

Cuernavaca, Mor., 11 de octubre del 2020

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **DECTOR ARRIAGA LAURA ALICIA**, con el título del trabajo: **AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS DE LA PLANTA DE RESURRECCIÓN *Selaginella lepidophylla*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR:      SI (XXX)              NO (\_\_\_\_)

ATENTAMENTE



---

**DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2020-10-12 20:16:33 | Firmante**

kmAxqIKyAW3/VU/kTRuV8a6OeT+wKTzTR0nLtGLseWxHb0fy6k8hVY3fAtsdXH9Bu9sD2ofwDK7+aQFdxSX0w2tP8wH7Y47wuxACkVKTpJi5JfO6bwKHuAO8yqcodZQLa2nG6LJv3B7+IGgdmyrIBjw7NIYmBftrVo6Nt+haK69yqKyD1j51aeeWVJpqIP0qjA+fEdhHXXXuVsGsvNNamVQLwclPccpcOMHBWulXxO1+Dpb5Zoe+Gl+fpli860UI9eonL4y8ieevDKEitW9Gq3X7EDkIQB12EQ0wDmz6DfLuyeuG0LKGit11kfc4DeAzCD47UBG3OcBwn9U4yItjQ==

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



**b7SW0G**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/J2z5KwDkEm8yk3N5tkJkTpLozFpUlzqn>



Cuernavaca, Mor., 29 Octubre de 2020

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **DECTOR ARRIAGA LAURA ALICIA**, con el título del trabajo: **AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS DE LA PLANTA DE RESURRECCIÓN *Selaginella lepidophylla*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR:      SI (X)              NO (\_\_\_\_)

A T E N T A M E N T E



**DRA. SUSANA VALENCÍA DÍAZ**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**SUSANA VALENCIA DIAZ** | Fecha:2020-10-29 12:07:50 | Firmante

FwQmXiC3l27r8ln1RM+9jUM8Gct6jEbAiciDWCv7xS66bN6MWk1F8CsBEj4E6x4Wc+m3srJj0OrxASdh1vvnqm3rUCRpLB1lu+fnnw3jCPceHFKoDT6aeXkqAGrwUT3Z0wFfHj3RpXosTQBnqK5hMSdB8Q3GWcj2VK8YjI90zKwZBvJmVwb44fpEQczRZ4xfMWz7wm8q+Lq0EXWp+Uvt1ILKLzsuBbPi6iVFOc95NiNTkkO88iEnWBFKmkLbX4eQw19PWf6kjm74fupqOcAndSO9gkF+o6al8hWcy8vQyve7tvr4rikX1BNq8JdWVIWhP1MaTO39VeevR10pRbHB6A==

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



**JfdHW8**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/USruKrPYT3p7KsgJwAazxZcnD662w4uq>



Cuernavaca, Mor., 12 de octubre de 2020


**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **DECTOR ARRIAGA LAURA ALICIA**, con el título del trabajo: **AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS DE LA PLANTA DE RESURRECCIÓN *Selaginella lepidophylla*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR:      SI ( X )              NO ( \_\_\_ )

ATENTAMENTE



---

**DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2020-10-12 11:08:02 | Firmante**

fR+hhoGNOSOCu1mGr10rD8O0x5FcY51AP2cDh9xHLkAthgd/FedGHUICp1X6zggJfkBeqo5UguQX9YhAqvX/4S7Jlu5aUn2joXShh+fJMqsMgni2qdxPraJ1CqkGujdQWYYIjml+Bof5mF7HP/uD0HR2gVAyXScBZV5iliMCIhshXCzFS96lVaPdx32bqrabElbljob3Cw05gLYgFAWxNY5NZgnyjNbQvAhQ1mmQR0dwOA/CG9jzDtljL3TonGzzkgSPhXVglJObOQOFb7uf8jcNT2akv0sNKJxc3dCYxfJ+c16wTDF8MSwVbbzEEeFWydoWgtShmLPOaqT/uRfg==

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



[GerU1Q](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/P21j9ehgdJRs4QLFxIQoTPNLWaqH3hRX>



Cuernavaca, Mor., a 12 de octubre de 2020

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **DECTOR ARRIAGA LAURA ALICIA**, con el título del trabajo: **AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS DE LA PLANTA DE RESURRECCIÓN *Selaginella lepidophylla*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR:      SI ( X )              NO ( \_\_\_\_ )

A T E N T A M E N T E

---

**DRA. VERÓNICA OBREGÓN BARBOZA**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**VERONICA OBREGON BARBOZA** | Fecha:2020-10-12 11:03:32 | Firmante

NPRMw+p6FKJrXlCpPa8VRDJ8J5736oVyYv6hzR2mhUtwlvpzhn4m6oOJG0SLOYl1SMUZSQfH/SCHT0Op6p0la8n0U7G1Uh+aOJNa5sbJk/ZkygPJnm99ft9g+CJYVW1Ug4hRknZRyk70OqPxcMmSQ23D7L+D1x+xnzz0LT5KaoPUo5XPwz2whtVo9MCKtCdV/7iWcbunQq5bOyOZKjY5l2VwbDijl+imbjKe926MyqxQs1UtWJhUWYk1N7PXB3dRc1bRKAbavRrLvVlRReSgjZVPY6TMPNkXXbzNnFirlqLtokG3OnqLz4LIHgZxkesKU3gS1+Ja6xx00hjpQIQGQ==

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



qE7DJX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/D58ILM9UKQPi8eQ2RBYLzyUJJ0OpkSvN>







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Mor., \_\_\_a 20 de octubre 2020.

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **DECTOR ARRIAGA LAURA ALICIA**, con el título del trabajo: **AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS DE LA PLANTA DE RESURRECCIÓN *Selaginella lepidophylla*** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR:    SI ()            NO ()

ATENTAMENTE

DR. MARIO RAMÍREZ YÁÑEZ

**UA  
EM**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Aislamiento, identificación y caracterización de hongos  
endófitos de la planta de resurrección *Selaginella  
lepidophylla*”**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**LAURA ALICIA DECTOR ARRIAGA**

**CODIRECTORES**

**DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ  
DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO**

**CUERNAVACA, MORELOS  
DICIEMBRE, 2020**

## Agradecimientos

A lo largo de este proyecto he contado con la ayuda de muchas personas, a las que debo mi completa gratitud. En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis y tutor de carrera, el Dr. Ramón Suárez Rodríguez, por estar siempre pendiente de mi desarrollo como estudiante y ayudarme en cada paso que di por la Facultad. Del mismo modo, a mi co-director, el Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, por apoyarme en gran medida con la parte experimental del proyecto, por sus sugerencias y conocimientos, también por las llamadas de atención que me ayudaron siempre a mejorar mi desarrollo en el laboratorio. Gracias a ambos por darme un espacio en su laboratorio y permitirme ser parte de este gran proyecto, por la confianza que me brindaron y por todas sus aportaciones y recomendaciones hasta el final del mismo, que sin su ayuda no hubiera sido posible.

A cada uno de mis sinodales, la Dra. Susana Valencia Díaz, Dr. Mario Ramírez Yáñez, Dr. Edgar Dantán González y Dra. Verónica Obregón Barboza, por haberme brindado sus conocimientos y que con sus preguntas, sugerencias y recomendaciones en cada seminario me ayudaron a mejorar y sacar el mejor provecho a este proyecto.

A la técnica del Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, la Mtra. Nancy Sofía Hernández-Bueno, por sus consejos y ayuda para el desarrollo experimental. A mis compañeros y amigos de laboratorio, Fernando y Lupita, gracias por brindarme su apoyo y amistad, por ayudarme a resolver cada una de mis dudas, apoyarme y animarme cuando cometía algún error. ¡Les deseo mucho éxito en sus próximos proyectos!

A mis queridos amigos de la carrera, Gaby, Abiram, Leslie, Regina, Ixil, Aldair, Miguel, Emmanuel, Zurizadai, y a los amigos de fuera, Diana, Paola, Jennifer, Sabrina, a Irene y Sergio. Gracias por escucharme siempre, aconsejarme cuando tuve problemas y, en general, todas sus locuras, pero sobre todo por brindarme su amistad. Ustedes son y siempre serán parte importante de mi vida. Nunca cambien.

Por último, quiero agradecer a mi familia, a mi novio, Hugo, por todo su apoyo y por echarme porras para poder concluir este ciclo. En especial, quiero agradecer a mis papás, Marcela y Jorge, a mis hermanos, Erika, Mauricio, Emilio, Jimena y Abigail, que siempre estuvieron apoyándome y alentándome en todo lo que necesitaba. Ustedes son el motivo por el que yo he llegado hasta aquí. Los amo.

A todos ustedes,  
*¡Muchas gracias!*

**Laura.**

## Dedicatoria

Con mucho cariño, dedico este proyecto a cada uno de mis seres queridos, quienes han sido mis pilares para siempre seguir adelante. Es para mí una gran satisfacción poder dedicarles a ellos, que con mucho esfuerzo, esmero y trabajo me lo he ganado.

A mis papás, Marcela y Jorge, porque ustedes son la motivación de mi vida, los guías que me permitieron llegar hasta este momento, los que con su aliento y cariño me alentaron a seguir mi sueño y a no echarme para atrás cuando sentía que ya no podía. Sin ustedes yo no habría podido llegar hasta aquí. Este logro es para ustedes.

A mis hermanos, Erika, Mauricio, Emilio, Jimena y Abigail, porque con su ejemplo y ánimo me enseñaron que todo esfuerzo conlleva sacrificios pero hay que echarle ganas y no darse por vencido; ustedes son la razón de sentirme orgullosa de culminar esta meta en mi vida. Gracias por siempre confiar en mí y echarme porras en tiempos de estrés (ya me conocen).

A mi novio, Hugo, por estar a mi lado a lo largo de todo este trayecto. Gracias por animarme y ayudarme cada vez que lo necesité (como a combatir mis nervios antes de cada seminario), por siempre escucharme y celebrar conmigo cada uno de mis logros. Has sido una parte importante en mi crecimiento, como estudiante y persona.

Y sin dejar atrás, a mi loca y amorosa familia por confiar en mí; a mis tíos y primos, a mis ángeles que desde donde quiera que estén sé que están alegres de verme llegar a la conclusión de esta etapa. Gracias por ser parte de mi vida y permitirme ser parte de su orgullo.

De forma especial, quiero también dedicar este proyecto a Jocelyn Suárez (†). Fuiste una chica que me enseñó mucho acerca de la vida en el poco tiempo que compartí contigo. Gracias por inspirarme a amar la Biología, la carrera y la vida. En donde quiera que te encuentres, espero que sepas lo mucho que me enorgullece haberte conocido.

# Contenido

RESUMEN .....	v
1. <b>Introducción</b> .....	1
2. <b>Marco teórico</b> .....	2
<b>2.1 El estrés en los organismos</b> .....	2
2.1.1 Estrés hídrico.....	2
<b>2.2 Género <i>Selaginella</i></b> .....	5
2.2.1 <i>Selaginella lepidophylla</i> .....	7
<b>2.3 Trehalosa</b> .....	8
2.3.1 Propiedades fisicoquímicas de la trehalosa.....	9
2.3.2 Vías de Síntesis y degradación de la trehalosa .....	10
<b>2.4 Organismos endófitos</b> .....	12
2.4.1 Endósfera .....	13
2.4.2 Hongos endófitos.....	14
2.4.3 Interacción hongo-planta .....	15
<b>2.5 Aislamiento e identificación de hongos endófitos</b> .....	18
3. <b>Justificación</b> .....	20
4. <b>Hipótesis</b> .....	21
5. <b>Objetivos</b> .....	21
5.1 Objetivo general .....	21
5.2 Objetivos particulares.....	21
6. <b>Metodología</b> .....	21
6.1 Estrategia experimental.....	21
6.2 Origen de las muestras .....	22
6.3 Aislamiento e identificación de endófitos en <i>Selaginella lepidophylla</i> en estado hidratado y deshidratado.....	22
6.4 Cuantificación de Ácido Indolacético (IAA).....	23
6.5 Producción de Sideróforos .....	24
6.6 Solubilización de fosfatos.....	24
6.7 Extracción de DNA de los endófitos aislados.....	24
6.8 Amplificación de la región ITS.....	25
6.9 Análisis filogenético.....	26
6.10. Análisis estadístico.....	26
7. <b>Resultados</b> .....	27

7.1	Aislamiento e identificación de hongos endófitos de <i>S. lepidophylla</i> .....	27
7.2	Cuantificación de Ácido Indolacético (AIA) en hongos endófitos de <i>S. lepidophylla</i> .....	30
7.3	Producción de sideróforos.....	30
7.4.	Solubilización de fosfatos.....	32
7.5	Identificación molecular de los hongos endófitos de <i>S. lepidophylla</i> .....	33
7.6.	Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM).....	39
8.	<b>Discusión</b> .....	41
9.	<b>Conclusiones</b> .....	45
10.	<b>Perspectivas</b> .....	45
11.	<b>Bibliografía</b> .....	46

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Factores que determinan la respuesta de la planta al estrés. ....	2
<b>Figura 2.</b> Estrategias empleadas por las plantas para resistir la sequía.....	3
<b>Figura 3.</b> Mecanismos fisiológicos de adaptación y sobrevivencia al estrés hídrico en plantas.....	4
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de tolerancia a la desecación en la planta de resurrección <i>Xerophyta viscosa</i> . ....	5
<b>Figura 5.</b> Relación filogenética del orden Selaginellales respecto a otros grupos de plantas, y dentro del cual se encuentra <i>S. lepidophylla</i> .....	6
<b>Figura 6.</b> Estructura general del género <i>Selaginella</i> . ....	6
<b>Figura 7.</b> Planta de <i>S. lepidophylla</i> en estado hidratado y deshidratado. ....	8
<b>Figura 8.</b> Historia evolutiva de la biosíntesis de trehalosa. ....	9
<b>Figura 9.</b> Modelo de osmoprotección de la trehalosa. ....	10
<b>Figura 10.</b> Vías de biosíntesis de la trehalosa. ....	12
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de las principales fuentes de microbios que componen las comunidades asociadas a las plantas.....	13
<b>Figura 12.</b> Representación gráfica de los efectos de los OPCV en las plantas. ...	16
<b>Figura 13.</b> Estructura del grupo de genes de ARNr y posiciones de los cebadores de PCR fúngicos. ....	19
<b>Figura 14.</b> Ubicación geográfica del poblado de San Andrés de la Cal en Tepoztlán, Morelos. ....	22
<b>Figura 15.</b> Clasificación de los hongos endófitos aislados de <i>S. lepidophylla</i> de acuerdo con su coloración.....	28
<b>Figura 16.</b> Producción de ácido indolacético (AIA) de 59 aislados fúngicos en medio Czapek-Dox con y sin adición de triptófano.....	30
<b>Figura 17.</b> Representación de la reacción en el medio CAS por la producción de sideróforos.....	32
<b>Figura 18.</b> Solubilización de fosfatos en medio PVK por los aislados Ri 24 y Mi 46. ....	33
<b>Figura 19.</b> Construcción del árbol filogenético a partir de las secuencias analizadas de 23 aislados fúngicos identificados. ....	36
<b>Figura 20.</b> Gráfico del análisis de correspondencia múltiple a partir de los resultados del aislamiento de hongos endófitos de <i>S. lepidophylla</i> .....	40

