



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS Y
RIZOSFÉRICOS EN CHOLUPA (*Passiflora maliformis*) PROCEDENTE DE
RIVERA, HUILA, COLOMBIA**

**Geraldine Duarte Romero
María Angélica Quiñones Leguizamón**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de Grado**

Bogotá D.C, 2025



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS Y
RIZOSFÉRICOS EN CHOLUPA (*Passiflora maliformis*) PROCEDENTE DE
RIVERA, HUILA, COLOMBIA**

APROBADA:

JURADOS:

- –
- –

ASESORA INTERNA: PhD. Martha Lucía Posada Buitrago

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de Grado**

Bogotá D.C, 2025

Dedicatoria

- A nuestros padres, quienes son los pilares de la vida, por su inagotable amor, apoyo y sacrificio, que hicieron posible este logro.
- A nuestros hermanos por su cariño, aliento y compañía constante a lo largo de este proceso.

Agradecimientos

Agradecemos infinitamente a Dios por habernos dado la fortaleza, la sabiduría y la perseverancia para superar cada obstáculo. En segunda instancia a nuestros padres, quienes siempre nos brindaron su amor incondicional y apoyo constante; su fe en nosotras nos impulsó a alcanzar este logro. A la docente asesora, Martha Lucía Posada, agradecemos su apoyo y guía académica, su conocimiento y orientación fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo. A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; al semillero de investigación Neonature y al grupo Ceparium, por facilitarnos los recursos que fueron esenciales para la realización de esta investigación. De manera especial al trabajo en equipo que se vivió durante cada proceso, el compañerismo y amistad enriqueció significativamente este trabajo.

Tabla de contenido

1. Resumen	5
2. Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
3. Introducción	7
4. Antecedentes.....	8
5. Marco teórico	16
5.1 Hongos endófitos	16
5.2 Importancia ecológica de los hongos endófitos	17
5.3 Metabolitos secundarios.....	19
5.4 Hongos rizosféricos	21
5.5 Diferencias entre hongo endófito y rizosférico.....	21
5.6 Cultivo de Cholupa	22
5.7 Microbioma identificado.....	23
5.8 Interacciones Planta-Hongo.....	24
5.9 Métodos de aislamiento de identificación de hongos en muestras ambientales.	24
Métodos convencionales.....	24
Recolección de la muestra:	24
6. Diseño metodológico.....	32
7. Resultados.....	35
Aislamiento microbiológico	35
Identificación molecular	37
8. Discusión.....	41
9. Conclusiones	49
10. Referencias.....	51

1. Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo aislar e identificar hongos endófitos y rizosféricos asociados a la planta de Cholupa (*Passiflora maliformis*), cultivada en Rivera, Huila (Colombia), con el fin de caracterizar su diversidad y explorar su potencial biotecnológico. Se recolectaron muestras de raíces, hojas, flores y suelo rizosférico de plantas sanas y enfermas. Para el aislamiento de los hongos se utilizaron medios de cultivo selectivos (PDA y Sabouraud) y técnicas de desinfección superficial. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN y la identificación molecular mediante amplificación de la región ITS del ADN ribosomal por PCR, seguida de secuenciación tipo Sanger. Los análisis bioinformáticos a través de BLAST permitieron identificar diversas especies pertenecientes a los géneros *Naganishia*, *Candida*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Algunos de los hongos encontrados presentaron un potencial biotecnológico relevante, como actividades antimicrobianas, capacidad promotora del crecimiento vegetal y propiedades de biocontrol. Los resultados obtenidos sientan las bases para futuros estudios enfocados en el aprovechamiento de la microbiota fúngica en el manejo sostenible de cultivos de pasifloras y en la mitigación de enfermedades como la causada por *Fusarium* spp.

2. Objetivo general

Identificar hongos endófitos y rizosféricos de la Cholupa (*Passiflora maliformis*)

Objetivos específicos

1. Aislar hongos a partir de la rizósfera, raíz, tallo, hojas y flor de la planta de Cholupa.
2. Identificar los hongos aislados por medio de técnicas moleculares.
3. Determinar el potencial biotecnológico de los hongos identificados provenientes de las muestras de Cholupa con base en revisión de literatura.

3. Introducción

El cultivo de pasifloras en Colombia se ha consolidado como una actividad agrícola de importancia para pequeños agricultores. Estas plantas se encuentran en 24 departamentos y 422 municipios con más de 15.000 hectáreas (3). Dentro de este panorama el departamento del Huila destaca por ser líder en la producción de pasifloras aportando más del 50% de la producción nacional. La Cholupa, con denominación de origen huilense, en el año 2013 registró un total de 154 hectáreas sembradas con una producción de 1.634 toneladas, es decir, el 66 % del total producido en toda Colombia en ese año (4). Sin embargo, desde el año 2018 en el departamento del Huila se han reportado problemas sanitarios y disminución del sistema productivo de las pasifloras debido a la aparición de la enfermedad “la secadera”, producida por hongos del género *Fusarium*, perjudicando en su mayoría al Maracuyá y la Granadilla, afectando de manera casi irreversible los suelos infectados por el patógeno (5). Hasta el momento no se ha reportado la enfermedad en cultivos de Cholupa, sin embargo, en Rivera (Huila) hubo una pérdida de productividad de la Cholupa por síntomas relacionados.

De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en el periodo comprendido entre 2007-2018 hubo una pérdida significativa en el rendimiento de la Cholupa, esto se puede observar en la relación tonelada por hectárea (ton/ha)¹ cosechada (rendimiento), por ejemplo, en el 2011 hubo un registro 10.56 (ton/ha), en comparación al año 2018 con un rendimiento de 7.23 ton/ha (6). A pesar de esta tendencia, las causas específicas de esta pérdida aún no han sido determinadas. Este vacío de información limita la comprensión de las interacciones entre los microorganismos presentes en los cultivos y su impacto.

1

En este contexto, surge la necesidad de investigar los hongos endófitos y rizosféricos asociados al cultivo de Cholupa como una estrategia para identificar factores que podrían estar contribuyendo a su rendimiento. Este enfoque permite identificar tanto especies patógenas como benéficas asociadas al cultivo, lo que es un avance significativo para comprender mejor las dinámicas microbiológicas que interactúan en esta planta. Aunque no se determinan las causas directas de la pérdida del rendimiento, los resultados obtenidos sientan las bases para futuros estudios orientados a mitigar los efectos negativos y aprovechar los beneficios potenciales que algunos microorganismos pueden ofrecer al cultivo.

4. Antecedentes

A continuación, se presentan los principales trabajos de donde han sido aislados e identificados hongos endófitos y rizosféricos de pasifloras como de otras especies vegetales.

Ortiz et al. (2014) en un estudio sobre las características histopatológicas de diferentes tejidos afectados por los patógenos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en el maracuyá morado *Passiflora edulis* Sims, describen la distribución de cada patógeno en diferentes tejidos vegetales, su colonización y las alteraciones tisulares que producen la infección en la planta. Esto lo hicieron mediante la obtención de tejidos de plantas de maracuyá recolectadas en la zona de Venecia (Colombia, Cundinamarca). Realizaron una inoculación artificial en la cual las plantas de maracuyá morado de 2 y 4 meses de edad se inocularon con cepas de *F. oxysporum* (códigos A54, A64) y *F. solani* (código A62). Posteriormente realizaron los análisis histológicos de la raíz, el cuello y el tallo, con ayuda de tinciones especiales como safranina - verde rápido, ácido peryódico, evidenciando la colonización

de *Fusarium oxysporum* en todas las plantas de maracuyá corroborando la capacidad del patógeno para colonizar por medio del sistema radicular y colonizar la planta por su sistema vascular, este sistema de colonización vascular también ha sido descrito en plantas como el tomate y guisantes susceptibles a *F. oxysporum*. En los análisis del tallo se evidenció que no hubo colonización por parte del patógeno, lo cual fortalece la idea de que tiende a colonizar el collar de la planta. Por último, se pudieron observar la respuesta de defensa de la planta observando hifas y microconidias en la luz de los vasos como la formación de geles que constituyen la defensa de las plantas para limitar la propagación del patógeno (7).

Forero et al. (2015) en su estudio en el Huila, Colombia, evaluó la resistencia de *Passiflora maliformis* a *Fusarium oxysporum*. Plantas obtenidas de semillas de Cholupa fueron inoculadas con el patógeno a los 2.5 y 19 meses de edad. Se observó marchitez vascular más severa en las plantas jóvenes, pero la especie mostró cierta resistencia mediante la producción de geles y engrosamiento de paredes vasculares. Los resultados sugieren la selección de linajes de *P. maliformis* como una alternativa promisorio para el control de *Fusarium* en cultivos (8).

Sabogal-Palma et al. (2015) investigaron las características bioquímicas de la cáscara, semilla y arilo de *Passiflora maliformis* (Cholupa) del Sur Macizo Colombiano en comparación con *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, con el fin de determinar su potencial bioactivo y agroindustrial. El análisis fitoquímico reveló compuestos bioactivos como taninos, antociánicos y antioxidantes en la Cholupa, con una mayor actividad antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* que el maracuyá, además de actividad antifúngica contra *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. El estudio concluyó que la Cholupa, debido a su

riqueza en fitocompuestos, posee un gran potencial para aplicaciones industriales y medicinales (9).

Berna et al. (2018) investigaron en Tunja, Colombia, la capacidad morfogénica de embriones cigóticos maduros (EZM) de Cholupa para generar embriones no cigóticos y regenerar plantas. Utilizando semillas de *P. maliformis* de Boyacá, se indujo embriogénesis en explantes jóvenes mediante un medio B5 suplementado con reguladores de crecimiento, donde la luz, la oscuridad y el carbón activado jugaron un papel crucial. El estudio demostró el alto potencial embriogénico de los EZM de Cholupa para inducir embriogénesis no cigótica bajo diversas condiciones, lo que podría servir como base para investigaciones similares en otras especies de *Passiflora* con diferentes objetivos. (10).

Molano et al. (2020) estudiaron la fenología del crecimiento de la Cholupa en Rivera, Huila, Colombia, midiendo semanalmente variables vegetativas y reproductivas en plantas de la zona y aplicando modelos logísticos sigmoideos y análisis estadísticos. Utilizando la escala BBCH, describieron detalladamente las etapas de crecimiento del tallo, hojas, flor y frutos. Este primer ensayo de descripción fenológica en Cholupa resultó eficiente para predecir la cosecha y establecer prácticas agronómicas efectivas para programas de cultivo. (11).

Ramírez et al. (2017) investigaron los patógenos del maracuyá morado en Antioquia, recolectando muestras de frutos maduros e inmaduros para aislar microorganismos en diversos medios de cultivo. La identificación taxonómica, mediante análisis morfológicos, moleculares y pruebas de patogenicidad, reveló a *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* como un patógeno significativo, aislado de frutos dañados. También se identificaron *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* en frutos con manchas y *Phytophthora*

drechsleri como causas importantes de deterioro en el maracuyá morado, junto con la bacteria *Xanthomonas axonopodis*, previamente reportada en Colombia. El estudio concluyó que *P. nicotianae* var. *parasitica*, *C. gloeosporioides sensu lato* y *P. drechsleri* son las principales causas de deterioro en el maracuyá morado en la región estudiada. (12).

Cruz et al. (2019) analizaron las comunidades bacterianas y fúngicas de las cáscaras de cinco frutas tropicales silvestres de Brasil (plátano, guayaba, mango, papaya y maracuyá) mediante secuenciación de ARNr 16S y la región ITS del ADNr para ampliar los perfiles taxonómicos y mejorar las prácticas postcosecha. Los resultados revelaron una mayor abundancia de *Streptomyces mashuensis* en la cáscara de maracuyá, donde también predominaron los hongos *Sordariomycetes* y *Dothideomycetes*. El estudio demostró que la abundancia, diversidad y composición microbiana variaron según el tipo de cáscara y el sistema de producción, con una mayor abundancia de bacterias (Actinobacteria y Proteobacteria dominantes) que de hongos, y una mayor riqueza de OTUs en plátano y guayaba. Esta investigación logró diferenciar la comunidad bacteriana a nivel de clase y la diversidad fúngica a nivel de filo (13).

Park et al. (2020) investigaron en Australia los posibles atrayentes de machos de la mosca *Bactrocera jarvisi* en flores de *Passiflora maliformis*. Mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas de extractos florales (separados por partes internas y externas), identificaron compuestos como terpenos, ácidos grasos y fenilpropanoides, incluyendo la zingerona. La detección de zingerona y otros atrayentes de moscas de la fruta a lo largo del día apoya la hipótesis de su rol en la atracción de insectos. Los compuestos identificados podrían también tener funciones de defensa y su producción varía según la etapa floral y factores ambientales. El estudio concluyó que la zingerona atrae a ciertas moscas e insectos

polinizadores, explicando la interacción entre *P. maliformis* y *B. jarvisi*, aunque se requiere más investigación sobre el papel específico de este compuesto en la polinización de la Cholupa (14).

Dos Santos et al. (2020) en Brasil aislaron hongos endófitos del maracuyá amarillo con potencial biocontrolador contra *Colletotrichum* sp. A partir de hojas sanas de *Passiflora edulis*, aislaron e identificaron molecularmente hongos endófitos, demostrando su actividad antagónica in vitro contra el patógeno. Los resultados resaltan el potencial de estos hongos endófitos como herramientas sostenibles y eco-amigables para el biocontrol en la agricultura, con métodos de inoculación sencillos. (15).

Hurtado et al. (2020) investigaron la población de hongos endófitos en diferentes tejidos de Gulupa en tres cultivos comerciales de Cundinamarca y Boyacá, así como su potencial antagónico contra *Fusarium* sp. Encontraron hongos endófitos con mayor prevalencia en raíz, hojas y tallo, siendo los géneros más comunes *Trichoderma*, *Fusarium* y *Mucor*. Se destacó la producción de ácido indol acético y la solubilización de fósforo por algunas especies, especialmente *T. asperillum*. In vitro, varios aislamientos de *Trichoderma*, *Chaetomium* y *Mucor* inhibieron significativamente el crecimiento de *F. oxysporum*. En invernadero, la infección por *Curvularia penniseti* incrementó la biomasa y el contenido de clorofilas. El estudio concluyó que la Gulupa alberga una diversa comunidad de hongos endófitos con potencial bioactivo, variando su composición según la ubicación del cultivo (16).

