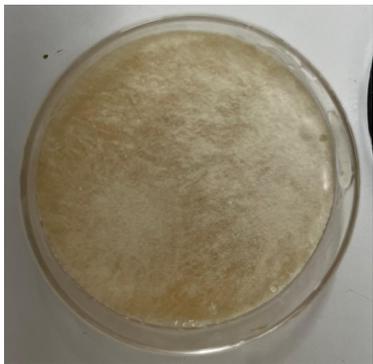
Ceba Ñ



Ceba -R



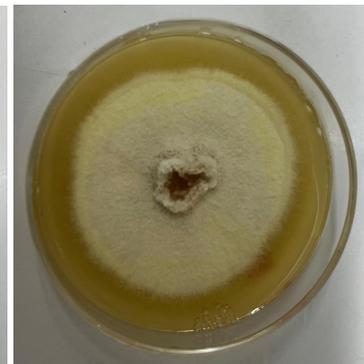
Ceba RS



Ceba +R



Ceba Esc



Ceba Alfa

7.2 Identificación de los hongos endófitos.

En cuanto a la identificación de las cepas, se obtuvieron 17 emparejamientos, los cuales corresponden a *Sarocladium ssp*, *Aspergillus fumigatus*, *Paraglomerus*, *Alternaria ssp*, *Umbelopsis ramanniana*, *Umbelopsis ssp*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Yarrowia lipolytica*, *Pseudogymnoascus*, *Cystobasidium slooffiae* y *Clonostachys rosea*, datos obtenidos gracias a los BLAST en NCBI y

FungiDB, con un porcentaje mayor a 95% con los oligos utilizados de las regiones de ITS fúngicas. Las secuencias obtenidas, que fueron comparadas con las bases de datos genómicas, se encuentran en el Anexo 3.

Muestra	Identificación	Score	Base de datos
		ITS (F + R)	
A	<i>Sarocladium ssp</i>	99.8	NCBI
A.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99.49	NCBI
B	<i>Paraglomus ssp</i>	88.35	NCBI
C	<i>Alternaria ssp</i>	99.4	NCBI
C.1	<i>Umbelopsis ramanniana</i>	97.5	NCBI
E	<i>Umbelopsis</i>	99.6	NCBI
K	<i>Penicillium expansum</i>	97.89	NCBI
G	<i>Penicillium digitatum</i>	243	FungiDB
J	<i>Penicillium expansum</i>	98.49	NCBI
W	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99.5	NCBI
Cruz roja (+R)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	98.88	NCBI
Alfa	<i>Clonostachys rosea</i>	97.23	NCBI
Ñ	<i>Pseudogymnoascus</i>	95.26	NCBI
I	<i>Clonostachys rosea</i>	97.83	NCBI
Raya roja (-R)	<i>Clonostachys rosea</i>	99.46	NCBI
Rosa (Rs)	<i>Cystobasidium slooffiae</i>	95.13	NCBI
Escarlata	<i>Clonostachys rosea</i>	97.55	NCBI

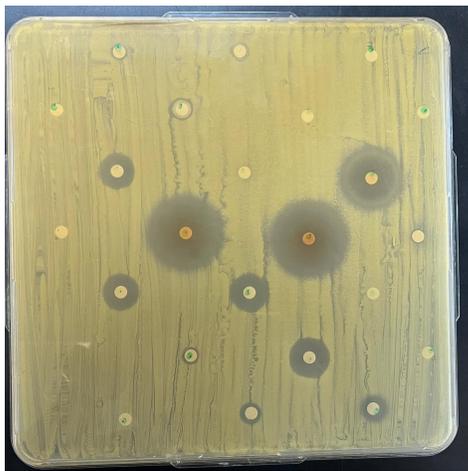
Tabla 1. Identificación de hongos endófitos.

7.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los cultivos

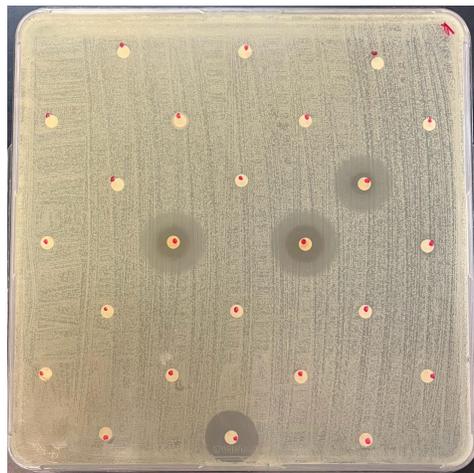
El ensayo contra *Kocuria rhizophila* permitió observar halos de inhibición producidos por siete muestras (Figura 5), con una media de diámetro de 26 mm para la muestra G, 18 mm para I, 40 mm para J, 39 mm para K, 18.5 mm para -R, 20 mm para ESC y 20.5 para Alfa (halos de inhibición de 13.5 mm para penicilina y 10.5 mm para

gentamicina, como controles positivos). Los halos que se pudieron observar en el ensayo contra *Listeria monocytogenes* fueron debidos a solo tres muestras: G produjo halos con un diámetro promedio de 27 mm, J de 27.5 mm y K de 27 mm (solo gentamicina mostró actividad en este caso, con una media de diámetro de halo de 25.5 mm). Por último, en el ensayo contra *Salmonella spp.* sólo se observaron halos de inhibición en esas mismas tres muestras: G con un promedio de diámetro de halo de 27 mm, J con 35.5 mm y K con 27.5 mm (de igual manera, solo gentamicina presentó actividad contra esta bacteria, con un promedio de halo de 25.5 mm de diámetro).

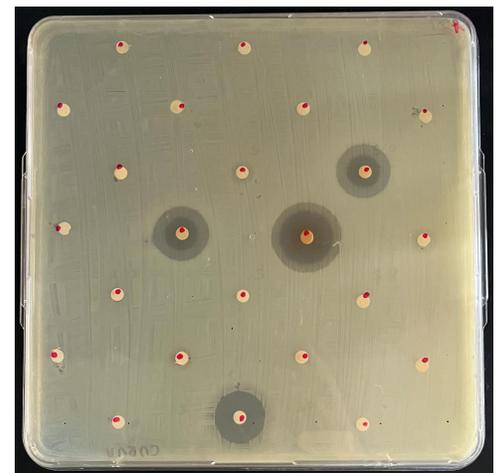
Figura 5. Placas de bioensayo para determinación de la actividad antimicrobiana.



Actividad antimicrobiana contra *Kocuria rhizophila*, muestras G, J, K, -R, +R, ESC



Actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, muestras G, J, K



Actividad antimicrobiana contra *Salmonella spp.*, muestras G, J, K

Las muestras que presentaron actividad contra las tres bacterias fueron las denominadas G, J y K. Después de concluir la identificación molecular, pudo observarse que las tres cepas pertenecen al género *Penicillium*. Se conoce que los hongos del género *Penicillium* son importantes productores de compuestos con actividad antimicrobiana (la penicilina es un buen ejemplo de ello). Kouipou-Toghueo y Fekam-Boyom (2020) publicaron una revisión bibliográfica sobre las aplicaciones de los hongos endófitos del género *Penicillium*, en donde destacan que

se han realizado varios trabajos experimentales con extractos de estos microorganismos y se analiza habitualmente su actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias. Extractos de endófitos aislados por Gashgari y colaboradores (2016), provenientes de plantas medicinales como *Alhagi graecorum*, *Cressa cretica* y *Citrullus colocynthis* presentaron una muy buena actividad contra *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Kuo y colaboradores (2021), por su parte, aislaron hongos endófitos provenientes de la planta medicinal *Zanthoxylum simulans*. A partir de esta planta hospedera, obtuvieron seis cepas de endófitos del género *Penicillium* y probaron sus extractos contra 11 bacterias (*E. coli*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus agalactiae*, *S. aureus*, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans*) para analizar la actividad antimicrobiana. Los extractos mostraron una mayor inhibición del crecimiento de las bacterias Gram-positivas, con un porcentaje del 56.52%, mientras que contra las bacterias Gram-negativas, solo hubo una actividad del 21.74%. Ababutain y colaboradores (2021) aislaron hongos endófitos de la planta *Artemisia sieberi* y lograron identificar a dos de sus cepas como *Penicillium chrysogenum*. Fueron evaluadas contra diferentes bacterias y la primera cepa, denominada “AS2”, presentó valores muy buenos en comparación al control positivo de ampicilina, inhibiendo a todas las bacterias (*Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. agalactiae* y *S. epidermis*).

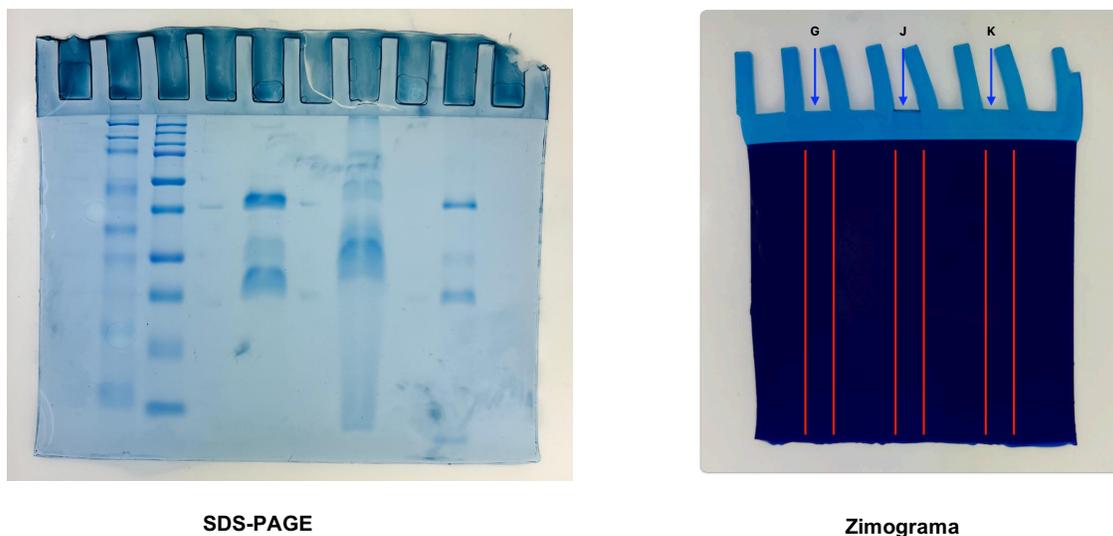
Existen, pues, diversos estudios en los que *Penicillium* ha sido probado contra diferentes bacterias de interés industrial y clínico. La novedad (y problemática a la vez) que se da en el presente proyecto es que las especies *P. expansum* y *P. digitatum* no han sido estudiadas principalmente como productoras de compuestos de interés, al ser hongos que afectan a cosechas. Por el contrario, suelen usarse en pruebas de antagonismos contra los hongos de interés. A ese respecto, Yeh y colaboradores (2021) evaluaron la eficacia inhibidora de *Nodulisporium sp.*, el cual fue aislado de las hojas de la planta medicinal *Peperomia dindygulensis*, contra *P. digitatum*. Se utilizaron nueve ingredientes: semillas de té, harina de soja, de

sésamo, granos de trigo, de avena, salvados de arroz y de avena, además de cáscaras de arroz y bagazo, en los que se probó la actividad fungicida y se observó que hubo un porcentaje de inhibición, en cada caso, mayor al 50%. Más en el contexto de nuestro trabajo, Atindehou y colaboradores (2020) evaluaron la posible actividad antimicrobiana de varias cepas de hongos, entre ellas *P. expansum*, contra cuatro bacterias (*S. aureus*, *Shigella sp.*, *E. coli* y *Salmonella sp.*), utilizando el método de cilindros de agar. Estos cilindros son de aproximadamente 7 mm de diámetro y en el centro se deposita cada cepa de los hongos de interés. Se colocan sobre la superficie de medios ya inoculados con cada bacteria, y las cajas se incuban a 37°C durante un tiempo de 24 a 72 horas. Después de las 24 horas se miden los halos de inhibición y se toma otra medición después de una semana. *P. expansum* demostró ser la mejor cepa que inhibía el crecimiento de las cuatro bacterias, teniendo en promedio un halo de más de 20 mm en todos los casos. Además, se pudo observar que en el caso de la prueba contra *S. aureus*, *P. expansum* activó a *Aspergillus nidulans* para que produjera compuestos con actividad antimicrobiana.

En el caso de las cepas que demostraron actividad sólo contra *K. rhizophila*, (que corresponden al endófito *Clonostachys rosea*) no hay apenas estudios realizados en su papel de organismos productores de compuestos bioactivos. Wang y colaboradores (2023) realizaron un estudio en el que prueban nuevos metabolitos producidos por *C. rosea*, aislado de cultivos de arroz, contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *C. albicans* y *Mycobacterium*. Las estructuras de los compuestos que se obtuvieron fueron analizadas mediante resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas de ionización por electropulverización y cromatografía de gases, identificando varias asperfenalenonas. En concreto, las F y H mostraron buena actividad inhibitoria contra *S. aureus* resistente a meticilina, además de presentar una baja citotoxicidad contra las células Jurkat (línea celular de linfocitos T inmovilizada), mientras que la asperfenalenona B mostró una actividad antiviral baja contra la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana.

Para analizar si la actividad antimicrobiana es dada por proteínas o por un metabolito secundario se realizaron geles de SDS-PAGE y zimograma de los extractos (Figura 6). Se obtuvieron resultados con los geles de proteína SDS-PAGE, lo cual indica que sí existen proteínas secretadas. Para los extractos de los hongos G y K, se observaron bandas con peso molecular de entre 37 y 50 kDa, bandas alrededor de 25 kDa y bandas entre 20 y 25 kDa. Para el extracto J se observaron bandas, una con peso molecular entre 75 y 50 kDa, otra entre 50 y 37 kDa y otra alrededor de 25 kDa, todo esto comparado contra la referencia dada por el marcador de marcador de peso molecular. En el zimograma no se observaron las bandas encontradas en el gel de SDS-PAGE, lo cual indicaría que la actividad antimicrobiana no es provocada por alguna de estas proteínas, sino a un metabolito secundario excretado por los hongos.

Figura 6. Gel SDS-PAGE y Zimograma contra *Micrococcus lysodeikticus*.



Existen pocos estudios sobre péptidos producidos por hongos endófitos con actividad antimicrobiana, como es el caso del publicado por Tejesvi y colaboradores en 2013. Cultivaron a *Fusarium tricinctum* en dos medios diferentes (caldo dextrosa y papa y medio FG4) a 26°C y 100 rpm durante siete días. Pasado el tiempo, concentraron el medio de cultivo diez veces y lo utilizaron para pruebas de actividad biológica. La actividad del compuesto trtesin se probó contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, mostrando buena

actividad inhibitoria contra *Staphylococcus carnosus*, *C. albicans* y *Candida utilis*, mientras que contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. pneumoniae* y *Bacillus subtilis* no hubo actividad. De igual manera, Liu y colaboradores (2012) aislaron hongos endófitos a partir de la planta medicinal china *Lilium lancifolium*. El endófito que utilizaron para el estudio fue identificado como *Fusarium oxysporum*, y su actividad antibacteriana fue probada contra *Leuconostoc mesenteroides*. El trabajo experimental consistió en realizar una superfiltración, encontrando las principales fracciones con actividad antibacteriana entre las masas moleculares de 35 y 60 kDa. Las fracciones de interés fueron parcialmente purificadas y al caracterizar su temperatura óptima mostraron conservar más del 80% de actividad durante una hora a 60°C y hasta 70-75% de actividad a 121°C durante 15 min. También se mostró un porcentaje de actividad de entre el 90 al 99% en rangos de pH de 4 a 7. Hay que destacar, como ocurre en nuestro trabajo, que *F. oxysporum* es también un importante hongo patógeno (causante de la enfermedad de Panamá en los bananeros y de más de un centenar de enfermedades en otras tantas especies vegetales). Independientemente de esto, produce metabolitos con actividad antimicrobiana que tienen una gran similitud con péptidos y representa un gran potencial de utilización con fines benéficos.

7.4 Análisis de compuestos bioactivos por espectrometría de masas.

Las matrices de compuestos encontrados tras la ionización positiva y negativa fueron procesadas con el MS Software MetaboScape (BRUKER, Massachusetts, E.U.A) contra dos bibliotecas de compuestos producidos por hongos. En el análisis de compuestos ionizados positivamente se encontraron poco más de 1500 compuestos (en los 20 extractos), mientras que en los ionizados de forma negativa se encontraron poco más de 670 compuestos. Estos datos fueron interpretados con ayuda de un código bioinformático en el paquete estadístico “R”, lo que permitió obtener un gráfico *heatmap* para la visualización e interpretación de los datos (Figuras 7 y 8).

Figura 7. Compuestos ionizados positivamente, con zoom en la parte donde se observa más intensidad.