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Grupos y clases de hongos endófitos. ....	15
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región ITS. ....	25
<b>Tabla 3.</b> Condiciones para la amplificación de la región ITS por PCR. ....	25
<b>Tabla 4.</b> Aislados de hongos endófitos de <i>S. lepidophylla</i> en dos estados de la planta. ....	27
<b>Tabla 5.</b> Características macro y micromorfológicas de aislados pertenecientes a los géneros <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i> . ....	29
<b>Tabla 6.</b> Producción de AIA en presencia y/o ausencia de triptófano. ....	30
<b>Tabla 7.</b> Ensayo para la determinación de producción de sideróforos para aislados fúngicos de <i>S. lepidophylla</i> . ....	31
<b>Tabla 8.</b> Determinación de solubilización de fosfatos para aislados fúngicos de <i>S. lepidophylla</i> . ....	32
<b>Tabla 9.</b> Aislados seleccionados para identificación molecular (ITS). ....	33
<b>Tabla 10.</b> Identificación molecular para diferentes aislados fúngicos obtenidos de <i>S. lepidophylla</i> (ITS). ....	35
<b>Tabla 11.</b> Características y mecanismos reportados para la promoción de crecimiento vegetal por diferentes géneros de hongos endófitos aislados de <i>S. lepidophylla</i> . ....	37
<b>Tabla 12.</b> Resultados del Análisis de Correspondencia Múltiple de los aislados fúngicos de <i>S. lepidophylla</i> . ....	39



## RESUMEN

*Selaginella lepidophylla* es una planta conocida debido a que puede sobrevivir largos periodos en estado deshidratado, gracias a su capacidad para tolerar la deshidratación. Esta predisposición se debe a la expresión y síntesis de metabolitos que fungen como osmo-protectores ante diversos factores de estrés; dentro de estos, la síntesis y acumulación de grandes cantidades de trehalosa se considera como el principal mecanismo de la tolerancia a la deshidratación. Sin embargo, se ha reportado que los niveles de trehalosa no son exclusivos de *S. lepidophylla*, sino que su acumulación se debe a la presencia de organismos endófitos asociados a ella que pueden sintetizarla. Los hongos endófitos, en particular, constituyen un grupo de microorganismos que se consideran socios simbióticos importantes para el desarrollo de las plantas, al desarrollar funciones tales como la promoción del crecimiento, la adquisición de recursos del suelo y la tolerancia a diferentes tipos de estrés.

El objetivo del presente trabajo fue el de aislar e identificar los endófitos fúngicos asociados a *Selaginella lepidophylla* de dos estados fisiológicos naturales de la planta (hidratada y deshidratada), así como también determinar sus características de promoción del crecimiento vegetal: síntesis ácido indolacético (AIA), producción de sideróforos y solubilización de fosfatos.

Se obtuvieron 81 aislados a partir de las micrófilas y rizóforos de *S. lepidophylla*. La síntesis de ácido indolacético (AIA) se observó en 59 aislados, los cuales mostraron capacidad para sintetizarlo en presencia y/o ausencia de triptófano. Con base en la producción de sideróforos, 25 aislados mostraron capacidad para quelar hierro, pudiendo observarse sideróforos de tipo hidroxamato y catecol; por otro lado, sólo dos aislados fúngicos mostraron capacidad para solubilizar fosfatos.

Con base en sus características de promoción del crecimiento, se eligieron 23 aislados para su identificación mediante herramientas moleculares amplificando la región ITS, logrando identificar hongos pertenecientes a los géneros *Setophoma*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Didymella*, *Stagonosporopsis*, *Phoma*, *Didymocrea*, *Nigrospora*, *Arthrinium*, *Trichoderma* y *Fusarium*.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permitieron vislumbrar los diferentes mecanismos mediante los cuales los hongos endófitos asociados a *S. lepidophylla* pudieran estar confiriendo algún beneficio a la planta. De manera adicional, se espera que en un futuro algunos aislados sean evaluados para determinar su capacidad de sintetizar trehalosa y su efecto como organismos promotores del crecimiento en plantas de interés agrícola.

A nuestro conocimiento, este es el primer reporte realizado sobre los hongos endófitos asociados a *S. lepidophylla*.

## 1. Introducción

Los hongos endófitos son organismos que viven en asociación con plantas en la mayor parte o todo su ciclo de vida, y se encuentran en hojas, tallos y raíces de muchas plantas. Las interacciones entre los hongos endófitos y las plantas se han establecido generalmente como mutualistas, antagonistas o neutralistas. Así, los endófitos, que toman nutrientes y protección de su hospedera, en retribución pueden beneficiarla al inducir su crecimiento, aumentar su tolerancia al estrés y producir metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural que le brindan protección y resistencia contra herbívoros y/o microorganismos fitopatógenos, así como a promover su crecimiento (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Debido a estas características, es que los hongos se consideran como socios simbióticos importantes para el desarrollo de las plantas (Barrow *et al.*, 2008; Hassan, 2017).

*Selaginella lepidophylla*, mejor conocida como “planta de la resurrección”, es una planta perteneciente a la familia Selaginellaceae, que se caracteriza por su capacidad de resistir largos periodos en desecación. La predisposición para el desarrollo de la tolerancia a la desecación de *S. lepidophylla* se debe a la expresión y síntesis de metabolitos que funcionan como osmo-protectores ante diversos factores de estrés; dentro de estos, la síntesis y acumulación de grandes cantidades de trehalosa se considera como el principal mecanismo de tolerancia a la desecación. Sin embargo, se ha reportado que los altos niveles de trehalosa pueden no ser el único componente implicado en la tolerancia a la deshidratación, ya que *S. moellendorffii*, que no es una planta de resurrección, contiene niveles más altos del disacárido que *S. lepidophylla* (Yobi *et al.*, 2012). Investigadores de la Universidad de Lovaina en Bélgica, en un intento por aislar y caracterizar los genes de biosíntesis de trehalosa de *Selaginella* a partir de una biblioteca de cDNA, mediante el uso de mutantes para la biosíntesis de trehalosa de levadura, resultaron en el aislamiento de un gran número de genes de biosíntesis de trehalosa de origen fúngico, lo que sugiere que estos organismos también participan en el aporte del disacárido (Pampurova *et al.*, 2014), y en la producción de otros metabolitos (producción de fitohormonas, agentes solubilizadores de hierro y fosfatos) que podrían influir en la capacidad de la tolerancia a la deshidratación de la planta. En el laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del CEIB (UAEM), se desarrolló un proyecto de establecimiento *in vitro* de plantas axénicas (libres de microorganismos endófitos) de *S. lepidophylla*, del cual resultó sumamente complicado adaptar plantas a condiciones de crecimiento en maceta, lo cual nos hace sugerir que los endófitos son importantes en el proceso de adaptación de un ambiente de alta humedad (*in vitro*) a uno de baja humedad (*ex vitro*). A nuestro conocimiento, éste es el primer reporte realizado sobre los hongos endófitos asociados a *S. lepidophylla*, y los resultados obtenidos en este estudio pueden servir como un primer indicio para denotar la capacidad que poseen estos organismos para conferir algún tipo de beneficio a las plantas.

## 2. Marco teórico.

### 2.1 El estrés en los organismos

Las plantas están continuamente expuestas a distintas condiciones de *estrés*, el cual se define como aquellas condiciones externas que afectan adversamente el crecimiento, desarrollo y productividad de éstas. El estrés puede ser *biótico*, impuesto por otros organismos, o *abiótico*, que surge por un déficit o exceso en el entorno físico o químico (inundaciones, sequías, altas o bajas temperaturas, salinidad excesiva del suelo, nutrientes minerales inadecuados y exceso o insuficiencia de luz, entre otros) (Buchanan *et al.*, 2006).

El estrés desencadena una amplia gama de respuestas de las plantas, desde alteraciones en la expresión génica y el metabolismo celular hasta cambios en la tasa de crecimiento y el rendimiento; la duración, intensidad y velocidad a la que se impone el estrés influye en la forma en que responde la planta (Figura 1).



**Figura 1. Factores que determinan la respuesta de la planta al estrés.** El genotipo y las circunstancias del desarrollo de la planta, la duración y la severidad del estrés y el número de exposiciones al que la planta fue sometida (Tomado y modificado de Buchanan *et al.*, 2006).

#### 2.1.1 Estrés hídrico

El estrés hídrico puede afectar a las plantas si el ambiente en el que se encuentran contiene un exceso de agua o si su volumen o calidad es insuficiente para sostener sus necesidades básicas. Muchas condiciones ambientales pueden ocasionar un déficit de agua en las plantas: periodos cortos de lluvia o ausencia de ésta, altas concentraciones de sal y/o bajas temperaturas. A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado diferentes respuestas y adaptaciones que les permiten sobrevivir en estas condiciones, afectando su morfología, fisiología y metabolismo (Figura 2) (Covarrubias, 2007).



**EVASIÓN A LA DESHIDRATACIÓN**  
- Almacenamiento de agua en tejidos suculentos  
- Metabolismo C4 y CAM  
**Cactáceas**



**ESCAPE A LA DESHIDRATACIÓN**  
- Acortamiento del ciclo de vida  
- Floración precoz  
**Plantas efímeras**

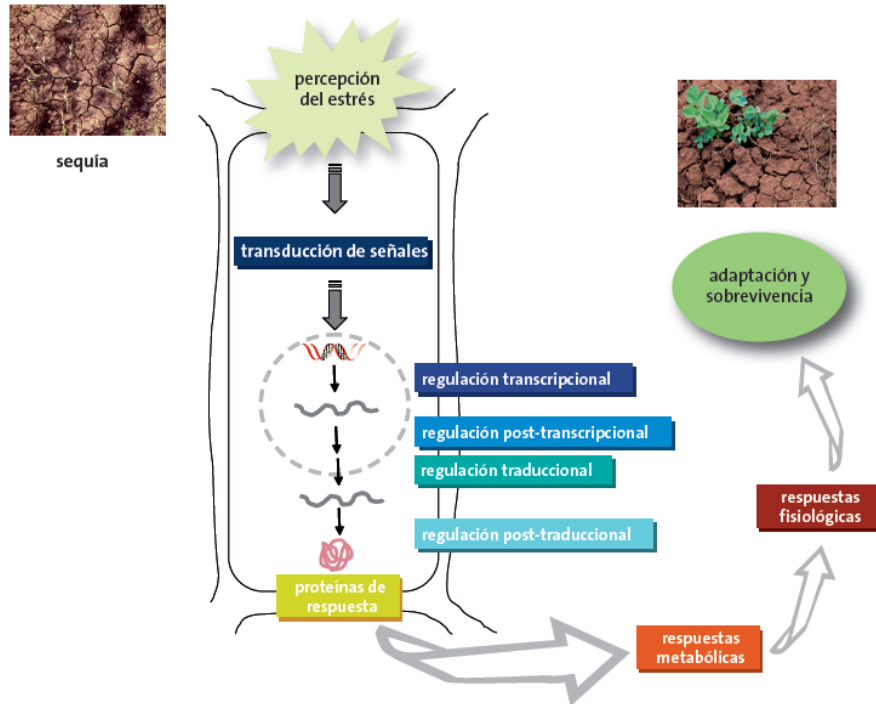


**TOLERANCIA A LA DESHIDRATACIÓN**  
- Sobreviven a la deshidratación total  
- Adaptaciones bioquímicas  
**Plantas de resurrección**

**Figura 2. Estrategias empleadas por las plantas para resistir la sequía.**

Los organismos, incluyendo las plantas, adaptados a la sequía poseen mecanismos, estructuras y estrategias que les confieren su aptitud para evitarla (cambios en la transpiración, respiración, fotosíntesis, distribución de nutrientes, ajuste osmótico) o tolerarla (Soriano, 1980). Dentro de estos mecanismos, se encuentra la tolerancia a la deshidratación, la cual se define como la capacidad que tienen algunos seres vivos (plantas, bacterias, hongos, insectos) para sobrevivir eventos extremos de falta de agua (pérdida del 80-95% de su contenido de agua total) sin sufrir daños irreparables (Pampurova & Van Dijck, 2014).

Las *plantas de resurrección* responden a la deficiencia de agua por medio de la combinación de diferentes mecanismos de protección, ya sea de manera constitutiva o inducida, los cuales van acompañados de distintos cambios fisiológicos, metabólicos y moleculares que les permiten sobrevivir en ese estado (Yobi *et al.*, 2013) (Figura 3).

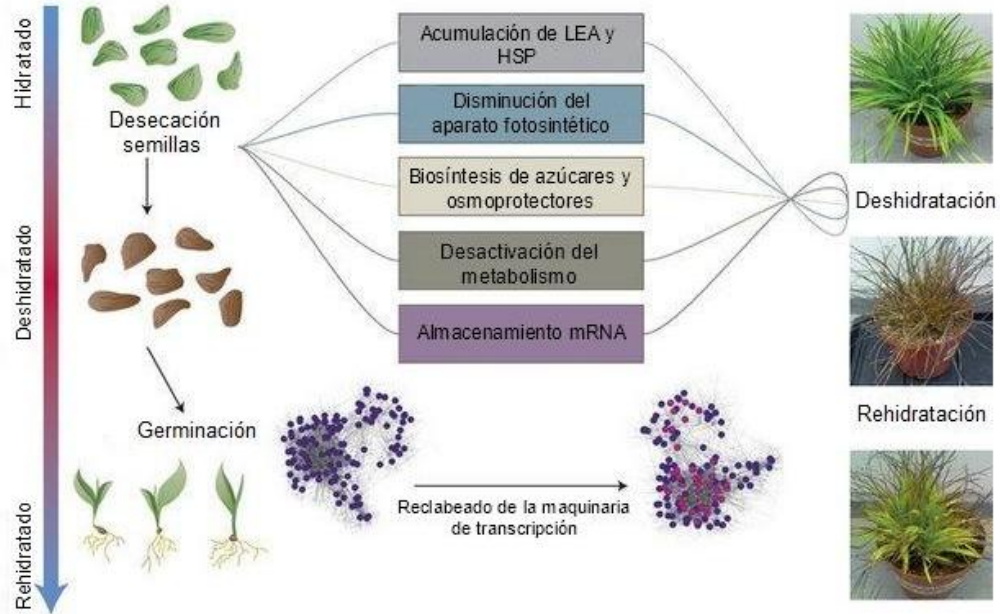


**Figura 3. Mecanismos fisiológicos de Adaptación y supervivencia al estrés hídrico en plantas** (Tomada de Covarrubias, 2007).