Zhang et al. (2021) investigaron la influencia de la diversidad fúngica del suelo de la rizósfera y su estructura comunitaria en la pudrición de la raíz del trigo en una zona con

historial de la enfermedad, identificando a *Gaeumannomyces graminis*, *Pellicularia rolfsii*, *Rhizoctonia cerealis* y *Fusarium oxysporum* como patógenos principales. Mediante secuenciación de ADN fúngico del suelo de la rizósfera de plantas enfermas y sanas, observaron que la abundancia de la mayoría de los géneros fúngicos diversos disminuyó desde la formación de espigas hasta el llenado del grano, mientras que géneros de baja diversidad como *Fusarium* y *Ceratobasidium* aumentaron significativamente. El análisis del suelo reveló que un bajo pH, alta densidad, y altos niveles de nitrógeno amoniacal y nitrato, se asociaron con la aparición de la pudrición de la raíz. El estudio concluyó que, si bien en etapas tempranas puede haber diversidad fúngica, las condiciones químicas del suelo como el nitrógeno y el pH bajo contribuyen significativamente al desarrollo de la enfermedad (17).

López et al. (2022) investigaron en Manizales, Colombia, la influencia de *Passiflora maliformis* como portainjerto en el maracuyá morado, analizando características físicas del fruto, productividad y rentabilidad. El diámetro del fruto no varió significativamente, pero el peso del fruto y la cáscara sí mostró diferencias entre las combinaciones de plantas, con las injertadas presentando mayor absorción de agua. El análisis de costos reveló rentabilidad positiva solo en la combinación de maracuyá morado con Cholupa dos años después del inicio del cultivo, a pesar de que los frutos injertados cumplieron con criterios de calidad comercial con rendimientos superiores al 50%. El estudio recomienda ajustes en el manejo de enfermedades para mejorar la rentabilidad en otras asociaciones (18).

El estudio de Liu et al. (2022) investigó la diversidad de las comunidades microbianas de la rizósfera y endófitas de *Stipa purpurea* en tres sitios de la meseta tibetana. Se analizó la correlación de estas comunidades con factores ambientales del suelo, así como la influencia

de las propiedades físico-químicas del suelo y la actividad enzimática microbiana. Se encontraron diferencias significativas en las comunidades microbianas entre sitios y tejidos (hojas, raíces y suelo). Los filos dominantes fueron Ascomycota y Basidiomycota, ambos importantes en el ciclo del carbono. Basidiomycota fue más abundante en el suelo de raíces y la rizósfera de las hojas, mientras que Ascomycota, típico de ambientes hostiles, mostró una asociación negativa con varios factores del suelo y enzimas. El análisis de RDA reveló asociaciones positivas entre Zygomycota, Cercozoa, Glomeromycota, Chytridiomycota y Rozellomycota con la altitud, actividad enzimática (deshidrogenasa, fosfatasa alcalina y neutra) y nutrientes disponibles (kalium y fosfato) (19).

Salazar et al. (2022) en la investigación realizada en varias fincas de los municipios de Ancuya, San Pablo y Guaitarilla, Nariño Colombia, buscaron determinar la diversidad genética de diferentes especies de *Fusarium* implicadas en la enfermedad relacionada con el marchitamiento y la pudrición del maracuyá. Se recogieron 50 muestras aleatorias de diferentes fincas en estos tres municipios de donde se obtuvieron muestras de *Passiflora ligularis* con signos de daño en las diferentes partes de esta planta, las cuales se empacaron en bolsas tipo *ziploc*. Luego se realizó aislamiento de hongos realizando cortes a tejidos enfermos y sanos previamente esterilizados en hipoclorito y etanol, los cuales fueron sembrados; para la obtención de aislados puros se realizaron diluciones de las cuales se obtuvieron conidias que posteriormente se observaron al microscopio. Luego de estos ensayos se realizó identificación molecular y electroforesis. Como resultado se obtuvieron 35 aislamientos en donde se pudo observar diferentes colores en las colonias que tuvieron un aspecto algodonoso, evolucionando a color morado con el crecimiento del hongo. La mayoría de estos hallazgos son compatibles con *Fusarium oxysporum*, siendo este, aislado de los tres municipios de Nariño donde fue realizada la investigación. Esto permitió

concluir que *F. oxysporum* es el patógeno que causa el marchitamiento vascular en la fruta de la pasión (20).

Wang et al. (2023) investigaron las comunidades fúngicas y bacterianas en suelos de cultivo continuo de maracuyá (cultivado, no cultivado y rizosférico) en Guandong, China, buscando estrategias contra *Fusarium*. Se utilizaron diferentes pasifloras injertadas con estiércol y se recolectaron muestras de los tres tipos de suelo, incluyendo la rizósfera de maracuyá morado y amarillo. El análisis genético reveló una mayor biodiversidad bacteriana en suelos cultivados, con *Bacillus* como el género más abundante, y diferencias menores entre las rizósferas de las dos variedades de maracuyá. Se destacó el género *Trichoderma* en la rizósfera del maracuyá amarillo, sugiriendo su papel en la resistencia a la pudrición del tallo. El estudio concluyó que el cultivo continuo de maracuyá altera la biodiversidad microbiana del suelo y que el injerto enriquece microorganismos en la rizósfera. Además, se identificó a *Trichoderma* como un potencial agente de biocontrol eco-amigable para reducir el uso de pesticidas y mejorar la calidad del cultivo (21).

Muñoz et al. (2023) investigaron las comunidades microbianas y los perfiles funcionales de la rizósfera de manzanos sintomáticos y asintomáticos con pudrición de la corona en Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Se utilizaron secuenciación de amplicones y metagenómica de escopeta para analizar muestras de suelo de la rizósfera de manzanos *Malus domestica*. La secuenciación metagenómica reveló una mayor diversidad bacteriana (39 filos, 451 familias, 1741 géneros) en comparación con la secuenciación de amplicones (23 filos, 196 familias, 507 géneros). En la comunidad fúngica, Ascomycota y Basidiomycota fueron los filos dominantes, con *Fusarium* y *Penicillium* como los géneros más prevalentes. *Mortierella* fue particularmente abundante en la rizósfera de árboles

asintomáticos. Se observó una diversidad microbiana heterogénea independientemente del estado de salud de los árboles, con *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Rhodanobacter* comunes en ambos grupos. Los resultados indicaron que las comunidades bacterianas alfa y beta variaron influenciadas por factores bióticos y abióticos en el nicho ecológico de la rizósfera, dependiendo de la salud de los árboles. (23).

5. Marco teórico

5.1 Hongos endófitos

Un hongo endófito se define como un microorganismo que reside dentro de un huésped sin causar daño aparente y lo hacen mediante una variedad de relaciones simbióticas hasta ligeramente patógenas (17). Antes el término se restringía a microorganismos como bacterias y hongos, sin embargo, se ha ampliado el concepto refiriéndose a bacterias, hongos, algas e insectos, en donde se ha encontrado con mayor frecuencia los hongos como endófitos. El “endofitismo” se refiere a una relación no invasiva de costo-beneficio, asintomática y transitoria definida por su localización establecida dentro de los tejidos vivos de la planta hospedera (18).

Clasificación: Los hongos endófitos son principalmente miembros de *Ascomycota* o sus hongos mitospóricos (que poseen reproducción asexual únicamente y micelio septado; también se han encontrado en *Basidiomycota*, *Zygomycota*, y *Oomycota* (18). Históricamente se han clasificado en dos grupos: clavicipitáceos que se encuentran en plantas gramíneas como pastos y los no clavicipitáceos que se encuentran en sitios asintomáticos de plantas no vasculares, helechos y plantas relacionadas, coníferas y angiospermas (19). Los hongos de clase 1 (*clavicipitáceos*) se encuentran dentro de la familia *Clavicipitaceae* se relacionan filogenéticamente y se transmiten de forma vertical,

de manera que las plantas madre transmiten hongos a las hijas por medio de semillas infectadas. Las funciones que se han descrito constituyen el desarrollo de biomasa de la planta, producción de tolerancia a estrés ambientales como la sequía y producción de productos tóxicos para animales que atacan la planta.

Los *clavicipitáceos* se dividen en tres grupos. Tipo I: incluye hongos sintomáticos y patogénicos que se propagan por ascosporas, esterilizando al huésped. Son heterotálicos y requieren transferencia de espermacios entre tipos de apareamiento para poderse reproducir. Tipo II: se producen en gramíneas en forma de cuerpos fructíferos e inflorescencias de la planta descrito como un mecanismo de interacción mixta, por esta característica se denominan como *simbiontes pleiotrópicos* porque se transmiten de forma horizontal por esporas y vertical por semillas. Tipo III: se encuentran dentro del tejido vegetal durante toda la vida incluso cuando florece el hospedero y su ciclo de vida es asintomático, no producen esporas sexuales lo cual limita la recombinación genética del hongo, se transmiten de forma vertical a través de semillas por crecimiento de hifas en óvulos de desarrollo favoreciendo las relaciones coevolutivas (19).

Los no *clavicipitáceos* se dividen en tres clases según los patrones de colonización, mecanismos de transmisión entre los huéspedes, la biodiversidad *in planta* y la interacción con el hospedero. Los de clase 2 pueden crecer por encima o debajo del suelo con diversidad limitada, se transmite vertical y horizontalmente confiriendo tolerancia a la planta a estrés abióticos. La clase 3 están restringidos a sitios encima del suelo presentando mayor diversidad. La clase 4 coloniza extensamente la raíz y no se ha determinado su diversidad. Estos dos últimos se transmiten de manera horizontal (19).

5.2 Importancia ecológica de los hongos endófitos

Los microorganismos endófitos representan una relación endosimbiótica que involucra bacterias, hongos y eucariotas unicelulares con las plantas ya sea de forma intracelularmente lo que resulta necesario para la supervivencia de las plantas hospedantes (20). Los endófitos microbianos se caracterizan por la producción de moléculas bioactivas con funciones antimicrobianas, antioxidantes, citotóxicas, inmunosupresoras e inflamatorias, como también la promoción del crecimiento de la planta y la resistencia contra patógenos. Los mecanismos de la asociación benéfica con las plantas incluyen la producción de sideróforos, la solubilización de fosfatos como fitohormonas, la producción de ácido indol acético (IAA) y la actividad de desaminasa de 1- aminociclopropano- 1- carboxilato (ACC).

Los hongos endófitos ocupan varios nichos del ecosistema natural que determina sus funcionalidades incluida la tolerancia con estrés bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (estrés salino, temperatura, metales pesados, etc.) para adaptar las plantas a diferentes condiciones extremas y la protección contra patógenos. Las plantas hospedantes se benefician de los hongos mutuamente de varias maneras: los hongos toman alimento de la planta lo que le permite crecer y desarrollarse. La estructura de la planta brinda protección contra la sequedad y condiciones adversas, por último, les brinda a los hongos un espacio donde puedan prosperar. En cuanto a la reproducción pueden usar la planta para la transmisión de sus estructuras reproductivas (propágulos) a la próxima generación de las plantas. Dentro de las especies que se destacan de esto se encuentra *Piriformospora indica* como promotora de crecimiento mediante la absorción de minerales y proporciona resistencia al estrés biótico y abiótico (20). Se han descrito tres mecanismos por los cuales proveen protección a la planta (18).

- Mecanismos directos: mediante la producción de enzimas y/o metabolitos secundarios, lo que les confiere la habilidad de atacar y eliminar de manera directa al patógeno.
- Mecanismos indirectos: por medio de la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos que tiene la propia planta fortaleciendo sus propias capacidades de protección.
- Mecanismos ecológicos: a través de la ocupación de nichos ecológicos, parasitar a otros parásitos (hiperparasitismo) y la depredación de organismos dañinos para la planta.

5.3 Metabolitos secundarios

Una de las principales características de los hongos endófitos es la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, antibacteriales e insecticidas (19). Estos metabolitos se pueden clasificar como alcaloides, quinonas, ácido fenólico, policéticos, compuestos alifáticos, esteroides, terpenos, saponinas, entre otros (20). Los metabolitos secundarios se producen en diversas condiciones. Cuando los microorganismos viven en un mismo hábitat, pueden verse con la necesidad de competir por nutrientes, el espacio vital y la reproducción durante el ciclo de vida (21). Por otra parte, se estimulan por la patogenicidad o tolerancia a estrés ambientales como la temperatura y la luz UV, pH, nutrientes entre otros. Los factores ambientales participan como reguladores de manera concertada (39). La regulación de metabolitos secundarios necesita señales externas como la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno, carbono.

En las funciones biológicas los metabolitos secundarios son importantes para el crecimiento de los hongos en condiciones controladas, como por ejemplo el papel de la melanina en la protección contra UV, facilitando la supervivencia del microorganismo bajo una fuerte

exposición a la luz solar (40). Los metabolitos secundarios pueden cumplir funciones fisiológicas. A continuación, se dará una breve descripción de los metabolitos secundarios de los hongos endófitos (21).

- Alcaloides: conformados por derivados del indol, pirimidina y pirrolizidina, aminas, amidas, quinolina e isoquinolina, son tóxicos, por lo tanto, inhiben los ataques de insectos y herbívoros a los huéspedes. Este tipo de metabolito se ha encontrado *F. oxysporum*, *Penicillium* sp, *Epichloe* sp, *Neotyphodium* sp, *Claviceps* sp, *Nothapodytes fortida*, entre otros.
- Terpenoides: compuestos defensivos atrayentes de polinizadores y sustancias alelopáticas en ambientes de competencia se han encontrado en microorganismos como *E. tiphyna* y *Phyllosticta* sp.
- Policétidos: son los metabolitos fúngicos más abundantes detectados exclusivamente en hongos, las enzimas clave en su producción son las policétidos sintetas que comparten similitudes con los ácidos grasos eucarióticos, han sido descritos en especies como *Ampelomyces* sp, *A solani*, *Edenia* sp, *Fusarium* sp.
- Saponinas: desempeñan defensa en la simbiosis con las plantas hospedantes, poseen propiedades anticancerígenas, antinutritivas y anticolesterol. Se han descrito en *Fusarium* sp, *Cephalosporium* sp y *Paecilomyces* sp.
- Fenoles y ácidos fenólicos: su función principal es actuar como factores de señalización en la relación planta-microbio, también ayudan a la promoción de crecimiento en plantas que se encuentran en suelos limitados de nutrientes.
- Esteroides: son compuestos derivados de los lípidos presentes en los seres vivos compuestos por una estructura de cuatro anillos de carbono fusionados que forman

un núcleo esteroide, la diversidad de la estructura es por la variación en los estados de oxidación de los grupos funcionales unidos al anillo.

5.4 Hongos rizosféricos

Un hongo rizosférico es aquel organismo que vive en una relación benéfica realizando una interacción directa con la planta, a nivel de las raíces, proporcionando un aumento en la disponibilidad de nutrientes y absorción por parte de la planta, influyendo positivamente en el rendimiento, resistencia y control de patógenos (29). Esta relación es también conocida como de vida libre en la que estos microorganismos no se benefician ni se perjudican, pero sí generan beneficios indirectos en la planta, y tienen la capacidad de llevar a cabo su ciclo de vida de forma completa e independiente, facilitando la circulación de nutrientes, y sustancias que estimulan el crecimiento vegetal. Además, estos fijan N₂ atmosférico, solubilizan fosfatos insolubles, movilizan cationes, mejoran la resistencia a condiciones de estrés hídrico y suelos salinos y mejora la calidad de los suelos permitiendo que se obtengan plantas más fuertes y fructíferas (30).