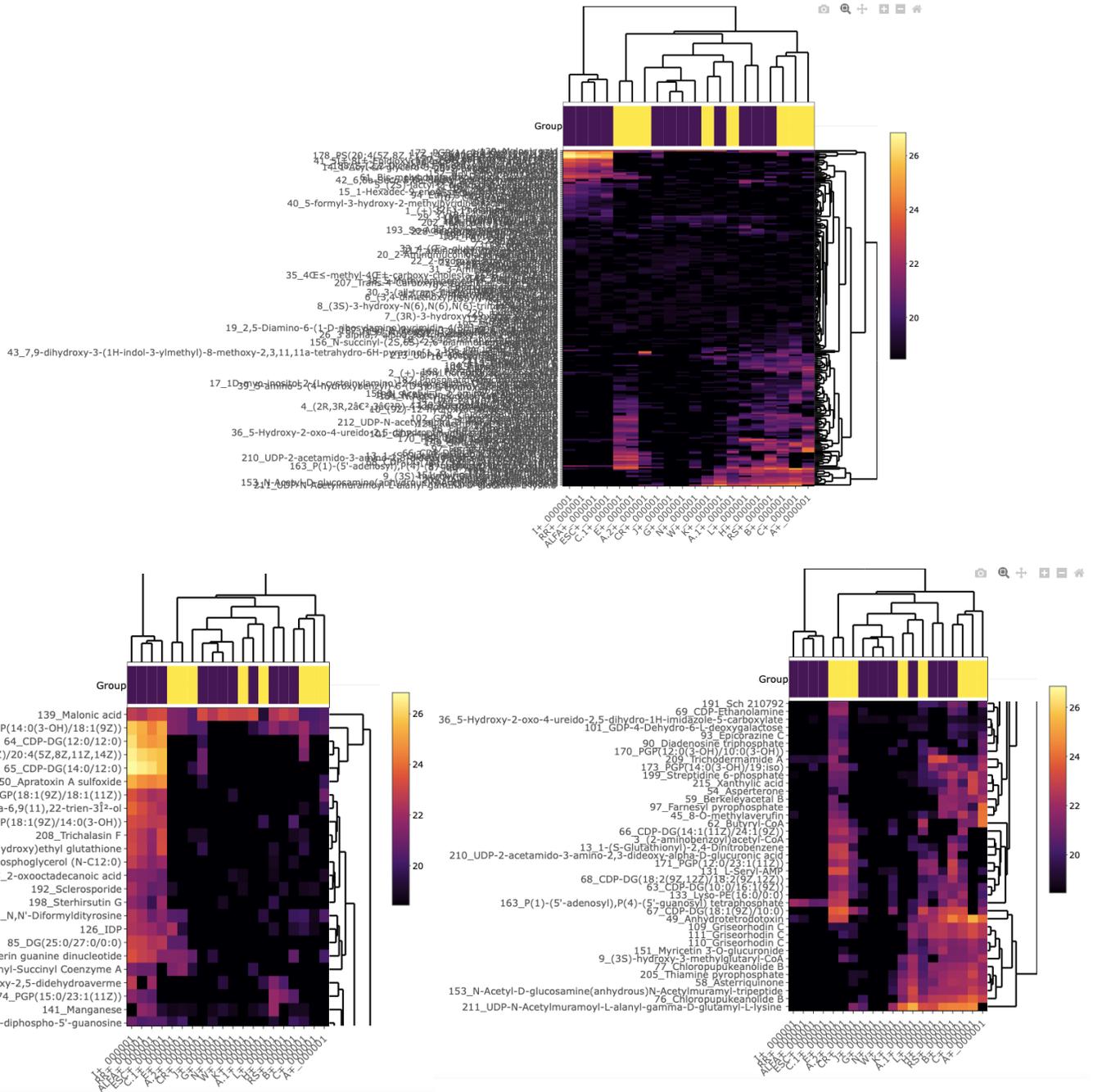
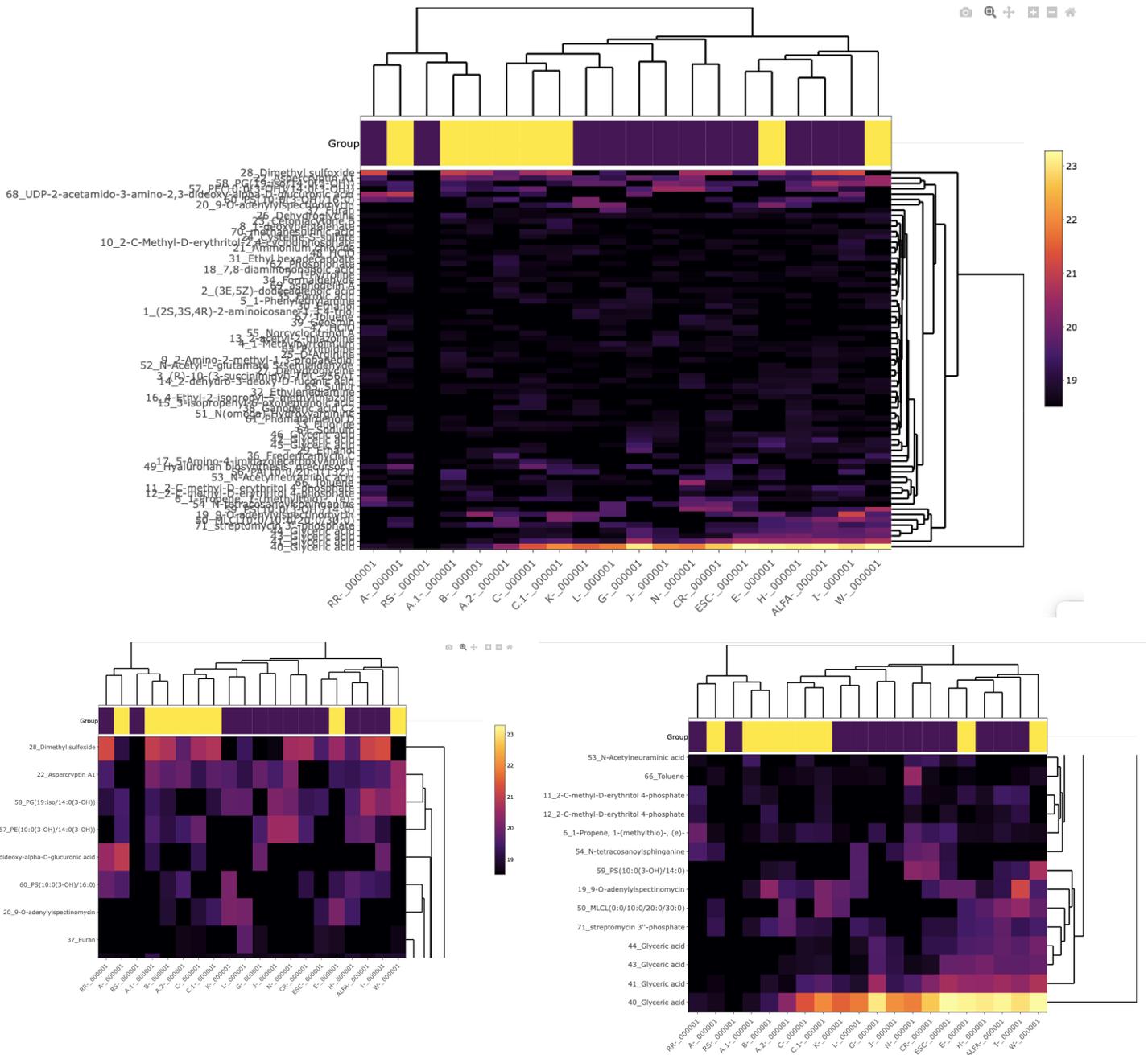


Figura 8. Compuestos ionizados negativamente, con zoom en la zona donde se observa más intensidad.



Al encontrarse demasiado compuestos, no es factible analizar uno por uno, por lo que se escogieron aquellos que tengan relevancia para actividades biológicas y/o aquellos que se encontraron en mayor concentración en las muestras. La asperjinona es un neolignano obtenido a partir de *Aspergillus terreus*, que en un estudio de Liao y colaboradores (2012) se descubrió que podía suprimir la expresión de los transportadores ABCG2, los cuales median la resistencia a diferentes

fármacos. Con esta molécula se podrían mejorar los tratamientos del cáncer de mama, por ejemplo. Otro compuesto encontrado es la arisugacina, compuesto aislado de extractos de *Penicillium*. Actúa como inhibidor de la acetilcolinesterasa y es un agente antimicrobiano. El ácido ganosporérico A es utilizado en investigación acerca del daño hepático, se extrae de las esporas de *Ganoderma lucidum*. También se pudo determinar la existencia de la bikaverina, la cual es un pigmento rojizo producido por hongos (generalmente por *Fusarium*), que presenta propiedades antimicrobianas contra protozoos y algunos otros hongos, además de presentar actividad antitumoral contra células cancerosas (Limón y col., 2010). La aspulvinona E es un metabolito que fue aislado a partir de *Aspergillus terreus*; se le ha dado uso como agente antiviral, además de ser un inhibidor de la alfa-glucosidasa (una enzima que participa en el catabolismo del glucógeno en los lisosomas). La apratoxina A es un agente antitumoral capaz de inhibir la vía secretora celular, previniendo la N-glicosilación y la traslocación de receptores asociados al cáncer (Thornburg y col., 2013). Khedr y colaboradores (2015) evaluaron la actividad antimicrobiana del estafilopéptido A, el cuál es un tetrapéptido cíclico obtenido de *Staphylococcus spp*. La evaluación de su bioactividad se realizó contra diferentes bacterias, pero solo mostró inhibir a *Trichophyton concentricum*. Otro compuesto identificado fue la estreptomycin 3"-fosfato, la cual es una molécula de estreptomycin, fosforilada mediante ATP en el hidroxilo 3". La estreptomycin es utilizada como antibiótico por su alta eficacia contra diversas bacterias, ya que se une al ribosoma y de esa forma crea desajustes codón-anticodón durante la traducción (Howart y col., 2023). La microcolina es producida principalmente por cianobacterias marinas, esta molécula presenta actividad citotóxica e inmunosupresora bastante buena, como es el ejemplo de la microcolina majusculamida D que presenta citotoxicidad alta contra líneas celulares de carcinoma pancreático (Yu y col., 2019). Las nicroforusamidas A y B son moléculas descubiertas a partir de *Microbacterium spp*. Shin y colaboradores (2017), evaluaron la actividad antimicrobiana de estos compuestos, mostrando que tenían buena eficacia contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Salmonella entérica*. (Fotos de los picos de masas en Anexo 4).

8. CONCLUSIONES

El aislamiento de los hongos endófitos nos permitió tener más y mejor conocimiento acerca de estos microorganismos, además de permitirnos conocer con más detalle las condiciones en las que se pueden cultivar en laboratorio y los metabolitos que producen. Las temperaturas que se eligieron para hacer crecer a los endófitos fueron favorables para su estudio y pudo observarse que la composición del medio y la humedad presente jugaron un papel crucial, buscándose igualar lo más posible las condiciones en las que estos microorganismos se encuentran coexistiendo con su hospedero. Probablemente, por esta misma razón puede explicarse el por qué el número de cepas para la identificación y análisis de actividades biológicas se redujo con respecto al número de cepas aisladas originalmente. De todas formas, se lograron identificar 17 hongos endófitos de 20 cepas aisladas.

Tras detectarse actividad antimicrobiana, se analizó en principio si ésta era debida a proteínas o a otros metabolitos, para lo que se realizó un gel de SDS-PAGE y un zimograma. Mientras que en el primero se pudo observar la existencia de proteínas excretadas, en el zimograma no se observó ningún rastro de actividad biológica, lo que permite concluir que la actividad antimicrobiana no es mediada por proteínas en estos casos.

El análisis de los compuestos producidos por espectrometría de masas ayudó al entendimiento del por qué algunos de los endófitos presentaron actividad antimicrobiana. Se identificó la presencia de muchos metabolitos secundarios. Aunque algunos no se producían en concentraciones significativas y otros no eran de gran interés, se detectaron varios compuestos de importancia biotecnológica, utilizados, entre otros, en la síntesis de antibióticos y como medicamentos para el tratamiento contra el cáncer, como lo fue la arisugacina, la bikaverina, la apratoxina A y el estafilopéptido A.

9. PERSPECTIVAS

Gracias a los resultados obtenidos en este trabajo experimental se abren nuevas puertas para continuar con la investigación de hongos endófitos:

- Realizar un estudio dirigido de los compuestos encontrados mediante espectrometría de masas: p. ej. Búsqueda de compuestos presentes en la síntesis de algún principio activo para el tratamiento de cáncer, agentes antimicrobianos, antifúngicos, o también moléculas de alto impacto en el sector agroindustrial, como lo son los pesticidas.
- Mejorar los medios de cultivo para el crecimiento o crear nuevos medios, variando los nutrientes, temperatura, la humedad, etc., para favorecer la preservación de hongos endófitos de nueva identificación.
- Hacer un estudio del metaboloma en cada nueva condición.
- Estudiar las proteínas encontradas para saber si pueden presentar alguna otra actividad biológica de interés (y en dado caso, conocer si es viable poder escalarlo a nivel de producto industrial).
- Analizar mediante zimograma los extractos de *Clonostachys rosea*, ya que también presentaron actividad antimicrobiana contra *Kocuria rhizophila*.
- Realizar la identificación de un mayor número de hongos endófitos.
- Realizar un metagenoma de la planta completa, para no depender de la etapa del aislamiento, altamente restrictiva.

10. REFERENCIAS

1. Ababutain, I. M., Aldosary, S. K., Aljuraifani, A. A., Alghamdi, A. I., Alabdallal, A. H., Al-Khaldi, E. M., Aldakeel, S. A., Almandil, N. B., AbdulAzeez, S. y Borgio, J. F. (2021). Identification and antibacterial characterization of endophytic fungi from *Artemisia sieberi*. *International Journal of Microbiology*, 6651020. <https://doi.org/10.1155/2021/6651020>
2. Abdel-Azeem, A.M., Zaki-Sherif, M., Khalil-Waleed, F., Makhoulouf-Noha, A. y Farghaly-Lamiaa, M. (2016). Anti-rheumatoid activity of secondary metabolites produced by endophytic *Chaetomium globosum*. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01477>
3. Abello, J.F., & Kelemu, S. (2007). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7 (2): 55–57. https://doi.org/10.21930/rcta.vol7_num2_art:70
4. Adhikari, K., Niraula, D. y Shrestha, J. (2020). Use of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) as a biopesticide in agriculture: A review. *Journal of Agriculture and Applied Biology*, 1 (2): 100-117. <https://doi.org/10.11594/66lo.01.02.08>
5. Altier, D.J., Ellanskaya, I., Gilliam, J.T., Hunter-Cevera, J., Presnail, J.K., Schepers, E., Simmons, C.R., Torok, T. y Yalpani, N. (2009) Antifungal polypeptides. US Patent US-7589176-B2, 1-47.
6. Aragón, S. (2017). La importancia de los hongos endófitos en la modulación de las interacciones planta-insecto. Entomología de impacto. Universidad El Bosque.
7. Aragón, S. y Beltrán-Acosta, C. (2018). Los hongos endófitos en el control biológico de fitopatógenos e insectos plaga. Capítulo 19, pp. 850-877. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia).
8. Atindehou, M.M., Adjovi, Y.C.S., Dagbozounkou, G M. y Fanou, L.A. (2020). Identification and characterization of the antibacterial activity of fungal metabolites on contaminants responsible for foodborne diseases. *American*

Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS), 64 (1): 28-42.

9. Bamisile, B.S., Dash, C.K., Akutse, K.S., Keppanan, R. y Wang, L. (2018). Fungal endophytes: Beyond herbivore management. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00544>
10. Bano, N., Rizvi, I., Sharma, N., Mohd, H., Mohd, K., Khan, A. y Akhtar, S. (2016). Production of bioactive secondary metabolites from endophytic fungi. *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)* 3 (6): 1859-1866.
11. Barni, S. y Cantone, A. (2022). Biocontrol de *Macrophomina phaseolina*, agente causal de la podredumbre carbonosa de la soja, con endófitos fúngicos. Informe de trabajo final de carrera. Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
12. Bell, D.K., Wells, H.D. y Markham, C.R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
13. Bezerra, J.D.P., Santos, M.G., Barbosa, R.N., Svedese, V.M., Lima, D.M., Fernandes, M.J.S., Gomes, B.S., Paiva, L.M. y Souza-Motta, C.M. (2013). Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: A first study. *Symbiosis*, 60 (2): 53-63. <https://doi.org/10.1007/s13199-013-0243-1>
14. Camacho-Luna, V., Rodríguez-Hernández, A., Rodríguez-Monroy, M., Norma, R. y Sepúlveda-Jiménez, G. (2022). Identificación de hongos endófitos de *Ageratina pichinchensis* con actividad antagónica contra fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 13 (6) 1027:1040. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i6.3030>
15. Camarena-Pozos, D. A., Flores-Núñez, V. M., López, M. G. y Partida-Martínez, L. P. (2021). Fungal volatiles emitted by members of the microbiome of desert plants are diverse and capable of promoting plant growth. *Environmental Microbiology*, 23 (4): 2215-2229. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15395>

16. Cardona, M., Osorio, J. y Quintero, J. (2009). Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquía*, 48: 27-37.
17. Centelles, J. e Imperial, S. (2010). Paclitaxel. Descubrimiento, propiedades y uso clínico. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 29 (4): 68-75.
18. Cerón-Moreno, María F. (2020). Caracterización de la función de la proteína PcSNT y su papel en la vía de señalización celular mediada por proteínas G heterotriméricas en *Penicillium chrysogenum*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
19. Cruz-Miranda, O. (2020). Aislamiento de hongos endófitos de *Phlegmariurus taxifolius* productores de huperzina A. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
20. Depetris, M. (2021). Diversidad de hongos endófitos en *Paspalum*, su efecto sobre los patógenos fúngicos y el comportamiento agronómico de la planta. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
21. Duplat-Torres, D. (2019). Búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana producidos por hongos endófitos del frailejón plateado (*Espeletia argentea*) en el páramo de Cruz Verde, Cundinamarca. Tesis de Pregrado en Microbiología. Universidad de los Andes, Colombia.
22. Fardella, C., Oses, R., Torres-Díaz, C. y Molina-Montenegro, M. (2014). Hongos endófitos antárticos como herramienta para la reintroducción de especies nativas en zonas áridas. *Bosque (Valdivia)* 35 (2): 235-239. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002014000200011>
23. Fonseca-García, C., Desgarenes, D., Flores-Núñez, V. M. y Partida-Martínez, L. P. (2018). "Chapter 12-The microbiome of desert CAM plants: lessons from amplicon sequencing and metagenomics," *Metagenomics*. 231-254. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00012-4>
24. Galindo-Solís, J. (2023). Hongos endófitos de plantas medicinales: búsqueda de taxol fúngico y compuestos bioactivos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México.