Algunos de los mecanismos de las plantas para tolerar la desecación son (Figura 4):

- **Expresión de genes (ELIPs, LEAs, HSPs):** las proteínas tempranas inducidas por luz (ELIPs) dan protección contra daño foto-oxidativo durante la fase de desecación. Por otro lado, las proteínas de embriogénesis tardía (LEAs) y de choque térmico (HSPs) proporcionan estabilidad a la membrana y estructura de las proteínas, y funcionan como un mecanismo de protección constitutivo (VanBuren *et al.*, 2018).
- **Síntesis de aminoácidos ( $\gamma$ -glutamil):** participan en el proceso de desintoxicación por especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la movilización de nitrógeno después de la rehidratación (Yobi *et al.*, 2013).
- **Síntesis de compuestos secundarios (flavonoles –apigenina, luteolina, naringenina-, estilbenos):** mitigan el daño causado por los radicales libres de la luz UV y estabilizan las estructuras de membrana (VanBuren *et al.*, 2018).
- **Acumulación de polioles (sorbitol, xilitol, glicerol):** los polioles son carbohidratos que contienen más grupos hidroxilo que el azúcar al cual están asociados, y ayudan a reducir la tensión superficial del agua, disminuyendo su pérdida durante el proceso de la desecación y ayudando a ingresarla en la rehidratación. También actúan como osmoprotectores, estabilizando la estructura de las proteínas y disparando genes de expresión de estrés adaptativo (ABA, HSP, DI, ERD, HTX) (Yobi *et al.*, 2013).
- **Acumulación de azúcares de manera constitutiva (sacarosa, glucosa, trehalosa):** la combinación de la sacarosa con otros azúcares o macromoléculas ayuda en la protección de los tejidos vegetales durante la

deseccación por medio de la formación de cristales anhidro o por el reemplazo de agua. La síntesis de trehalosa cumple con varias funciones, como fuente de carbono, componente estructural y molécula regulatoria (Pampurova *et al.*, 2014).

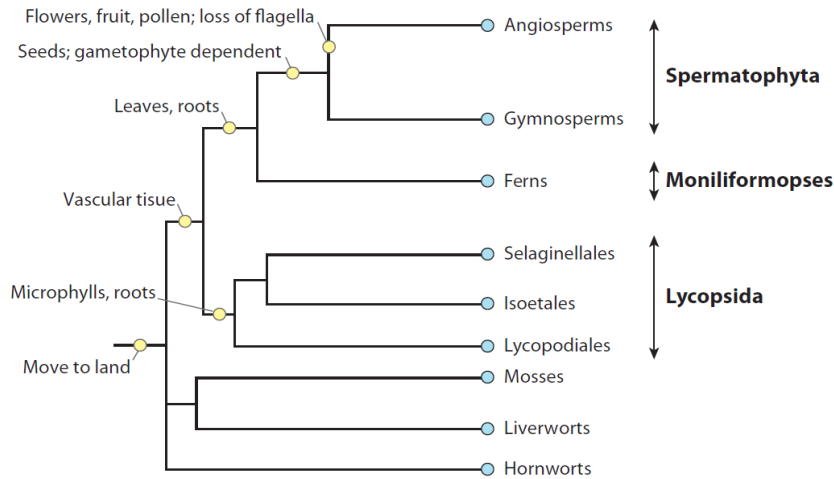


**Figura 4. Mecanismos de tolerancia a la desecación en la planta de resurrección *Xerophyta viscosa*** (Tomada de VanBuren, 2017).

## 2.2 Género *Selaginella*

Las licofitas representan un linaje de plantas vasculares clave compuesto por alrededor de 1000 especies, que incluye tres órdenes: Lycopodiales (licopodios), Isoetales (isoetes) y Selaginellales (selaginelas), que surgieron hace más de 400 millones de años durante el Silúrico y dominaron la flora de la Tierra desde el Devónico hasta el Carbonífero (Figura 5) (Yobi *et al.*, 2013).



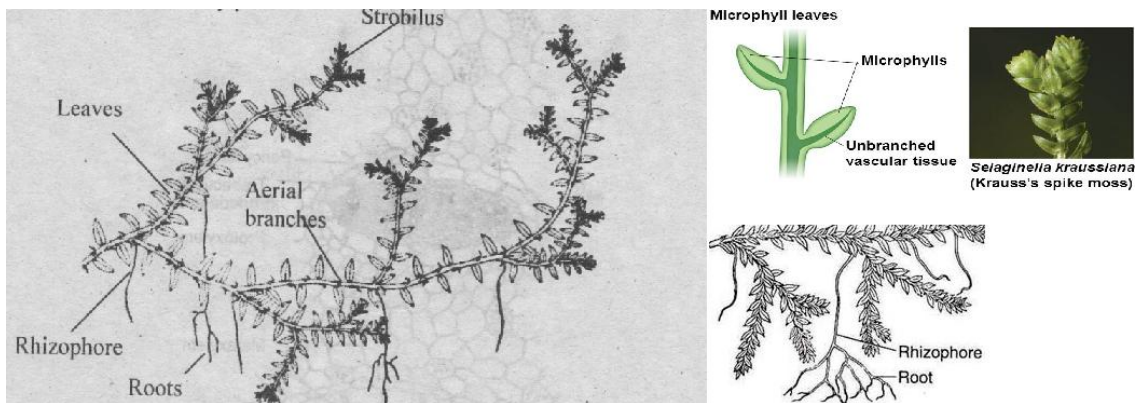


**Figura 5. Relación filogenética del orden Selaginellales respecto a otros grupos de plantas, y dentro del cual se encuentra *S. lepidophylla* (Tomada de Banks, 2009).**

Actualmente, *Selaginella* es el único género viviente del orden Selaginellales, y está conformado por aproximadamente 700 especies distribuidas en una gran variedad de hábitats (Yobi *et al.*, 2013).

El género está caracterizado por la presencia de micrófilas (hojas aplanadas dimórficas) y rizóforos (Figura 6) (Banks, 2009):

- **Micrófilas:** hojas con una sola vena no ramificada que está conectada directamente al haz vascular del tallo de la planta. Cada micrófila posee una simetría abaxial/adaxial distinta; la epidermis abaxial de las micrófilas dorsales y la epidermis adaxial de las micrófilas centrales tienen un solo cloroplasto por célula, y las estomas se limitan a la superficie abaxial.
- **Rizóforo:** primera estructura que emerge del meristemo apical de la planta para, finalmente, dar origen a la raíz.



**Figura 6. Estructura general del género *Selaginella* (Tomada y modificada de Banks, 2009).**

A pesar de que casi todas las especies de *Selaginella* son susceptibles a la deshidratación, algunas especies han desarrollado tolerancia a la deshidratación, y debido a esto son conocidas como “plantas de resurrección”; *S. lepidophylla*, en conjunto con *S. tamariscina* y *S. bryopteris* son algunas especies de la familia Selaginellaceae que han desarrollado esta capacidad (Yobi *et al.*, 2013).

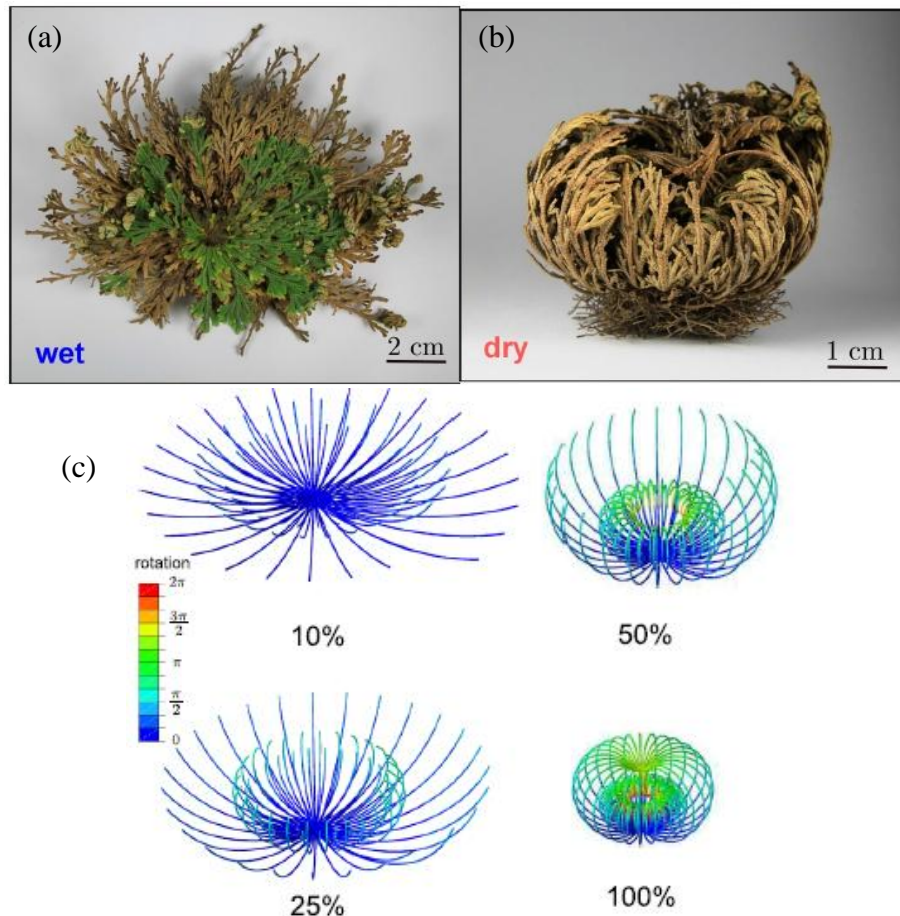
Las plantas de resurrección pasan por diferentes estados de desecación, los cuales van acompañados de diversos cambios fisiológicos, metabólicos y moleculares, representando una adaptación ecofisiológica particular entre las plantas vasculares (Yobi *et al.*, 2013). Un atributo importante para la tolerancia a la deshidratación de este tipo de plantas es su capacidad de acumular compuestos compatibles con su metabolismo como la prolina, el manitol, el pinitol, la betaína, la sacarosa y la trehalosa. Esta última juega un papel osmoprotector importante, estabilizando las membranas y estructura de las proteínas durante el periodo en que la planta está deshidratada (Iturriaga *et al.*, 2009).

### 2.2.1 *Selaginella lepidophylla*

*S. lepidophylla*, también conocida como “rosa de Jericó”, “siempre viva”, “doradilla” o “flor de roca”, es una planta xerófita originaria del desierto de Chihuahua que puede sobrevivir largos periodos de desecación (Figura 7); también se distribuye a lo largo del país, en los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas (Vázquez-Ramírez *et al.*, 2005). Se emplea como diurético y tratamiento para infecciones urinarias, cistitis, cálculos renales, inflamación de los riñones y para dolores de cintura y espalda. Otros usos incluyen el tratamiento de problemas digestivos, así como para la tos, bronquitis e infecciones parasitarias (Aguilar *et al.*, 2015).

Cuando la planta se encuentra hidratada, *S. lepidophylla* muestra micrófilas verdes totalmente expandidas, mientras que, durante la deshidratación, las micrófilas se enrollan para formar una esfera apretada de entre 6 y 8 cm de diámetro, como una respuesta adaptativa para protegerse contra daños causados a altas radiaciones o temperaturas, o ambas (Figura 7) (Rafsanjani *et al.*, 2015).





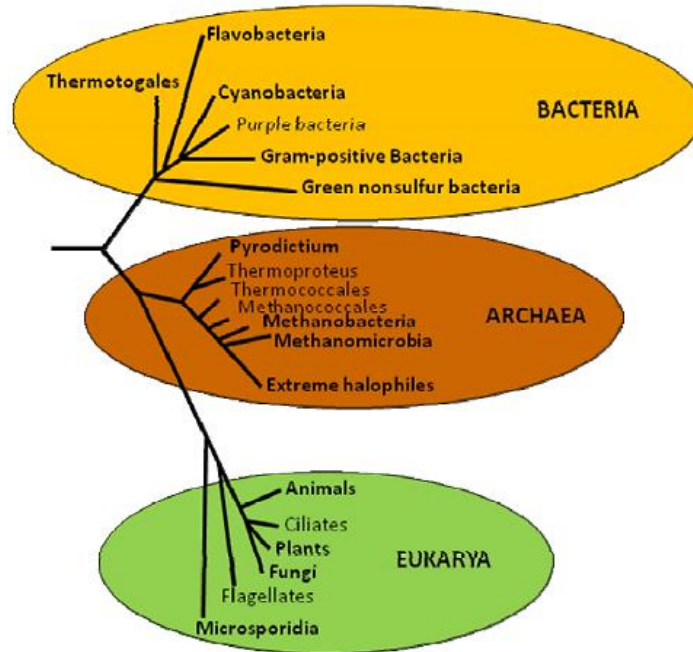
**Figura 7. Planta de *S. lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado.** Se muestran ambos estados de la planta (a-hidratado y b-deshidratado), y un modelo simplificado para la respuesta hidráulica (c) (Tomada y modificada de Rafsanjani *et al.*, 2015).

Cuando la planta es sometida a cambios en el ambiente que limitan la cantidad de agua que la planta recibe, se produce un estado de vida latente para evitar daños en los tejidos; durante la desecación, las células de *S. lepidophylla* sintetizan el disacárido trehalosa. La presencia de este disacárido tiene diversas funciones donde, además de osmoprotector, juega un papel esencial en diversas etapas del desarrollo de la planta como formación del embrión y floración. La trehalosa también parece estar involucrada en la regulación del metabolismo del carbono y en la fotosíntesis, y su acumulación está asociada a una mayor tolerancia al estrés abiótico (Vargas *et al.*, 2009; Suárez-Rodríguez *et al.*, 2015).