Entre algunos géneros de hongos rizosféricos se encuentra *Trichoderma* sp, *Talaromyces* sp, *Rhizoctonia* sp, *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum*, *Fusarium* sp, *Phytophthora* sp, *Gliocladium virens*, *Phoma* sp, *Podospora bulbillosa*, *Actinomucor elegans* (41)(42).

5.5 Diferencias entre hongo endófito y rizosférico

Los hongos endófitos viven al interior de tejidos vegetales como hojas, tallos, en una relación mutualista o comensal con la planta, generando sustancias que la protegen de agentes patógenos y de estrés abiótico, también mejoran el crecimiento y hacen a la planta tolerante a condiciones adversas. Por otro lado, los hongos rizosféricos habitan principalmente al interior de las raíces de la planta y en el suelo alrededor de esta, su

relación con la planta es simbiótica permitiendo la formación de micorrizas. Estos microorganismos mejoran la absorción de nutrientes, permiten que se dé la descomposición de materia orgánica y a su vez brindan protección a las raíces (52).

En un estudio en plantas de algodón sanas las bacterias de la rizósfera son mayores que en las plantas enfermas mientras que el número de hongos endófitos y de la rizosfera es mayor en las plantas enfermas (24). Los hongos endofíticos desempeñan un papel crucial en el crecimiento de las plantas al mejorar la absorción de nutrientes como nitrógeno, fosfato, y la producción de sustancias promotoras de crecimiento como ácido indol- 3- acético (IAA) (25).

5.6 Cultivo de Cholupa

La Cholupa pertenece a la familia Passifloraceae, encontrada en las montañas de los Andes tropicales, con la capacidad de crecer hasta los 2.200 msnm, y en Colombia se desarrolla principalmente en alturas inferiores a los 1.000 msnm. Es también conocida como granadilla de piedra, granadilla de hueso y chulupa. Esta planta es una liana trepadora (comúnmente conocida como bejuco), que luego de que ha alcanzado cierto tamaño requiere de un soporte externo para continuar desarrollándose, normalmente este soporte es otro árbol. Esta planta tiene un sistema radical fibroso y ramificado.

La Cholupa como la familia de las pasifloras posee una flor característica muy llamativa de aroma agradable. Su fruto es una baya esférica con una cáscara dura que en su estado inmaduro es de color verde pálido, amarillo o a veces rojo y cuando está maduro es verde amarillento. El sabor de su jugo es similar al del maracuyá,

pero más dulce y por ende es una fruta apetecida para su consumo como fruta fresca. Es rica en vitamina C y minerales como el calcio y fósforo (33).

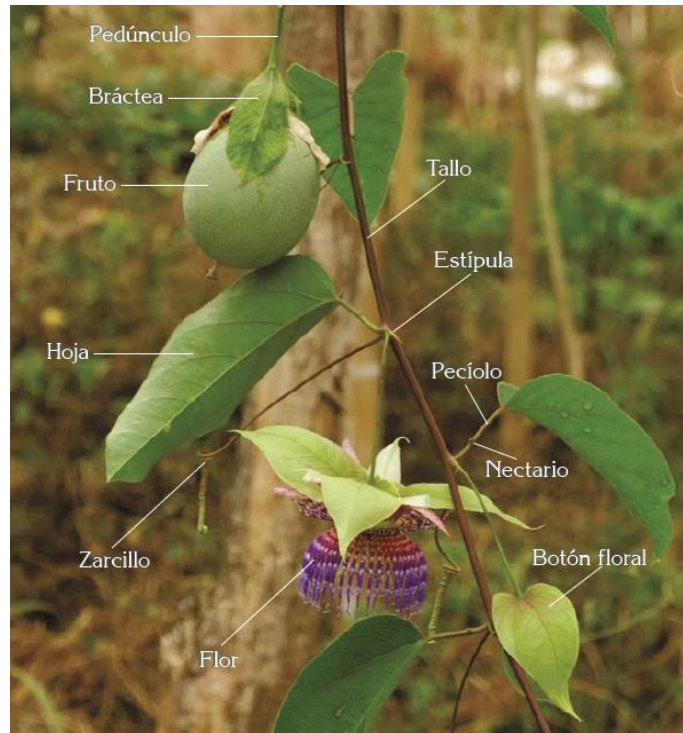


Figura 1. Morfología de la planta (33).

5.7 Microbioma identificado

En *Passiflora Edulis* (maracuyá amarillo) algunos estudios han encontrado actividad endófito en la cepa PE-36 del hongo *Colletotrichum sp* viviendo en relación asintomática con el maracuyá amarillo. Aunque este género es reconocido por ser el agente causal de la antracnosis, investigaciones mostraron que éste fue promotor de crecimiento y tuvo capacidad antagonista frente a especies de *Colletotrichum* patógenas. (51)

5.8 Interacciones Planta-Hongo

A nivel general, existen hongos que juegan un papel fundamental en el desarrollo y la productividad de muchas plantas, en donde se observa clara evidencia de su interacción y asociación, por ejemplo, uno de ellos son los hongos promotores de crecimiento vegetal que producen ciertas sustancias como las auxinas las cuales estimulan la formación de raíces y pelos radiculares que aumentan la capacidad de absorción de nutrientes por parte de la planta y a su vez mejoran la germinación y el vigor de ésta. Además, las auxinas son importantes en esta interacción planta-hongo ya que actúan como moléculas de señalización afectando la expresión genética en esos microorganismos y apoyando en la eficiente respuesta inmune de la planta frente a muchos fitopatógenos. (57)

5.9 Métodos de aislamiento de identificación de hongos en muestras ambientales.

Los hongos son organismos eucariotas que habitan en una amplia variedad de nichos ecológicos desde el suelo hasta los ambientes más extremos. Para poder estudiar e identificar las propiedades de los hongos es necesario abordar las metodologías convencionales y moleculares más frecuentes en investigación con muestras ambientales.

Métodos convencionales

Para el aislamiento de hongos en muestras vegetales se procede a la toma de muestra la cual se debe realizar en condiciones de asepsia y los contenedores para su transporte.

Recolección de la muestra:

En la mayoría de la literatura se ha recomendado tener en cuenta las muestras más representativas de la planta, colectando plantas sanas y plantas con un síntoma en particular, sobre todo cuando se encuentren en estadios de enfermedad tempranos (34). Generalmente

se recolectan muestras y hojas, tallos, frutos o la planta completa. En etapas tempranas del cultivo se colectan de 10- 20 plántulas. Cuando se requiere coleccionar la raíz se debe excavar a una profundidad adecuada el suelo, para poderlas separar y lavar de manera inmediata antes de su análisis en el laboratorio.

Según Almeida, et al. (2022) las condiciones ambientales influyen en la distribución de especies porque exponen los hongos a disponibilidad de recursos teniendo en cuenta los factores como la luz, temperatura, humedad, disponibilidad de nutrientes (abióticos) o interacción entre especies (bióticos). Luego de la recolección de la muestra se debe llevar a un recipiente o bolsa estéril para transferirse a una caja fría y procesarse dentro de las 24 horas (35).

Desinfección del material vegetal: Los métodos de desinfección de superficies es obligatorio para cualquier análisis microbiológico vegetal para eliminar los microorganismos epífitos. Dentro de estos se incluyen procesos físicos o químicos. La esterilización química es el método más usado. Usualmente consta en: sumergir el tejido en etanol 30% (2-3 min), luego en un agente esterilizante principal (NaOCl, MgCl) (3-5min) y lavado con agua destilada estéril (4-6 veces) (34). Otros agentes esterilizantes de amplio uso son el ácido peroxiacético 1% y peróxido de hidrógeno 30%. Dentro de los métodos físicos existen tratamientos por sonicación por 5 minutos en un baño de sonicación Biosonic posterior a lavados sucesivos con agua estéril. Según Burgdorf et al. (2014) los métodos físicos son más efectivos para eliminar microorganismos de superficie (36).

Medios de cultivo y aislamiento de hongos: Para el aislamiento de hongos, los medios más utilizados son el agar PDA y el agar Sabouraud. El agar PDA es especialmente efectivo

para el aislamiento de hongos endófitos, ya que proporciona una fuente rica en nutrientes gracias a la dextrosa, que favorece la formación de micelios, y al extracto de papa, que ofrece vitaminas esenciales. Por otra parte, el medio Sabouraud es útil para el aislamiento de hongos saprófitos y patógenos, ya que contiene una alta concentración de azúcar que enriquece el medio y cloranfenicol, que inhibe el crecimiento de bacterias. Es importante destacar que el pH para el aislamiento de hongos endófitos debe ser ligeramente ácido, en un rango de pH 5.8 a 6.0 (35).

Además de estos medios, otros utilizados para el crecimiento de hongos incluyen el extracto de malta, Czapek, agar triptona de soja, medio Luria-Bertani y agar triptona de extracto bovino, todos ellos eficientes para la recuperación de hongos en plantas. En el caso de los hongos endófitos, el agar PDA puede utilizarse de forma exclusiva para recuperar una mayor diversidad de taxones (35).

La esporulación de los hongos, por otro lado, suele ocurrir en condiciones poco favorables. Muchos microorganismos de un mismo grupo requieren carbono, nitrógeno y micronutrientes para su crecimiento, aunque existen otras especies que necesitan condiciones más específicas. La mayoría de los medios de enriquecimiento favorecen el crecimiento de un amplio rango de microorganismos, pero a menudo no son propicios para inducir la esporulación (37). De hecho, el agotamiento nutricional estimula la esporulación, por lo que medios menos enriquecidos, como el agar agua o el PDA en media concentración, son más efectivos para este propósito (37).

Finalmente, las actividades de los micelios pueden desactivarse al almacenarlos a bajas temperaturas o en aceite sin oxígeno. Para estos casos, se utilizan medios como agar harina de maíz, agar extracto de malta, medio papa dextrosa, medio papa sacarosa y agar jugo de vegetales V8.

Método de cultivo de fragmentos de material vegetal: Los hongos endófitos se encuentran en lugares intra o intercelulares de las plantas, los aislamientos se hacen a partir de las hojas, tallos y raíces sanos. La esterilización de la superficie es el primer paso para asegurar el aislamiento.

Las partes de la planta previamente desinfectadas se cortan en fragmentos de 0.5 cm porque la colonización puede ser inadecuada y se transfieren a un medio nutritivo, preferiblemente complementado con antibióticos que inhiban el crecimiento de microorganismos no deseados y sustancias antimicóticas para evitar contaminación con hongos de rápido crecimiento (37). La incubación se realiza a temperatura ambiente o de 20- 25 °C por 8 días.

Al obtener el crecimiento de hongos se trasladan a medios frescos, teniendo en cuenta que algunos son de lento crecimiento. Los tiempos de crecimiento pueden presentar variaciones de acuerdo a el tipo de hongo que se obtenga: las levaduras se reproducen principalmente por gemación o formación de pseudohifas en condiciones aerobias o anaerobias con colonias visibles de 24 a 74 horas. Los hongos filamentosos son aerobios estrictos, de crecimiento lento de colonias que pueden demorar de 3 a 20 días (38).

Métodos moleculares para la identificación de levaduras y hongos filamentosos

Las técnicas de biología molecular han permitido mejorar la identificación de microorganismos, evolución molecular, la genética de poblaciones, la interacción planta-hongo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más usada para la identificación de hongos, permitiendo la amplificación de un segmento específico como el gen del ADN ribosómico 18S.

Los principales componentes son el ADN molde que tiene la región específica de interés, para estudio de hongos generalmente se usa las regiones ITS1 e ITS2; cebadores como cadenas simples complementarias a la cadena de la región objetivo; bases de nucleótidos simples (dNTPs) y la enzima ADN polimerasa que se encarga de llevar a cabo el proceso de replicación. Este proceso se lleva a cabo mediante tres ciclos dependientes de la temperatura. Desnaturalización a 95 °C para romper los puentes de hidrogeno que mantienen unidas las dos hebras del ADN molde; hibridación donde la temperatura disminuye entre 50 y 60 °C (dependiendo del tipo de cebadores), y elongación en la cual se genera la replicación impulsada por la Taq polimerasa alrededor de 75 a 80°C (45).

La región ITS (espaciador transcrito interno) es el principal marcador de código de barras de ADN fúngico. Dentro de los estudios realizados en esta región, se ha comprobado que es la que tiene mayor probabilidad de identificación exitosa para un amplio grupo de hongos (42). Ésta se compone de las regiones hipervariables ITS1 e ITS2 (44) (Figura 2). Se encuentran entre los genes que codifican para el ARN ribosómico 18S, 28S y 5.8S. Específicamente la región ITS1 se encuentra en el gen de ARN ribosómico 18S y 5.8S, mientras que ITS2 se encuentra entre el gen 5.8 S - 28S comparativamente conservado, siendo el marcador de ADN universalmente aceptado debido a la alta variabilidad en la composición y longitud de la secuencia entre especies (42). Los marcadores de ADN codificadores de proteínas son muy eficientes para el análisis filogenético e identificación de especies de hongos, sin embargo, estos genes tienen tasas de éxito de amplificación por PCR más bajas comparados con la región ITS. Aparte de algunos linajes fúngicos como *Pezizomycotina*, *Rozella*, *Neocallimasgomycota*, y especies de hongos crípticos, la región ITS es capaz de discriminar una amplia gama de especies de hongos relacionadas estrechamente con una alta tasa de éxito de amplificación por PCR (42).

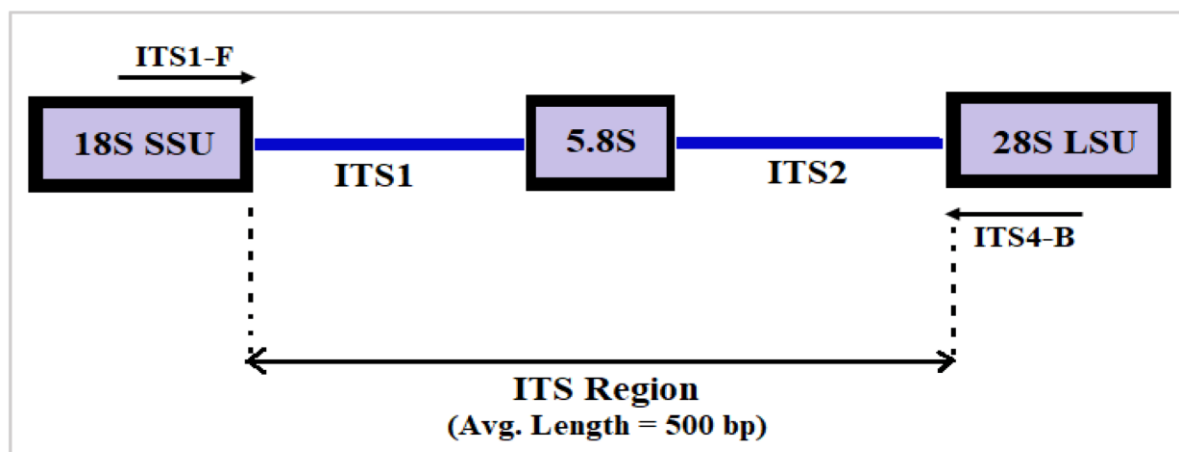


Figura 2. Diagrama región ITS de hongos (43).