25. Galindo-Solís JM, Fernández FJ. (2022). Endophytic fungal terpenoids: Natural role and bioactivities. *Microorganisms* 10 (2): 339. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020339>
26. García-Latorre, N. (2017). Determinación de la actividad fungicida, bactericida y antioxidante de metabolitos secundarios extraídos de hongos endófitos. Tesis de Maestría. Universidad de Extremadura, España.
27. García-Latorre, C. (2022). Hongos endófitos en sistemas agroforestales. Evaluación de sus metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, antioxidante y reguladora del crecimiento vegetal. Tesis de Doctorado. Universidad de Extremadura, España.
28. Gardes, M. y Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2 (2): 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
29. Gashgari R., Gherbawy Y., Ameen F., Alsharari S. (2016) Molecular characterization and analysis of antimicrobial activity of endophytic fungi from medicinal plants in Saudi Arabia. *Jundishapur Journal of Microbiology* 9 (1): e26157. <https://doi.org/10.5812/jjm.26157>
30. González-Díaz, A. (2015). Aislamiento e identificación de hongos endófitos de la especie *Piper aduncum* (Piperaceae) y su actividad bactericida antagónica frente a distintas cepas microbianas. Trabajo de grado. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
31. Gupta, P., Verma, A., Rai, N., Kumar-Singh, A., Kumar-Singh, S., Kumar, B., Kumar, R. y 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 <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00581>
32. Howarth, RE., Pattillo, CM., Griffiths, JS., Calvopina-Chavez, DG. (2023). Three genes controlling streptomycin susceptibility in *Agrobacterium fabrum*. *J Bacteriol* 205:e00165-23. <https://doi.org/10.1128/jb.00165-23>

33. Hurtado, J. (2019). Identificación y caracterización parcial de proteínas con actividad antimicrobiana producidas por *Lactobacillus paraplantarum* aislada de un producto cárnico. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
34. INEGI (2023)
https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_Cancer.pdf
35. Khedr, A., Mohamed, G., Orabi, M., Igrahim, S. y Yamada, K. (2015). Staphylopeptide A, a new cyclic tetrapeptide from culture broth of *Staphylococcus* sp. *Phytochemistry Letters*, 13: 11-14.
<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.05.007>
36. Kouipou-Toghueo, R. y Fekam-Boyom, F. (2020). Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *3 Biotech* 10, 107. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2081-1>
37. Kuo, J., Chang, C.F. & Chi, W.C. (2021). Isolation of endophytic fungi with antimicrobial activity from medicinal plant *Zanthoxylum simulans* Hance. *Folia Microbiologica* 66: 385-397. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00854-4>
38. Liao, WY., Shen, CN., Lin, LH., Yang, YL., Han, HY., Chen, JW., Kuo, SC., Wu, SH., Liaw, CC. (2012). Asperjinone, a nor-neolignan, and 70lobose, a suppressor of ABCG2-expressing breast cancer cells, from thermophilic *Aspergillus terreus*. *Journal of Natural Products* 75 (4): 630-635.
<https://doi.org/10.1021/np200866z>
39. Liang, H., Xing, Y., Chen, J., Zhang, D., Guo, S. y Wang, C. (2012). Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon 70lobose70a* (Liliaceae). *BMC Complementary Medicine and Therapies* 12, 238. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-238>
40. Limón, M.C., Rodríguez-Ortiz, R. y Avalos, J. (2010). Bikaverin production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (1): 21-29.
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2551-1>
41. Liu, X. L., Huang, K. H., J.Z. Zhou, L. Meng, Y. Wang, L.X. Zhang, Identification and antibacterial characteristics of an endophytic

fungus *Fusarium oxysporum* from *Lilium lancifolium*, *Letters in Applied Microbiology*, Volume 55, Issue 6, 1 December 2012, Pages 399–406
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03306.x>

42. Malhadas, C., Malheiro, R. y Pereira, J.A. (2017). Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: 46. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2216-7>
43. Mosquera, W., Criado, L. y Guerra, B. (2020). Antimicrobial activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Mammea 71lobose71a* (Calophyllaceae) and *Moringa oleifera* (Moringaceae). *Biomédica* 40 (1): 4644. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4644>
44. Navarro-de-la-Fuente, L., Salinas-Castro, A. y Trigos, A. (2022). Hongos endófitos aislados de *Manilkara zapota* y su actividad antibacteriana y antifúngica. *Scientia Fungorum* 53: 1407. <https://doi.org/10.33885/sf.2022.53.1407>
45. Nelson, J.M., Hauser, D.A., Hinson, R. y Shaw, A.J. (2018). A novel experimental system using the liverwort *Marchantia polymorpha* and its fungal endophytes reveals diverse and context-dependent effects. *New Phytologist* 218 (3): 1217-1232. <https://doi.org/10.1111/nph.15012>
46. Organización Mundial de la Salud. (2021). Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
47. Palanichamy, P., Krishnamoorthy, G., Kannan, S. y Marudhamuthu, M. (2018). Bioactive potential of secondary metabolites derived from medicinal plant endophytes. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 5 (4): 303-312. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2018.07.002>
48. Pincay, A., Noboa, M., Viera, W., Herrera, K., León, A. y Jackson, T. (2020). Evaluación *in vitro* del potencial antagonista de *Trichoderma* sp. Y hongos endófitos de mora (*Rubus glaucus* Benth) para el control de *Botrytis cinerea*. *Journal of Science and Research* 6 (1): 109-124.
49. Pinheiro da Costa, S., Schuenck-Rodrigues, R., da Silva-Cardoso, V., Sacramento-Valverde, S., Beatriz-Vermelho, A. y Ricci-Júnior, E. (2021).

- Actividad antimicrobiana de hongos endofíticos aislados de *Brugmansia suaveolens* Bercht. & J. Presl. *Research, Society and Development* 10 (14): e113101421646. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i14.21646>
50. Ratnaweera, P.B., de Silva, E.D., Williams, D.E. y Andersen, R.J. (2015). Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15: 220. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0722-4>
51. Ribeiro, B.A., da Mata, T.B., Canuto, G.A.B. y Silva E.O. (2021). Chemical diversity of secondary metabolites produced by Brazilian endophytic fungi. *Current Microbiology* 78: 33-54. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02264-0>
52. Rodrigues, K., Hesse, M. y Werner, C. (2000). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology* 40 (4): 261-267. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200008\)40:4<261::AID-JOBM261>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200008)40:4<261::AID-JOBM261>3.0.CO;2-D)
53. Rodríguez-Mendoza, C., Hernández, L., Pérez-Armendáriz, B. y Juárez, Z. (2021). Bacterias y hongos endófitos de la familia Cactaceae y sus aplicaciones. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 24: 1-14328. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.328>
54. Rosado-Muñoz, M. (2022). Potencial bioplaguicida de hongos endófitos aislados de *Bethencourtia palmensis*. Trabajo de fin de grado. Universidad Europea, España.
55. Sánchez-Fernández, R., Sánchez-Ortiz, B., Sandoval-Espinosa, Y., Ulloa-Benítez, A., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. y Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 16 (2):132-146. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
56. Sánchez-Ortiz, B. (2016). Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae)

útiles en agricultura. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

57. Saravanakumar K, Sriram B, Sathiyaseelan A, Hu, X., Mariadoss, A.V.A., MubarakAli, D., Wang, M.-H. (2021). Molecular identification, volatile metabolites profiling, and bioactivities of an indigenous endophytic fungus (*Diaporthe* sp.). *Process Biochemistry* 102: 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.12.002>
58. Secretaría de Salud. (2023). De la página web En México, más de 30 millones de personas padecen hipertensión arterial: Secretaría de Salud (<https://www.gob.mx/salud/articulos/en-mexico-mas-de-30-millones-de-personas-padecen-hipertension-arterial-secretaria-de-salud>). Descargado el 20 de septiembre de 2024.
59. Shin, Y., Bae, S., Sim, J., Hur, J., Jo, S., Shin, J., Suh, J., Oh, K., Oh, D. (2017). Nicrophorusamides A and B, Antibacterial Chlorinated Cyclic Peptides from a Gut Bacterium of the Carrion Beetle *Nicrophorus concolor*. *Journal of Natural Products*.
60. Silva-Hughes, A. F., Wedge, D. E., Cantrell, C. L., Carvalho, C. R., Pan, Z., Moraes, R. M., Madoxx, V. L. y Rosa, L. H. (2015). Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological Research*, 175: 67-77. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.007>
61. Silva-Quintigüiña, P. (2020). Diversidad de hongos endófitos en la Cueva de “Los Tayos” (Morona Santiago; Ecuador). Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica, Ecuador.
62. Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. y Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67 (2): 257-268. <https://doi.org/10.1021/np030397v>
63. Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M. B., Sasse, F., Jansen, R., Murali, T. S. (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews* 23 (1-2): 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.07.001>

64. Tejesvi, M., Kukkundoor, R., Harishchandra, S., Ven, S. y Hunthrike, S. (2008). Antioxidant, antihypertensive, and antibacterial properties of endophytic *Pestalotiopsis* species from medicinal plants. *Canadian Journal of Microbiology* 54 (9): 769-780. <https://doi.org/10.1139/W08-070>
65. Tejesvi, M.V., Segura, D.R., Schnorr, K.M., Sandvang, D., Mattila, S., Olsen, P.B., Neve, S., Kruse, T., Kristensen, H.H. y Pirttilä, A.M. (2013). An antimicrobial peptide from endophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity* 60 (1): 153-159. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0227-8>
66. Temiño García, R. (2020). Hongos endófitos productores de taxol. Trabajo de fin de grado. Universidad de La Laguna, España.
67. Thomas, P. (2019). *Taxus Globosa*, de la página web Threatened Conifers of The World (<https://threatenedconifers.rbge.org.uk/conifers/taxus-globosa>). Descargado el 20 de septiembre de 2024.
68. Thornburg, C.C., Cowley, E.S., Sikorska, J., Shaala, L.A., Ishmael, J.E., Youssef, D.T. y McPhail, K.L. (2013). Apratoxin H and apratoxin A sulfoxide from the Red Sea cyanobacterium *Moorea producens*. *Journal of Natural Products* 76 (9):1781-1788. <https://doi.org/10.1021/np4004992>
69. Trujillo-Ortigoza, K. (2022). Evaluación de actividad antimicrobiana asociada a endófitos fúngicos de *Fernandezia lanceolata* ubicada en la Reserva Natural El Encenillo contra *Colletotrichum* sp. Y *Fusarium* sp. Trabajo de fin de grado. Universidad de los Andes. Colombia.
70. Wang, L., Kiffe-Delf, A., Ostermann, P., Simons, V., He, D., Gao, Y., van Geelen, L., Dai, H., Zhao, Y., Schaal, H., Mándi, A., Király, S., Kurtán, T., Liu, Z. y Kalscheuer, R. (2023). Asperphenalenones isolated from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 71 (29): 11056-11068. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00447>
71. Yeh, C., Wang, C., Chen, Y., Tsai, S. y Chung, W. (2021). Potential of a volatile-producing endophytic fungus *Nodulisporium* sp. PDL-005 for the

control of *Penicillium digitatum*. *Biological Control* 152: 104459.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104459>

72. Yu, H., Glukhov, E., Li, Y., Iwasaki, A., Gerwick, L., Dorrestein, P., Jiao, B y Gerwick, W. (2019). Cytotoxic Microcolin Lipopeptides from the Marine Cyanobacterium *Moorea producens*. *Journal of Natural Products*.
73. Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X. y Gao, X. (2011). Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 11 (2): 159-168.
<https://doi.org/10.2174/138955711794519492>

ANEXO 1

Tabla 2. Secuencias de cebadores.

Nombre del cebador	Secuencia 5' – 3'
ITS 4	tctccgcttattgatatgc
ITS 5	ggaagtaaaagtcgtaacaagg
EF-1 α _F	catcgagaagtgcgagaagg
EF-1 α _R	tactgaaggaacccttacc

ANEXO 2

Soluciones para geles de proteínas

SDS al 10%

0.5 g de SDS y 5 mL de H₂O MilliQ estéril.

Buffer separador

Tris 1.5 M y llevar a pH 8.8 con Hcl (para 100 mL, se pesa 18.17 g de Tris-base).

Buffer concentrador

Tris 0.5 M y llevar a pH 6.8 con Hcl (para 100 mL, se pesa 6.057 g de Tris-base).

Buffer de muestra

3.55 mL de H₂O MilliQ estéril

2.5 mL de Glicerol

2 mL de SDS 10%

1.25 mL de Tris-Hcl pH 6.8

0.2 mL de Azul de Bromofenol 1%

Buffer de corrida pH 8.3 10X – 1 L

30.3 g de Tris-base

144 g de Glicina

10 g de SDS

APS al 10%

100 mg de Persulfato de Amonio para un mL de agua MilliQ estéril

ANEXO 3

Secuencias obtenidas.

>Cepa A

ITS 1

CAGTGGCCTAAGGCTCTCCACCCATTGTGAACTTACCAAACGTTCCCTCGGCGGGCTCAGCGCGGGTGGCCT
CCGGCCCTCCGGGCGTCCGCCGGGGAAAACCAAACCTGATTTAATCGTATTTCTCTGAGGGGCGAAAGCCCG
AAAACAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCGGCACTCC
GGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCTCAGGCCACCCCTTCCGGGGGAGCGGGCCTGGTGCTGGG
GATCGGCGGCCCTCGCGGCCCCCGTCCCTCAAATACAGTGGCGGTTCGCGCCGAGCCTCCCTGCGTAGTAGC
ACAACCTCGCACCGGAGAGCGGAACGACCACGCCGTGAAACCCCAATTTTTTAAGGTTGACCTCGGATCAGG
TAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAGCGGGAGAGGA

ITS4

CCCCTGGATCCGAGGTCAACCTTAAAAAATTGGGGGTTTACGGCGTGGTTCGTTCCGCTCTCCGGTGCAGGT
TGTGCTACTACGCAGGGGAGGCTGCGGCGCGACCCGACTGTATTTGAGGGACGGGGGCCGCGAGGGCCGCCG
ATCCCCAGCACCAGGCCCGCTCCCCCGGAAGGGTGGGCCTGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCC
GCCGGAGTGCCGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTT
ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTGT
TTTTGGGCTTTTCGCCCTCAGAGAAATACGATTAATCAGGGTTTGGTTTTCCCGGGCGGACGCCCGGAGGCC
CGGAGGCCACCGCGCGCTGAGCCCGCCGAGGGAACGTTTGGTAAGTTTACAATGGGTTGGAGAGCCTAGGGCA
CTCTGGTAATGATCCCTCCGATTACCCCTCAGGGAAACG

>Cepa A.2

ITS 4

AGGGGGATCCTACCTGATCGAGGTACCTTAGAAAAATAAAGTTGGGTGTCGGCTGGCGCCGGCCGGGCGCTAC
AGAGCAGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCCGGCCCGTCCCC
GGGAGAGGGGGACGGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCC
CCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTA
TCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTACGAT
AATCAACTCAGACTGCATACTTTTCAAGACAGCGTTTCATGTTGGGGTCTTTCGGCGGGCGGGGCCCGGGGCGC
AAGGCCTCCCCGGCGGCCGTCGAAACGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAGGTACGATAGACACGGGTGGGAGGT
TGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGAAACCTTGTACGACTTTTA
CTATCCAAAAAAGGGCCACAGAGGTGGGACAAATGAACGCTGTAGCGATTACGCTGTTCCACGAGGAAGTGA
TGAATCGTAAGAAGAATCGGGTTGAGAAGACGTAACGCGCCGAGAGTGTGGGGTTTCGTAACCCCGCGATGTGG
AGTAAGTGAGACAAGCCCATGATGTATAGGATGAGGGCAGGGTAACGAATATTAAGGAAGTGGGGGCGTTAAT
AGTGAGAGAATGTAGAAAAAATGAGAGGATGGAGGATTGGTCTTGCTGTGGGGGTACAAGATTATGGGGGGGG
GGGGTCCCAACCCGCTGCCGAAGGTTGGTTGGTGCAGGGGAGGTCGTAAAATGGATACGTCCGCAACTGAT
ATGTATCGTGGTAGGCTTGTGTGGGGAGAGGTGTTAGGGCTACGATGATGATTCAACGGGGAGGAGTGATGTC
CAGTTCTTCTTCTCGATTGGCGCGTTTTGGGTTCGCGTCCGGAGAGAAAGAGACTTGTGATGAGAAGGAAACAG
ATTGCTTGAGTTGGTGATGGGACCGAGGTGAGTTGGGTGCGGGAATTGGTGTGAGCGTTGGAATCGGGGTCCA
GGACGCGGGCTGGATGT

ITS 5

GCCGTATAGGTTGGACTGCGGGAAGGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGT
CTATCGTACCTTGTGTGCTTCCGGCGGGCCCGCGTTTTCGACGGCCCGGGGAGGCCTTGCGCCCCCGGGCCCG
CGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCC
GAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCGGGGACGGGCCCGAAA
TGTTGCGGTGAAACCGCTCCGGTCTCATTGTATGGGACATAGTCACCTGCTCTGTAGCCGGACGGCGCTGC

CACAGCAGTTTATTTTGAAGGATGACCTCGGATCGGGAAGGGACACGCTGAGTTAGCAAACAATCGCGGAAGA
AAGAGTCCTTGAGATGAGGTGTACAGGGAAGAAGAGAGTGTAGTAGAGGGCATGTGCGCGAGTGGGAGTAGGA
AAGGGTTGCGACAAAAAGAAAGGCGTCTGAAGTGATGGGAGTAGAACCGTAGCGTGTGTGCGGATCAATAATGG
AAGCGTAGTGAGAGAGGAGTGTGAGAGGAGTGGGACTTGCGAGGCGTATGACAGTGGTGACACCGCGAGAGAG
AAGGACAGATGTAGAGAGAACGTTGTGCGGAAGAGTAATAGTGAGTGGGTGCGGAAGAATCATAGAGTTGTTAGC
TGAGATGGGATGAGAGTAGAGCGCTGTAGGGGTCCGTAGCTGTGTTTGG

>Cepa B

ITS 4

GGATTGGGGAACCTTGCTGAATTGAGGGGGCAAGTAAAAAGAGAGTATTGACAGAAAAAGCTGGAGGTAGGT
GTTGCAGGACGAGCATTAAAGAACAACCTTACAGGATCTACACAATAGTATCTACACAATCTCGCTCCACCTTT
GCTTAAACTCAAGTGGACTCAATTCATTTCAAGCGGAGCTAGGAGTTGTGCGCCATCATTTCACCCGCTCAA
CGGGAGACGACAACGAGCGTTACCGGGGGTCCGCAAAAGCTGGGTTCAAATACTCAATGATTTCGAAAACCTGAG
CAGGTACGCCAGTTTTTCGGACTTGACA

>Cepa C

ITS 1

TAGGGGCGGGGCTGGGACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCCTTGTCTTTTTCGCTACTTCT
TGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAACA
AATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAGTGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCT
GGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGACTCTCTATCA
GCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCT
AAGCATATCTAAACCGGGAGAGAGAA

ITS 4

AGGTCAAAAGTTGAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGGGACTTGTGCTGCGCTC
CGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAACAC
CAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCG
TTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAA
GGTTTATGTTGCTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGGGTGAATAA
TTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGCAGCCACC
CCTCTACACGAAAA