### 2.3 Trehalosa

La trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil,  $\alpha$ -D-glucopiranosido o  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalosa) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa. Se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo biológico (Figura 8), siendo común en levaduras, bacterias y esporas, cuerpos fructíferos y células vegetativas de hongos. También se encuentra en plantas no vasculares como *S. lepidophylla*, plantas

superiores como *Arabidopsis* y en algunos pastos de resurrección, como *Sporobolus atrovirens* y en algunos insectos (Iturriaga *et al.*, 2009).



**Figura 8. Historia evolutiva de la biosíntesis de trehalosa** (Tomada de Iturriaga *et al.*, 2009).

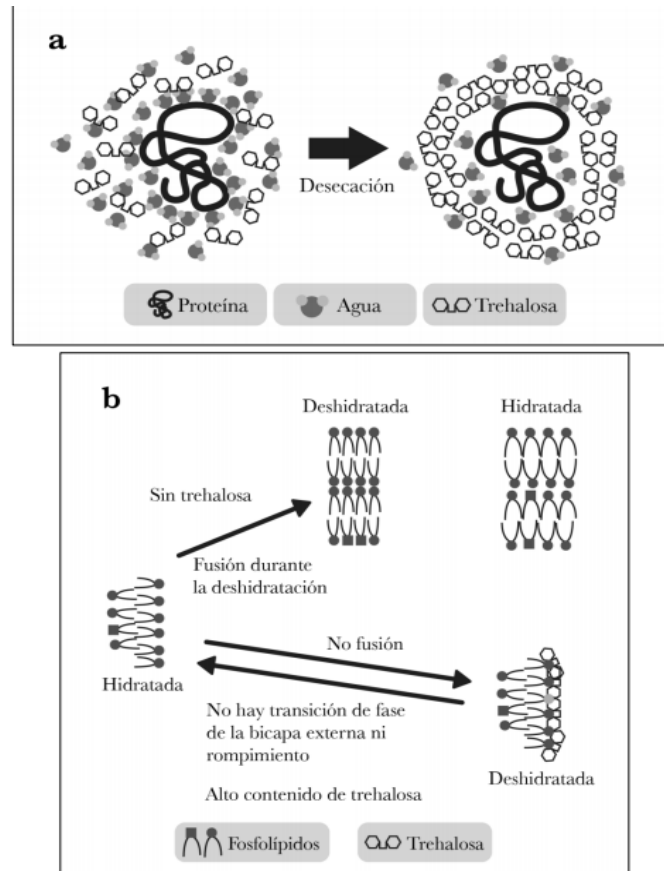
La trehalosa sirve como azúcar de reserva y como osmoprotector frente a diferentes tipos de estrés ambiental; cuando esto sucede, se acumula gradualmente dentro del citoplasma del organismo como respuesta directa, donde evita que las macromoléculas se desnaturalicen y, además, impide su agregación (Walmagh *et al.*, 2015).

### 2.3.1 Propiedades fisicoquímicas de la trehalosa

La trehalosa es una molécula que desempeña diversas funciones bioquímicas, ya sea como fuente de carbono o energía, molécula señal, componente de lípidos en la pared celular, o bien, como agente protector ante condiciones de estrés ambiental (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2015). Al ser un disacárido no reductor, posee características específicas, de las cuales las más importantes son la alta temperatura de transición vítrea y la fuerte interacción del enlace de hidrógeno entre el agua y la trehalosa, lo que la hace una estructura muy estable en comparación de otros azúcares, como la sacarosa (Pampurova *et al.*, 2014).

La trehalosa es capaz de proteger y estabilizar la estructura y función de las proteínas, así como la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico. El mecanismo de acción de la trehalosa sobre las proteínas se debe al reemplazo de las moléculas de agua, lo cual permite la formación de una cápsula alrededor de éstas, gracias a la interacción entre los grupos polares de la proteína y los grupos hidroxilos del azúcar, protegiendo su estructura terciaria y su actividad (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2015). En las membranas, la trehalosa favorece el estado

fluido de los lípidos, evitando su fusión, separación y rompimiento de fases; asimismo, retarda la transición de líquido a gel mediante el reemplazo de las moléculas de agua por las de trehalosa, manteniendo a las membranas en forma de cristal líquido (Figura 9) (Iturriaga *et al.*, 2009).



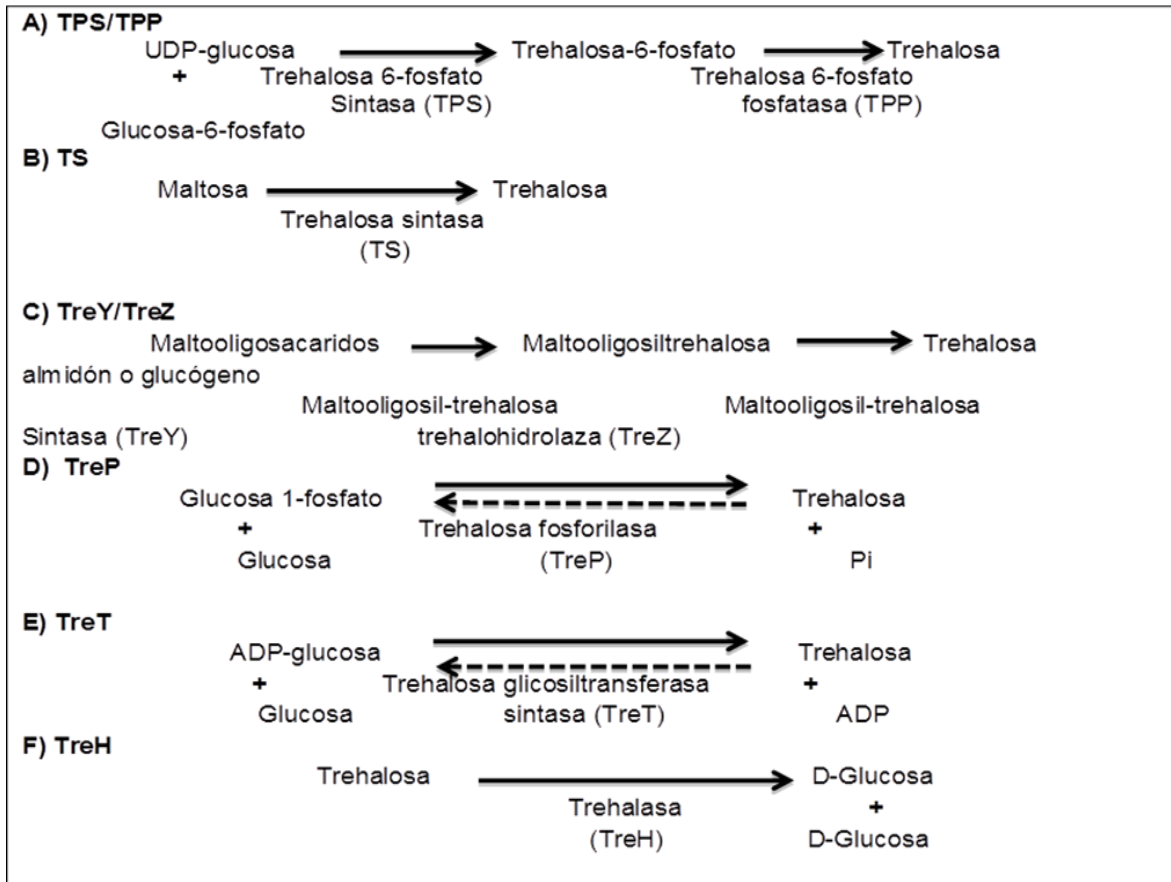
**Figura 9. Modelo de osmoprotección de la trehalosa.** a) En proteínas, al disminuir el agua se forma una capa protectora de trehalosa que atrapa el agua disponible que así queda en contacto con la proteína. b) Las membranas biológicas son protegidas por la trehalosa durante la desecación evitando su fusión, cambio de fase y rompimiento (Tomada de Suárez-Rodríguez *et al.*, 2015).

### 2.3.2 Vías de Síntesis y degradación de la trehalosa

Existen cinco vías de biosíntesis de trehalosa distribuidas en plantas, animales, hongos y en bacterias (Figura 10) (Iturriaga *et al.*, 2009):

- a) Vía **trehalosa-6-fosfato-sintasa (TPS)**: ruta más común y mejor estudiada. Cataliza la transferencia de glucosa por medio de UDP-glucosa a glucosa-6 fosfato, lo que lleva a trehalosa-6 fosfato (T6P). En una segunda etapa, la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) cataliza la hidrólisis del grupo fosfato del disacárido intermedio para generar trehalosa. Esta ruta se encuentra en una variedad de organismos; por ejemplo, insectos, plantas como *S. lepidophylla* y *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

- b) Vía **trehalosa sintasa (TS)**: cataliza una disposición intramolecular de maltosa, para convertir el enlace glicosídico  $\alpha$ -(1-4) de este disacárido en el enlace  $\alpha$ -(1-1) trehalosa. Esta enzima se encuentra en varios organismos como *Pimelobacter sp.*, *Pseudomonas syringae* y *Thermus caldophilus*.
- c) Vía **TreY-TreZ**: presente en bacterias donde la conversión de maltooligosacáridos presentes en el almidón se descompone a trehalosa (*Sulfolobus*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*); es una vía de dos pasos que involucra maltooligosil-trehalosa-sintasa (TreY) que cataliza la conversión de maltodextrinas a maltooligosiltrehalosa y, posteriormente, la maltooligosil-trehalosa-trehalohidrolasa (TreZ), que rompe este intermedio para generar trehalosa.
- d) Vía **trehalosa fosforilasa (TreP)**: TreP cataliza una reacción reversible *in vitro*, que hidroliza trehalosa y transfiere una molécula de glucosa al fosfato inorgánico, para formar glucosa-1-fosfato y liberar glucosa libre. Está presente en *Agaricus bisporus*, *Catellatospora ferruginea*, *Euglena gracilis* y *Flammulina velutipes*.
- e) Vía **trehalosa glicosil transferasa-sintasa (TreT)**: que da lugar a la formación de trehalosa a partir de ADP-glucosa y glucosa. Esta reacción es muy similar a la descrita para UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato, pero varía porque la síntesis se produce en una sola reacción y los productos son trehalosa y ADP. Esta reacción reversible se ha detectado en diversos organismos, como *Thermococcus litoralis* y *Sulfolobus solfataricus* KM1.

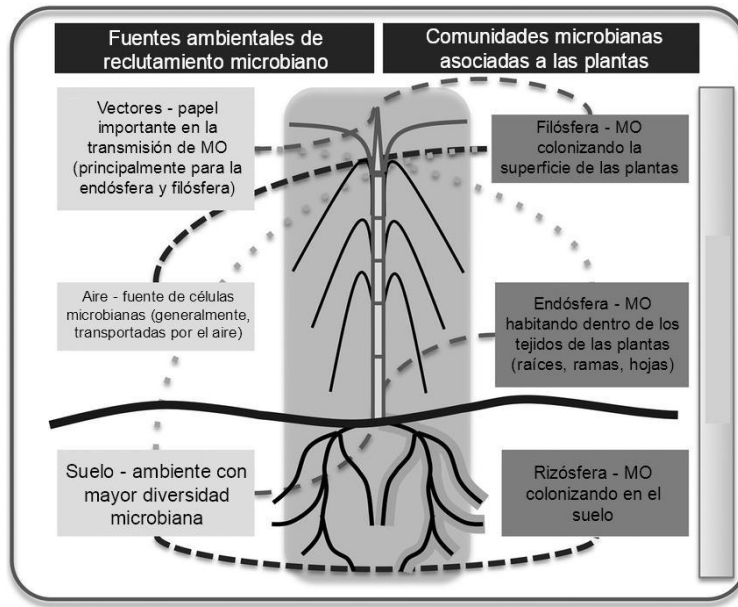


**Figura 10. Vías de biosíntesis (A-E) y catabólica (F) de la trehalosa.** (Tomada y modificada de Iturriaga *et al.*, 2009).

## 2.4 Organismos endófitos

Las plantas albergan una amplia diversidad de microorganismos tanto dentro como fuera de sus tejidos. Estos microorganismos están implicados en funciones importantes como la nutrición de las plantas, protección contra patógenos y la resistencia a diversos tipos de estrés biótico y abiótico.

Las interacciones entre la planta y los microorganismos ocurren en diferentes niveles: en el suelo, con microorganismos asociados a las raíces; en la rizósfera, sobre la periferia de las raíces; en el rizoplano, con microorganismos asociados a la superficie del tejido de la raíz (ectomicorrizas); y en los tejidos aéreos, en las hojas. Así mismo, algunos microorganismos son capaces de penetrar e invadir los tejidos internos de la raíz, formando parte de la endósfera de la planta. En la gran mayoría de las plantas terrestres, la endósfera de la raíz está colonizada por hongos en conjunto con bacterias y algunas arqueas (Figura 11) (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015; Hamzah *et al.*, 2018).



**Figura 11. Representación esquemática de las principales fuentes de microbios que componen las comunidades asociadas a las plantas** (Tomada y modificada de Andreote *et al.*, 2014)

#### 2.4.1 Endósfera

El término endófito se refiere a todos los organismos que colonizan por un período variable de su ciclo de vida los tejidos internos vivos de las plantas sin producir síntomas visibles de enfermedad. Los endófitos comunes incluyen a una variedad de bacterias y hongos, y pueden aislarse tanto de plantas silvestres como cultivadas (Shi *et al.*, 2013). Las primeras evidencias de asociación entre los microorganismos y las plantas se han descubierto a partir de observaciones de tejidos de tallos y hojas fosilizadas, suponiendo que la asociación planta-microorganismo pudo haber ocurrido junto con la aparición de las primeras plantas en la tierra (Taylor *et al.*, 2015). Como resultado, es posible que algunos de estos microorganismos hayan adquirido un sistema genético para transferir información desde la planta hospedera a ellos o viceversa, permitiéndoles desarrollar diferentes mecanismos para lidiar con las condiciones cambiantes del ambiente y, del mismo modo, permitir una mayor compatibilidad con su planta hospedera (Strobel, 2003; Pérez *et al.*, 2009).

El estrecho vínculo de estos organismos dentro de los tejidos de las plantas puede ayudar a mejorar su desarrollo mediante una amplia variedad de mecanismos directos e indirectos, ya sea facilitando el intercambio de nutrientes, mejorar la actividad de diversas enzimas y la distribución de hormonas promotoras de crecimiento, así como la capacidad para movilizar fosfato insoluble hacia los tejidos. De la misma forma, la asociación planta-endófito mejora la salud de la planta, contribuyendo potencialmente a la protección de éstas contra la patógenesis microbiana (Barrow *et al.*, 2008; Hassan, 2017).