El método más usado para analizar el producto de PCR es la electroforesis en gel de agarosa el cual separa los productos en tamaño y carga. Permite detectar la presencia y el tamaño del producto de PCR. En esta técnica se requiere un producto de ADN conocido como marcador molecular estándar para poder determinar el tamaño del producto (46). Una de las desventajas en el uso de la PCR es que su alta sensibilidad aumenta la posibilidad de que se contaminen las muestras en cantidades mínimas. Por otro lado, se requiere de conocimientos de secuencias para el diseño de los cebadores. Los cebadores pueden presentar errores en el alineamiento con la secuencia molde y, además, el ADN polimerasa puede añadir nucleótidos erróneos en la secuencia PCR.

Secuenciación Sanger

Este es un método que consiste en realizar múltiples copias de una región blanco de ADN (sentido 3'-5'), utilizando la cadena molde, un primer específico, dNTPs, ADN polimerasa y adicionalmente ddNTPs, los cuales se encuentran marcados con un fluoruro de diferente color lo que permite distinguir entre ellos.

Este es un método clásico que determina la secuencia de nucleótidos en el fragmento de ADN específico que se quiere estudiar, y aunque ha sido superada por técnicas más modernas, sigue siendo la herramienta para la secuenciación de fragmentos específicos obtenidos por PCR.

Proceso: La síntesis de ADN se lleva a cabo en cuatro reacciones distintas en donde cada una debe tener una mezcla de una cadena doble de ADN molde, un par de cebadores o *primers*, dNTPs, ddNTPs, ADN polimerasa, MgCl₂. Inicialmente se calienta la mezcla en mención para desnaturalizar el molde de ADN, luego se enfría para que el primer pueda unirse al molde de cadena sencilla, una vez se ha unido, se eleva la temperatura para que la ADN polimerasa empiece a sintetizar ADN nuevo a partir del *primer*. La ADN polimerasa empezará a añadir nucleótidos a la cadena hasta que aleatoriamente agregue un didesoxinucleótido y allí se interrumpe la síntesis.

Esta secuenciación sintetiza una hebra de ADN complementaria a una de cadena molde en presencia de ADN polimerasa, los cuatro dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y cuatro ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) marcados con un pigmento diferente. Estos ddNTPs conocidos también como nucleótidos de parada carecen del grupo -OH en el extremo 3', que permite la adición del nucleótido consecutivo de forma que cuando uno de ellos es incorporado, se interrumpe la síntesis de la nueva hebra, permitiendo la obtención de fragmentos secuenciados de diferentes tamaños. A partir de ahí, no es posible agregar más nucleótidos y la cadena finaliza con un didesoxinucleótido que se reconoce por el fluoruro con el que se encuentra marcado.

Cuando la reacción termina, los fragmentos secuenciados pasan a través de un tubo largo y delgado que contiene una matriz de gel en un proceso denominado electroforesis capilar en gel. Estos fragmentos se mueven a través de los poros del gel y cuando llegan al final del

tubo un láser los atraviesa permitiendo así la detección del pigmento asociado. Los datos registrados por el detector consisten en una serie de picos coloreados con el fluoróforo de cada ddNTPs y son observados en un cromatograma. Es así que la secuencia del ADN se lee a partir de los picos en el cromatograma. Esta técnica es adecuada para hongos de crecimiento lento en medios de cultivo, como cargas fúngicas bajas, proporcionando una identificación más precisa con respecto a otros métodos. Sin embargo, dentro de las dificultades que se han encontrado en el uso de dicha técnica es que existen sesgos con el espaciador transcrito (ITS) como por ejemplo ITS1-F, ITS1, ITS5 tiene sesgos frente a la identificación de basidiomicetos, como los ITS2, ITS3, ITS4 son más inusuales hacia los ascomicetos (47).

La secuenciación provee la posibilidad de estudiar especies fúngicas a nivel de cepa, como se ha logrado con *Saccharomyces cerevisiae*, en el cual se encontraron 13 genes variables que podrían estar implicados en su información filogenética (47). En otros estudios se ha podido identificar el genoma de *Rhizoctonia solani*, un patógeno vegetal de importancia económica y complejidad biológica, logrando comprender la estructura, la función y el contenido de los genes (48).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Es una herramienta bioinformática utilizada para comparar secuencias biológicas. Permite identificar similitudes entre secuencias y encontrar especies relacionadas debido a su variedad de base de datos para la identificación fúngica.

Luego de ingresar la secuencia a BLAST, se elige la base de datos, por ejemplo, GenBank y se empieza con la búsqueda. Esta herramienta arroja las secuencias con mayor similitud a la secuencia estudiada, junto con el porcentaje de identidad que es útil para saber qué tan similares son las secuencias y así facilitar la identificación de los hongos en estudio.

El análisis bioinformático permite generar las bibliotecas dianas dentro de los genomas de las especies para poder compararlos con los genomas de otras especies. Hasta el momento se encuentra registro de al menos 19.517 secuencias de genomas fúngicos (54). Esto se logra mediante la detección de cambios estructurales a lo largo del genoma, permite inferir las relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como identificar miembros de familias de genes (54).

6. Diseño metodológico

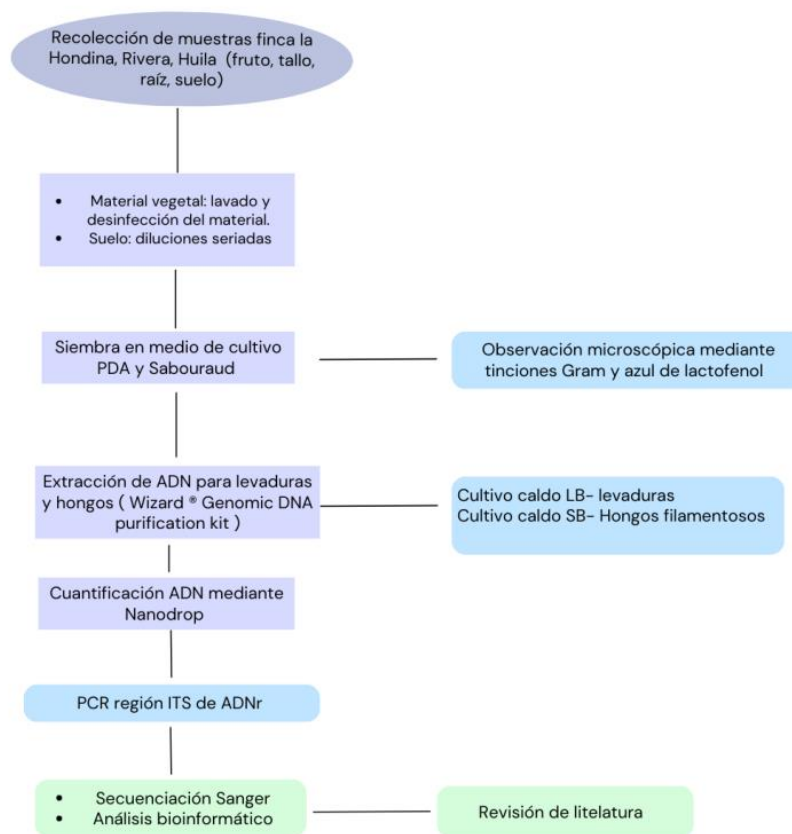


Figura 3. Diseño metodológico

Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de raíces, hojas, flores de plantas de Cholupa y suelo rizosférico tanto de plantas enfermas como sanas en diferentes puntos de la finca La Hondina, Rivera,

Huila. Estas muestras fueron transportadas al laboratorio conservando la cadena de frío y almacenadas hasta su procesamiento.

Aislamiento de hongos filamentosos y levaduras

Las muestras fueron lavadas con abundante agua destilada y luego se prepararon fragmentos de 10 x 10 mm dispuestos en gasas estériles para facilitar el proceso de lavado y desinfección. La desinfección se realizó con hipoclorito (0.5%) por 1 minuto, un lavado con agua destilada estéril, seguido de Etanol (70%) por un minuto y los dos lavados finales con agua destilada estéril. Para el aislamiento de hongos, se colocaron seis fragmentos de cada parte de la planta en medios de enriquecimiento para hongos y levaduras (Agar PDA y Agar Sabouraud). Para el aislamiento de hongos a partir de suelo rizosférico se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta 10^{-6} , partiendo de 10 gr de suelo en 90 ml solución salina. Para este ensayo, cada muestra se sembró por triplicado. Se hicieron los análisis a nivel macroscópico del crecimiento de los primeros aislamientos en los medios de cultivo, y microscópico mediante tinciones Gram y azul de lactofenol. Los aislamientos de hongos filamentosos y las levaduras fueron mantenidos en agar Sabouraud.

Extracción de ADN genómico

Los aislamientos de levadura fueron incubados en LB a 25°C durante 48 horas, y los hongos filamentosos en caldo Sabouraud a 25°C durante 7 días. Las levaduras se recuperaron por centrifugación a 16000 rpm durante 2 minutos, mientras que los hongos filamentosos fueron filtrados con el sistema de embudo de filtración por membrana, usando bomba de vacío, y se utilizó el micelio recuperado. La extracción de ADN se realizó con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1. protocolo WIZARD).

El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría mediante el uso de Nanodrop Lite Plus (Thermo Scientific, USA) y su calidad fue evaluada con base en la relación 260/280, teniendo como referente un valor de 1.8 y 2.0 para un ADN puro.

PCR de la región ITS e identificación molecular de los aislamientos

Se realizó la PCR de la región ITS con los cebadores ITS1 e ITS4 de ADNr usando como patrón el ADN genómico extraído con el kit comercial Accustart II Supermix (Quantabio, USA). Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% con TAE 1X. Esta corrida se realizó durante 40 minutos a 80 voltios, el tamaño del producto esperado es de 500 pb aproximadamente. Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen (Corea) y fueron secuenciados por el método Sanger. La edición de las secuencias obtenidas se realizó con el programa Chromas 2.6.6 (Technelysium, Australia). La identificación de los hongos aislados se realizó mediante comparación de las secuencias editadas con la base de datos de "nr" de nucleótidos del GenBank usando el algoritmo BLAST (58).


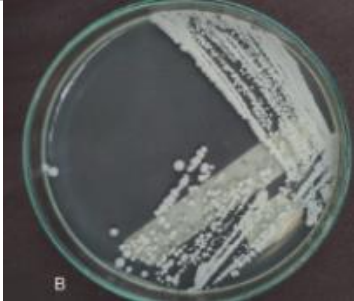
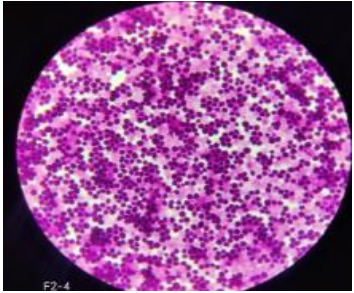
Determinación del potencial biotecnológico de los hongos aislados




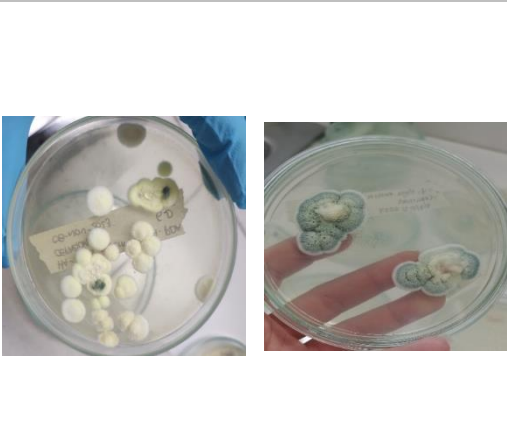
Se determinó el potencial biotecnológico de los hongos identificados con base en la revisión de literatura realizada en las bases de datos bibliográficos NCBI, ScienceDirect, Google Academics, Springer Nature, Wiley, Taylor, Mendeley.

7. Resultados

Aislamiento microbiológico

A partir de los tejidos de plantas sanas y enfermas, y del suelo rizosférico se obtuvieron 7 hongos filamentosos y 8 levaduras, los códigos en la tabla indican la localización donde se tomaron las muestras en la planta (raíz, tallo, hoja, fruto) y suelo rizosférico (Tabla 1).

Código	Características macroscópicas/ microscópicas	Descripción
H4-HE (Hoja de planta enferma)		Hongo filamentosos. Colonias algodonosas. Inicialmente de color blanco que con el tiempo pueden adquirir tonos verdosos.
F2-4 (Flor de planta enferma)	 	Levadura. Colonias blancas de superficie suave y ligeramente brillante. Hongo levaduriforme células de forma ovalada a esférica, de tamaño uniforme. Tinción de Gram en 400X.

<p>HE (Hoja de planta enferma)</p>		<p>Hongo filamentoso. Colonia de color blanco, de textura algodonosa, con formaciones elevadas del centro hacia la periferia.</p>
<p>F1 -3 (Flor de planta enferma)</p>		<p>Levadura. Colonias color blanco opaco, lisas de aspecto mucoide.</p>
<p>HSE (Hongo de suelo enfermo)</p>		<p>Colonias con micelio aéreo color blanco, de fondo rojizo.</p> <p>Hongo filamentoso, hifas hialinas, septadas, con ramificaciones rectas. Tinción azul de lactofenol 400X.</p>
<p>H4-HE (Hoja de planta enferma)</p>		<p>Hongo filamentoso. Colonias algodonosas, circulares de color amarillo con pronunciaciones centrales verde-amarillas.</p>

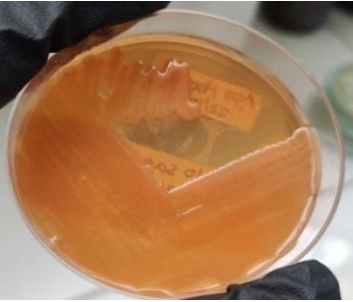
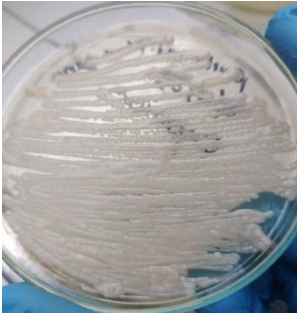
<p>SE-R2 (suelo rizosférico)</p>		<p>Levadura. Colonias brillantes de aspecto mucoide con tonalidades rojizas a naranjas</p>
<p>PI-FS (flor planta sana)</p>		<p>Levadura. Colonias de color blanco opaco de aspecto mucoide</p>

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópicas de hongos aislados.