>Cepa C.1

ITS 1

ACCGTTGAAATAAGGGGTTGCTCGGGCTAATCTGCCATGCCTCTGTGAGCCCGTACAGCTCGACAGGGGACC
CCTCCCTTGACCTTGTGACAATTCCTTCTGGGACTTTCCCGGGTTGGGCCAGGCGCACTCGCCCCACATGGC
CTGGTCGGGCGTTACGATTGCACCGAAGATGGCTGGGTGCTGAAGTGCATGGTTTTAAGTGCATCTGCCCTG
TCTCTGGTTTTCGGGCTGGGCAATGCCTTTACGTTAGATGTACCAAGCGTGCTATTTTCCGCTCTCTTCTTT
TCCGCTGTGGAACCGTGAATTAAGCTTCGTTTCTGACGCTGAGTTGAGGACCAAACGCCTATATCTGTCATC
CTGTTGGGTTAAGGGGTAAGGAAACATTAAGTTCCCAAAAAACTAAGGTAAGTCAACCATGCTGGATGAAATT
ACGAGAATTTTCAACCCGCTTCATATTTGAGTGTGACCAACCAACGAAGCCAACCTCAAAAAAGGAAA

ITS 4

CTCCCGCCGGGGACCACGGGTGCATTTTTGTGGTTGGCATGCCCCAGTGAGCCCGCTCCTTTTCGAAATGGGAA
CCACCCCTTGATCTTGCGGAACACTCAGGAACCTTGCCCTTTGAAAAAAAACAGAACGCAACGAACCCGGCC
AAGGAAACCTGGACTTTGAAAATTAATAAATGGAGATTTTTCGTTAAAACAATGGATTGAGGGACAACATAAC
ACCTCCCTCTTATAACTCGACAACAAATTCGCCGGGGCACAGTTGTGTTTTAAAGCCCTTTTCCGCAACTA
TCCATTTTGTAAAGTTTTTCAATTTGCGAATTAATTTTCTTTTTTGCATGAGTTTGGTAACAAAATGCCAACA
GCTTTCACATTTGGTTTTTTTATGGCCCTCCGGAGACTTTAATTTTACAGGTAATTTTTTAAAGTGACCCCGGT

GAAGAAGAATACGAATTATACAGCCCGCCTTCATACCTTCCAGGGACCACACCGGGTGTGCAAGTTCCAAAAA
GG

>Cepa E

ITS 1

ATTTAGAATCTTCTTATGATTGTTGCTGGCTTTGACCGTTTCGTTATGTTGTGGATTAAACATGGCTTGTATTT
ATTTTAACCGTCCCCTGAATTATCTCATCCTTTATTTAAATTTGAACTGAACTCATTTTGAGATTACCTAAAAAA
TAATCTTTTAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
ACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACTCTATGGTATTCCGTA
GAGTATGCCTGTTTTAGTATCATGAACACCTCACTACTATAACTTTATTGTTGTAATAGTGGACTTGGAAATGC
GCTGGTGTCAATCAGCCCTTCTAAAATGGAGTTCTTGCCTGTTGATTTGTTTTAACAGCGATGTTGGCCTAA
TAAGTTTCGGCAGTAATGTTGAAATCCTGGCTTTTTTTGCTTAGAATCTGACAGTCTTGATATACAGAATTTT
GAGGTGACTTGTCTCCTCTTCAAATTTTGATCTGAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TAAGCGGAGGAAAAGG

ITS 4

GGGGATCCTACCTGATTTAGATCAAATTTGAAGAGGAGACAAGTCACCTCAAAATTTCTGTATATCAAGACTGT
CAGATTCTAAGCAAAAAAGCCAGGATTTCAACATTACTGCCGAACTTATTAGGCCAACATCGCTGTTAAAA
CAAATCAACAGTGAAGAAGTCCATTTTAGAAGGGCTGATTGACACCAGCGCATTCCAAGTCCACTATTACAA
CAATAAAGTTATAGTAGTGAGGTGTTTATGATACTGAAACAGGCATACTCTACGGAATACCATAGAGTGCAAT
GTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCA
TCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTATTAAAAGATTATTTTTTTATGTAATCTCAAATGA
GTTTCAGTTCAATTTAATAAAGGATGAGATAATTGTTGGGGACGGCTAAAATAAATTTCTAACCATGTTTAATCC
CCAACATAACATACGGTCAAAGCCAGCACAAATGGGAAGAAGCTTCAATGATGAAGACTCACTTCAGTAATGAT
CCTTCCGCAGGCACCCCTACGGGAAG

>Cepa G

ITS 5

CAAGAGGGGGAAGTCCGGCAGAAGGTCCCTTACCGAGTGAGGGACTTTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATT
TACCTCGTTGTTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTCACGCCCCGGGCCCCGCCCCGCCGA
AGACACCCCGAAGTCTGCCTGAAAATTTGTCGGCTGAGTGAAAATATACATTATTTAAATTTCTGCCACGCGTG
ATCTTAAGGTTCTTGGGTACAAAACAAGACATCCTTGATCACTA

>Cepa I

ITS 4

CGGGGGGGATTCCCCTACCTGAATCTGGAGGTCACCTTAGAAGTTGGGGTTTTACGGCAGGGGCTCGCCGCTC
TCCGGTGCGAAATATCACTACTACGCAGAGGAGGCTACAGCGAGTCCGCCACTAGATTTAGGGGACGGCCCGG
GCGTTAGCTCAGGCCGATCCCCAACACCACACCGCTGGGGCATGAGGGTTGAAATGACGCTCAGACAGGCATG
CCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTTCTGCAATTCACATTA
CTTTTCGCATTTTCGCTGCGTTCTTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTATTTG
TGTAATCCACTCAGAAATTCATAATAACAAGAGTTTAGGTCCCCCGGCAGGCGCCTGAATCCGGGGCACCG
AAGCGCCCCGGGCAATCCTGCCGAAGCAACGAAAAGGTAATAATTCACAATGGTTTGGGATTTGTAAACTCGGT
AATGATCCCTCCGCTGGTTCAAGCAGGGATACCTTGATACACTTTTACTTCCATGGGTGTCTGAGAGGTAAAG
TAAGGTTGTAGAAAGAGAGAGGACGAGGCAATGTTTAAAGACATAGGAGACGATTTAGAAGACAGAATCATTTT
CGTAGAGGGCTATGTTGAAGAGGAAGCGGAAGTTGAAGGGCTAGAGGCCGGAATACGTGAAATGAACGTATAA
TGTAAGGAGTAAGATGAAGATCGCCGAACGAATCAGTAAAACGTTCAACGAAATAGTTAGATGAAGGCTGG
CAGGTAGAATATTTGTCCGAACGATGAGCGTGATCAATATCATGAAAAGCACGCATATTGCACGGGGAGTTAG
TGACATATGTAGGCACTTACGTGGGAATAGCGGAATTAGAAAAGAACGTATGATACGTTTTCGGGAGGCGGTTAA
GAGGATTTTCGTGATTGGCGGTTGGAGGGGGAGGAGGGACAATGAAAGGCACGGTAGGTGTAGATACGTCTTAC
TAGCGTACGAGACTGATAGAGTGTAATGATTAAAACGGATGTTGAAAGGAAGGTGAGCGGGTGGAGGATGACA
AAATGTAAGGTGGTTTATCTGAAGTCCGGATCAACGCAATGGATAAGGCGAAACGACAGACGAAGTAAAGGAT
TTGAGGGATGGGAAGTTGCTGCTAGCCCGGTTGGTACCTTATACGCGCATCGGCGTAAGGGGTTGTGAGAAAT
GAAGGGAAAAGAGAGAAAAGAATATTGAGTACTATGGTAAATGGGTGCGGTGCGCGGTGGTTCACAGCGGAGA

TGGGGAGCGCTGAGACTAGGATTTTGAAGTGTAAGGTGAGTACTGGGGTTTATACGTGGAGATTGACAGACTA
ACAATGGGATATGTGGGAGTTGTGCGGGCGAATTGGGAGAGGAAGCGTTAGAACGGGGCGC

ITS 5

ATTAACAGAACTTGCCCCAAACCCATTGTAGAATTTTACCTTTTCGTTGCTTCGGCAGGATTGCCCGGGCGC
TTCGGTGCCCCGGATTTCAGGCGCCTGCCGGGGACCTAAACTCTTGTATTATAGTGAATTTCTGAGTGGATTA
CACAAATAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAAA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCG
GGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCCTCATGCCCCAGCGGTGTGGTGTGGGGATCGGCCCTGAGCTAAC
GCCCCGGCCGTCCCCTAAATCTAGTGGCGGACTCGCTGTAGCCTCCTCTGCCTAGTAGTGATATTTTCGCACCG
GAGAGCGTCTAGCCCCTGCCGTAACACCCCAACTTCTAAGGTGACCTGATATCAGGGAGGATTGCCAGCTGG
ACTTAAGCATATCACTGCGCCGAGGAATTTAGTAGTGGTGTGGCATGTAACAGTTGGATTGAAGACGAATAT
GGAGTCGAGTTAGTGATGTGCGAGATCCCTCGAGGAAGAGAAAATTCGGTGCCTGGGGAAAAGTGGTATAGTCTG
AGTCGGAGCGTCATAGTATGCTGCAGGAGAGGATGTGATTTGGAGGTAGGCCTGGGAGGTAGACGGGTTCCGA
GTACAACCTGCAGTAGGTATGTAGATGCAGGGACAGTACCTACCTACTCGACTAGGTGACAGACAGTGGATGTA
GATATAGGGAGAAACATAGAAGAGCCATGTTGGGCGCCGTTTCTACATGATATGACCTGGGTGGGTTGTGGGA
ACGATGGGTATGAGCGTGTGGCCGTTAGGACGGGGTAGGACCGGTGGAGGGGCTTGTACCCAGACGAGACGAG
TCACATAGGATGTGATCGGAGCATCGCAGTAAGGAATCGAACAGCAGTATCGCCGGCATTGATGCGCAACGGA
TAGCTCCGTTGGATGAGATCACTGGGTACGCTGACGTGCGGACACATGTGAATCGCACGGAACGCTCTATCGG
TTGCGCTTCGGTACGGTAGTGCAGGTGCACGGGTTGGAAGTTCAGGATGAAATTTGAAGATACGGAGTGACGAG
AGACACTTTGCGTGAATAGTCACGGTACCCAGAAAGATGTAGTCTCGGACGCATGAAAGAGGCACGAGTCAGG
GTACGACTGGACAGAGGAGGCGTA

>Cepa J

ITS 4

TTTGGGTTCCCTTACTGATCCGAGGTCAACCTGGATAAAAAATTTGGGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGCCTA
CAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTTCGGGCCCCGTC
CGGAATCGGAGGACGGGGCCCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCC
CCGGAATACCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTACGTAT
CGCATTTTCGCTCGCTTCTTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAAATAATTTATATT
TTCACCTCAGACGACAATCTTCAGGCAGAGTTTCGGGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCGTGAGCCC
CCCGGCGCCAGTTAAGGCGGGCCCCGCGAAGCAACGAGGTAAATAAACACGGGTGGCAGGTTGGACACGAAG
GTCCCGCACTAGGTAATGATCCGTTGGGGGATCCGCTAAGGATGCCTTGTCTTATAGTGAATAAAAAATGTGCG
TAGCGATAACTGTGTATGTTGAGCGTTGCGTCTGTGTAGAGTGGGCTGCGGCGAGCAGCTACAGTGTGTCTCT
GACCTATATAGCCCCGGCGTGGCAGACTGTTCTTATGATACTCTAGCGGTAGCCTTTGCTGCTTGTGGGTTCT
GGGGTTGCTCACTGAGTGACGCGGAACCTGTGATAGTGAAGTGGCTCCTGTTTAGTGGTGGGTCGCGTGTGGT
ACAAGATTGTTCTATCCAGGCGTCTAAGTTGTTTTGCTGCAGATGTGATTGGTATGTGAATATTTTCGAGAGGG
GAGTGCAAGGGTGCCTGTGATTTCCGGTCCCTTTCAGTTTTACGTTAGTACGAGTGCCCAGATGAAACTAGA
GTGATTTTCGGGCACGGCACGTCGAGCGTGCCTTAAGCGGGACATGAGTGTTCATTTCTTTTAGGGTGTGGTA
TCTTTCTGTGCTGAAGATGGCGCTGAGATCATCCCGCGGTTGTTATCATGTGTGCGGTAGGGTACTGGGGACA
TGGGAGACATGTAATATTCGGGCTATGTGGGAATTTAAGGTGGTTGTCCACCTACTTGGGGGAAAGAGAGA
CTCTGGTTCGCGGCTCAGGTGCTGTGTCTTTGGGGTTCGGAGTACGATTGTATGAA

ITS 5

AGGGGGGGAAACTGCCGGGAGGGACATTACCGAGTGAGGGCCCTTTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTAT
TTACCTCGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCTTAACTGGCCGCCGGGGGCTCACGCCCCGGGCCCGCCCGCCG
AAGACCCCCGAACCTGCCTGAAGATTGTCGTCTGAGTGAAAATATAAATTTATTTAAAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTCGCAATTCAGTGAA
TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGAATTACGAGAGGCATGTCTGTCTATAGCGTTCATTGATGC
CCTCGAGCTCGGTGTGTGTGTTGGCCTACGTCATTCAATTAGGGTAGACGTTATCAAGAGGAACCGAGATTGT
ATTGTTTGTGAGACTGTATGACTGAGCACTTTGTCTAAGCCCTGATTGAACATGTAGAGTCATCTGGGATGT
TGACATATGTTGTCAGTACTAACATGACTGATTGAAGCATATTTAGGAGATCCAGGTCTGACTTAGTATGTA
TTCATCTATTTCTAGATAAATACAGTATAAGCTAATGTAGATGTGTATCTTCTGTGCGGTCCTCTGTAGATGAG
GTGGTGACGACCGAGGGTCAATGTAGGAGTGATGATATCAGTTGCCTGTATATAAGTGTGAGTTTTATGCA
TGTCATCGATCATTACAATTGTCATGATTTCTAACAAGAGGGTCTCTTTCTACATTCTCTTTTTTGACATGGA
GGTCAGTGATGATTTCGTATCAATTGATCCAAACACAACTGTCGCGCGTCTCTTTAGCTGGCTTGTGCATGTA

AATTGCGGTCATTTCACTGTTTTGATTCCCTTCGAGTTGATGTATCCAGGTTTCATGTCAATTCTCACTTTAAATA
TCGGGATTTCCGTTTGTACCGGATCGTTTCATGGCGATTGACGTCTAAATGGTACGTGAACAAATACGGCCATC
TGGTTCCGTCTGAAAAAGCATGCTTATTATATGATCGTAATATAGAAGAAATCGATATTTATCAAAGACAAGA
TTGGAGAATAACTCCTCTCCTCCCCATAATACGGGGATTGTTAATCAAAAATTTCTTGTCTGAATTTCTTT
TGCGGATGGGGGCGCTTTTTGTGAAACCCCGACATTTGCTGTTGTTTGTAAAGGACAAAAGAGAGTGAGTAAGG
TGCTTACAACATAAGCACAAACTTTTTTTTTCTTCCGCTGGGTTTTGTGCGACGACTCCACCTCGATGAAAAT
GGGAGGGAAGTGTGTTTTCTTCGTGTGTCTCAGAATGCCCTTGGGAGGATATTTGTTTTTGGGTACAGGCA
CCCAGAGAAAATGTTTTCGATATCTGTCTGTAGACAGATGAGAGCAGGAGGCCCGAACCGGGTTATATGGTT
ATGCGCTGCAGAATAATTTATTCGATTTATCTTGTGTTCTGGTGTGAGGAGAGAACGGAGGGTGTCTTTTT
TTTTCTCGTTTTGGCAGAAATTTGTTTAGTTCGTGGAAATAAAAAATGTGTGAGTGCACACAATACAAATGAACGT
TTCGTTGATTGTGGTTGTGGGGCTGTTAATAATATTA AACATCTCGTTTCGTTGTTTCTCGGTCGTGTTGGC
ATATGCCAGATAGAGGGATATGATTGTGGTGTGAAAACATTCAAAAAGTCTCAACGTTGTTTTGGATTGGGTG
GGTTCGGTGTGTTTATTATGATTGACTTCTGTTGATACTCATTCCGTTGAATTACCCCTGGGGGGGTGAGTAT
AGGTTGAGATGATAAATAGCGCGCACGACGGGTTTTATTGTCTCAGACGTGTTTTCGAACGCGCAGTGGCTCT
TGTTTCTACGACTGGACTGGTGTATGTGCC

>Cepa K

ITS 4

AGACCGGCACCTACTGATCCGAGGTCACCTGGATAAAAAATTTGGGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGCCCTAC
AGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTTCGGGCCCGTCCCC
GGAATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCC
CGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTACGTATC
GCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATATTT
TCACTCAGACGACAATCTTCAGGCAGAGTTCGGGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCGTGAGCCCC
CCGGCGGCCATTTATGGCGGGCCCCCGGAAGCATCGAGGTCGAGAAGCACTATGCGGAAGTTGGACCTATATA
ACCAATGTGAGAAAGAGTAGTAAGAGGTTAGGGGGTGGTATTATGCTTAGCAGCAAATGAAAATAAGACATAT
TGCGCACGTCTAGATGATGTAATAAAGGTATATGATGAGTGACAGAGCGAATATAGGTATCTTTGAGTGGGAG
ATTTGCTAGACGGGAGAGACAGGCGTGATTGGCAGTATGTGAGAGATTAAGGGGTTATGAACGTTAGAATATG
GCATTAGAAGGGTAGGATGAGAGGTTATTAGGTGCATGTAAGAGTTGAAGAGAATAGTATAAAGGAGTGGTAG
TGAGTGAGGAGGGTGAGAATATGAGAACTAGAGACGACTGTAGATAGATAGACTAGAGAGTGAATAAAGAGT
TAGTTGTGGTGTGTTAAGGAAAACGCAGAGAAAACAGTGGATGAGTGTGAGAAATCATGATTGGGGTTGTGTA
TGATAGAAGGTGCAATTGTTAGTGACACAGGGTCTTGGGGCTAGGGAAGACATTTTTTCGTTGTGCTGAGGAC
TAAAGAAGAATTTGATGAGGTGGTCTGATTCCGTA AAAATATGACTGATTTAGTGAGGCTTAATCGTACTTGTA
GAAAAGATGGGATATAAGTAGAATACTGCGGGTTAATGAAGGGAACGAGGTGAGAATGGAATTGAAATTGGA
CGAGGGATCGAAGTAACAAAGAAAACAAATGAGTTGAATAACGTTGGGAGCAGTCAGTTGTGAGAAAAGATTAG
ATGTATGGAATATGTGTCTGAGAGACTGAAATGTATAGCCAAAGATAATGTAGCGTTCCATGAGGACGTATAT
TATCACGCTACAGGTTGACATATTACAATGAAGAATTCAGATAATAATTGTCTGGCGTATTGTAATGTGAT
TGATAACGCGTGTGACACCGTTAAAGGCTGTGGTAGAACTAT