## 2.4.2 Hongos endófitos

En la naturaleza, las plantas tienen una relación intrínseca con una amplia gama de microorganismos. Los hongos endófitos son aquellos microorganismos que están asociados con las plantas y las habitan durante cierto período de tiempo sin causar ningún tipo de daño, y que pueden actuar como promotores del crecimiento, defensores contra los depredadores y/o competidores de los patógenos microbianos (Adnan *et al.*, 2018). Los compuestos bioactivos producidos por estos microorganismos son muy importantes para aumentar la adaptabilidad de los hongos y sus plantas hospedantes, como la capacidad de tolerar diversos tipos de estrés biótico y abiótico (Jia *et al.*, 2016).

Los hongos endófitos conforman un grupo diverso y polifilético, distribuyéndose en cerca de 300,000 especies de plantas terrestres. La mayoría pertenecen al phylum Ascomycota, aunque también se han encontrado en los Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota (Jia *et al.*, 2016; Paris, 2016).

Históricamente, los hongos endófitos se han clasificado en *clavicipitáceos* y *no clavicipitáceos*, basados en su filogenia e historia de vida (Tabla 1) (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Ambos grupos se diferencian, entre otras características, por su tipo de transmisión, siendo principalmente vertical (a través de las semillas) en el primero y horizontal (a través del medio ambiente) en el segundo. Estos procesos de transmisión se han relacionado con la diversidad de la comunidad endófito en la planta; en la vertical un genotipo dominante coloniza la planta, mientras que en la horizontal la incidencia y riqueza aumentan conforme a la edad, como consecuencia de varios eventos de infección a lo largo del tiempo (Lizarazo-Medina *et al.*, 2014).

Con base en las características de colonización, se distinguen 4 clases de endófitos (Hardoim *et al.*, 2015):

- *Clase 1:* hongos que colonizan tallos y rizomas, con transmisión horizontal y vertical (los hongos clavicipitáceos son clasificados dentro de esta clase).
- *Clase 2:* hongos que colonizan los tejidos aéreos y subterráneos, que se transmiten horizontal y/o verticalmente.
- *Clase 3:* contienen principalmente miembros de Dikaryomycota (Ascomycota o Basidiomycota). Los miembros de esta clase están mayormente restringidos a tejidos aéreos de sus hospederas y se transmiten horizontalmente.
- *Clase 4:* comprende endófitos septados oscuros que, de forma similar a los hongos micorrízicos, están restringidos a las raíces, donde residen entre sí y/o intracelularmente en las capas de células corticales.

Los hongos *clavicipitáceos* son endófitos que colonizan los pastos (por ejemplo, hongos del género *Epichloë*, *Balansia*), mientras que los *no clavicipitáceos* colonizan las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (por ejemplo, hongos del género *Acremonium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Colletotrichum*) (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Algunos endófitos son capaces de habitar en diferentes tejidos vegetales,



tales como hongos del género *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta* y *Xylaria* (Bezerra *et al.*, 2015).

**Tabla 1. Grupos y clases de hongos endófitos.**

Criterio	Clavicipetáceos	No clavicipetáceos		
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
<b>Rango de hospederos</b>	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
<b>Tejidos que colonizan</b>	Tallo y rizomas	Tallos, hojas y rizomas	Tallos, hojas, corteza, flores, frutos	Raíces
<b>Colonización <i>in planta</i></b>	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
<b>Biodiversidad <i>in planta</i></b>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
<b>Transmisión*</b>	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
<b>Función ecológica</b>	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia a la sequía y producen metabolitos secundarios tóxicos contra herbívoros	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia al estrés abiótico y biótico y protegen contra hongos patógenos por acción de los metabolitos secundarios	Inducen resistencia a enfermedades, protección contra herbívoros y modifican la sensibilidad al estrés abiótico mediante la producción de los metabolitos secundarios	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para herbívoros
*Transmisión de los hongos endófitos (HE) en plantas: vertical, a través de las semillas, y horizontal, se adquieren del medio ambiente (Tomada de Sánchez-Fernández <i>et al.</i> , 2013).				

### 2.4.3 Interacción hongo-planta

Durante el largo período de coexistencia y los procesos evolutivos, se han establecido diferentes relaciones entre los hongos endófitos y las plantas huésped. Dentro de las interacciones que existen entre los hongos endófitos y las plantas existen tres tipos: los endófitos “obligados”, que requieren de los tejidos de las plantas para completar su ciclo de vida (por ejemplo, los hongos micorrízicos y miembros de los géneros de la familia Clavicipitaceae (Ascomycota); los endófitos “oportunistas”, que prosperan principalmente fuera de los tejidos de las plantas y entran esporádicamente en la endósfera de la planta (entre estos se encuentran hongos de los géneros *Hypocrea* y *Trichoderma*); por último, están los endófitos “facultativos”, que comprende la gran mayoría de los microorganismos endofíticos. De este grupo aún no están claros los detalles de la interacción hongo-planta (Hardoim *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2016).

Algunos microorganismos son conocidos por los diferentes beneficios que le aporta a su hospedera. Los Organismos Promotores de Crecimiento Vegetal (OPCV), son un grupo conformado por diversas bacterias y hongos que pueden incrementar el crecimiento y productividad en las plantas. Así, los endófitos que toman nutrientes



y protección de su hospedera, en retribución, pueden beneficiarla al inducir su crecimiento, aumentar su tolerancia al estrés y producir metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural que le brindan protección y resistencia contra herbívoros y/o microorganismos fitopatógenos (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Se puede inferir que estos organismos pueden inducir el crecimiento vegetal a través de mecanismos directos e indirectos (Figura 12). Los mecanismos directos incluyen la producción de fitohormonas, por ejemplo, ácido indolacético (AIA), ácido giberélico, citoquininas y ácido abscísico (ABA) o bien, la capacidad para solubilizar fosfatos. Los mecanismos indirectos se deben a la modificación del ambiente rizosférico y su ecología, actuando como agentes de biocontrol de fitopatógenos mediante la liberación de sideróforos,  $\beta$ -1, 3-glucanasas, quitinasas, antibióticos, entre otras (González & Fuentes, 2017).



**Figura 12. Representación gráfica de los efectos de los OPCV en las plantas** (Tomada de Samaniego-Gómez *et al.*, 2017).

#### 2.4.3.1 Biosíntesis de Ácido Indolacético

Las fitohormonas son las moléculas señal, que actúan como mensajeras químicas, controlando el crecimiento y desarrollo vegetal. Aparte de su rol para el desarrollo de las plantas, las hormonas son también los principales agentes que regulan la respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Bose *et al.*, 2013).

Las auxinas son hormonas de crecimiento de plantas, debido a su capacidad de estimular el crecimiento diferencial en respuesta a estímulos de luz, siendo las fitohormonas que juegan el rol más importante en el desarrollo de las plantas (Vega-Celedón *et al.*, 2016). El Ácido Indolacético (AIA) es una de las mayores auxinas fisiológicamente activas, producto del metabolismo del L-triptófano, y es producido por diversidad de microorganismos, que incluyen bacterias, hongos y levaduras. Al igual que otras fitohormonas (por ejemplo, las giberelinas), el AIA es un compuesto esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, teniendo efectos,

principalmente sobre la elongación y división celular, promoviendo el crecimiento del tallo, y en las raíces, estimulando su crecimiento y desarrollo (Syamsia *et al.*, 2015).

#### 2.4.3.2 Producción de Sideróforos

El hierro (Fe) constituye el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, siendo fundamental para la mayoría de los sistemas vivos. Principalmente, el hierro juega un papel muy importante en las plantas para la formación de la clorofila en las células y como activador de varios procesos bioquímicos como la respiración, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno (Restrepo-Correa *et al.*, 2017).

Los suelos generalmente contienen un abundante suministro de Fe; sin embargo, la mayor parte de éste se encuentra en formas que no son fácilmente asimilables para las plantas. En estas condiciones, los organismos que dependen del suelo como su única fuente de nutrientes minerales, son susceptibles a la deficiencia de este elemento (Alexander & Zuberer, 1991). Frente a este contexto, la mayoría de las células procarióticas, ciertos hongos y plantas elaboran múltiples agentes quelantes de bajo peso molecular y alta afinidad, que solubilizan el hierro férrico en el medio ambiente y lo transportan a la célula, y son conocidos como sideróforos; la mayoría de los sideróforos son de tipo catecolato o hidroxamato, pero se han encontrado algunos que contienen otros grupos funcionales. La mayoría de los hongos producen sideróforos de tipo hidroxamato, derivados del L-ornitina (Renshaw *et al.*, 2002; Hu & Xu, 2011).

Los complejos que forman los sideróforos con el hierro en el suelo, son asimilados eficientemente tanto por el microorganismo que los produce como por los que habitan en las cercanías, y es, precisamente, a través de la síntesis de sideróforos, que algunos organismos presentes en el suelo influyen de manera positiva en el crecimiento de las plantas. Adicionalmente, los sideróforos juegan un papel clave en el control de microorganismos fitopatógenos, ya sea al secuestrar el hierro y/o reducir las cantidades de este elemento disponibles para el crecimiento de éstos, o también al activar los sistemas de resistencia sistémica inducida de las plantas (Benjumeda, 2017).

#### 2.4.3.3 Solubilización de fosfatos

El fósforo (P) es un mineral esencial en los procesos nutricionales de las plantas. Constituye más del 0.2% del peso seco de éstas, por lo que se considera uno de los requerimientos fundamentales para su crecimiento y funcionamiento. El fósforo se encuentra involucrado en la división celular, en el desarrollo y crecimiento de las raíces, y en la formación de semillas, y cumple funciones importantes en el metabolismo energético celular y en el proceso de fotosíntesis; sin embargo, a pesar del vasto contenido de este elemento en los suelos, la mayor parte se encuentra de forma insoluble para las plantas (Hernández-Leal *et al.*, 2011; Beltrán-Pineda, 2015).

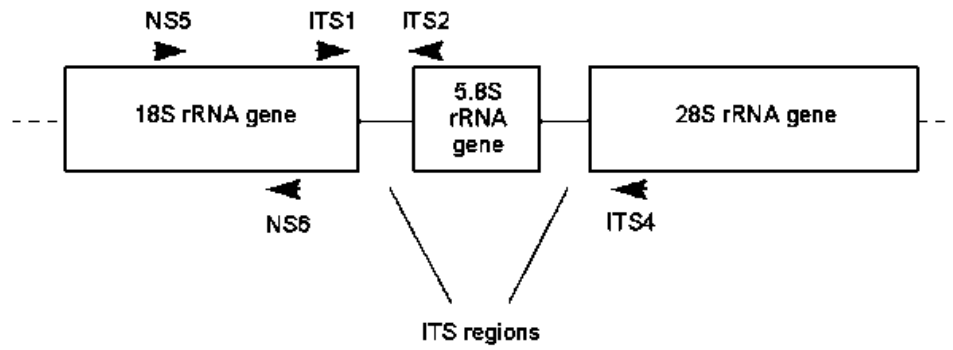
La disponibilidad del fósforo puede ser facilitada por la acción de algunos hongos y bacterias solubilizadores de fosfatos de calcio, hierro y aluminio. Debido a que están involucrados en un amplio rango de procesos que afectan la transformación del P, se consideran componentes integrales del ciclo edáfico de este nutriente, facilitando su movilidad en el suelo y transformándolo en compuestos accesibles para la planta. Uno de los mecanismos de solubilización empleado por estos microorganismos, principalmente en los hongos, es la producción de diversos ácidos orgánicos, como el cítrico, oxálico y málico, y la quelación de los minerales que forman los complejos insolubles con el fósforo (Hernández-Leal *et al.*, 2011).

## 2.5 Aislamiento e identificación de hongos endófitos

El desarrollo de métodos experimentales ha proporcionado información acerca del papel crucial que tienen los hongos en los ecosistemas terrestres. Debido a ello, aplicar el método adecuado en el aislamiento de los hongos resulta imprescindible para llevar a cabo estudios de caracterización, identificación y clasificación taxonómica de los mismos (Mier *et al.*, 2013). Los métodos clásicos de cultivo para aislar hongos se basan en la observación directa de los especímenes y sus cultivos, siendo selectivos en el sentido de que están diseñados para prevenir el crecimiento de microorganismos no deseados y favorecer el desarrollo *in vitro* de las formas en que los hongos se encuentran de manera habitual para facilitar su identificación (De Souza-Motta *et al.*, 2003; Paris, 2016).

En los estudios de diversidad de hongos, es frecuente que se presente la dificultad de no poder realizar una identificación a partir de sus características morfológicas; esto se debe principalmente a que no esporulan en medios de cultivos artificiales y a que la mayoría de estos organismos no han sido descritos (Bayman & Otero, 2006). En la actualidad se ha extendido la aplicación de técnicas moleculares, enfocadas en el estudio y análisis de segmentos de ADN o ARN para identificar hongos, permitiendo que la determinación de la biodiversidad fúngica pueda abordarse de una manera más rápida y fidedigna (Mier *et al.*, 2013).

La región interna espaciadora transcrita (ITS) de la unidad ribosómica nuclear repetida es, con mucho, la región secuenciada más comúnmente utilizada para consultas de sistemática y taxonomía a nivel del género para la determinación de los hongos. Esta región está ubicada en el complejo del gen rDNA de todas las células eucariotas, entre los genes 18S y 5.8S (ITS1) y los genes 5.8S y 28S (ITS2) (Figura 13) (Iwen *et al.*, 2002). Los cebadores de PCR para obtener una amplia aceptación para el trabajo con Secuencias de Transcripción Interna (ITS) fúngicas son "ITS1" e "ITS4", que amplifican secuencias altamente variables de ITS1 e ITS2 que rodean la secuencia de codificación 5.8S (esta secuencia se encuentra bien conservada y tiene un alto grado de polimorfismo), y están situadas entre la codificación de la secuencia de subunidad pequeña (SSU) y de la subunidad grande (LSU) del operón ribosomal (Martin & Rygeiwicz, 2005).



**Figura 13. Estructura del grupo de genes de ARNr y posiciones de los cebadores de PCR fúngicos.** El grupo se divide en regiones de codificación (genes 18S, 5.8S y 28S) y no codificantes (ITS). Las posiciones de los cebadores de PCR y su dirección de síntesis se indican mediante flechas (Tomada de Lilley & Chinabut, 2000).