Identificación molecular

Se realizó la extracción de ADN de 4 hongos filamentosos y 2 levaduras. La tabla 2 muestra las concentraciones de los ADN extraídos y la relación de A260/ A280, relacionada con la calidad del mismo.

Estos valores se obtuvieron mediante espectrofotometría de volumen (NanoDrop). La relación A260/A280 con valores ideales entre 1.8 y 2.0 para ADN de alta calidad.

Código	A260/A280	Concentración ng/μL
F1-3	2,04	30,9
F2-4	1,83	47,0

H3-TE	2,16	357.82
H9 -B	1,22	6.65
H4-HE	2,19	370,5
H4-a	2,02	394,9
H1-SE	2,22	357,4
H1	2.11	436,0

Tabla 2. Cuantificación del ADN obtenido.

El ADN correspondiente al hongo H9-B presentó una baja calidad y concentración a diferencia de los otros ADN extraídos.

Se realizó PCR de la región ITS con los cebadores ITS1 e ITS4, se usó ADN de *Aspergillus niger* como control positivo y agua desionizada estéril como control negativo. Se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado (aprox. 500 pb) en todos los hongos, incluido el H9-B (Figura 3).



Figura 3. PCR de la región ITS1, ITS4. Electroforesis en gel de agarosa 1%, TAE 1X, corrido en 80 V por 40 min. 1). marcador 1KB ladder (Zymoresearch); 2) F1- 3; 3) F2-

4) H3- TE; 5) H9 B; 6) H 4- HE; 7) H4-a; 8) marcador; 9) H1-SE; 10) Control negativo; 11) Control positivo; 12) Marcador 100 pb ladder (Zymoresearch).

Identificación mediante BLASTn

Los productos de PCR fueron secuenciados por el método de Sanger a partir del cebador ITS1 y del cebador ITS4, y las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Chromas 2.6.6 con el fin de eliminar regiones ambiguas (Figuras 4 a y b).

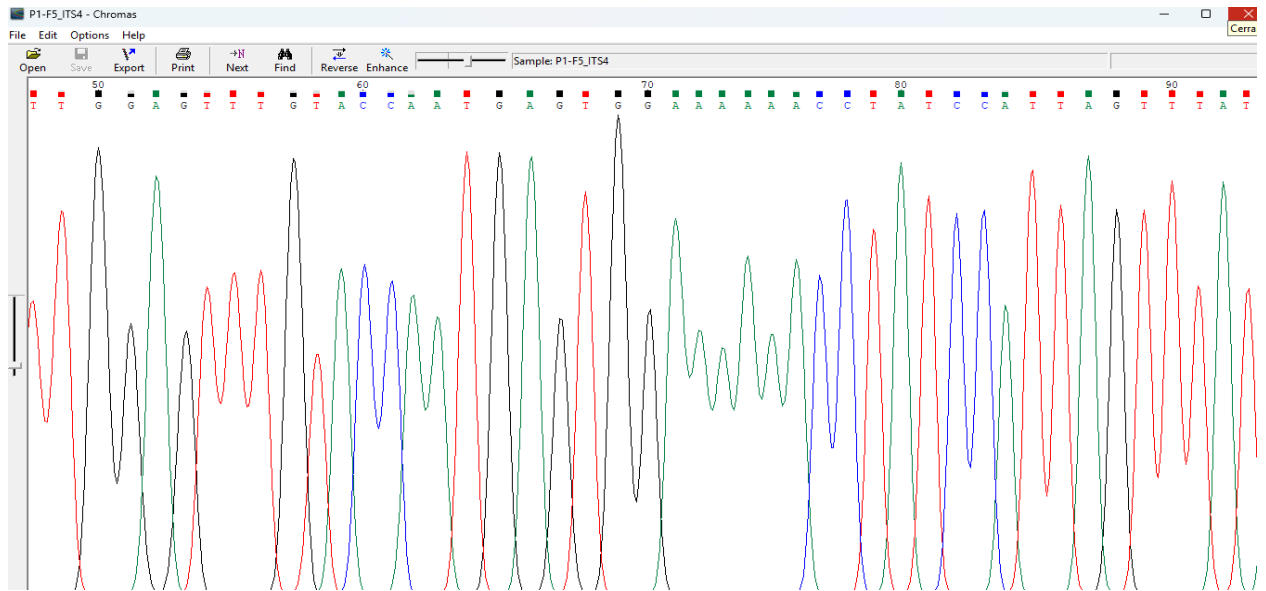


Figura 4a. Secuenciación Sanger. Electroferograma resultante de la muestra P1F5 ITS4. Se observa una clara resolución de los picos a lo largo de toda la secuencia.

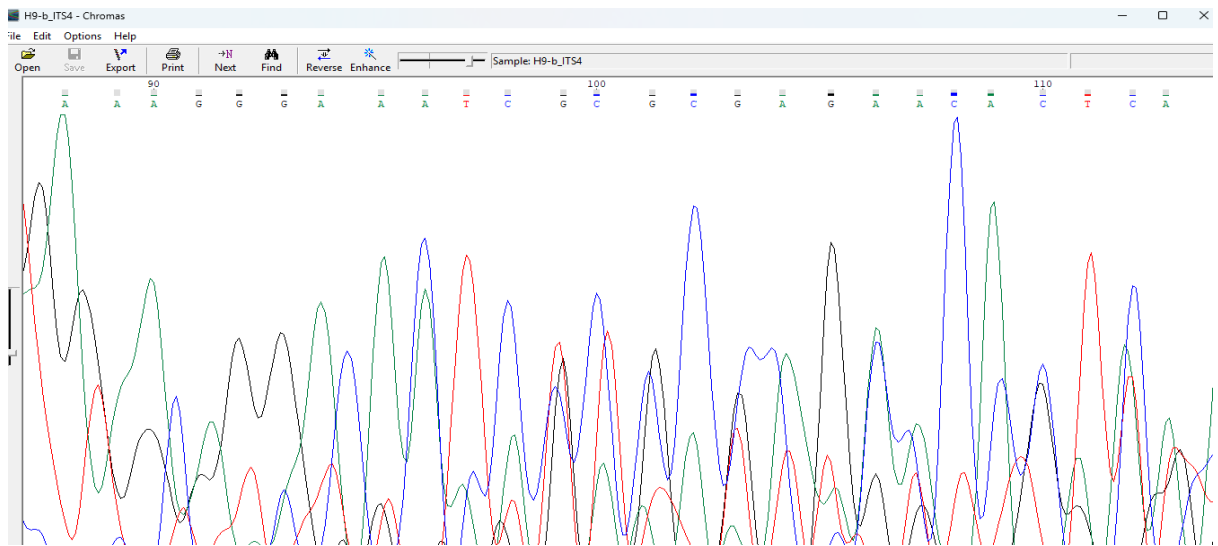


Figura 4b. Secuenciación Sanger. Electroferograma resultante de la muestra H9-B en

donde se observa una superposición de picos, lo que podría indicar múltiples secuencias de ADN en la reacción de PCR.

La figura 4b muestra el resultado de secuenciación del producto de PCR del ADN del hongo H9-B, donde se observa una superposición de picos, lo que podría indicar múltiples secuencias de ADN en la reacción de PCR, por lo tanto, no se obtuvo una secuencia clara para este hongo que permitiera continuar con el análisis bioinformático.

Las secuencias consenso de la región ITS para cada hongo se obtuvieron con el programa de alineamiento de secuencias múltiples EMBOSS Cons (80) (Figura 5 anexo 3). A partir de las secuencias editadas en Chromas obtenidas con los cebadores ITS1 e ITS4



Salida de la herramienta

Archivos de resultados

Detalles de la presentación

Salida de la herramienta

Descargar

```
>EMBOSS0001
gatactgtctgtcGaGcttgetCacAgactTatcatATccaTAACacctgtgCacttgTc
ggatggcttagtgaAGAcCgcaAggttggactAtccaTctacTttacataacAAtttaG
tAAcaaatGtAgTcTtatTAacaTAataAAactTToAacAACggATcTctTggctcTc
gcAtcgAtgAAgAacgcagcgAAatGcgaTaagtaaTgTgaatTgcAgaAttcAgtgAat
cAtcgaatcTttGaAcgcacctTgcgctcccTggattccggggagcatgcctgtttgAg
tgTcatgaaaaccTcaaCCttaGAttggttaacacctttctTtggcttggattTggACg
TtTgCgatgatAagtCggctcgTcttaaaagTaatagCtggatCtGtctcgcacatGg
TttgacTtggcGTAATAagTattTCgcTaagGacAtcTcggatggccGcgtTgcaAgac
taaagaCcgctttCtaaTcCattgatCttCGgattAAAtTcttGACatCTggCctcaaa
tcaGgTaggactAcccgctgaacTtAagcaTatCaTcaaatcaggttagga
```

Figura 5. Análisis EMBOSS secuencia consenso F1- 3 ITS1. ID emboss_cons-I20250422-235633-0144-43797840-p1m.

Finalmente, la identificación se realizó con la herramienta de BLAST mediante comparación entre la secuencia consenso obtenida y la base de datos “nr” de nucleótidos del GenBank, y se tomaron como válidas solo las que presentaron el porcentaje de identidad mayor que 95% (Ver tabla 3).

Código	Género/ especie	BLAST/ Evalue	Score (bits)	Identidad (%)	Cobertura (%)	No. Acceso
F1-3	<i>Naganishia diffluens</i>	0.0	1061	100.00	96	ON358372
F2-4	<i>Candida parapsilosis</i>	1e-73	291	82.75*	62	MF462179
H3-TE	<i>Penicillium corylophilum</i>	0.0	974	100.00	97	MT722131
H9-B	—	—	—	—	—	—
H4-HE	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.0	833	95.77	97	PP989958
H4-a	<i>Trichoderma</i> sp.	0.0	1044	98.48	99	KT278891, KR812252
H1-SE	<i>Penicillium obscurum</i>	0.0	1047	99	100	<u>KP016815</u>

Tabla 3. Identificación molecular de los hongos aislados mediante BLAST.

A pesar de haber obtenido producto de PCR del hongo H9B, la secuenciación no fue exitosa, por lo tanto, no fue posible la identificación de este.

8. Discusión

La presente investigación se realizó con el fin de ampliar el conocimiento en la microbiota fúngica presente en la Cholupa, una especie frutícola muy importante en nuestro país, y establecer un punto de partida en la exploración de su potencial biotecnológico en la agricultura local. Dentro de los hongos y levaduras identificados se destacan los géneros *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. *Candida* spp. y la especie *Naganishia diffluens*. De estos hallazgos es importante resaltar que algunos de los hongos encontrados son promotores de crecimiento vegetal y tienen actividad biocontroladora, como es el caso de algunas especies del género *Trichoderma*. Este resultado se relaciona con estudios previos como el realizado por Hurtado et al (2020) en su investigación en tejidos de Gulupa, quien reportó la presencia de hongos filamentosos endófitos, incluido *Trichoderma* spp. (16),

género que ha sido descrito como un biocontrolador eficiente de hongos fitopatógenos, induciendo resistencia a nivel sistémico en la planta, y parasitando un amplio grupo de hongos perjudiciales (81) (82).

Trichoderma spp. fue aislado de la muestra H4-a (hoja de planta sana). Este es un hongo ascomiceto cosmopolita que tiene la capacidad de colonizar diferentes nichos, lo que le permite cumplir diferentes roles en beneficio de las plantas. Además, es antagonista contra hongos fitopatógenos, participando en el control de plagas y enfermedades (74). Esto lo hace induciendo las defensas de las plantas, mediante la producción de enzimas y metabolitos secundarios; algunos de estos son los compuestos orgánicos volátiles, los cuales ejercen funciones en favor de la planta, como mejorar su crecimiento y su estructura radicular que le permite activar las defensas contra el estrés biótico y abiótico. Estos metabolitos se producen con el crecimiento del hongo por separado o en asociación con la planta. *Trichoderma* spp. También posee un mecanismo de biocontrol interactuando con diversos microorganismos, activando diversas vías bioquímicas, compitiendo por espacio y nutrientes al interior de la planta. La colonización de *Trichoderma* en los tejidos vegetales, permite que se desarrolle una respuesta inmune en la planta permitiendo la protección mediante la activación de la respuesta inmune de manera generalizada en la planta (82).

En concordancia con lo anterior, existen diferentes especies de *Trichoderma*, que además de ser importantes promotores del crecimiento de la planta, poseen la capacidad de frenar no solo el desarrollo de fitopatógenos, sino también pueden ser entomopatógeno de plagas de insectos. Esto lo realiza accediendo hasta la cutícula del artrópodo mediante el uso de sus hifas que se enrollan rodeando el patógeno, y a su vez secretan quitinasas y glucanasas

que invaden el cuerpo de estos insectos causándoles la muerte (82). Además de su aplicación como biopesticidas, se está incrementando la evidencia de que diversas especies de *Trichoderma* son hongos endófitos porque se infiltran en los tejidos de las plantas. En las últimas décadas, la bibliografía acerca del rol de los endófitos de *Trichoderma* en la preservación de los cultivos ha ido en aumento (73).

En los aislamientos primarios se obtuvieron 15 hongos, de los cuales 8 fueron levaduras y 7 hongos filamentosos, de los cuales solo se logró la identificación molecular de 6 aislamientos. Algunos de los hongos fueron aparentemente de crecimiento exigente, lo cual causó su pérdida en los siguientes repiques. Por otro lado, los hongos filamentosos presentaron contaminación con otros hongos pese a los reiterados intentos de purificarlos. En cuanto a la muestra H9-B (tallo enfermo), a pesar de que en la PCR se obtuvo un producto del tamaño esperado para la región ITS amplificada (Figura 3), los resultados de la secuenciación muestran picos múltiples para el mismo sitio (Figura 4b), lo cual hizo imposible su análisis, y no fue posible la identificación molecular de este hongo.

El aislamiento F1-3 (de flor de planta sana) corresponde a *Naganishia diffluens*, la cual pertenece al orden Filobasidiales, y es sinónimo de *Cryptococcus*, comprende más de 20 especies. Los miembros del género *Naganishia* se distinguen por varias características morfológicas y fisiológicas únicas, entre estas, se incluye su incapacidad para desarrollar estructuras reproductivas complejas como basidiocarpos, así como la ausencia de hifas, pseudohifas y blastoconidias, que son comunes en otros hongos. En cuanto a su nutrición, estas levaduras utilizan el nitrato como su única fuente de nitrógeno, lo que sugiere una especialización en su metabolismo nitrogenado (59).