ITS 5

TCTGCAGGTAACCTGCGGAGACATTACCGAGTGAGGGCCCTTTGGGTCCAACCTCCCACCCGTTGTTTATTTACC
TCGTTGCTTTCGGCGGGCCCCGCTTAACCTGGCCGCCGGGGGGCTCACGCCCCCGGGCCCCGCGCCCGCGAAGAC
ACCCCCGAACCTCTGCCTGAAGATTGTGCTCTGAGTGAAAATATAAATTTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCT
CTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATC
GAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCA
AGCCCCGCTTGTGTGTTGGGCCCCGCTCCTCCGATTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGGGGGGGCACCCGCT
CCGGTCCCTCAAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCTTGGCCGATCAACCCAAAT
TTTATCCAGGGTACCTCGGATCAGGTAGGTTACCCGCTAAATTTATACATATCAATATGCAAAGAAATCAT
TATATTGATTTTTAAGAGTAAAGGTTGCTATAACCTTGTAAATGATGAGTGTGGAGTACCTGGTCAAGTATG
TAATATGCCACTTGAAAAACACGTGAGAGAGTCTTATGTCTGAGCGATAGAGGTAGATATAGGTAGAGATTCT
CGTAGTTAGTTAATATTATGTGAGTTGTGATATGAGATAAGTGAATATCGCGCTGATCGGCAGTGAAAGATGA
TAGGCATAACTGGTTTTAGAGAAAAAGTTACGTGAGTTTAGAGTCTATGTACTCAGATGCAAGTTGGATTAAAG
TGCTTATATATGTGAAGTTTCCATAACGATTGAGAACGTACAAGGATCAATGTACAAAGCGGAATGGATAAG
CACGGTCGACGTTGAGAACGTACGGTAATTGATAACGTGCTCTGTTTCGAGGCTTCAGGATTAGTCACAAACA
GATCAGCACGTCCTCTTTCTGAAAACATTTCTTGTTTAATCATACGAATTAAGATGTTATATGTATTATCAC
TGTCCACATTTATCGAGTATTTATGCGTGACATGAGATAACATATGACACGGATGACAATGCAATAAGCTCT

AAATGTATCATCTGGATTAGATAAAAACACATACATGAATCACAATTTACAATGCATAGAACGGCGGTTGTGGT
ATGTATATCCTGTGAATGACTTGCCTTAGAGAAGACGATATATCTGATTTCTGCTGACAGCGCGATAGATTCC
CAACTTCTTGGATACCTGACAATATTACTAATTAATAAGCTAATACGAGTGATATCGTCATTCTGAACACAG
TTGAATCGCATACGCCGAGCAGTACGTAGATATCGATGTGATATGGGTCGAGCGATTGTAGTATGTGTAAGAC
GTTGTCCGAGTCTGAGTACATCACGCATAGGACCTTATGAAGCTCTTAGATAGTTATATGAGATATATGTGTG
CGACATGTGCTGAGAGACAAGCGAGCCGTTTAGTGATCATATCTGTTACGATGTGTATCGATTGTTGTGATC
GTTGGCACAGGATGTATACTGAGACTGAGCTATGCTCGTCTGATACCGGATATATGGTATGTATGAACGATAT
CTGGCTAAACTGTCATCCTAATGATCTCCTCAACG

>Cepa Ñ

ITS 4

ATGGGGGTTTCTACCTGATCCGAGGTACCTGAAAAAAATTGGGGGTTGCTGGCGAGCACACGACCGGACCT
CCAGAGCGAGAAGAATTACTACGCTCGGAGCCGGACGGCACCCGACTGACTTTAGGGCCCGCGGAGCGGGC
GGGCCCAATACCAAGCTGAGCTTGGAGGTTGTAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGG
CGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGT
TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTATTATATAGTACTCAGACGATATAG
ACAAACAGAGTTTAGGTCCTCTGGCAGGCGCTCGCCGGCCGAGCCAGCAGCCCCGAGGGCAGGCCTGCCAAAG
CAACAAAGTGTAATAAAACAAAGGGTGGTAGGTTACCCGGGAGGCCTTGCGGCAACCCGGGCGACTACTGTAAT
GATCCTTCCGCGAGGTTACCTACGGAACGGTTCGAGTTCGTAGCGACTCACCCCTGCGCTTTTACGCGAGGGCC
CGACTATATCTTAAGCAGAGCTAGGCTCCACCCACAACCCTTAGTCTGTGAACGTTACCCGTATAGCTAGCG
CTACTTGGGGTCTTCGCTGCGGATTATCCATAGTTCCCCGGAGGGATATCTATAACATTCTTTTACCACCCCGT
GTAGTTAGACGGGGCCCCCGCTCGGTTTCCCGGTGAAGGTTGGTGTAGTAGGCTGTAGGAACTCCCCGTCAA
TTCAGTCGGGGTTGCCAGGAGGGCTGACTTGCAGATAGGAAGACTTTTTAGAAGTGGGGCTCCCAGCCCCGTT
GTGGGGGGTGGGAAGGACTGTAAAAAGTGGAGATCGTCTGGACGAATGATTGGAAGGAAGGTGAGGAGTTAG
GTTCCGAAGGAGCTTAGATTAGCTTGTGTGGTGGAAAAAAGGCGTTGTGGGGCGAGGCAAGGAAGTGAATGG
GGAGAGGAGTGGGTTGGTGTCTGGTGGGGTAAGGAGGAGGAGAGGATGGGGATTTGAATGAGGCGGGTCCCTG
GCTCAGGTTAGAAAAGCAGCAAATGCATGAAACTGGAAGTGTACCTCGAAGTGTGAGCGCGCTTGGATACTTG
GCGGGACGCTCGTGTGTCAGAGTAGGTGACGAAACGCTTGAAAACATGGGTTACTGTTATCGGGGTTCTGCTG
TGTTCTGTTTGGAGAAAAGCGGAAAATAGCGTGTGCGTGGATGCGGTGGAAACGGAAAGGCAGAAATGGGGGAA
CAAGCTGATATGCGTAGATCCGGTGTTCGTTGGAGATGAAGGAGGGGACAGGTTGC

ITS 5

TCCCTTTAGTTGGAGCAATCTCATGATTCTTCCGTGGCGACACTTATGGAAGCCTTTGCAGCCCCGCAAGGGG
TGGGGAGCACGACTGTAAATAAGTCTCCCTTCATGCAAGTCAGCACCCGCTGGCAACACGATCGAATTGACGG
GGACGTCCATAAGCCTACAACACCAACCTACCCGGGAAACCGAGGTGGGGGCCCGTGCTAACTACACGGGGTG
GTAAGAAGTATGATGGATACTCCCTCCGGGGAACCTATGGATAATCCGCAGCGAAGACCCTAAGTAGCGCTAGC
TATACGGGTAACGTTTACAGACTAAGTGGTTGTGGGTGGAGCCTAGCTCTGCTTAAGATATAGTCGGGCCCTG
CGTGAAAGCGCAGGGGTGAGTCGCTACGAACTCGAACCGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAG
TAGTCGCCCCGGGTTGCCGCAAGGCCTCCCGGGTAACCTACCACCCCTTTGTTTATTACACTTTGTTGCTTTGGC
AGGCCTGCCCTCGGGCTGCTGGCTCCGGCCGGCGAGCGCTGCCAGAGGACCTAACTCTGTTTGTCTATATC
GTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCTAATAGAATAATGTAAATGCCAATTTACGTTGAGCATCGGAATCATTATTGGCAATGTGCACGCT
CGGGTATTCGGGGGAGCACGCCGGAGATATAGGGTACGTAGGACGTAAAGCGAACTCTATAGAGATGGGTGC
CCGTAGATTGTAAGGAGGATCCAATCACGATGGATTAGCATGACAGAACAAATAGGATTAATGCTAGTCCCT
AGGGAGTGGGGGTGGGATAGGGGAAGAGTGCAGGATTGTTTTTAGGTTGCAGTCAGGGGTTGGTTCGTATAGCG
GTGGTGATATACGTGAAGAATATTCTGAGGAAAAAAGGGTTGTTGAGAGGTACGTCAGGTTAGTAGAATTGTC
AGTTTGTGCGTCAAGCAGAGGAGGTAGATGGAATGGTTTGGTAAGATTAGTAAGGAAGCGTAGTAACACGAGG
AATAGTCCGGTTGTCTGAGGTGCTGTTGGATCGCATGGTTTGGGTGAGGAAAAGGAGGGAAAAGGAGTTGAAG
AGTGATAGTGTGTTGATTAGTTACGGGCGAGGCTTGGGACAGGGCGGGCTAGGATCCTGGAAGAGCTAGT
GTTTGTGATGCGTATCGGGAAGGAGTT

>Cepa RS

ITS 4

GTGGGGGAAGGCCCTGGAATGATTTGAAGGTCTAAAGCTTAAATGCTATTAGGAAGCGAATTAGAAGCACCTC
TTATATTTGAAGAAAACGTCCTTAGCGAAATAATTATTACGCCAAGTCAAACCGTTTATTTCAATAGGGTTGC
TCGTGTATTTTCAGTTGAGCCGGCAATTACGCCGACAGACAACCATAATCCAAGCCCACACCCATCTCATTACA
AAATAGGGGGGTTGAGAGTTTCATGACACTCAAACAGACATACTCTTCGGAATACCAAAGAGTGCAAGGTGCG
TTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGAT
GCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTTTGTTTTTATTTATGCTCAATTAAGAGACTATTACATTCTTA
TACTAATGTGTTAAAAGTGTGTGTAAGAAAGAACTGTGTGCACAGTGTAAAGAAATTGACATGGTCTGACTTCC
AATAAGAACCTCGTAAAATTCATACGATCCTTCCACAAGATCAACTACTGTTATGTTGGTAGGACTTTGACTT
CCACAAGATATCCCGGTGGTGGGTATGACAACATCGAGCTCGCGATGGGGTGAAGTGTGCGGGACGAAGTAG
TAAAGTAGCTGTTGGATAAGGAAGATTCTGAAAGTAGTGAACGTAGATCGCAGTCCATGTATGTGGTATGTCG
TACGATGCTGGTAAACAGTACTCATGGATCTGAGGAAAACATCAGAAAATGCTGGTAATTATCTAGAGTCATA
GAAGTCTGAGACTTAGGAGGTGCGATGCAGATAATGTCCACGTCTATGGGATAGTCAGGGACCAATATACTTA
TCTCTACGTGAGTGGCGCAGTCTATGAATGAAATGGATAGATGGTTAACGAAGAGCCGGTACGAAGTGGTGAC
CTACAGAAAACGGTAGCCTCGATCCATGATCTGCAGCATATAGATCATGGATACGTGTGTTGCCGCGCTGTGGG
CTGACACAGAGATTGCTATGCTATAAGTTTGGATTCTGTGAAATGATTAGGCTAAACATGGACCCATGATGT
ATATTGCATGTGTGCTTACTCAATGGCGTGTGCGGGAGACGGATGTATGTCATACGCTGTAGTTCGCTTCACTC
GATAAGGTATCGAGTGGATGGGACTTGCTTATTTATCGACCATCCGGACATTGCCGCTGTGACGTGTTAATGG
ACCGTTCATGAGGTTGTTTCGAGGTAGAAGAAATGCGATATGTGCGAATACCGTGGTTTGGCGAGCGTCAGTAT
GATGGTGCCTGTTGCGTGTGCTGCCCACACTGGGGTTCATGTGAAGACGGAGATACGCGGGCTAGACACGTGA
GGGTACTATATTGTCGTGCGCAATAACAGCGACTACAGAGACATGCTCATATCTTGATGTGCGAAAATGCGGGG
TGACGCTGCTGTAGCTGTGGTACTGCGTGTATGGGACGTGATCAAGCAGAAGCGAATGATGCTTGGCAGTACT
CAGAGACGCAGATCTAATAGCGGTTACTCGGATGACTGCGTTACACAATATACATGCATTGGGTGCGAGAGA
CCACGACAGGTGGAATCTCAGCGGCCCTTGAGTTGCGTGGATGAAGACGGAGAGGAATGACTGCGTGTGATTTG
GAGAATACGACGAT

ITS 5

ACGGGCGGAAGGGTCAATTAAGTGAATTTTAAATGACGTTCTTTTTTAGAAGTCCGACCCTTTTCAATTTCTTACAC
TGTGCACACACTTCTTTTTTACACACACTTTTAAACACCTTAGTATAAGAATGTAATAGTCTCTTAATTGAGCA
TAAATAAAAACAAAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTTGGTATTCCGAAG
AGTATGTCTGTTTGTGAGTGTGCATGAAACTCTCAACCCCTTATTTTGTAAATGAGATGGGTGTGGGCTTGGATTA
TGTTTGTCTGTGCGGTAATTGCCGGATCAACTGAAATAGACAAGCAGCCCTATTGAAATAGGTGTTTGAATT
GGCCTAACATTTATGGTCTGTGCATGACGTGTTTCTTCGAGGTGTGAAGAGGCGGATTCCCTAATTAGTTCGTCGA
TGTAGGCAGTTGGAATATTGGGACCTGAAGATCTAATCGGGGACTTATCCGACCCTCAAACGGTAAAATCGT
TGGTGGAGATGCCTGCGGGGAGTGAACAGGTGGCTTGGCTGGAGAGATGAGAACGGTGTGTGAGTGGCTGG
TTAGTGTAGGTAGGAAGGGAACATGGAGGATGGGGTTCGTGATGGGTGTATGGTTGTAGGAAGTTAAGGTAGG
GGGCGGTGGAGTAGGAGTAGAGCTTACGGTTTCGGGGCGAGTTGGCGAGGTGGGCCGTTAGGGTTCCGATGGGG
GATTAAGTGTGAGTAATGGGTTTGGAGTATTGGTTTCAGATCTGAGGTTACGTGTATCCGGGATCGAGTGTAGC
AGTGTGAGATGAATGTGAACGAAGTGCAGATATGGGAAAACGGAAATCCGCATCAACGGGTGAGGATGGTTG
GAGGGGAGAGGGGCGAGTGGGGGCTGGGCCGGAGTAGAGACAAGACTGGCGAGAGTTGACGGGGTATCAGGG
GTGGGAGTTGGAGTTGGAGGAGGGCGTGGGGGAGGTGTGGGTGCGGTGATGTGGCTGGAAATCGCAGGTATGA
AGGTGACGAAGAAAGAGATGGAGATTGAGCAAATAGGCGGGGTGCGGTGGGAATTGCTGGTGTAGTTCGGGGA
TTTAAGGGGGGCTATTGTGGCGGATTGCATGGGGATAGAAAGGGGATAAGTAGTGTGATCTAATAGGGATCA
GTGCGGATGGTTACACGGGATCGGGGACCTCGGGAATAGTGACGGAGCGAGAGTCCGAGAGAGTATACTGTAG
GGGGGAGATTAGCAGCGGAGCTCGAGATTGTGTGGTTACTTGTGATGGGAAGATAGAAGCGGGAATGAGACACA
GACAGTAGGATGAGGGAAGAGGTGGAGACAGAGATTAGATTGGGCGCGGAATCGAGTGGTGTACTGTAGATAGG
TGTGATTGTCTCGCGTGCGAATCTAGCGGGTCTGGTACTGTGCAGGATGTATGGAGAGAGAGAAGGGTAAG
AACTGCAAAAACGAAGGCGGAGAATGAGTGGTGGGTTTTATAAAAAGTGGATGAGTTGTAGGGATACGTGGAGTG
GAGTGAGCACGTGCGGTGGCTTGGCGGAGCGGTATGTAACGGAGAGTAATACATGGAGGAGATGTGAGAATGAG
CGTAGTAGATAGCGAGCGGCTGTACTGATCGCTGCGTGGTGTACTGTAGTGGGATACTGTGTGCGTGGAGGTG
ATATGGATAGGAGACACAGACGAGCCTGCGAGCAGAGAATAGTGGCGAATGAGTGTGAGTGGCGCACAGTCCGAA
GGAAAGACAGCTGTATAGGAGGAATGGACAGCGAGGTATTGTAGATCGTCACGCTGATGCTCCGATAGAGGCG
GTGTCGATATCCGTCGCGCATATAGTATGTGCGCTCAAATTTATCTGCAGCCCGACAGATATCTAGGAGAGTA
GTAGAAGCGAGAGCAGTGGTTAAAACGATAGGGGGATCTTGTGTAGGCGATGTGGTTTTGAAAGCTAGCTCT

CTCAGGGAGAGAGAGCTCGATGTGTGGAGCTGCTGCAGAACCGACAGTGTGCTAAAATCGGGCACACTCTATG
GGATCGGATGCATTAGTATAGAGGAGCGAGAGCTAGTGTAGTTTGGTATATGGTGCGGATGGACATGAGGATG
TCAAGATACATAATAGCATCAGATCTGCAGTAGAGCAGATCTAGTTCGAACGCAGTATATAGTGTACGAGATGT
GGTGTAAACGGGGCATGTGCGTGGGACGGGGTGAATGTACTGACGGGAGGTGAGTGATAAGAGTGGAGTATATA
GCGCGGCGACAGTACGGGAACGGCAGGGGCAGAATCGAGACGAGTACAGTGGTAGTGGTCTTTGAGAGTGCAC
TCTACTGACTGAGAATATGGTGTGTGCTGAAGTGTATAGAGCGTATGGTAGTTTGGCGGTAGTATTGTGCGGAT
ACAGATAGCAGAGAGGAGAGACCAGAGCGGATATGTGCGATCAGTTGCATTGTTCTGAAGTGCCTGGGGATAG
TTGATGCTGTGCCTGATAGGAGAGAGACTCGACAGGTGAGCACAGAGATATATAATCGAAGAACGAGCTGCAG
GCGCACATAATGGTGAGAATAGATCGAGCTGGGAAGGTGCGAGAGTGTGTTGAACATCGAGTAGCGCGTGT
AATATCGGCATTGAGAG