### 3. Justificación

Los hongos endófitos se han encontrado en gran diversidad de plantas alrededor del mundo, tanto de regiones templadas y de bosque tropical, así como en campos agrícolas. Estudios recientes demuestran la capacidad que tiene este grupo de organismos para producir compuestos activos que les confieren protección a las plantas contra el ataque de patógenos y herbívoros, así como a diferentes tipos de estrés abiótico (sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas). Esto constituye una alternativa para la obtención de precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura.

*S. lepidophylla* es una planta que puede resistir largos periodos en estado deshidratado, debido a su capacidad de acumular altas cantidades de trehalosa, que se sabe es un disacárido que ayuda en la protección de membranas, proteínas y células contra el estrés por déficit de agua. A pesar de esto, se ha reportado que los altos niveles de trehalosa no son determinantes para conferir la tolerancia a la deshidratación en esta planta, ya que *Selaginella moellendorffii*, que no es de resurrección, acumula niveles más altos del disacárido (Yobi *et al.*, 2012), lo cual indica que la capacidad de *S. lepidophylla* para tolerar la deshidratación puede deberse no sólo a la síntesis de trehalosa, sino también a la combinación con otros mecanismos. Investigadores de la Universidad de Lovaina en Bélgica reportaron tras el análisis de una biblioteca de cDNA de la planta de resurrección, genes de biosíntesis de trehalosa de origen fúngico preferencialmente expresados, lo que sugiere que estos organismos también participan en la síntesis del disacárido (Pampurova *et al.*, 2014). Estos resultados se ven apoyados por el estudio realizado por Brighigna y colaboradores (2002), quienes observaron la presencia de estructuras fúngicas durante el proceso de rehidratación de la planta. Del mismo modo, el hecho de que *S. lepidophylla* es difícil de adaptar cuando crece en condiciones axénicas *in vitro* (libre de endófitos) (comunicación personal, R. Suárez), al ser transferidas a condiciones de invernadero, sugiere que los organismos asociados a ésta se requieren y son necesarios para su crecimiento y, además, podrían influir en conferir la capacidad de tolerancia a la deshidratación a través de la síntesis de diferentes tipos de metabolitos, tales como fitohormonas, sideróforos y/o agentes solubilizadores de fosfatos.

Debido a lo anterior, el conocimiento de la microbiota asociada a *S. lepidophylla*, en específico los hongos endófitos, así como su caracterización bioquímica (características promotoras del crecimiento vegetal) nos permitirán, en un futuro, entender el papel que estos microorganismos juegan en la tolerancia a la deshidratación de esta especie.

## 4. Hipótesis

*S. lepidophylla* hospeda hongos endófitos que contribuyen en el proceso de la tolerancia a la deshidratación.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo General

Caracterizar molecular y bioquímicamente la microbiota endófito fúngica de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla*.

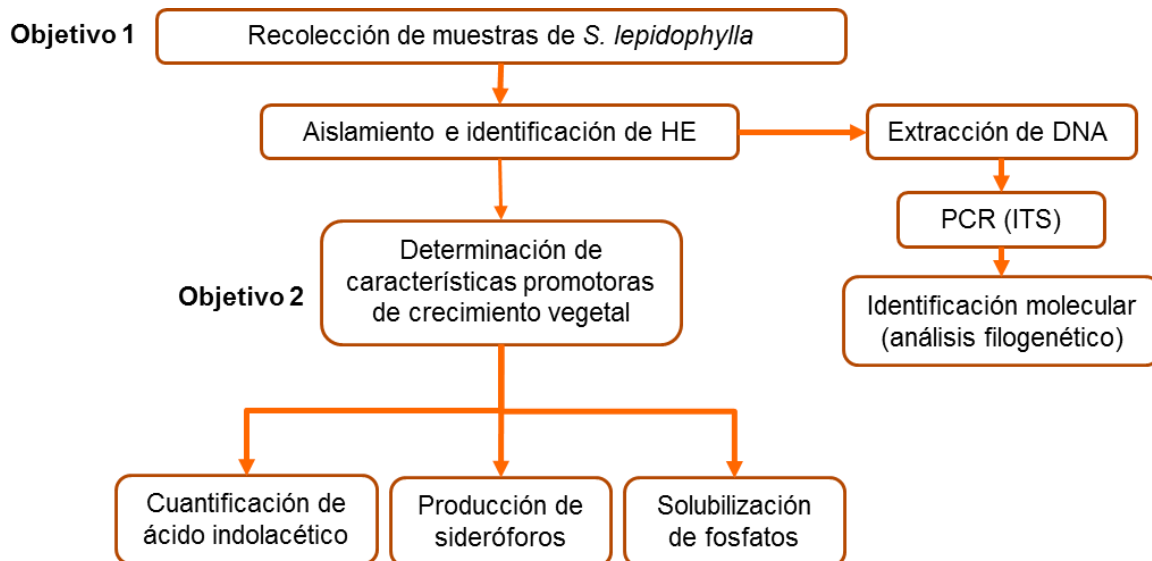
### 5.2 Objetivos particulares

- Aislar e identificar los hongos endófitos de *S. lepidophylla* en dos estados fisiológicos naturales de la planta (hidratada y deshidratada).
- Determinar características de promoción del crecimiento en los hongos endófitos aislados.

## 6. Metodología

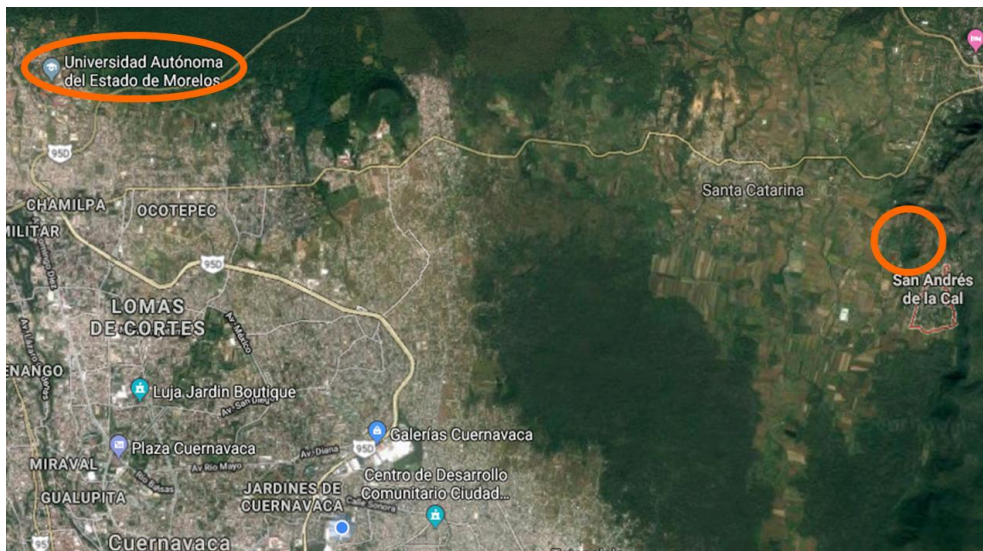
### 6.1 Estrategia experimental

Para cumplir los objetivos planteados en el siguiente proyecto, se planteó la estrategia experimental mostrada en la Figura 14.



## 6.2 Origen de las muestras

Se realizaron 5 salidas de campo entre agosto de 2018 y julio de 2019, correspondientes a los periodos de lluvias y sequía, para la recolección de ejemplares de *S. lepidophylla*, realizándose un total de 2 colectas durante la época de lluvias (agosto de 2018 y julio de 2019) y 3 durante la época de sequía (marzo, abril y mayo de 2019), en el cerro de la Cruz, localizado en el poblado de San Andrés de la Cal, en Tepoztlán, Morelos, México (18°57'22.2 W, 99°06'50.2" N, 1495 msnm). Esta localidad se caracteriza por tener un clima y vegetación dominante de selva baja caducifolia, con temperaturas de entre 24°C a 31°C y una precipitación pluvial de 9 mm/año en época de secas y 145 mm/año en época de lluvias. En cada salida se colectaron 5 ejemplares de la planta, tomando la mayor cantidad de suelo posible para evitar la pérdida de los rizóforos, y se trasladaron al laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del CEIB-UAEM, para su posterior procesamiento, en un rango no mayor a dos horas posterior a su recolección.



**Figura 14.** Ubicación geográfica del poblado de San Andrés de la Cal en Tepoztlán, Morelos (Tomada de Google Maps, 2018).

## 6.3 Aislamiento e identificación de endófitos en *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado

Las plantas colectadas durante las salidas de campo se lavaron con abundante agua corriente para eliminar el exceso de suelo y, posteriormente, se realizó un *pool* de cada tejido (micrófilas y rizóforos), con el fin de tener una muestra representativa de las plantas analizadas. Los fragmentos seleccionados de los tejidos se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% más tritón X-100 al 0.05% durante 8 minutos. Finalmente, se hicieron lavados con agua destilada estéril para eliminar completamente la solución de desinfección.

De cada colecta se seccionaron un total 32 fragmentos (16 de micrófila y 16 de rizóforo), de aproximadamente 1 cm, los cuales fueron sembrados en cajas de Petri



con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) suplementado con Estreptomina a 200 µg/ml, para prevenir el crecimiento de bacterias. Los fragmentos se colocaron evitando el contacto entre ellos, y se incubaron a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  de 3 a 5 días, para permitir el crecimiento de micelio.

Una vez observado crecimiento, se cortaron discos de 5 mm de diámetro y se incubaron en cajas con medio de cultivo PDA a  $26^\circ\text{C}$  durante 5 días, o hasta que el hongo llenara la totalidad de la caja. Con el fin de verificar que el proceso de desinfección externo fue el adecuado, se realizaron impresiones de los tejidos de las plantas seleccionadas sobre la superficie del medio y se mantuvieron en incubación durante 7 días a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ .

La obtención de los cultivos monospóricos de los aislados se realizó agregando 2 ml de agua destilada estéril y se hizo un raspado con asa de vidrio; posteriormente, se tomó 1 ml de muestra y se hicieron tres diluciones ( $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  y  $1 \times 10^{-3}$ ), las cuales se plaquearon en cajas con medio PDA y se incubaron a temperatura ambiente hasta observar el crecimiento de hifas de alguna de las diluciones. Finalmente, se pasó a una nueva caja, usando el mismo medio de cultivo. Los cultivos puros, se conservaron en crioviales estériles con 1 ml de solución estéril de agua-glicerol 10% para ser almacenados a  $-80^\circ\text{C}$ .

La identificación de los hongos se realizó mediante la observación morfológica del micelio de cada aislado y con preparaciones de laminillas con colorante azul de lactofenol para identificar las características micromorfológicas (tipo de hifa, tipo de conidióforo, tamaño y forma de las conidias) de los mismos (Mier *et al.*, 2013).

#### 6.4 Cuantificación de Ácido Indolacético (IAA)

La producción de ácido indolacético de los aislados se determinó por el ensayo colorimétrico utilizando el reactivo de Salkowski (Tsavkelova *et al.*, 2007). Este reactivo se emplea para determinar la presencia de grupos indol. Es un método colorimétrico basado en la oxidación que produce el ácido perclórico a las moléculas de indol, generando una coloración que va de la gama de los rosados al fucsia, siendo proporcional a la cantidad de AIA oxidado.

Las muestras se inocularon en matraces con 25 ml de medio Czapek-Dox (1% peptona, 1% glucosa, 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05% KCl, 0.001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; pH  $7.3 \pm 0.2$ ) suplementado con 0.1% de triptófano y en medio sin suplementar; esto con el fin de determinar la posible vía de síntesis de AIA por parte de los aislados. Los matraces se incubaron a  $30^\circ\text{C}$ , manteniendo en agitación a 120 rpm (Séne *et al.*, 2015).

La concentración de AIA de los aislados se determinó a tres tiempos de crecimiento (48, 72 y 96 h). Para ello, se tomaron 2 ml del cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 13,000 rpm durante 6 minutos. Posteriormente, se tomaron 500 µl del sobrenadante y se pasaron a una celda para espectrofotómetro, a la cual se añadieron 500 µl de reactivo de Salkowski (61.4 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 38.61 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1.2 g  $\text{FeCl}_3$ ); lo anterior se realizó por triplicado. Las muestras se agitaron vigorosamente



y se incubaron durante 30 min en oscuridad. Finalmente, se hicieron las lecturas en un espectrofotómetro a 530 nm.

Para hacer la estimación de la auxina en las muestras, se elaboró una curva estándar para AIA con triptófano y una sin triptófano, a partir de una dilución 1:10 de la solución patrón de AIA (10 mg AIA/ml etanol). Posteriormente, se prepararon diluciones para obtener concentraciones de 40, 20, 10, 5 y 1 µg AIA para 1ml de medio Czapek-Dox con y sin triptófano. La lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro a 530 nm y se hizo el cálculo de los resultados de las muestras, expresando la concentración de AIA en µg/ml (Tsavkelova *et al.*, 2007).

## 6.5 Producción de Sideróforos

La producción de sideróforos se determinó cualitativamente utilizando el medio de cultivo CAS. En este medio, el hierro se encuentra formado un complejo estable con el Chrome Azurol S (CAS) y el HDTMA (bromuro hexadeciltrimetil amonio), siendo este complejo el responsable de la coloración azul del medio. Conforme un quelador fuerte, como los sideróforos, capturan el hierro del complejo, éste pierde su color azul y se torna naranja o rosado (Schwyn & Neilands, 1987; Siverio & López, 1994). Para el ensayo, se preparó medio PDA adicionado con CAS (60.5 g en 50 ml), solución de hierro III (1 mM FeCl<sub>3</sub>OH<sub>2</sub>O), HCl 10 mM (10 ml) y bromuro de hexadeciltrimetil-amonio (HDTMA) (72,9 mg en 40 ml), en el cual se inocularon las muestras de manera independiente, por triplicado, y se incubaron a 28°C por 7 días. Finalmente, se evaluó la producción de sideróforos, a partir de la presencia de halos de coloración naranja-rosa alrededor del crecimiento del micelio. Para obtener una estimación cuantitativa de la producción de sideróforos se calculó la relación entre el diámetro del halo producido y el diámetro de la colonia al séptimo día (Milagres *et al.*, 1999).

## 6.6 Solubilización de fosfatos

La capacidad de los hongos endófitos aislados para solubilizar el fosfato se determinó por medio del ensayo en medio Pikovskaya-agar modificado (PVK) (Hernández-Leal *et al.*, 2011). El indicador cualitativo de la acción solubilizadora de fosfatos se puede observar al formarse un halo claro alrededor del micelio, debido a la disociación de los ácidos orgánicos, que libera protones y contribuyen a reducir el pH del medio.