Naganishia liquefaciens y *Naganishia albida* han sido reportadas como causantes de fungemias en humanos (60), al igual que *C. neoformans* y *C. gattii*, reportadas como causantes de criptococosis, una enfermedad de distribución mundial que causa daños en el sistema nervioso central, piel y pulmones (59). Cabe aclarar que el género *Naganishia* es distinto a *Cryptococcus*, pero se reclasificó a partir de ciertas especies caracterizadas como *Cryptococcus albidus*. Es decir, comparten similitudes genéticas y fenotípicas, pero son taxonómicamente independientes. *Naganishia* se establece como nuevo género en 2015 después de que los análisis moleculares arrojaran diferencias genéticas con *Cryptococcus* (61). Se ha encontrado en ecosistemas como el mar, troncos de árboles. Algunas especies como *Naganishia vaughanmartinae*, *Naganishia onofrii*, *Naganishia vaughanmartinae*, *Naganishia onofrii*, *Naganishia antarcticus* y *Naganishia albidosimilis* han sido descritas en la Antártida, lo cual indica que se adapta a ambientes fríos (62). *N. albida* fue aislada en suelo de la Antártida y en árboles de eucalipto en la ciudad de Bogotá, Colombia (63). Recientemente, *N. tulchinskyi* fue descrita como una especie aislada de superficies de la Estación Espacial Internacional mostrando resistencia a la radiación, informando que era psicrófilo y psicrotolerante, característica dada por la presencia de genes asociados a la síntesis de carotenoides y trehalosa y enzimas de reparación de ADN, comunes en microorganismos extremófilos; análisis filogenéticos muestran a *N. tulchinskyi* cercana a *N. diffluens*. En estrés ambiental se demostró que desarrolla células de paredes gruesas como mecanismo de resistencia (66). Leo et al. (2022), con base en una revisión detallada de MEROPS peptidase database, reportan en *N. kalamii* 219 peptidasas de membrana clasificadas según su grupo catalítico como cisteína, metalo, serina, treonina e inhibidores de proteasa, lo cual puede estar relacionado con la adaptación a ambientes diferentes, la regulación de procesos intracelulares finos y, posiblemente, la interacción con su hospedero (67).

En otro estudio, evaluaron la diversidad de hongos y levaduras asociados a flores en 44 muestras en plantas ornamentales (manzanilla, eucalipto, algodón, entre otras) y plantas frutales (mango, guayaba, limón) en la región de Asyut, Egipto. Identificaron 26 especies de 18 géneros de levaduras, entre ellos, *Cryptococcus* (*C. albidus* var. *kuetzingii*), *Metschnikowia* (2 especies), *Naganishia* (*N. diffluens*) y *Rhodotorula* (2 especies) siendo las especies de levaduras más comunes. *N. diffluens* tuvo prevalencia tanto en las plantas frutales como ornamentales (68). Esto indica que las levaduras suelen ser colonizadores de las flores por el néctar floral, se cree que esto es por insectos asociados. Sin embargo, se ha demostrado que las levaduras alteran las propiedades fisicoquímicas del néctar como la composición del azúcar. Esto, con el tiempo puede generar cambios en el comportamiento de los polinizadores (69,70). De acuerdo con esto, se pudo inferir que *N. diffluens* no tiene un impacto negativo en la flor de Cholupa, mediante una relación simbiótica mutualista, sin embargo, hay que evaluar si tiene los mismos efectos en el néctar de la flor que pueda afectar a insectos polinizadores. A nivel biotecnológico se ha comprobado que *N. diffluens* puede funcionar como un catabolizador biológico por su capacidad de producir proteasas que son de uso para la industria alimentaria, textil, farmacéutica que tienen una capacidad de degradar proteínas, siendo más ecológicas que los catalizadores químicos, y su alta capacidad adaptativa facilita el cultivo en diversas condiciones para su producción. (71).

La *Candida parapsilosis* es una levadura reconocida principalmente por ser un patógeno oportunista en el humano, sin embargo, esta fue encontrada en la muestra de la flor de Cholupa correspondiente a F2-4 (flor de planta enferma). Glushakova et.al (2023) evaluó la producción enzimática de *Candida parapsilosis* en plantas trepadoras por sarcillos (ahuyama, zucchini, berenjena, zapallo), frutas de consumo como manzana, pera, melocoton, ciruela, cereza, fresa, frambuesa y rosas., encontrando una alta incidencia de

esta levadura representada por el complejo *C. parapsilosis*, el cual comprende las especies, *Cándida parapsilosis* sensu stricto y *Candida orthopsilosis*. El mecanismo por el cual ella se introduce en estas plantas es a través de la cutícula mediante la producción de enzimas líticas como quitinasas, proteasas y lipasas (65). Es importante resaltar que, muchos microorganismos endófitos entran en los tejidos de las plantas e interactúan con el hospedador de diversas formas, tanto de manera negativa (parasitismo) como neutral para uno o ambos seres vivos. En este caso, existe evidencia del comportamiento de *Candida parapsilosis* es de modo parasitismo (65). A pesar de su reconocimiento como patógeno, se han realizado trabajos en la determinación de su potencial biotecnológico como parte del género *Candida*, como fuentes de proteínas y polisacáridos microbianos, biocomplejos para nutrición animal y humana, además de la posibilidad de biosíntesis de metabolitos como ácido cítrico, etanol, xilitol, eritol, y biocatalizadores como las lipasas (84).

Por otro lado, esta levadura fue encontrada en un estudio realizado simultáneamente con otras levaduras donde se demostró que algunas eran promotoras de crecimiento vegetal por la producción de la fitohormona ácido Indol-3-acético, sin embargo, las cepas endofíticas de *Candida* mostraron una síntesis de la fitohormona IAA más baja, por ende, no existe suficiente evidencia de un impacto positivo en tejidos vegetales dónde se ha aislado esta levadura (72).

Las especies de *Penicillium* fueron encontradas en H3-TE (tallos), H4-HE (hojas) y H1-SE (suelo). Este género tiene más de 354 especies y es importante por la producción de metabolitos secundarios como agentes antifúngicos, antibacterianos e inmunosupresores (75). Murali et al (76) demostraron que *Penicillium chrysogenum* es promotor de crecimiento en mijo de perla, una especie de gramínea, e induce a la resistencia sistémica

contra el mildú vellosa causado por *Sclerospora graminicola*. Esto lo hicieron mediante la colonización de *P. chrysogenum* en raíces y suelo. La protección se asocia con la “priming” (preparación) de genes de defensa generando una respuesta más rápida.

Por otro lado, *Penicillium chrysogenum* es un productor de polisacáridos como el PCPS, que ha demostrado defensa antiviral contra el virus del Mosaico del Tabaco en plantas de tabaco, mediante la desestabilización de las partículas del virus e inducción de resistencia la vía de señalización Na/H₂O₂ y la activación de rutas fenilpropanoides, mostrando ser un biocontrolador eficiente (77). Se han usado filtrados de biomasa de *Penicillium corylophilum* para la producción de nanopartículas de Selenio (NP-SE) frente a microorganismos patógenos, especialmente bacterias Gram positivas y Gram negativas mostrando un mayor impacto en Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) que en Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) demostrando que puede tener aplicaciones para biomedicina y salud pública (78); adicionalmente se ha reportado como productor de compuestos bioactivos que pueden tener propiedades antimicrobianas, antifúngicas o insecticidas , lo que los hace de gran interés para el desarrollo de nuevas drogas, pesticidas y otros bioproductos (). Finalmente, en las bases de datos consultadas se encontró escasa información sobre *Penicillium obscurum*, aunque está en el mismo clado filogenético de *P. corylophilum*, por lo tanto, no se puede inferir su posible impacto en las plantas de Cholupa (*Passiflora maliformis*), así como su potencial biotecnológico. Este vacío de conocimiento resalta la necesidad de investigaciones futuras sobre su papel como endófito, así como su potencial biotecnológico.

A nivel general, el género *Penicillium* se agrupa dentro de los hongos considerados promotores de crecimiento en las plantas, por ser solubilizadores de fosforo, potasio y

minerales mejorando la absorción de nutrientes. En el suelo ayudan a la descomposición de materia orgánica y estimulación del crecimiento radicular, promoviendo la inmunidad contra patógenos, gracias a la producción de compuestos antifúngicos y a la activación de mecanismos de resistencia sistémica en las plantas (79).

Cabe resaltar que, aunque se encontraron 3 especies del mismo género, cada una tiene un perfil metabólico único que puede influir tanto en la interacción con la planta como en el potencial biotecnológico. Por ejemplo, algunas especies pueden sintetizar enzimas industriales, antibióticos o incluso compuestos bioactivos con aplicaciones farmacéuticas, mientras que otras se especializan en la biorremediación de suelos.

Por otro lado, la mención de *Candida* sp y *Naganishia* considerados patógenos humanos y encontrados en microbioma vegetal se relaciona con la dualidad que puede existir ya que el comportamiento puede variar entre huésped, en la planta se pueden comportar como comensales en plantas sanas, sin causar síntomas aparentes, sin embargo, esto puede variar bajo ciertas condiciones ambientales adoptando un rol patógeno reflejando el papel de una coexistencia compleja por explorar. En contraste a esto, se puede evidenciar que la presencia de *Trichoderma* en la hoja de Cholupa representa papel en la respuesta inmune de la planta, y el papel antagonista frente a otros patógenos que son cruciales para determinar el resultado de esta coexistencia. En definitiva, la coincidencia de microorganismos entre plantas sanas y enfermas apoya la hipótesis de una compleja red de interacciones. En este sistema, los hongos beneficiosos pueden ejercer un control activo sobre los patógenos, manteniendo un estado de equilibrio. Sin embargo, este equilibrio es susceptible a las alteraciones ambientales, que pueden inclinar la balanza hacia una relación patogénica latente, desencadenando la enfermedad en la planta (85,86).

9. Conclusiones

- Se logró aislar 7 hongos filamentosos y 8 levaduras a partir de los tejidos de plantas sanas y enfermas de Cholupa (*Passiflora maliformis*) y de su suelo rizosférico en el municipio de Rivera, Huila.
- Se identificaron los hongos filamentosos *Trichoderma* sp., *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium corylophilum* y *Penicillium obscurum*. y las levaduras *Candida* sp. y *Naganishia diffluens*.
- Con base en la revisión de literatura, se infiere que como parte del microbiota de Cholupa, los hongos identificados podrían estar jugando un papel importante en la promoción del crecimiento vegetal, inducción a la respuesta inmune y el control biológico de fitopatógenos.
- A partir de la literatura consultada se destaca el potencial biotecnológico de *Trichoderma* sp puesto que este es un agente biocontrolador frente a otros patógenos fungicos, esto se lleva a cabo por medio de la producción de celulasas y lacasas. Por otro lado *Penicillium* demostró ser un productor de polisacáridos como PCPS, asociado principalmente a la respuesta inmunológica contra patógenos. Por último, el género *Naganishia* se ha destacado como un catabolizador biológico de importancia industrial.
- La coincidencia de microorganismos entre plantas sanas y enfermas sugiere dinámicas biológicas complejas en la cual los hongos benéficos pueden estar limitando la acción de hongos patógenos, o en algunos casos, mostrando una relación latente patogénica bajo ciertas condiciones ambientales.

Recomendaciones

- Se recomienda hacer estudios in vitro e in vivo de los hongos aislados para poder evaluar los efectos específicos en Cholupa y su comportamiento frente a patógenos como *Fusarium* spp.
- Hacer monitoreos continuos en los diferentes cultivos de Cholupa en el departamento del Huila para poder establecer mejor la relación entre la microbiota fúngica con las condiciones del suelo.
- Estudios metagenómicos de la rizosfera del cultivo para poder caracterizar con mayor profundidad los hongos y la interacción que tengan con los factores abióticos como el pH del suelo, contenido nutricional y clima.

10. Referencias

1. [Internet]. [citado el 27 de marzo de 2024]. disponible en:
<https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/planes-departamentos-ciudades/201124-InfoDane-Neiva-Huila.pdf>
2. Delgado M, Ulloa CS, Ramírez JM. La economía del departamento del Huila: diagnóstico y perspectivas de mediano plazo. 2015.
3. Huila, lider en producción de pasifloras [internet]. La nación. 2013 [citado el 19 de marzo de 2024]. Disponible en <https://www.lanacion.com.co/huila-lider-en-produccion-de-pasifloras/>
4. del Huila G. Productores del norte del Huila conocieron los alcances del proyecto de investigación sobre resistencia de pasifloras al fusarium [Internet]. Gobernación del Huila. 2023 [citado el 19 de marzo de 2024]. Disponible en:
<https://www.huila.gov.co/publicaciones/13661/productores-del-norte-del-huila-conocieron-los-alcances-del-proyecto-de-investigacion-sobre-resistencia-de-pasifloras-al-fusarium/>
5. Caranguay HEO. Etiología de enfermedades asociadas a fusariosis en el cultivo de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del sumapaz [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2012. Disponible en:
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/9567/790745.2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
6. Estadísticas Agropecuarias [Internet]. [cited 2024 May 21]. Obtenido de:
<https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>
7. Ortiz E, Cruz M, Melgarejo LM, Marquínez X, Hoyos-Carvajal L. Características histopatológicas de infecciones causadas por *Fusarium oxysporum* y *F. Solani* en

- plantas de maracuyá morado (*passiflora edulis sims*). *Suma fitopatológica*. Junio de 2014; 40 (2): 134–40. doi:10.1590/0100-5405/1910
8. Forero R, Ortiz E, De León W, Gómez JC, Hoyos-Carvajal L. Análisis de la resistencia a *Fusarium oxysporum* en plantas de *Passiflora maliformis* L. *Rev colomb cienc hortíc* [Internet]. 2016;9(2):197. [Citado el 09 de mayo de 2024]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2015v9i2.4174>
 9. Sabogal-Palma AC, Chávez-M J, Oliveros-Gómez DF, Murillo-Perea E, Méndez-Arteaga JJ. Funcionalidades biológicas de *Passiflora maliformis* del sur macizo colombiano. *Bioagro-* [Internet]. 2016 [citado el 9 de mayo de 2024];28(1):003–12. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612016000100001
 10. Bitterlich M, Franken P, Graefe J. Arbuscular mycorrhiza improves substrate hydraulic conductivity in the plant available moisture range under root growth exclusion. *Front Plant Sci* [Internet]. 2018;9. [Citado el 02 de mayo de 2024]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.00301>
 11. Molano-Avellaneda Z, Miranda-Lasprilla D, Ocampo-Pérez J. Progress in the study of phenology cholupa (*Passiflora maliformis* L.) in producing areas of Colombia. *Rev colomb cienc hortíc* [Internet]. 2020;14(1). [Citado el 09 de mayo de 2024]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2020v14i1.11251>
 12. Gil JGR, Tamayo PJ, Morales JG. Identification and pathogenicity of microorganisms affecting purple passion fruit in Colombia [Internet]. Universidade Federal de Viçosa; [citado 28 de marzo 2024]. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/rceres/a/Q65t5m6hw8fhd86xr8hVtKb/#ModalTablet1>
 13. Cruz AF, Barka GD, Blum LE, Tanaka T, Ono N, Kanaya S, et al. Evaluation of Microbial Communities in peels of Brazilian tropical fruits by amplicon sequence

- analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2019 May 9;50(3):739–48. DOI: 10.1007/s42770-019-00088-0
14. Park SJ, De Faveri SG, Cheesman J, Hanssen BL, Cameron DNS, Jamie IM, et al. Zingerone in the Flower of *Passiflora maliformis* Attracts an Australian Fruit Fly, *Bactrocera jarvisi* (Tryon). *Molecules* [Internet]. 2020;25(12):2877. [Citado el 09 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules25122877>
15. Dos Santos Oliveira JA, Polli AD, Polonio JC, Orlandelli RC, Conte H, Azevedo JL, Pamphile JA. Bioprospección y filogenia molecular de hongos endófitos cultivables asociados con maracuyá amarilla. *Acta Scientiarum. Ciencias Biológicas*. 2020;42:1-11.
16. HURTADO CLOPATOSKY, Stephany. Aislamiento de endófitos en gulupa (*Passiflora edulis* Sims f.) y su potencial para promoción de crecimiento de la planta y control del Fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2020 [Fecha consulta: 3 de mayo de 2024].
17. Zhang X, Wang H, Que Y, Yu D, Wang H. The influence of rhizosphere soil fungal diversity and complex community structure on wheat root rot disease. *PeerJ*. 2021 Dec 13;9. <https://doi.org/10.7717/peerj.12601>
18. Lopez C, Salazar AH, Ocampo J, Silva DFP da, Ceballos NA. Economic and quality study of purple passion fruit grafted on a fusarium wilt tolerant rootstock. *Bragantia* [Internet]. 2022;81. [Citado el 09 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20220055>
19. Liu H, Cheng J, Jin H, Xu Z, Yang X, Min D, et al. Characterization of rhizosphere and endophytic microbial communities associated with *Stipa purpurea* and their correlation with soil environmental factors. *Plants*. 2022 Jan 28;11(3):363. <https://doi.org/10.3390/plants11030363>

20. Salazar-Gonzalez C, Yela-Caicedo O, Gomez-Espinoza B. Molecular characterization of *Fusarium* spp. associated vascular wilt in passion fruit (*Passiflora ligularis* JUSS) [Internet]. 1 de junio de 2022 [consultado el 29 de marzo de 2024];39(2):33-46. Disponible en:
<https://revistas.udenar.edu.co/index.php/rfacia/article/view/7646>
21. Wang Y, Teng Y, Zhang J, Zhang Z, Wang C, Wu X, et al. Passion fruit plants alter the soil microbial community with continuous cropping and improve plant disease resistance by recruiting beneficial microorganisms. *PLoS One* [Internet]. 2023;18(2):e0281854. [Citado el 02 de mayo de 2024]. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0281854>
22. Hernández-Martínez AX, Lozano-Puentes HS, Camacho-Montealegre CM, Costa GM, Díaz-Ariza LA. Establishing the relationship between flavonoid content, mycorrhization, and soil nutritional content in different species of the genus *Passiflora* in Colombia. *ACS Omega* [Internet]. 2023;8(43):40647–56. [Citado el 02 de mayo de 2024]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.3c05606>
23. Muñoz-Ramírez ZY, González-Escobedo R, Avila-Quezada GD, Ramírez-Sánchez O, Higuera-Alvear VM, Zapata-Chávez E, et al. Exploring microbial rhizosphere communities in asymptomatic and symptomatic apple trees using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Agronomy*. 2024 Feb 9;14(2):357.
<https://doi.org/10.3390/agronomy14020357>
24. Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003 Dec;67(4):491–502. DOI: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003
25. Elvira Sánchez-Fernández R, Lorena Sánchez-Ortiz B, Monserrat Sandoval-Espinosa YK, Ulloa-Benítez Á, Armendáriz-Guillén B, Claudia García-Méndez M,

- et al. Hongos Endófitos: Fuente potencial de Metabolitos Secundarios bioactivos con utilidad en Agricultura y medicina. TIP. 2013;16(2):132–46.
[https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
- 26.** Cotes Prado AM, Fargetton X, Köhl J, Díaz García A, Gómez Álvarez MI, Grijalba Bernal EP, et al. Control Biológico de fitopatógenos, Insectos y ácaros: Aplicaciones y perspectivas (volumen 2). 2018 Oct 1;
doi:10.21930/agrosavia.investigation.7402544
- 27.** Aamir M, Rai KK, Zehra A, Kumar S, Yadav M, Shukla V, et al. Fungal endophytes: Classification, diversity, ecological role, and their relevance in Sustainable Agriculture. Microbial Endophytes. 2020;291–323.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818734-0.00012-7>
- 28.** Alam B, Li J, Ge Q, Khan MA, Gong J, Mehmood S, et al. Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa? 2021 17 de diciembre;12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.791033>
- 29.** Bourgeois C. Microorganismos rizosféricos [Internet]. Plant Care Knowledge Center | Lallemand Plant Care; 2021 [citado el 16 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://kcenter.lallemandplantcare.com/es/espana/ag20-es/microorganismos-rizosfericos/>
- 30.** Los microorganismos rizosféricos y cómo ayudan a tus cultivos [Internet]. Symborg. 2021 [citado el 16 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://symborg.com/es/proteccion-suelos/microorganismos-rizosfericos-ayudar-cultivos/>
- 31.** Shi Y, Yang H, Chu M, Niu X, Wang N, Lin Q, et al. Differentiation and variability in the rhizosphere and endosphere microbiomes of healthy and diseased

- cotton (*Gossypium* sp.). *Frontiers in Microbiology*. 2021 Dec 6;12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.765269>
- 32.** Mohamed AH, Abd El-Megeed FH, Hassanein NM, Youseif SH, Farag PF, Saleh SA, Abdel-Wahab BA, Alsuhaibani AM, Helmy YA, Abdel-Azeem AM. Native Rhizospheric and Endophytic Fungi as Sustainable Sources of Plant Growth Promoting Traits to Improve Wheat Growth under Low Nitrogen Input. *J Fungi (Basel)*. 2022 Jan 19;8(2):94. <https://doi.org/10.3390/jof8020094>. PMID: 35205849; PMCID: PMC8875171.
- 33.** Ocampo, J.A., Rodríguez, A., Puentes, Molano, Z y Parra M. El cultivo de la Cholupa (*Passiflora maliformis* L.) Una alternativa para la fruticultura colombiana. 2015. Corporación Centro de Desarrollo Tecnológico de las Pasifloras de Colombia - Cepass. Neiva (Huila), Colombia. 52 páginas.
- 34.** MUESTREO-PARA-ANALISIS-DE-HONGOS.pdf - fertilab [Internet]. [cited 2024 Jul 9]. Disponible en:
<https://www.fertilab.com.mx/new/files/fito/MUESTREO-PARA-ANALISIS-DE-HONGOS.pdf>
- 35.** Dos Reis, JBA, Lorenzi, AS, y Do Vale, HMM (2022). Methods used for the study of endophytic fungi: a review on methodologies and challenges, and associated tips. *Archives of Microbiology*, 204 (11). <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03283-0>
- 36.** Burgdorf RJ, Laing MD, Morris CD, Jamal-Ally SF. A procedure to evaluate the efficiency of surface sterilization methods in culture-independent fungal endophyte studies. *Braz J Microbiol* [Internet]. 2014;45(3):977–83. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822014000300030>
- 37.** Senanayake IC, Rathnayaka AR, Marasinghe DS, Calabon MS, Gentekaki E, Lee HB, Hurdeal VG, Pem D, Dissanayake LS, Wijesinghe SN, Bundhun D, Nguyen

- TT, Goonasekara ID, Abeywickrama PD, Bhunjun CS, Jayawardena RS, Wanasinghe DN, Jeewon R, Bhat DJ, Xiang MM. Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. *Mycosphere*. 2020;11(1):2678–2754. DOI:10.5943/mycosphere/11/1/20
38. Universidad Veracruzana. Hongos, mohos y levaduras [Internet]. Xalapa: Universidad Veracruzana; c2014 [citado 12 de abril de 2025]. Disponible en: <https://ecobiouvm.wordpress.com/wpcontent/uploads/2014/02/hongosmohosylevaduras.pdf>
39. Pusztahelyi T, Holb IJ, Pócsi I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front Plant Sci* [Internet]. 2015;6:573. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00573>
40. Avalos J, Limón MC. Fungal secondary metabolism. *Encyclopedia (Basel, 2021)* [Internet]. 2021;2(1):1–13. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010001>
41. Murali M, Naziya B, Ansari MA, Alomary MN, AlYahya S, Almatroudi A, et al. Bioprospecting of rhizosphere-resident fungi: Their role and importance in sustainable agriculture. *Journal of Fungi*. 2021 Apr 18;7(4):314. DOI: 10.3390/jof7040314
42. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012;109(16):6241–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

- 43.** Das R, Rai A, Mishra DC. CNN_FunBar: Advanced learning technique for fungi ITS region classification. *Genes (Basel)* [Internet]. 2023 [citado el 12 de septiembre de 2024];14(3):634. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/3/634>
- 44.** Mohamed AH, Abd El-Megeed FH, Hassanein NM, Youseif SH, Farag PF, Saleh SA, Abdel-Wahab BA, Alsuhaibani AM, Helmy YA, Abdel-Azeem AM. Native Rhizospheric and Endophytic Fungi as Sustainable Sources of Plant Growth Promoting Traits to Improve Wheat Growth under Low Nitrogen Input. *J Fungi (Basel)*. 2022 Jan 19;8(2):94. <https://doi.org/10.3390/jof8020094> PMID: 35205849; PMCID: PMC8875171.
- 45.** Ghannam MG, Varacallo M. Biochemistry, Polymerase Chain Reaction [Actualizado el 30 de julio de 2023]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Ene-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/>
- 46.** Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2013 Mar;133(3):1-4. DOI: 10.1038/jid.2013.1 PMID: 23399825; PMCID: PMC4102308.
- 47.** Jiang S, Chen Y, Han S, Lv L, Li L. Next-Generation Sequencing Applications for the Study of Fungal Pathogens. *Microorganisms*. 2022 Sep 21;10(10):1882. DOI: 10.3390/microorganisms10101882 PMID: 36296159; PMCID: PMC9609632.
- 48.** Verwaaijen B, Wibberg D, Kröber M, Winkler A, Zrenner R, Bednarz H, et al. The *Rhizoctonia solani* AG1-IB (isolate 7/3/14) transcriptome during interaction with the host plant lettuce (*Lactuca sativa* L.) [Internet]. 2017 [cited 2024 Oct 10]; 12(5):e0177278. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0177278>.

49. Guerrón Sánchez CE, Mora Landívar AE. Detección de alternaria alternata y fusarium spp. en el cultivo de uva (vitis spp.) en el Ecuador [Internet]. 2019 [cited 2024 Oct 10]. Available from: <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10825>.
50. Meléndez O, Bethancourt R, Bethancourt A, Rodríguez–Castro L, Mendieta J, Durant A, et al. Leaf-fungal endophytes of Neotropical Gymnosperms: A culture-based, Sanger sequencing and whole genome approach. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4654318>
51. Oliveira JA dos S, Polli AD, Polonio JC, Orlandelli RC, Conte H, Azevedo JL, et al. Bioprospection and molecular phylogeny of culturable endophytic fungi associated with yellow passion fruit. Acta Sci Biol Sci [Internet]. 2020;42:e48321. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsci.v42i1.48321>
52. Elvira Sánchez-Fernández, R., Lorena Sánchez-Ortiz, B., Monserrat Sandoval-Espinosa, YK, Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., Claudia García-Méndez, M., & Lydia Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas, 16 (2), 132–146. [citado el 14 de octubre de 2024];14(3):634. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72084-9)
53. Oliveira JA dos S, Polli AD, Polonio JC, Orlandelli RC, Conte H, Azevedo JL, et al. Bioprospection and molecular phylogeny of culturable endophytic fungi associated with yellow passion fruit. Acta Sci Biol Sci [Internet]. 2020;42:e48321. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsci.v42i1.48321>
54. U.S. National Library of Medicine. (n.d.). *Genome - NCBI - NLM*. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=4751>

55. DNA and RNA Extraction and Purification - EE. UU . (s/f). Recuperado el 26 de octubre de 2024, de https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis.html?gclid=Cj0KCQjwpvK4BhDUARIsADHt9sRgWiOGH5LvK8HvRC3-F72e_DwkRZO45vGoif00yxf8rIXm4FvSoaAjxfEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjwpvK4BhDUARIsADHt9sRgWiOGH5LvK8HvRC3-F72e_DwkRZO45vGoif00yxf8rIXm4FvSoaAjxfEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!641074304337!b!!g!!purificacion%20de%20acidos%20nucleicos!15928457972!137626497972&cid=bid_sap_rst_r01_co_cp1362_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_awa_con&gad_source=1
56. Fernández-Aliseda, CM (2022, 30 de marzo). ¿Cómo corregir un cromatograma? EsCiencia; ValorEficaz. Recuperado el 26 de octubre de 2024, de <https://www.esciencia.org/como-corregir-un-cromatograma/>
57. Mohamed AH, Abd El-Megeed FH, Hassanein NM, Youseif SH, Farag PF, Saleh SA, et al. Native Rhizospheric and Endophytic Fungi as Sustainable Sources of Plant Growth Promoting Traits to Improve Wheat Growth under Low Nitrogen Input. *J Fungi (Basel)* [Internet]. 2022;8(2):94. [citado el 03 de noviembre de 2024] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/jof8020094>
58. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) “Basic local alignment search tool.” *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
59. Oliveira LSS, Pinto LM, de Medeiros MAP, Toffaletti DL, Tenor JL, Barros TF, et al. Comparison of *Cryptococcus gattii*/neoformans species complex to related genera (*Papiliotrema* and *Naganishia*) reveal variances in virulence associated