>Cepa Raya Roja

ITS 4

AGGGGGGGTTTTCTACCCTGATCTGAGGTCACCTTAGAAGTTGGGGTTTTACGGCAGGGGCTCGCCGCTCTC
CGGTGCGAAATATCACTACTACGCAGAGGAGGCTACAGCGAGTCCGCCACTAGATTTAGGGGACGGCCCGGGC
GTTAGCTCAGGCCGATCCCCAACACCACCCGCTGGGGCATGAGGGTTGAAATGACGCTCAGACAGGCATGCC
CGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACT
TTTTCGATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTATTTGTG
TAATCCACTCAGAAATTCATAATAACAAGAGTTTAGGTCCCCCGGCAGGCGCCTGAATCCGGGGCACCGAA
GCGCCCCGGGGCAATCCTGCCGAAGCAACGAAAAGGTAATAATCACAATGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGATAA
TGATCCCTCCGCTGGTTACCAACGGAGACCTTGTACGACTTTTACTTCCAATAATGGGTATGTGCACATC
ATAATTTAAATCGCTAGGGCGGATAAGTACGCAGAGCCGTGCGAATATGAACGGAGATATTAATATTGAAGTT
CAAAGTGATTAGGAGTAATGTAGTTAGAGTAGTTGTAGATGTTAGTTGTATATTCAGTGTATAAGCCCCGCT
ATAAAATGCTGGATTAGAGTCGATGGAGGGGAAGGTCCCGTTTTTCGATAGACGCGCTGTGATAGTATGAGAT
GTGCTCTTGGTGTGAAAGGTAGGGTACAGATCGTGTGTTGAGCATTATGGATCAGTTCAGAGAAAGTTGAT
GGATGAGAGACGGGTGGTTGAAATGGGCATCATGAAGGTATGGTAACGGTATATGACGCAAGGCAGTAGGTAC
GATATGCTTGTACATGAGAAATCTTGGTGGTCACGAGCTTCAGTACTGAATGAAGGGACAATCAGTAATGTAT
GTGTATCCGATCCTGAACAGGAGTTGAGCAGTGGTGGGTGTACTATGTGTCTGGTGTGTTGCACGTGGTCCGGT
TCACGAGATGTGAGTATCGATGAGCATTGGGTAATTATTACTTGAAGGGGCTTTGGGATGGTGGACCTTATA
CTGCCGATCTTTTGTAGTCTTGTGTCGAATATAAGATACGCGCTTGGCGCGCCTTAGCCTATAGACGAACGTTA
ACACGACTTCTTGAATACTGGAGCGTGACATCTCAAACGTGCGCGTTCTCTTGCCTAACTAGCGTCTGGCCA
GTTTTGAGATCCAGAGCGAACGTATGGTGACTGATATTTAGACTCTACTGTGAGGGATTGATTGGTGACTGAAG
GTAAGCGTGATCCAAATCAATCGGATATTGCATTTACGCTACTTCTAGGTACGCTGTCTGGACCTGACGAAT
TCGGGGTGCAATGTGACAGGGTGAAGGCGATAAAGTACGCTCGCCATCATGCGTGTGCTTTTTCGAATCGAAC
GTGCACCTTGAAGAGACGGGCGTTGAACGATGAACAGTAGATGGGAAG

ITS 5

CCCACGGGGGGGACAGCGGGAGGGACATTATCGAGTTTACAACCTCCCAAACCATTGTGAATTTTACCTTTTCG
TTGCTTCGGCAGGATTGCCCCGGGCGCTTCGGTGCCCCGGATTACAGGCGCCTGCCGGGGGACCTAAACTCTTG
TATTATAGTGAATTTCTGAGTGGATTACACAAATAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAAAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCATTTCAACCCTCATGCCCCAGCGGTG
TGGTGTGGGGATCGGCCTGAGCTAACGCCCCGGGCCCTCCCTAAATCTAGTGGCGGACTCGCTGTAGCCTCC
TCTGCGTAGTAGTGATATTTGCGACCCGAGAGCGGCGAGCCCCCTGCCGTAAAACCCCAACTTCTAAGGTTGAC
CTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAACAGACTGCGAGGTCCCCC
AAAGATCTAGGGAACCTAGCGGGCGTTAGCTCGGCGCATTACCCCTAGGCCTAGACCGTCTTGGGTACAGAGT
GAATGAAAGTGAATGATCTATAAACACGCAGTCGCACCTAGGCTATTGGTCTGGATGCTATGTGGTCTGCTCA
AAATGCTATTGATTGATGTAAGAGATCATGTGGGAAGTACTTTAGTCAAGTTCAGTTCAGTTCAGTTCAGTTC
TGCTATGGTGCCCATTTGGTTCATGATTGGAGCAAAGTAGCGTAGGTAGTACGATGATAGGCGCATGCTCCG
ATGGGTTAGTTTGTATTGTGGACTTTTGTGATGACGCTCCTGTGCGTCACATGAGGTCGTACAATATGCTGA
CGGTCCGTGCTAGCACATCGTCTCATGTACCTGAGCCTCTGGTGCCGAAAATAGGCCATTTTTCTGGGGTGAG
TCATGCGTCTGATTTTTGTGACGATACTATGCATAGGGAACCTACGGAGATTGGATTTATTGTTATGGTCTGTA
ATGTGAATAGTGGCTCACGTTGCTGTGTGGTGGTGTACTCATCATCGTGTCTTTCTTTGCGAGCGGTTTACTCG
ATCTCTGGAACCGGATCGGCTCCTATTCATATCGCGACATGGTGGATGGGATGACGGAACCTGGTTCATGAG
AAATGGGCGCATTGGTTCCGACGCTTTCTGAATATCGTGTGGTCTTTGACTCTGGTGTGGGTGACCTTC
TGTCTAGCACTCGTTGGCATATACTTGGGGTTTTGATAAGTCCGGTTAAGACCGATATCTCTCTCACGCG

AAGTCGACATGGATAGGCGCATCGTGTTCTGATAATCGTGTGTGCGTGAACAGCTGTGGGCTGTTGCTATTCT
GTCGTGGATCTGTGGGAGAGAGAATTAAGCGTGCTTTGCTGAGTTGTGAGTGCGCGGTTCGTGTTTATGAAATT
GTGTGTGTGCACACATGGCTTGATGCATCCGAAAAGCTTACTCTACTACGTTGCGTCCGATCGTGTC
GAGAGAGTTAACAGATGA

>Cepa Cruz Roja

ITS 4

AAATTGGGTATCTCGGATGAAGGAGGTGAATGACGTAATAATTGAGAGTTTAAAAAATCCATTTCAAGAAAG
CAATGCTATCCCAGAGGGAACACGCTCCTCCATCCGTGCGGTACGGAATGCCATACCGCGCAATGTGCGTTCA
AAGATTGATGATTACATCTGCAAGTCACAAAAAATATCGCGGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGTGAGAGCC
AAGAGATCCGTTGTTGATAGTTATAATTGAGATAAAAATGACGCTGTAATAGAATATAAATCCACAGAAATAGA
TAAATCGAAATGATCCCTCCGCACTGATCAGCCAACGGAAACGTTATAACTTACTTGATACCGGCCATAACA
ACGCGAAGTATCAAGTGTGTGGGACGCTTCAGTGATTCTGGAGTCGTATAAAGATAGACTGTCATGATACATT
GAGCTTTTCGTTTAGTAAGAGAAAAAGCTTTATCTTAAATATTGTTTTTGCTTATGTATTATCGCAGTCGACT
GGCGGACAGAAAATCATTCAACATTGGTGCCTCTTACGCAGGAATACTGGCGTTGATAAATCGCCATCGTGCC
TAGAGAACCTCGTTGGCTCGGATGACGTTTTATGAGACAGAAACCTAGCTTGTAATGATGATGGTCAGACGGT
CTCCACACTTTCTGTTGACAGGAGGATTTATCTGATTAAAAACAGGTCATACTGAACAGTTATTAGGAGCAGA
TTTTTCGTACGGGACATCACAATACGAACATAAACCACACTTTTCGTCCTTGCCATAATCAGATGAACAGGTT
AGGGGAATTCTCAGCAACATTAGAGGGAAACGGAATAAAAATTACTCAGTAATAGATGCGGCTTGCGAGAACG
ACACCAAGCGAGACCAGGTGTATTTGGTGGATGCGTTATCACTTTCTTACCAGACGTTTGCATTTGTTTATAT
GGGCTATTTCGGTACTCCTCGATGGCGAAAAGGGCGCCTTCACGAAGGGCCCGTATTTTGTGTAATAACAAAAG
TCAGCAGTCTCAGTTATCAATGCTGGCTCATCCGAAGGCAGTGTTTAAAGCATCAAGGGGAGGGGCCACACAA
TTTTGGGAATTCACACTTTGTCTACTTAAGTCCCGCGACGAAGTAAGAGTATGGATTAACGTCGGGGGTAGGTT
CGTTGAACCTAGAGAAACATCGCCAATGGAAAATGCCCGAGACGGGTTCGTGTTGGGGCAGAAGGTGTGGAGTG
GATTTGACACTGTGCACGTTATAATCGTTCCCTCGAATCGAGTTATTGACCAAGTCCGAGGCCCGAGAAAAGG
CACTGTTTGGACGGCCAGGTTGCTGTCTTTGGCGGGTGTGGCACTCTACGCATACGTTCTGGCATTCCGGCG
GTCATCCCAAAAAATGCGGGGTGTTGACGAGAGGCCTTCGATTGCTTTTCGGGTAACCTTTATCAATCATTGTTG
GGGTCTGTGACTCAGTATTATCCTCCCTTAGAATATCGATGTGGTTCGAGTCCGAATACCAATTGCGCCGCCAC
CTACATAGAGGTTCTCCTGCGCCTGATTTAGCATGTGAAGGACGTCGGTATATGCCAGCTCGGTAGTGTGATTAC
TATCGTACTGTAGCGCGCTTAGGGTCTGGACAGTTTTCTGTGAGATATGGTATCGCGAGGGTCACTGTCATCGC
CGCACTATATGTCAGAGTTAACCGGTGTGTGGAGAGAGAGACAACCTCTGAACCTGTGCGCAAGACACGTCCTC
TGTCGACTTGTACTCCGCACAATAATATGAGTGATAAAAACGCGCTGAGAGTCACTTAGCTCTTGTACTATGGT
CTACCGAGGCATTCTTTCTCTCTCGGACACCGGCACAACCTGTGCGGTTATAACATGACATCTGTGGAGTGGCGT
CGAGGCATTAGAGTATAGGGGTGCGCAACGATCTGTACTTTCTCACAACCTGTGTCAGCATCCAAGGATGCAG
ACTTTGTCATGGGATACATCGGACTGAATTATCGTGAGAATCTCAAAAATCTTCAGTCTTCGCGGTATGACTGT
GAAGTCGGATGAGTGATTTCTCGTGCCTCCTGCCTAAGCGATTCCAGTGGTATGTGTTCAACCAACATCCAT
CTGTCCGAGAGTTGCTCGCGCCGTGATGGTTTTCTGTCGTGTAACACCATCAGGAGATCAATCGTGCCTATAAA
AAGAAGATAATGAGGGAGTGTGACAGCGTTTTATCAACGAACACTACACTTAGGATGGTTTTCGCTACTTGCAGA
AATTCGGTTGGAATGAACGACGCTAGAAATCTTGAAGGGGCAAATTTGAACCTATGATTCAGTAGTCTGTGCG
CCATTACCCCGCGGCACAGGGGCATTCTGCGCGCACGATATAATGCATGTAAATCCGAACCTATGAAATGTGGG
ATTTGATACGAGATCCAACGCGACTGATCGTCTCTACATAATATATGACTTTATTGATCGATGTTTCGTAGA
TGCAGTAGGAGTGAAGATCTCGTATTCTCTCACTCGGACACACAGCGTTGACGGAGGGAAAATCAGAGACCGA
TGCAGTCTTCGACTACATGGGTTCGATTCTGGGTTCATTGATGAGTAAGACGCGAGATTTTACCTGATAGCGATAC
ATCATCATCGTAGGGCTCGATCGCGGTGACTTCATGTACAGGTTCGGTACGAATGAAGGGTGTCTGTAGCGAA
GACTCTCAGAGG

ITS 5

CCTGTAAGGTTGACTTGCGGAGGATCATTATTGATTTTTATCTATTTCTGTGGATTTCTATTCTATTACAGCGT
CATTTTATCTCAATTATAACTATCAACAACGGATCTCTTGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGCGAACCGC
GATATTTTTTGTGACTTGAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCGCGGTATGGCATTCCGTACC
GCACGGATGGAGGAGCGTGTTCCTCTGGGATCGCATTGCTTTCTTGAATGGATTTTTTTAAACTCTCAATT
ATTACGTCATTTACCTCCTTCATCCGAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAGAGTG
TGCTGTGATGTTCAAACTTCCTTGCCCTTTGTCTTTTATAAGAGAATTTGATACCAGATGTTTTCTTATTTT
TGTTGAAGTTGGAATCTATTGCTCCTCACCTATCGAAACCGCTAGTTGTACAATGATCCTCGGGATAGATGAG
TATGAAACCGATTAGTCAAACCTGATTTTCAGCGAGTAAAGAAAGATGTGTTATAACCGTTTAGTTTCGTTAGTTCT
GCTAATAACCATAGGCTAGGTTACAGGTGCGTGGGACCATAACCAGTAGGTAGGGAGCGGTGCACAAATGACC

AGTCCATACTATGAGTTGTTTAGATTATATGGAATGAAGCAGCATGGTCTTTTCGTGACAGATCTTGGGTGCA
TAAAAGTAGCCCAAGTTTCCAGCAAATTTGGGTCGTCAAGAAACAGTTTGACAATGATGCACGTCCGTGGA
CTAGGTGACAGGATTTATTGGTTCAAGATTTCGACGATGACTGCGACCGTGATGCAAAGCCGAGTAGCCACACGA
TAACACCCAGAGGAACTCCGGTATAAAAATTCAGGCGAGGGAGTATGTTGGGATAGAGGCGGCTTCAGAAGGCT
CGCGAAAATATATACGTTTCATCGATATATAGGCACTTGCAAACCTCCCGCTTAACTGCCCTACAGAGGAAAAGTC
TGTTTTATCAAACACTAGTGATCTTGTATAGTGATATTGTCTCTGAGAGGTGCGGCGAAGCTACGAGACAAATGA
GACGGCGCGGAGCCTTCCCATTATAGCGGAAATAAAAAGTTTGGAGAGACAAGAATAGCCGACGCTCCACGT
GAGGGCATGAGAGATAGGCGAAGCCTGTGCTCCTCACACGCACTCCGTGGTGTATCTAACGAAAAAAAACCTG
GTGGAAGAGTGTCTACTCGCGACATATCTCACATTTATAAATCACATGTCTGTTTTTTGACTAGAAGAAGAG
CGTGGAAGGATAATGAATAAGGGCGACAGAATTTGACTCCTCGGCAGTTTATTCTCTGTGCATTACGAATT
CTAAGTGAGTGCTACACGTTCTTTTGTGTGTCTATGTTGCTCGCGAAGGTGTTAGGAGGTGCGGGATACG
ACCATACACTTGTCTCGGAGTAGAAGAAGGCGCGCAACACACGAGAGAATTTTTCTCTTGTTTTTCTCATA
AGCAACGTCCACCAGAAATGGGTGGCGAGAGGAGGACACATTTCTGCTCGTAGCAAACGATGAGGGCAGAAAT
AGAGAAAACAGCCGCGCCATGATAGAATCGCGATACTTGTGGAGGGCGTAATTGTTTAAATTTATGTATCGCC
ATATGAATGATTCTTCCAATCATGATCGCTCTATCCCATCGAGGGAGTGCTAAAGTGAGTGCTTGTCTTAAACA
GCGTTTTCTTTATCGTTGAGTGACGATCGCAGAGAGACGGTTTTGAGAGGGTTATTTGTGTGTTGACCGTGGTTTT
TTGCGATCGGGGAAAGATTAATGCATAATGTATAGTGATAGCGTCTGTTTCATGTATGGAACCTCACGCACGG
ATACACAATCGAGTAGGACAATAGTGG

>Cepa W

ITS 4

ACTGGGGATTCCCTACCTTGAATCCCGAGGTCAACCTTAGAAAAATAAAGTTGGGTGTGCGCTGGCGCCGGCC
GGGCCTACAGAGCAGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTTCGGGCC
CGTCCCCCGGGAGAGGGGGACGGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGG
CATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTCTGCAATTCAC
ATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTG
ATTACGATAATCAACTCAGACTGCATACTTTTCAAGACAGCGTTTCATGTTGGGGTCTTTCGGCGGGCGGGGCC
GGGGGCGCAAGGCCTCCCCGGCGGCGCTCGAAACGGCGGGCCCCGCGAAGCAACAAGGTACGATAGACACGGG
TGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTAC
GACTTTTACTTCCAAAATGTGGTGTATTTTTTTTTTATTTATATTTTTGGGTTCGGGAGACGGAAGACGTAG
GCATAGGGCCGATATTGGCTGGAAGTGTGAGACGCGTGTGTCTGGGATGTAGCGGGAGGTGGTGGGAGGGTGG
CGGGCGTTGTGGAGGCCTGAGAGCGACCGAAAGTTGGGGAAGTGACAAGCGGGTAAATGACGGGACAGTCCAG
TCGTCGTGGGTCTAGCTGAGACGGAAGTAGATCTGAGGATAGGAGTGAAGGTGTTTCGCCCGCAAGGATGA
AAGATAGGACGATTGGTAAAGCTCGCAGCATATGTAGGTTAGCTGGGACGAGAGCTCGGTTGGAGTGAGGAAG
AGGGAGGGGTGGGTCTGTCCGTGGGTAGATTGCCCGGTAGGACGGTACGTGGGCCCGGTGGAGCGTGTAGGAG
TGACGGGAGGGGGTGGGGCCAGTGCGGGAGGTGCGTCAAGAGGTGGGTGCGGCCGGCGTGTAGTGA
GTCGGTCAGCAGATGTGTGGAGTCAACGGGGTGGTGGTCCGTGCCGAGGTGTGCGGTATATAAGGAAAGCAC
AGGATGCATAGATGGGATGGGCAGAGAGGATCGGCTGTGGCCCCGTAAGAAAGAGGAAAGGGACGTTCCGGTAC
GCTGCGGAATGGAATGAGGAG