Los aislados se inocularon en placas con medio PVK por triplicado, y se incubaron durante 7 días. La formación de un halo claro alrededor del micelio se tomó como resultado positivo para la prueba y se realizó una estimación cuantitativa de la solubilización, la cual se calculó haciendo la relación entre el diámetro de la colonia y del halo formado alrededor del micelio al séptimo día.

## 6.7 Extracción de DNA de los endófitos aislados

Para la extracción de DNA se utilizó un estuche de purificación de DNA (DNA Isolation Kit, Qiagen), para lo cual se prepararon tubos de ensayo con 25 mL de

caldo de Papa Dextrosa (PDB), en los que se inoculó una porción pequeña de micelio de la muestra a extraer y se incubó en agitación de 3 a 5 días a 30°C. Posteriormente, se centrifugó la muestra, se colectó el micelio en un tubo de microcentrífuga y se almacenó a -80 °C por al menos 8 h.

Las muestras congeladas se trituraron con pistilos y enseguida se añadieron 600µl de buffer de lisis, se mezclaron durante 3 seg y se incubaron a 65 °C por 1 hr; a los 30 min de incubación, las muestras se mezclaron por inversión 10 veces. Posteriormente, se agregaron 3 µl de RNAsa (20 ng/ml), se agitaron y se incubaron a 37°C de 15 – 60 minutos. Los tubos se centrifugaron para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se colectó en un nuevo tubo. Se añadieron 200 µl de solución de precipitación de proteínas y se agitó a 14,000 rpm por 2 min. Enseguida, se centrifugaron durante 3 min a 13,000 – 16,000 rpm hasta obtener un pellet. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se agregaron 400 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y centrifugó nuevamente. Se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregaron 600 µl de isopropanol absoluto. Las muestras se mezclaron cuidadosamente y se centrifugaron por 1 min a 13,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 600 µl de etanol al 70%. Las muestras se mezclaron para su posterior centrifugación y se decantó el sobrenadante hasta retirar el exceso de líquido.

Las muestras se mantuvieron a 50°C durante 5 minutos, se añadieron 30µl de Tris EDTA pH= 8 (10 mM/1 mM) y se incubaron a 65°C durante 1 h. Se tomaron 2 µl para corroborar la integridad del DNA obtenido por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Finalmente, las muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso en la reacción de amplificación.

## 6.8 Amplificación de la región ITS

Para la amplificación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) se utilizaron el par de cebadores ITS1 e ITS4 (Tabla 2), y la reacción de amplificación se preparó en un volumen final de 50 µl por muestra.

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región ITS.**

Oligonucleótido	Tamaño del producto	Secuencia
ITS1	290 pb	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	550 pb	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

(White *et al.*, 1990)

La reacción de PCR, se llevó a cabo bajo las condiciones mostradas en la Tabla 3.

**Tabla 3. Condiciones para la amplificación de la región ITS por PCR.**

ETAPA	TEMPERATURA	CICLOS
<b>Desnaturalización Inicial</b>	95°C 3 min	1 ciclo
<b>Desnaturalización</b>	95°C 30 sec	
<b>Alineamiento</b>	55°C 30 sec	35 ciclos
<b>Extensión</b>	72°C 1 min	

<b>Elongación</b>	72°C 10 min	4°C ∞
	(Adnan <i>et al.</i> , 2018)	

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y se purificaron para su posterior envío a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

## 6.9 Análisis filogenético

Una vez obtenidas las secuencias de DNA, se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI con el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar los valores de similitud de los aislados con diferentes géneros de hongos. Finalmente, el análisis de relación filogenética se realizó utilizando el método de Neighbor Joining (NJ) con el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

## 6.10. Análisis estadístico

La incidencia de hongos endófitos fue comparada a nivel de tejido y época mediante la determinación del porcentaje variación y prueba t-Student ( $\alpha= 0.05$ ) para determinar diferencias significativas en relación a estas variables. Con el fin de determinar la relación (similitud) entre cada una de las variables evaluadas (época de aislamiento, tejido, producción de AIA, sideróforos, solubilización de fosfatos), así como obtener un panorama general de los resultados obtenidos en este estudio, se procedió a realizar un análisis de correspondencia múltiple (ACM), el cual se elaboró con el programa STATISTICA 7.

## 7. Resultados

### 7.1 Aislamiento e identificación de hongos endófitos de *S. lepidophylla*

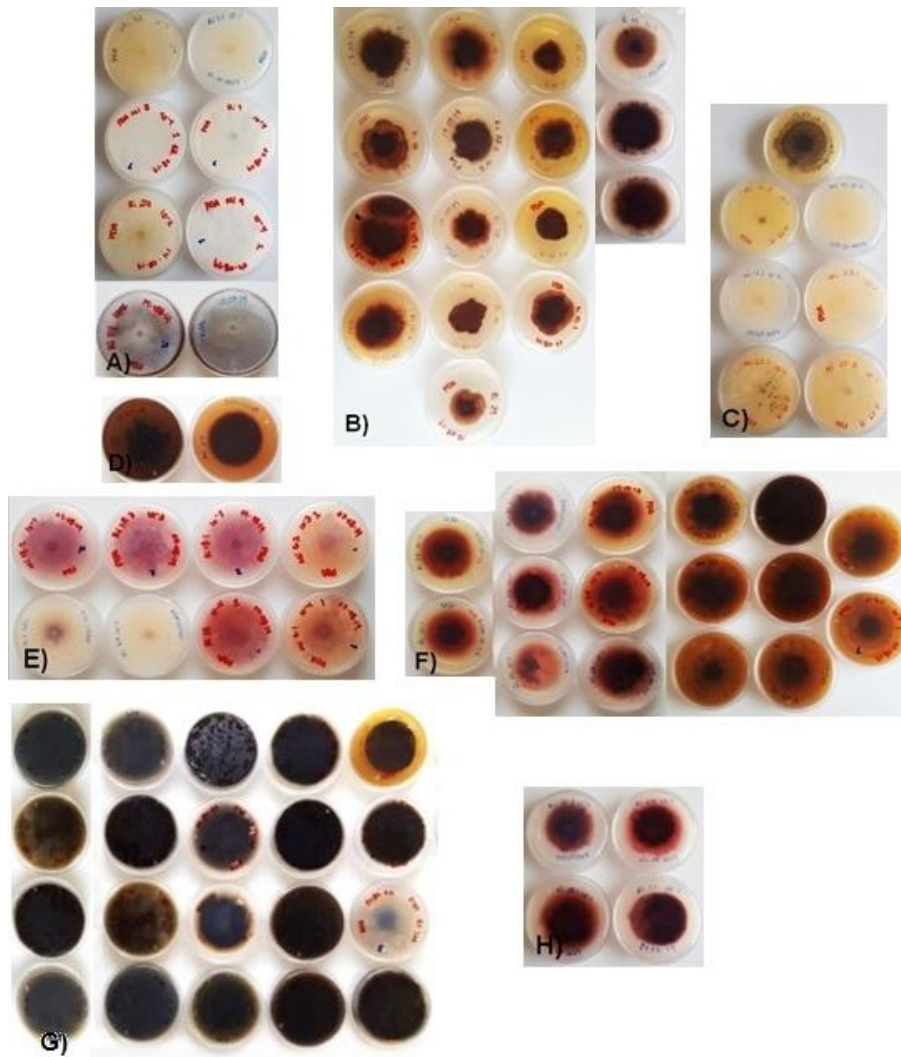
Para el aislamiento de los hongos endófitos de *S. lepidophylla* se realizaron 5 colectas, dos durante la época de lluvias y tres durante la época de estiaje, de las cuales se obtuvieron un total de 81 aislados fúngicos a partir de las micrófilas y rizóforos de plantas de *S. lepidophylla* (Tabla 4).

Con base en los resultados obtenidos, se observó que no hubo una diferencia significativa entre el número de aislados obtenidos de las micrófilas (40/81) respecto del número de aislados de los rizóforos (41/81). A pesar de esto, se pudo encontrar una variación entre el número de hongos endófitos a partir de los tejidos en relación a la época en que fueron aislados. Para el caso de las micrófilas, se observó un aumento del 35% en el número de aislados durante la época en que las plantas se encontraban hidratadas (17/40) respecto a la época durante la cual las plantas estaban deshidratadas (23/40), no así en el caso del número de aislados a partir de los rizóforos, en el cual se observó una disminución del 36% durante la época de lluvias (25/41) respecto a la época de estiaje (16/41).

**Tabla 4. Aislados de hongos endófitos de *S. lepidophylla* en dos estados de la planta.**

Colecta	Época de colecta	Número de plantas empleadas	Tipo de tejido		Total
			Micrófila (Mi)	Rizóforo (Ri)	
1 (Agosto, 2018)	Lluvia	2	12	5	17
2 (Marzo, 2019)	Sequía	2	17	9	26
3 (Abril, 2019)	sequía	2	5	4	9
4 (Mayo, 2019)	Sequía	2	1	3	4
5 (Julio, 2019)	Lluvia	2	5	20	25
	<b>Total</b>	10	40	41	81


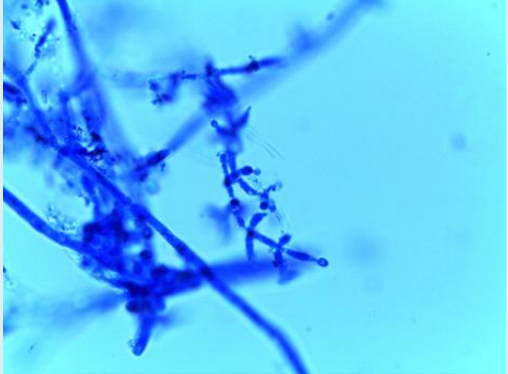

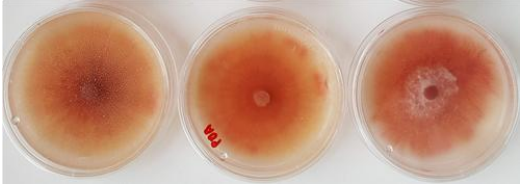


Los aislados se agruparon con base en sus características morfológicas (forma de la colonia, color, textura del micelio, elevación, tipo de micelio –aéreo, inmerso-) para permitir una selección sistemática de los mismos. De acuerdo al color que mostraba el micelio durante el crecimiento en medio de cultivo, los aislados se clasificaron en 8 grupos (Figura 14, A-H) en: blancos (Cool Gray 1, PMS 1205), cafés (PMS 411, 1405, 153), naranjas (PMS 143), negros (Black), rosas (PMS 183, 245, 196), rojos (PMS 1675, 180, 175), verdes (PMS 357, 371, 385, 3995) y vino (PMS 506). Así mismo, en base a sus características morfológicas, se clasificaron en diferentes subgrupos.



**Figura 15. Clasificación de los hongos endófitos aislados de *S. lepidophylla* de acuerdo con su coloración (A- hongos blancos, B- hongos cafés, C- hongos naranjas, D- hongos negros, E- hongos rosas, F- hongos rojos, G- hongos verdes, H- hongos vino).**

Con base en sus características morfológicas (macro y microscópicas), se lograron identificar seis aislados, lo cuales mostraron similitud con hongos de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*, correspondientes a los aislados Mi 8, Mi 9 y Ri 1, y Mi 6.1, Mi 6.2 y Ri 16, respectivamente; los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Características macro y micromorfológicas de aislados pertenecientes a los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*.

Género identificado: <i>Trichoderma</i>		Aislados: Ri 1, Mi 8, Mi 9
Morfología macroscópica		Morfología microscópica
Anverso		
Reverso		
<b>Descripción</b> Micelio de aspecto algodonoso y blanco, superficie plana, con presencia de pigmentación conidial color verde oscuro (aislados Mi 8 y Ri 1) y claro, poco visible (aislado Mi 9).		<b>Descripción</b> Hifas hialinas septadas, conidióforos ramificados en forma piramidal, fiálides con aspecto de botella y conidios ovoides, en algunos casos globosos, y hialinos. <b>Objetivo:</b> 100x
Género identificado: <i>Fusarium</i>		Aislados: Mi 6.1, Mi 6.2, Ri 16
Morfología macroscópica		Morfología microscópica
Anverso		
Reverso		
<b>Descripción</b> Micelio de coloración rosada, algunos con formación de un anillo, de textura afelpada y superficie plana.		<b>Descripción</b> Hifas hialinas, septadas y ramificadas, células conidiogénicas en forma de mono y polifiálides y microconidias ovoides con uno o dos tabiques, solitarias o acumuladas en forma de falsas cabezas. <b>Objetivo:</b> 100x



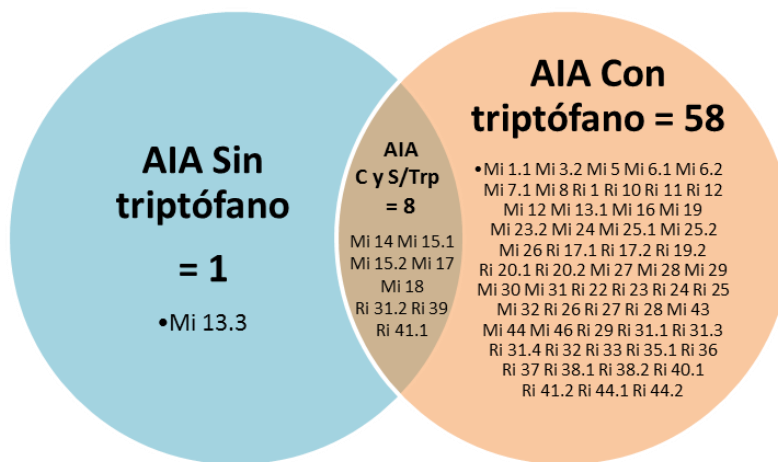
## 7.2 Cuantificación de Ácido Indolacético (AIA) en hongos endófitos de *S. lepidophylla*

De acuerdo con los resultados obtenidos, un total de 59 aislados resultaron positivos para la producción de AIA en ausencia y presencia de triptófano, y algunos presentaron producción en ambas condiciones (Tabla 6; Figura 16). Para el medio sin adición de triptófano se obtuvieron valores de entre 0.030 y 39 µg/ml en la producción de AIA y entre 0.040 y 64 µg/ml, en el medio adicionado. La mayor producción de AIA en ausencia de triptófano la tuvo el aislado Ri 31.2, con 39.065 ± 0.082 µg/ml a las 72 h de incubación; en presencia de triptófano, la mayor producción de AIA se observó a las 72 h en el aislado Mi 12 con 65.455 ± 0.282 µg/ml.