- factors and antifungal susceptibility. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:642658.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.642658>
60. Serna-Espinosa BN, Forero-Castro M, Morales-Puentes ME, Parra-Giraldo CM, Escandón P, Sánchez-Quitian ZA, et al. First report of environmental isolation of *Cryptococcus* and *Cryptococcus*-like yeasts from Boyacá, Colombia. *Sci Rep.* 2023;13(1):15755. DOI: 10.1038/s41598-023-41994-6
61. Bertout S, Gouveia T, Krasteva D, Pierru J, Pottier C, Bellet V, et al. Search for *Cryptococcus neoformans/gattii* complexes and related genera (*Filobasidium*, *Holtermanniella*, *Naganishia*, *Papiliotrema*, *Solicoccozyma*, *Vishniacozyma*) spp. biotope: Two years surveillance of wild avian fauna in southern France. *J Fungi (Basel).* 2022;8(3):227. <https://doi.org/10.3390/jof8030227>
62. Connell L, Redman R, Craig S, Scorzetti G, Iszard M, Rodríguez R. Diversidad de levaduras del suelo aisladas de South Victoria Land, Antártida. *Microb Ecol.* 2008 Oct;56(3):448-59. DOI: 10.1007/s00248-008-9363-1
63. Duarte A, Ordoñez N, Castañeda E. Asociación de levaduras del género *Cryptococcus* con especies de *Eucalyptus* en Santafé de Bogotá. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet].* 1994;36(2):125–30. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S0036-46651994000200006>
64. Zhou Y, Jia B-S, Zhou Y-G, Li A-H, Xue L. *Naganishia floricola* sp. nov., a novel basidiomycetous yeast species isolated from flowers of *Sorbaria sorbifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020;70(8):4496-501. DOI: 10.1099/ijsem.0.004304
65. Hydrolytic Enzyme Production and Susceptibility to Antifungal Compounds of Opportunistic *Candida parapsilosis* Strains Isolated from *Cucurbitaceae* and *Rosaceae* Fruits. [citado el 11 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2673-8007/3/1/14>

66. Bijlani S, Parker C, Singh NK, Sierra MA, Foux J, Wang CCC, Mason CE, Venkateswaran K. Genomic Characterization of the Titan-like Cell Producing *Naganishia tulchinskyi*, the First Novel Eukaryote Isolated from the International Space Station. *J Fungi (Basel)*. 2022 Feb 8;8(2):165. DOI: 10.3390/jof8020165
67. Leo P, de Melo Teixeira M, Chander AM, Singh NK, Simpson AC, Yurkov A, Karouia F, Stajich JE, Mason CE, Venkateswaran K. Genomic characterization and radiation tolerance of *Naganishia kalamii* sp. nov. and *Cystobasidium onofrii* sp. nov. from Mars 2020 mission assembly facilities. *IMA Fungus*. 2023;14(1):15. <https://doi.org/10.1186/s43008-023-00119-4>
68. Moubasher AH, Abdel-Sater MA, Soliman ZSM. Diversity of floricolous yeasts and filamentous fungi of some ornamental and edible fruit plants in Assiut area, Egypt. *Curr Res Environ Appl Mycol*. 2018;8(1):135-161. Disponible en: https://www.creamjournal.org/pdf/CREAM_8_1_12.pdf
69. Pozo M, de Vega C, Canto A, Herrera C. Presence of yeasts in floral nectar is consistent with the hypothesis of microbial-mediated signaling in plant-pollinator interactions. *Plant Signal Behav*. 2009 Nov;4(11):1102–4. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9874>
70. Jacquemyn H, Pozo MI, Álvarez-Pérez S, Lievens B, Fukami T. Yeast–nectar interactions: metacommunities and effects on pollinators. *Curr Opin Insect Sci*. 2021;44:35–40. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.09.014>
71. Carvalho JK, Panatta AAS, Silveira MAD, Tav C, Johann S, Rodrigues MLF, Martins CVB. Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2021;30:e00630. DOI: 10.1016/j.btre.2021.e00630

72. Kachalkin A, Glushakova A, Streletskii R. Diversity of endophytic yeasts from agricultural fruits positive for phytohormone IAA production. *BioTech (Basel)* [Internet]. 2022;11(3):38. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/biotech11030038>
73. Natsiopoulou D, Topalidou E, Mantzoukas S, Eliopoulos PA. Endophytic Trichoderma: Potential and prospects for plant health management. *Pathogens* [Internet]. 2024;13(7):548. Disponible en: DOI: 10.3390/pathogens13070548
74. Woo, S.L., Hermosa, R., Lorito, M. et al. Trichoderma: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nat Rev Microbiol* 21, 312–326 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5>
75. Shaaban, R., Elnaggar, MS, Khalil, N. *et al.* A comprehensive review on the medicinally valuable endosymbiotic fungi *Penicillium chrysogenum*. *Arch Microbiol* **205**, 240 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03580-2>
76. Murali M, Sudisha J, Amruthesh KN, Ito S -I., Shetty HS. Rhizosphere fungus *penicillium chrysogenum* promotes growth and induces defence-related genes and downy mildew disease resistance in Pearl Millet. *Plant Biology*. 2012 Jun 5;15(1):111–8. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2012.00617.x
77. Fu J, Zhang S, Wu J, Chen Y, Zhong Y, Zhou Y, et al. Structural characterization of a polysaccharide from dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* that induces resistance to Tobacco mosaic virus in tobacco plants. *Int J Biol Macromol*. 2020;156:67-79. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.050
78. Salem, SS, Fouda, MMG, Fouda, A. *et al.* Antibacterial, Cytotoxicity and Larvicidal Activity of Green Synthesized Selenium Nanoparticles Using *Penicillium corylophilum*. *J Clust Sci* **32**, 351–361 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01794-8>

79. ScienceDirect. Penicillium [Internet]. *ScienceDirect Topics*. [citado *coloca aquí la fecha de consulta*, ej. 10 Jul 2024]. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/topics/food-science/penicillium>
80. Madeira F, Madhusoodanan N, Lee J, Eusebi A, Niewielska A, Tivey ARN, Lopez R, Butcher S. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Res*. 2024 Jul;52(W1):W521–W525.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkae241> PMID: 38597606.
81. Rodríguez Pinto M del V, Campo Arana RO, Cardona Ayala CE, Manjarres Cogollo EE, Rossi Torecilla BJ. Trichoderma spp. biocontrolador de marchitez vascular (Fusarium spp.) de la berenjena en el Caribe colombiano: Manejo de Fusarium spp en berenjena. *Biotecnología Sect Agropecu Agroindustrial* [Internet]. 2021 [citado el 23 de abril de 2025];19(2):158–69. Disponible en:
<https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1847>
82. Poveda J. Trichoderma as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. *Biol Control* [Internet]. 2021;159(104634):104634. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104634>
83. Jiménez-Bremont JF, González-Pérez E, Ortega-Amaro MA, Madrigal-Ortiz S, Duque-Ortiz A, Mendoza-Mendoza A. Volatile organic compounds emitted by Trichoderma: Small molecules with biotechnological potential. *Sci Hortic (Amsterdam)* [Internet]. 2024;325(112656):112656. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112656>
84. Kieliszek M, Kot AM, Bzducha-Wróbel A, Błazejak S, Gientka I, Kurcz A. Biotechnological use of Candida yeasts in the food industry: A review. *Fungal Biol Rev* [Internet]. 2017;31(4):185–98. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2017.06.001>

85. Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, et al. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2015;79(3):293–320. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>
86. Waqar S, Bhat AA, Khan AA. Hongos endófitos: Desentrañando la interacción planta-endófito y el papel multifacético de los hongos endófitos en la mejora del estrés. *Plant Physiol Biochem* [Internet]. 2024;206(108174):108174. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108174>

Anexos

Anexo 1. Protocolo de extracción Kit Wizard® Genomic DNA Purification para levaduras

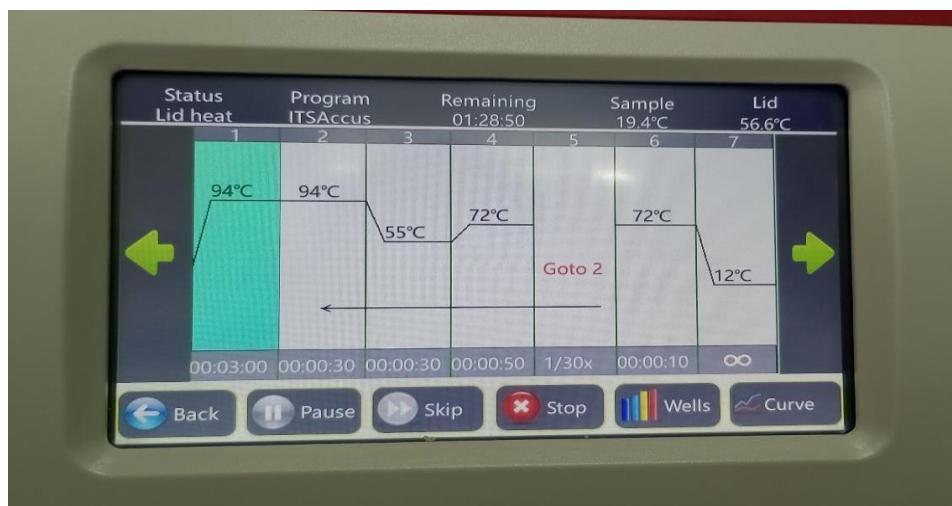
1. Centrifugar a 16000 rpm por 2 minutos el caldo previamente inoculado, se descarta el sobrenadante y se agrega 300 μ l de di Nuclei Lysis Solution y se lleva 5 minutos en agua hirviendo y 3 min de vórtex (se repite este proceso 3 veces)
2. Agregar 100 μ l de Protein Precipitation Solution, llevar a vórtex por 20 segundos y luego 10 minutos en hielo.
3. Centrifugar a 16000 rpm por 3 minutos.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf.
5. Agregar 300 μ l de isopropanol, mezclar suavemente y centrifugar a 16000 rpm por 2 minutos.
6. Se descarta suavemente el sobrenadante y agregar 600 μ l de etanol 70%. Mezclar suavemente y centrifugar a 16000 rpm por 2 minutos.
7. Descartar el etanol y dejar secar al aire 15 minutos.
8. Agregar 100 μ l de solución de rehidratación y llevar a vórtex. Incubar toda la noche a 4°C.

Anexo 2. Obtención de micelio por filtración



Figura 6. Sistema con embudo de filtración por membrana al vacío.

Anexo 3. Protocolo de PCR



A. Denaturalización inicial (94 °C - 3 minutos) B. Denaturalización (94 °C - 3 segundos)
C. Anillamiento (55 °C - 30 segundos) D. Extensión (72°C 50 segundos). Esto se repitió en el tiempo de termociclaje con 30 ciclos y continuo con una extensión final (72°C por 10 min). Las muestras se conservaron a 4 °C.

Anexo 4. Secuencias consenso

F1-3

```
>EMBOSS0001
GATACTGTCTGTCGAGCTTGCTCACAGACTTATCATATCCATAACACCTGTGCACTTGTG
GGATGGCTTAGTGAAGACCGCAAGGTTGGAACATCCATCTACTTTACATAACAATTTAG
TAACAAATGTAGTCTTATTATAACATAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCCTGGTATTCGGGGAGCATGCCTGTTTGGAG
TGTTCATGAAAACCTCAACCTTAGATTGGTTAACACCTTTCTTTGGCTTGGATTTGGACG
TTTGCCGATGATAAGTCGGCTCGTCTTAAAAGTAATAGCTGGATCTGTCTCGCGACATGG
TTTGACTTGGCGTAATAAGTATTTTCGCTAAGGACATCTTCGGATGGCCGCGTTGCAAGAC
TAAAGACCGCTTCTAATCCATTGATCTTCGGATTAATATTCTTGACATCTGGCCTCAA
TCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATCAAATCAGGTAGGA
```

H1-SE

```
>EMBOSS0001
TCTGGGTACCTCCCACCCATGTTTATTGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCAG
GCCGCCGGGGGCTTCTGCCCTCTGGCCCGCGCCCGGAAGACACCATTGAACACTGTC
TGAAGATTGCAGTCTGAGCAATTAGCTAAATAAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCT
GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTGTGTGTTGGGCCCGCTCCTCCTTCCC
GGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTT
TGTACCCGCTCTTGTAGGCCCGCGCGCTTGGCACAACCATCAATCTTTTTCAGG
TTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA
ACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGACGGAGGAA
```

H3-TE

>EMBOSS0001
TCTGGGTCCACCTCCCACCCATGTTTATTGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCAC
GGCCCGGGGGGCTTCTGCCCTCTGGCCCGCCCGCCGAAGACACCATTGAACACTGT
CTGAAGATTGCAGTCTGAGCAATTAGCTAAATAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCT
TGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCC
TGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCTTCC
CGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCT
TTGTCACCCGCTCTTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGACAACCATCAATCTTTTTTTCAG
GTTGACCTCGGATCAGGTAGGATAACCCGCTGAACTTAAGCATATCAGGTGACCTCGATC
AGGTA

F2-4

>EMBOSS0001
GATACTGGTCTGTCCGAGCTTGTCCAGACTTATCATATCCATAACACCAGTGCACATGT
CAGATGGCTTACCCCTTTCAGGAAGGTGGGAECTATCCATCTACCTTACCTAACAAATTA
TTAACAAATGTAGACTTATTATTACGTCGTAAACTCTTCAACAACAGCTCTCGTTGTGC
TCTCGCATCTGATGACGAACGGCTGCGCGCTGCTATATAGTAATGAGTGCACATAAACCA
GAATCATGTAATCTCTTAAACACATTGCGCCCTTGGTGTTCCAAAGGCATGCCTGTT
TGAGCGTCATTTCTCCCTCATACCCTCAGGTTTGGTGTGACCGATACTCTGGGTTTTCT
TGACAGAAATGCGCACTATAACCAAAGGCAACCGTTTTTCCACTTCGTTGATACAACT
CCAAAAGCTTCTTCAAATTCGAACCTGAACTCAGTGTAGGGACTACCCCGCTGAACTTC
AGCAGATCTCAGACCATAAAAGGAAACACTTCTTTCTTGACATCTGGCCTCAAATCAG
GAGGA

H4-HE

>EMBOSS0001
ATGATTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGATGCGCCTTACTGGGGGGAGGGGGCTTAC
GCTCTCGGGCTCGCGCCCGCCGTAACCACTATCCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGT
CTGAGTGAAAATATAAATATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCCGGCATAG
ATGAAAAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAG
TCTTTGAACGCGCATTGCGCCCTGTTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT
GCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCGATCCCGGGCGACGGGCC
GAAAGGCAGCGGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTGTACCCCGCTCT
GTAGCCCGGGCGGCTTGCCGATCAACCAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCA
GGTAGGATAACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAACGGCACGAAGAGATTAAGC

H4-a

>EMBOSS0001
ATGATCCCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACC
CCAATGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGCGCGTCCGAG
CCCCGGATCCCATGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAACTCTTTTTTCTCTCCGTCCGCT
GCCTCGGCGAGGGCTCTGTTATACTTTTTTGTCTGAGCCTTCTCGGCGACCTTAGCG
GGCGTCTCGAAAATGAATCAAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
TTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCA
ACCTCGAACCCCTCCGGGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACGGGGCGCCCCG
AAATACATGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCGCCC
AACGCGGCGGGCCACAGCCGTAAACACCCCAACTCTGAAATGTGACCTCGGATCA