ITS 5

CTTTTAGGGGAACCTGCGGAGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTCTATCG
TACCTTGTGTGCTTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCCGGGGAGGCCTTGCGCCCCCGGGCCCGCCCCG
CCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACCTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGT
CATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCA
GCGGCGGACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCTGCTCTGTAGGCCCGGGCCGGCGCCAGC
CGACACCCAACTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TAAGGCGGAGGAAAAGAGTGTGCGGGAGGGCTGAGTCTGCACCTGGTATAACAAGATGATCTCTTCGATGTATAT
GTAGGCACGGCCGGTAATCTGGCCGATGCTGAACGGGGAGGGGTGGCGAATCGCGGGCATCATGGTGTGCGAC
GCCATTGCGTAGGAGAACAGTTGGAGCACAGGTAGAGGAGGGGGCGGCGAGATGCCTAGTTAGTGGTGAAGG
TCGCACTTGTGCTAGCTCGACGACAGGCATCAGGGAGGCCGGGTATACGTCAGTGGATGCAGGGTGTGGAAG
AGATGGTACTAACGTTGGTGGGTAGGAGGCGAGTTAGTAGGGGTAGGGGCGGCTGGATAGGCTAGAGAGTAT
GGACAGATGGTATTATGTGTGAAAGGTACGTTGTAATAGTATGTGGTACGTCGTATGCGGATTGCAATGGGTA

AGGACGAGAGAAGGCTGGTACGGGACGAATATAGTGCGGTGTGCAAGGGCAATGGCGAGTTGAAGGTATCATG
ATTTTCGAATGCGTGTGTGCGTTTATCGTGAGTTGGTATAGCTACGGTCAGCAGTTAGGAACAGATGGGGTCTG
TTGGATGAAGGATCGAGGTCGCTGCGCCGGGCACGGATCGTATAGATGAGGTGTAGGCGTGACGGAAGCTAGG

>Cepa ALFA

ITS 4

GTGGGGTTTTTCTACCTGATCTGAAGGTCAACCTTAGAAGTTGGGGTTTTACGGCAGGGGCTCGCCGCTCT
CCGGTGCAGAAATATCACTACTACGCAGAGGAGGCTACAGCGAGTCCGCCACTAGATTTAGGGGACGGCCCGGG
CGTTAGCTCAGGCCGATCCCCAACACCACACCGCTGGGGCATGAGGGTTGAAATGACGCTCAGACAGGCATGC
CCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC
TTTTTCGATTTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTATTTGT
GTAATCCACTCAGAAATTCACTATAATAACAAGAGTTTAGGTCCCGCCAGGCAGGCCTGAATCCGGGGCACCGA
AGCGCCCGGGCAATCCTGCCGAAGCAACGAAGAGGAAAAATTCAGGGTTTGGGAAGTTTTAAAACCTCGAA
GATGAAACCTGCTGGGGTTCCCCCAAGGGATAACCGTGTAGGATTTTTTGTATGCAAAAAGAGATGAGGACAGT
GTATCGAATGGAAAGTACCGTTGCTGTGGAAGTGAAGATGTGGCAGTGGCAGTGGAGGGTGGTGTAGAGCACG
GATTGGAAGCGGTAGTAGAAGAGGAGGCCGTAGAAGTATGACGGTCGCTGTGCGATGATTCTGATGTCCGCTG
TCCGAAGTCGGAGAGACCAGGAAAGAACCCAGCATGGGGTGGCTCGTGGTAGGATGTAGAAAAGTAGGGGGG
CGGGGTTTCGTTGGAACGGATGACTGTATGCAGGGCGTGTGGAATGGGGTGTGGAAAGTATGCGATGCGGGG
GAATAGTGGTGCAGAGGAGAATCGCTTAGGTTAGGTGGCGACGGGTTGAGATGGGTGAGAGAAAAGAAATGTT
ACGGATCGGCGTGGACAGGCTCGAGTGAAGTACGACTCGCGAGGTTGCTTGGGGACTAGGTGGGTGAGGGAT
TGGGTAAAGGTTGTGGAAGGGGGAGAGGCGCTTGGCTGCGAGGTTGGAACCGAGGACAGCGATGGAGCGGAA
AGGATAACGGAGCAGGGTTGTGGCACTGGTTTTAGGGCGGTTCGATGGTGTGGGAATGGGGAGGGGGGAGGGG
GGAACGAGGGGAATACGTTGGATGCGTATTGATGCTTGCAATGTCTGGGCTTCTAGCGGGGTGAGACGTGTGG
GAGCGGAGGGGGATGGAGGAGACAAATGGAAACAAAAGGAAGTATGTATGGGGTTGTTTTAGAGGAGCGAATT
GCAAGAAATTTGGTATACTTCGTGGGGCTGTGAGATGAGGATGTACATAGTAGTTTTTTGGGTGCGCGTCATA
TGCGTGGTGGGTCTGGCGCGCGCATCGTGTCTGGTGGGAGACACATGAGGATTAGAAGTAGGAGGGACACACT
ATATAGTGAACACTAGGCAGGGTAGAACTGCGTGAACATGTGCCCGGAGATAGCGTCTGGGTGCGGTGCTGAG
AGAGTGCCGAGT

ITS 5

AATTTTTTTTTTACCCTTTTTCCGTTTCGTTCTTCATGATTGCCCCGGGCGCTTCGGTGCCCCGGATTTCAGG
CGCTGCCGGGGACCTAAACTCTTGTATTATAGTGAATTTCTGAGTGGATTACACAAAATAATCAAAACTTTC
AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAAAAGTAATGTGAATTCAGAAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTC
ATTTCAACCCTCATGCCCCAGCGGTGTGGTGTGGGGATCGGCCTGAGCTAACGCCCCGGGCCCTCCCTAAAT
CTAGTGGCGGACTCGCTGTAGCCTCCTCTGCGTAGTAGTGATATTTTCGCACCGGAGAGCGGGCATCCCCTGCC
GTAGAACCCCAACTTCTAACGTTGACCTCAGATCAGGAAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAACAGTTAAG
CTTCAAAGAATATAATAACCATAGACGATAGCGGAGAAGGTTGTTACACGATATCCGAAGACACAAGAAGATGT
CCCCTCGGCGTTGAAGTACACAAACTCTAATGATCTTATGTCGACAAGCTGTCTGTAGTTCTCTCCGTATAGT
AAGATCGAGGGCGCATAGACGACTATACTACGGCAGGTAATGCTAGGTCCAGCACGCCATATAAGGTACAATAT
AGTTACTGTATAGGCACAGCGAGTCGCTTGGCCGGATGTCGCACTTGTATGATGATTAGAAACGTCACAG
CTCCTAGGTCATGCTACAGTTCAAGATTAACGAATACGCTTACGCGACTCTACTGAATCCGGCATAT
GCGTGTAAAGGATCACGGTTACGTGATTACTGGACTTAACGATAACTGGCACTGCTGAATCGTGATGCACCAGG
TCGCCCCGAGATGCCAGATGATATAATCTGAATTATGCAGAGTATTGATTAATGTTTCCTTAAGATGTATAGAAT
TAGGTCTAAACGACCTGATGTATCGACTTAGCGCGCGATTTCAGCGTGTATCGTACATCAACGGTCTAGATGTGA
ATAGGCGGCTCTATGCTTGTAGAGATCAGCTCTAGATCGCGACTGTAGAAATAGTCGAGCTAGATGTATGATT
CGTCGTACGGTTGCAGTACAGTCTGTCGCGTAATACAGATCGGATCTCTAGTCTCGCCTAGCTGTGTACGCAC
AACAGCGCGGAGACAGACTAGAGACCTGTGTGTTGAGTTGCTGAGGATCACTATAATGCTGTGATGCAAC
AGTATCTCGCGCTATCGTTACCTTCGCGTCTACATACTCAGCCGCTCAGTCGAGTATATATGTGTTTTAGTGA
CAGCAGCTGTGAGTAGAGAGAGCATCAGCGGCTATAAGATAGCGATCGTTATAGCAAATCTGAGGATGCTGAT
CTGACTGAGGGTAAGTTCTATAGTCGTTCTTCGTCGTTTTTCTCGGCGGAGAGGAGGCTCGACGAGGATGACT
ACATTGCTGTGCAGGTAATGTAGTCTCTGGAGAACATCGTGTATAGATGGTGGCAGCTACATCAGACTCTGT
GTATCTCTAGTGAGAGCACTATAGCGACATAGCGTGGAGTCGCACACTGTGAGCTGTAGCTTGAAGTTTGCAGT
AACAGTAGTAGCGCGTGAGCGTCTGTGAGGACATGCGTAGCAGTGAGACATAGCGATGCGCTATCGTTGTGTGCG
CATCGCCTAAATATAATATCTGATATAGACGTAGCGAGCTTGAAGGAGCAGAGTAAGTCGCTGACTCTCAA
CATGTGTCCTGTCTTAGAGCGTGATATTTTTCTGTTATTATCATCAGTCTGGTAGGGAGCCTATCCAGACTCAC

ACTCGTAGAACTACAGGTCCAGATTCACTCACAGAAGTGAGACGATCGACTGATAGCTGACATGCGGAGTTGG
CAGCGTGTTCAGTAGCGATCGCTATCACTAGACAGGTGTTTCATCTACAGCGATACTTGTGTCCGTCTGCTAGT
ATATAGAGGCGTCTATGACACTACTCTGAGAATGTATCGAACATGGAGAGGAGTAATATCTAGAAGGTAGAGC
ATATATGGCGATCTCGAGCGTGGTTCTGGTCAGCGGAGTGAACAGGGCATAGCATACTAGAGATACATTGTGC
TGATTCCGCTGTCTGAGAGCACAGATCCGGATCTCGGCTTCGTAGTAGTCATATATATCGTGCAGCTATATA
CTCTCAGTGGTCTGCTACTGCTGTGCTGAGATCGACTAGACCTGTGCGAGCGATAGTAGAACAGCAGTATATTA
GATACAGCATGAAATACTGTACGCCAGTATGAGTTAGAGTAGAGTGAAGTGTGGGATGTGACATATATGCTGG
TGTGATGAGTGCACGTGTGTCTCGCTGGGGGTCACATCGCTGATGCAGATCTTTAAACATGAGAGTACTTATG
CGGCTAGTGGTACTGGCGTGCAGCATATGCGTCTGAGTAGCATGCAGTTGGTATATTATATAGCCGGGAGAACT
GAAGAGATACAGATCGTTAGAAGACTGGATAGACGATCGAGGTGTGCAATGTAGCTCGCGGAGCTTAGCAGTG
TGGAGATGTTTCGAGAAGAGTAGCATAGAA

>Cepa Escarlata

ITS 4

AGGGATTGGGGCTTTTCCCTACCTTGAATCTGGAGGTCACCTTAGAAGTTGGGGTTTTACGGCAGGGGCTCGCCC
CTCTCCGGTGCAGAAATATCACTACTACGCAGAGGAGGCTACAGCGAGTCCGCCACTAGATTTAGGGGACGGCC
CGGGCGTTAGCTCAGGCCGATCCCCAACACCACACCCTGGGGCATGAGGGTTGAAATGACGCTCAGACAGGC
ATGCCCCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACA
TTACTTTTTCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCTGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTGTGATTAT
TTGTGCAATTCATTCCCATACTCATAACTTTTTAGATTTTAAAGTAGCGTTCTAGGTACAAGGAGCAAAAAAC
TTTTTTTTTTTTTGTCAAACCTACCGAATCTTTTTTATTATCCTAGCGCAACAAAACAGTAGAATCTACAGA
GGATGCGTTAGTGGACACTACCATCTTGGGCATGCAGAAATATGCGGAAGATGTTTGTAAAATATCGGGCCTC
AGTCTGTATTATACAGATAGGTACGTTGCATTGCATCTTCCGCTGCATCTATTGAAGCGTGATACCGACCAAT
GGTCGAGTGCACAAGAGGGTATATTAGAATTCCTTACTAATAGCTGTTGGGGTGTCTGAATCTCCTGGTAACT
GTACACTTCGATCCTTTCAACATCGTGAAAGGCCCTCCATGAATTTGGTTGGTTTACGATTAAGTTCGTTGGT
GGACCTCAGGCTAGTCCCTGATCTAATGACTCCCACCGCTTATCAAGGATGTTACAGCAAAATAGCGGCCTT
CCCCAATTGACTCCATTGCGTTACACATTTTCAGACTTCCCTGGCTCTTTCGCATTTTTTTCAAATCGGATTCTTCT
TTCTTCGCCGATATCTTGCCACGCACGAATGGATTTCGTA AAAACTCTTATAACTCGAATACGCGCATCCGCGAT
CTCCAGTAGATAAAAAGAACCACGCTCTTACACGAGGAACGCGGGGGCTCCTCGAAGAAAAAACCAACTACAT
GTTCCCCGTAAGCCAGGAAGTATAGAGGAAGAGACCCCTGTTTCGCGCTAGTATATGAGGAAGGATACTTTATG
TACACACCCGCTATCGTTTCGTTCCCCATTTTTTCATCGTAGATGCTAGCACGGCTACATTATCAACAACACTCT
GATATTGTCTCTAAAACGTA AAAATAGACGAGGATATAGGCCAACTCCATTATCGCGAACTTGGTTGTCTCGC
CTTTTGAGGATTTGTGCAAAAACAGTCAATAAGTATGGAAGAGGAAGGGTATGTTTTTTCTTTTGTTTTCTC
TTCTTGCAGGGGATATTTTGTCTCTCCATGGGGACAATAGAACATAATAGATATCTCGAACAATTGGGTGGA
TCAAGATGAGAAGAAGAAGGCTGCTCGTCTATGCTGAATTTACTTCATGCAGCTCGGTAAGAATAATGTCCTA
GCGGGGAAGAGGAAGAAGCTCGTCTATTCTCTTTTCTGTCATACACAAAATTGGAAGTGATATAAAAAACTGGC
GCCACACACTCAGCCCAGTCTGTGGGATTTTAGCTAACAATGATACTCTTATATGGATTGAACACTCCTCTTC
GACTTCTCCCCAGCACATCATATCCCAACCCCCGATGGTGTGTGGGGAGATCAGAGTGGCGAGAATAGAAGAA
GCGTTTCTCATATCTGGTTGATCCTCTGGCGTGGGGGAGAAATAATGTCACGATAAGCGATCAGTAACGGGGA
TGTCATTGTATTACTACCCATTCGGAAGGGAGTCAAGCAAACATAACAGATAATACGATATATGACGCCTCGC
CGCTCGATCTTTATATCGAGTTAGTGCAATGTCGTCGCGCATCTTGCAATCTTCAAATGACATGTAGTTAA
TCGAGT

ITS 5

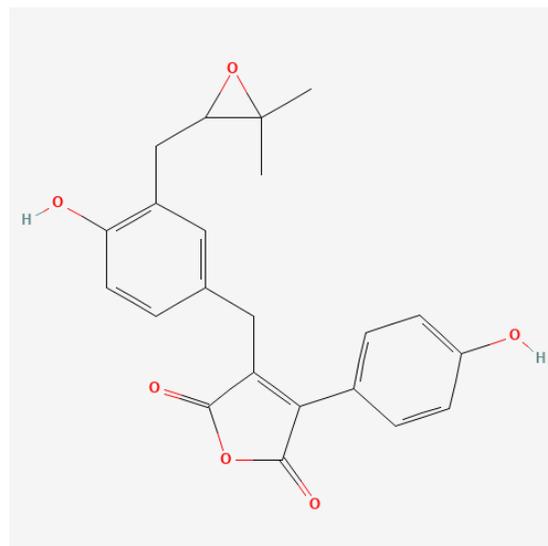
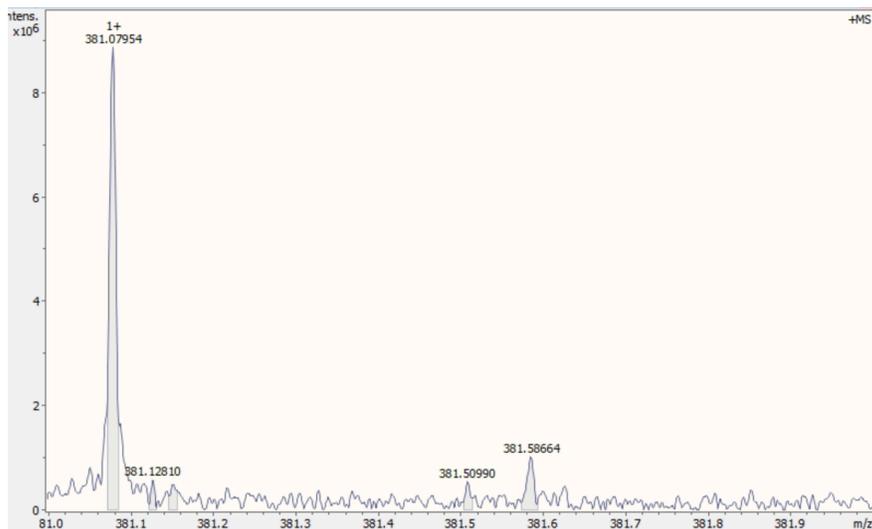
GGGGCTGCTCTCTCATGTGAGGAATTCGGAATCGTTCGACCTGGGCATTAATGCGTAGCTCGCGTTCCGTGCAA
GTTAGCGGCAGACGGCTCCTCTAGCACTGTGCTGTAACCTCTCCTGTAACACTGGTGATAGCTCCTGTCAACC
CCTGGACCTATACGGACATGCTTCTGTAAACCGGGTGGGTTCAAACATAACATTGCGCGTGACCATGATGTCAT
TTAATTATTGTAGGTTCTGCGTGACCCCTTAGTGGTTGCTGAGGTACCTGTTGAGGGATTCTTAATAGACTGTT
TCCGGCTCTGAGCCGTTCTATATAGTGTCTTGTGACTTGACATACAGTCCCTCCCTTTGGGGGGTTTAGTAT
TTGCATACCTCTGCGCCACTATTGCTCTGTGATGTGGATATAGCATTCCCTGTGTTCCATGATCTATTTTCCCT
TTATTTAGGTTAGCTTCTTACAAGTGTGGATTACTCGATTTCTGTTGCTTTTTTGGGAGCTCTACTGGCTTCC
CCATGTTTTCATCTCTTAGCGCTGCTTTGCAGCATGTTGGCCCTCTGGATGAGAGCACACGTTTGCACCTCTCG
CTACAAGTGTTTTTCTAGCATGATATAGGCTTACAAAATGGTTCTGTTGCCGCTTCGCTTCCCACTATACAGCC
TTATATAGTATAACCGAATGATGCTGCTGCCCTCATCCATCTCTCTTACAGCAGTCTGCTGCTGTCGACCTCAT
GTCCCATCTTCCCTGTGGTGTATATCGTTCCGACACTTACAAGCGCGAGAATGTGGCTAAGTCTTGTGTCAAT

CACTTCGAGCTTCCCCTTTGTAGGCTCTTTAGAGACCGTTGCGACGATGCTTATGGGATAGTTCATGTCTTGT
CCTTGTTAATTGCCACACTTATTAGGGAGATCCATGAGTACCGCTCCCCTTTATTCTGTGGTTGTCAGCAG
GTACAGCCTTGAATTTAAAGGGTTACTTCACTGGTCCCCTACTGTATTCTAATGATTAAGCTTTTGAAGTGT
AGATTGACTGTGTTAAGGCAGTCATATGATGGTCTCCTCATTCCATTGGCCTAGGCTCCCCATCTGGTTTTAT
CACACCCTGACGGTCTGAATTGCCCTTACCTAACTGTGTTGTACGAGTGGGCGATGTGCTCAAGTCCCCT
TGTTTCTGGATTTTCGATTCGCTGTAACATGGGATGTTCTCCTGGATCTACCTCGCGACGAGGTTTACAGTGTA
CTCATTCTTAATGAGGGGATTATGCACACTCATGCTCTTCGTTTTCTCCCATCATCCTCTGCCACTGGTTTTAT
GCCACTTTTTTTTTGATATTTCGTGGTGGTAGAATATATCGTCCCCTCCCTACTATCGTCTCTTATTTCTTAGT
CTATTATTGTCGATAACATCATCGATATCATTGGACCGCTCGCCGGCGTTCACTGTTTTCCGTGGTACACTGA
ATCCGCGGTGGGCGCGTCACGTGAGAGTGATGTACATCTGTCTTTGACGACTTGCGCGGTGCGCGTATGTTTCG
TTCCTGGCGACATCGGATTATGTTGTATAAATTCAGCGTATTACTCACCTCTTCTCTGACACGGGTGTCACAT
CCACATAATGTATATCAGGACGGTGACGACGCCTTTCTGGTTGCATCGTTCGTCATTTCAGTTGGCCGAACATG
ACGCAACGCTTCTGTGTGGGATATCTACACTGGTTCGGAACGTGGGGCA

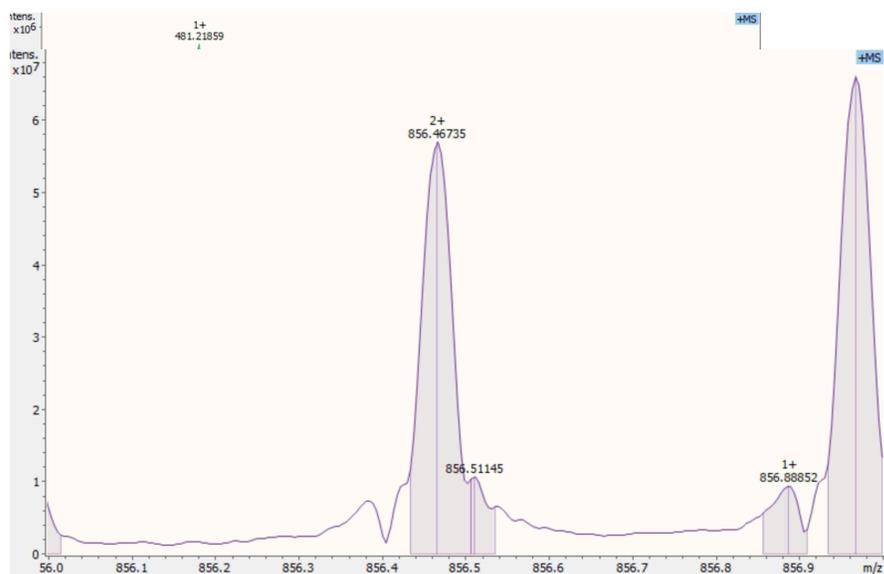
ANEXO 4

Picos de masas de los aductos identificados.

Asperjinone ($m/z = 381.07954$)

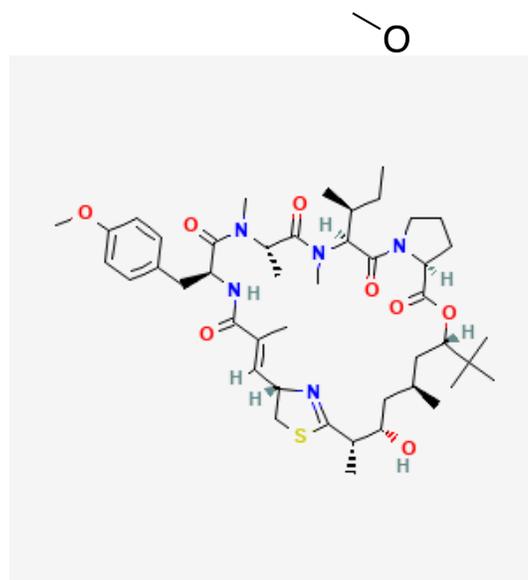
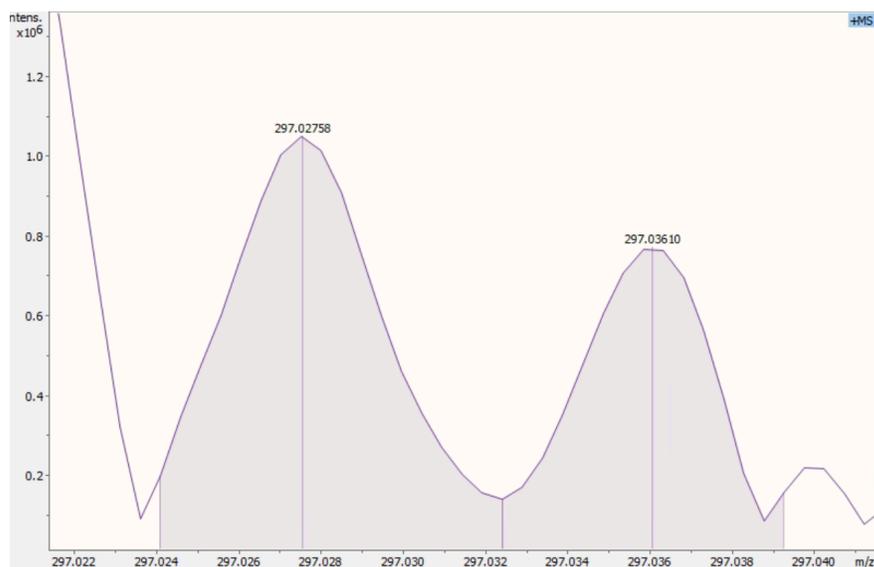


Arisugacina (m/z = 481.21859)

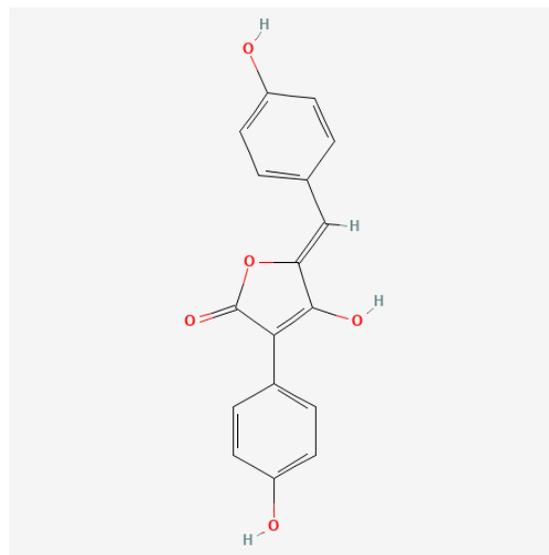


46735)

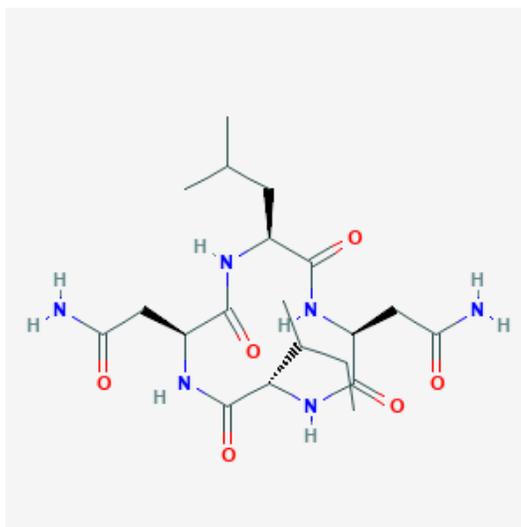
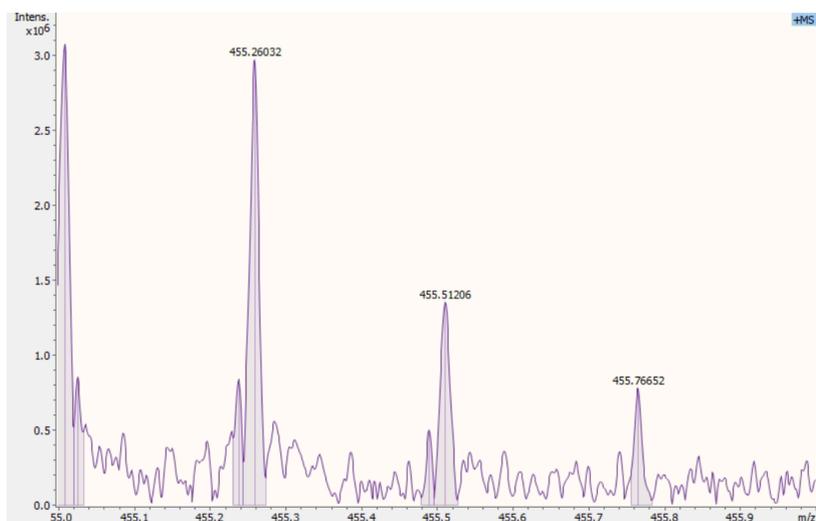
Aspulinona E (m/z = 297.02758)



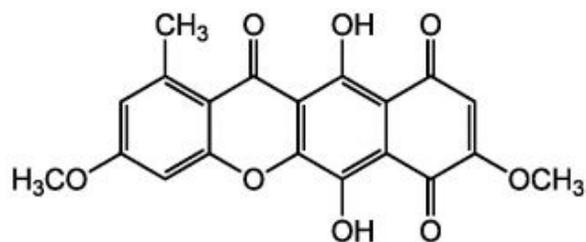
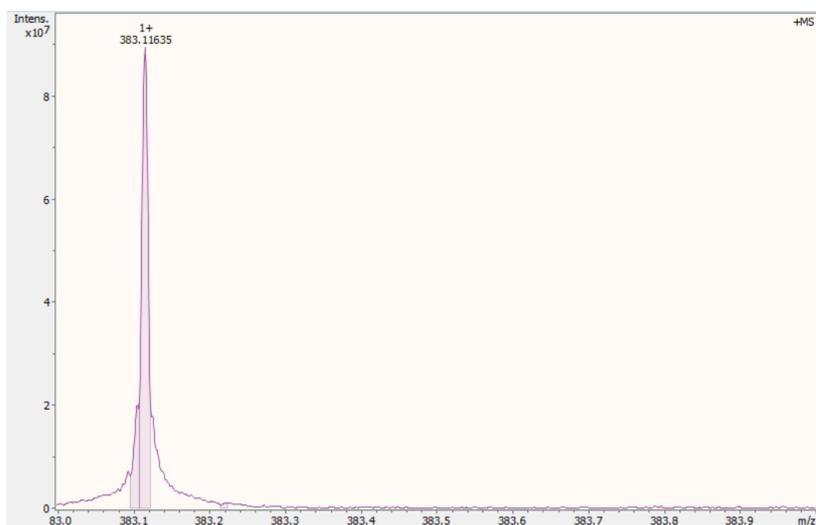
Apratoxina A (m/z = 856.



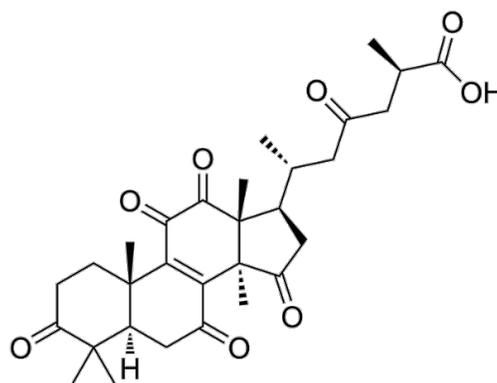
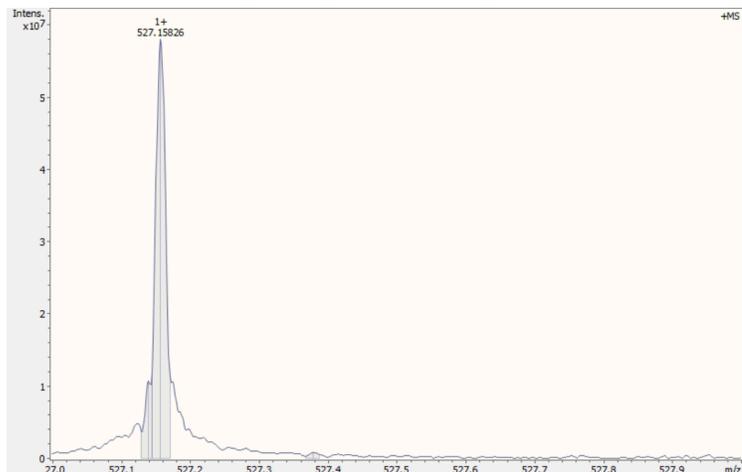
Estafilopéptido A ($m/z = 455.26032$)



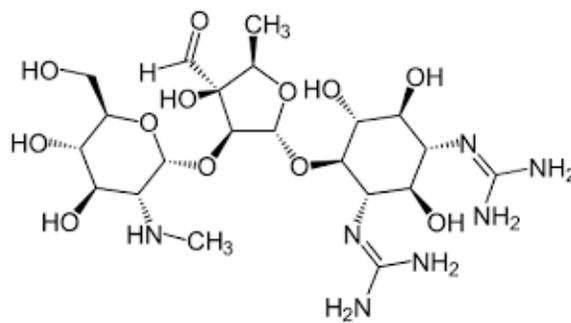
Bikaverina ($m/z = 383.11635$)



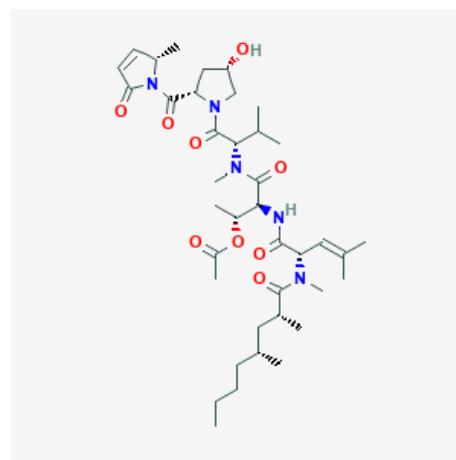
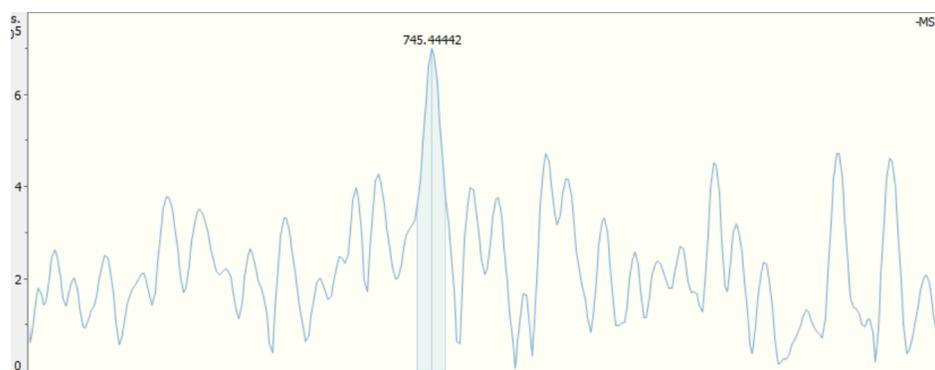
Ácido ganosporérico A ($m/z = 527.15826$)



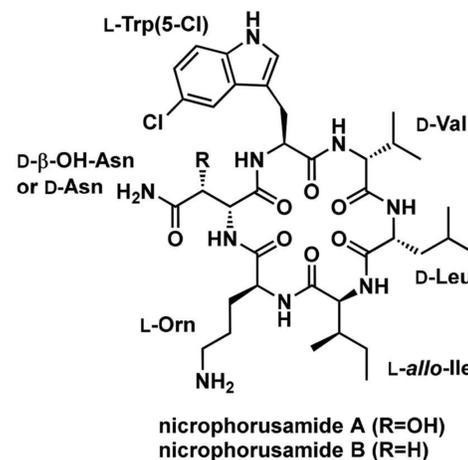
Estreptomicina 3" Fosfato (m/z = 661.15422)



Microcolin F (m/z = 745.44442)



Nicrofurosamida B (m/z = 808.39238)



Productos de trabajo obtenidos.

- Constancia emitida por La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, por la participación en la sesión de carteles con el trabajo "Aislamiento de hongos endófitos de Taxus sp."
- Constancia Expo UAM-I 2023 por la plática "¿Qué hongo con los hongos y lo que producen?"
- Constancia emitida por la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Facultad de Ciencias de la Salud, por la plática "La importancia de los hongos que viven dentro de las plantas"
- Constancia por parte del Colegio Español, plantel La Loma, Tlaxcala, por la plática "La importancia de los hongos que viven dentro de las plantas"



Búsqueda de hongos endófitos de *Taxus sp.* productores de compuestos bioactivos.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 7 del mes de noviembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO
DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA
DR. YAIR CRUZ NARVAEZ
DRA. WYLMA DOLORES PEREZ PEREZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA
DE: GERARDO DIAZ DOMINGUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

GERARDO DIAZ DOMINGUEZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

VOCAL

DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA

VOCAL

DR. YAIR CRUZ NARVAEZ

SECRETARIA

DRA. WYLMA DOLORES PEREZ PEREZ