Con base en la producción de AIA en ausencia y/o presencia de triptófano, se observó que el aislado Mi 13.3 fue el único que presentó producción de la auxina en ausencia de triptófano, no así en el medio adicionado, en el cual no tuvo producción. De la misma manera, se observó que los aislados Mi 14, Mi 15.1, Mi 15.2, Mi 17, Mi 18, Ri 31.2, Ri 39 y Ri 41.1 mostraron producción de AIA en ambas condiciones, presentándose la mayor producción en el medio adicionado con triptófano.

**Tabla 6. Producción de AIA en presencia y/o ausencia de triptófano.**

Condición	Número de aislados	Total	
AIA S/Trp	9	AIA +	59
AIA C/Trp	58		
No productores	22		



**Figura 16. Producción de ácido indolacético (AIA) de 59 aislados fúngicos en medio Czapek-Dox con y sin adición de triptófano.**

## 7.3 Producción de sideróforos

Del total de aislados obtenidos, 25 resultaron positivos para la producción del complejo a partir del segundo día de incubación, por lo que se procedió a hacer la

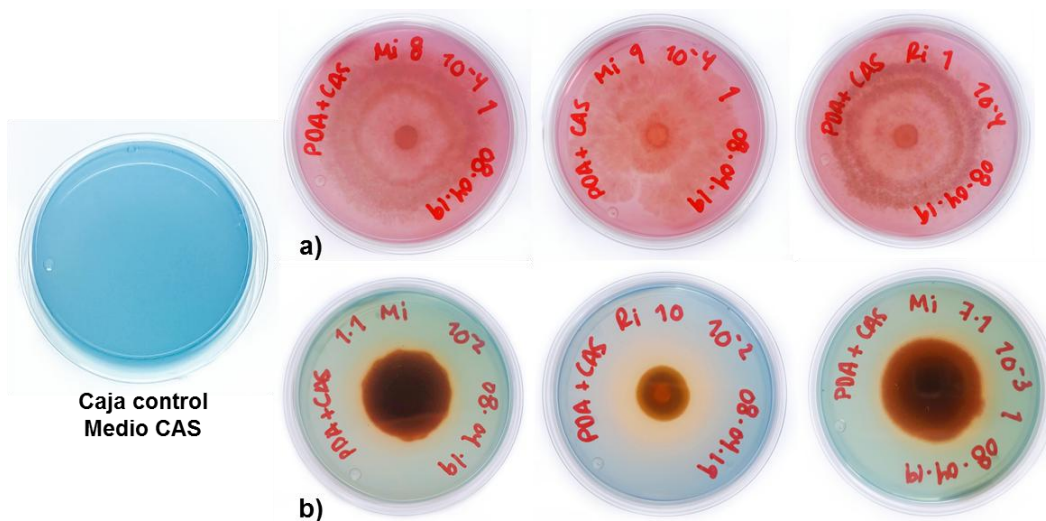
estimación cuantitativa para determinar la capacidad de la reacción en el medio CAS (Tabla 7). La mayor producción de sideróforos se presentó en el aislado Mi 29, con 4 mm; el resto de los aislados tuvo una producción media de 2.510 mm. Asimismo, se encontraron 14 aislados que mostraron una coloración rosada del halo en el medio, correspondiente a sideróforos de tipo catecol (Figura 17-a), y el resto un halo anaranjado en el medio, correspondiente a sideróforos de tipo hidroxamato (Figura 17-b).

**Tabla 7. Ensayo para la determinación de producción de sideróforos para aislados fúngicos de *S. lepidophylla*.**

Aislado	Producción sideróforos (mm)	Reacción de CAS	Aislado	Producción sideróforos (mm)	Aislado	Producción sideróforos (mm)	Aislado	Producción sideróforos (mm)
Mi 1.1	2,140	+	Mi 1.2	-	Ri 18.1	-	Ri 40.1	-
Mi 7.1	2,091	+	Mi 3.1	-	Ri 18.2	-	Ri 40.2	-
Mi 8	2,000	+	Mi 3.2	-	Ri 18.3	-	Ri 41.1	-
Mi 9	2,209	+	Mi 4.3	-	Ri 19.1	-	Ri 43	-
Ri 1	2,000	+	Mi 5.1	-	Ri 19.2	-	Ri 44.1	-
Ri 10	2,613	+	Mi 6.1	-	Mi 27	-	Ri 44.2	-
Mi 44	2,211	+	Mi 6.2	-	Mi 28	-		
Mi 46	3,973	+	Mi 7.2	-	Mi 31	-		
Ri 31.1	2,377	+	Ri 11	-	Ri 22	-		
Ri 31.2	2,505	+	Ri 12	-	Ri 23	-		
Ri 32	2,163	+	Ri 16	-	Ri 25	-		
Ri 35.1	2,542	+	Mi 12	-	Mi 32	-		
Ri 36	2,247	+	Mi 13.1	-	Ri 26	-		
Ri 37	2,294	+	Mi 13.2	-	Ri 27	-		
Ri 41.2	2,333	+	Mi 13.3	-	Ri 28	-		
Mi 14	2,261	+	Mi 16	-	Mi 33	-		
Mi 15.1	2,308	+	Mi 17	-	Mi 41	-		
Mi 15.2	2,350	+	Mi 18	-	Mi 43	-		
Ri 17.1	2,424	+	Mi 19	-	Ri 29	-		
Ri 17.2	2,125	+	Mi 23.1	-	Ri 31.3	-		
Ri 20.1	2,323	+	Mi 23.2	-	Ri 31.4	-		
Ri 20.2	3,125	+	Mi 24	-	Ri 33	-		
Mi 29	4,491	++	Mi 25.1	-	Ri 38.1	-		
Mi 30	2,073	+	Mi 25.2	-	Ri 38.2	-		
Ri 24	3,576	+	Mi 26	-	Ri 39	-		

Producción de sideróforos (CAS): - No producción; ± <1.0; +1.0-4.0; ++4.1-8.0 y +++8.0 mm (Milagres *et al.*, 1999).





**Figura 17. Representación de la reacción en el medio CAS por la producción de sideróforos.** Se observa el cambio de color de azul (control) a rosa y naranja por algunos de los aislados de evaluados. La formación de un halo con coloración rosada corresponde a sideróforos de tipo catecol (a), mientras que los sideróforos de tipo hidroxamato presentan una coloración anaranjada (b).

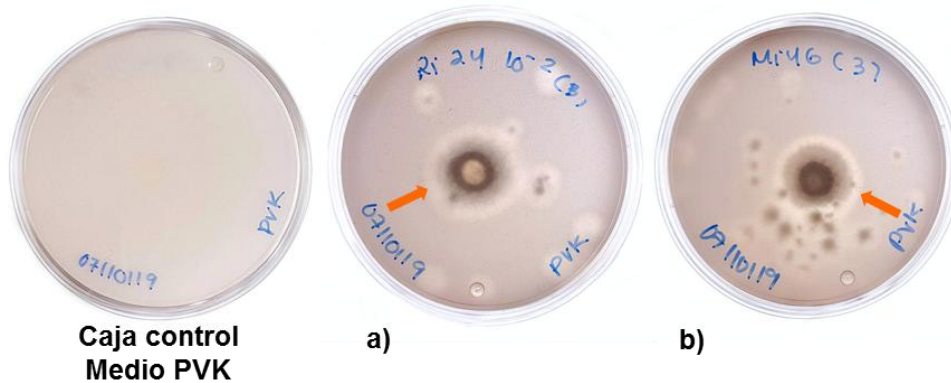
#### 7.4. Solubilización de fosfatos

La capacidad para solubilizar fosfato del medio Pikovskaya-agar resultó positiva únicamente para los aislados Ri 24 y Mi 46, observándose la formación de halos a partir de las 24 h de incubación (Figura 18-a y 18-b). La estimación cuantitativa de tres repeticiones se muestra en la tabla 8; los resultados mostraron que ambos aislados poseen la misma capacidad de solubilización (2 mm).

**Tabla 8. Determinación de solubilización de fosfatos para aislados fúngicos de *S. lepidophylla*.**

Aislado	Solubilización de PO <sub>4</sub> (mm)	Aislado	Solubilización de PO <sub>4</sub> (mm)	Aislado	Solubilización de PO <sub>4</sub> (mm)
Ri 24	2	Mi 17	-	Ri 26	-
Mi 46	2	Mi 18	-	Ri 27	-
Mi 1.1	-	Mi 19	-	Ri 28	-
Mi 1.2	-	Mi 23.1	-	Mi 33	-
Mi 3.1	-	Mi 23.2	-	Mi 41	-
Mi 3.2	-	Mi 24	-	Mi 43	-
Mi 4.3	-	Mi 25.1	-	Mi 44	-
Mi 5.1	-	Mi 25.2	-	Ri 29	-
Mi 6.1	-	Mi 26	-	Ri 31.1	-
Mi 6.2	-	Ri 17.1	-	Ri 31.2	-
Mi 7.1	-	Ri 17.2	-	Ri 31.3	-
Mi 7.2	-	Ri 18.1	-	Ri 31.4	-
Mi 8	-	Ri 18.2	-	Ri 32	-
Mi 9	-	Ri 18.3	-	Ri 33	-
Ri 1	-	Ri 19.1	-	Ri 35.1	-
Ri 10	-	Ri 19.2	-	Ri 36	-
Ri 11	-	Ri 20.1	-	Ri 37	-

Ri 12	-	Ri 20.2	-	Ri 38.1	-
Ri 16	-	Mi 27	-	Ri 38.2	-
Mi 12	-	Mi 28	-	Ri 39	-
Mi 13.1	-	Mi 29	-	Ri 40.1	-
Mi 13.2	-	Mi 30	-	Ri 40.2	-
Mi 13.3	-	Mi 31	-	Ri 41.1	-
Mi 14	-	Ri 22	-	Ri 41.2	-
Mi 15.1	-	Ri 23	-	Ri 43	-
Mi 15.2	-	Ri 25	-	Ri 44.1	-
Mi 16	-	Mi 32	-	Ri 44.2	-



**Figura 18. Solubilización de fosfatos en medio PVK por los aislados Ri 24 (a) y Mi 46 (b).** Se señala con una flecha la formación de un halo transparente alrededor del micelio, como resultado positivo a la prueba, posterior a las 24 h de incubación.

### 7.5 Identificación molecular de los hongos endófitos de *S. lepidophylla*

De acuerdo con las características de promoción de crecimiento vegetal de los aislados obtenidos, se seleccionaron representantes de cada grupo que presentaron por lo menos un resultado positivo a alguna de las pruebas evaluadas, tomando como principal criterio, la capacidad de producir ácido indolacético (AIA) en tres niveles: producción baja (1-10 µg/ml), media (11-20 µg/ml) y alta (21-30+ µg/ml), seguido de la producción de sideróforos y la solubilización de fosfatos. Con base en esto, 44 aislados fueron seleccionados para su identificación molecular (Tabla 10).

**Tabla 9. Aislados seleccionados para identificación molecular (ITS).**

Clasificación por color	AISLADO	Época de recolección	AIA	SIDERÓFOROS	FOSFATOS
BLANCOS (4/8)	Ri 24	Sequía	B	+	+
	Mi 46	Lluvias	B	+	+
	Ri 27	Sequía	B	-	-
	Mi 32	Sequía	B	-	-
CAFÉS (13/16)	Ri 10	Lluvias	B	+	-
	Ri 11	Lluvias	M	-	-
	Ri 12	Lluvias	M	-	-
	Ri 17.1	Sequía	B	+	-

	<b>Ri 20.1</b>	Sequía	B	+	-
	<b>Ri 20.2</b>	Sequía	M	+	-
	<b>Ri 28</b>	Sequía	B	-	-
	<b>Ri 29</b>	Sequía	B	-	-
	<b>Ri 33</b>	Lluvias	M	-	-
	<b>Ri 40.1</b>	Lluvias	A	-	-
	<b>Ri 32</b>	Lluvias	A	+	-
	<b>Ri 37</b>	Lluvias	M	+	-
	<b>Ri 41.1</b>	Lluvias	M	-	-
<b>NARANJAS (2/7)</b>	<b>Mi 25.1</b>	Sequía	M	-	-
	<b>Mi 43</b>	Lluvias	B	-	-
<b>NEGROS (2/2)</b>	<b>Mi 27</b>	Sequía	B	-	-
	<b>Mi 29</b>	Sequía	B	++	-
<b>ROSAS (1/8)</b>	<b>Ri 39</b>	Lluvias	B	-	-
<b>ROJOS (10/16)</b>	<b>Mi 1.1</b>	Lluvias	M	+	-
	<b>Mi 14</b>	Sequía	A	+	-
	<b>Mi 15.2</b>	Sequía	B	+	-
	<b>Mi 18</b>	Sequía	M	+	-
	<b>Ri 25</b>	Sequía	M	-	-
	<b>Ri 31.1</b>	Lluvias	B	+	-
	<b>Mi 30</b>	Lluvias	B	+	-
	<b>Ri 31.2</b>	Lluvias	A	+	-
	<b>Ri 36</b>	Lluvias	M	+	-
	<b>Ri 41.2</b>	Lluvias	M	+	-
<b>VERDES (10/20)</b>	<b>Mi 3.2</b>	Lluvias	A (STRP)	-	-
	<b>Mi 19</b>	Sequía	B	-	-
	<b>Mi 5</b>	Lluvias	B	-	-
	<b>Mi 12</b>	Sequía	A	-	-
	<b>Mi 15.1</b>	Sequía	M	-	-
	<b>Ri 17.2</b>	Sequía	B	+	-
	<b>Ri 19.2</b>	Sequía	B	-	-
	<b>Mi 23.2</b>	Sequía	B	-	-
	<b>Mi 26</b>	Sequía	B	-	-
	<b>Mi 44</b>	Lluvias	B	+	-
<b>VINO (2/4)</b>	<b>Ri 23</b>	Sequía	B	-	-
	<b>Ri 22</b>	Sequía	M	-	-

A partir de la amplificación y secuenciación de la región ITS, los resultados de las secuencias obtenidas de 23 aislados fúngicos, analizados en el programa BLAST, mostraron identidad con géneros de los Órdenes Pleosporales (86.95%), Xylariales (8.69%) e Hypocreales (4.34%). Los géneros dominantes fueron *Setophoma* (34.78%), *Didymella* (13.04%) y los géneros *Epicoccum*, *Phoma* y *Alternaria* (8.69%), mientras que los géneros que fueron representados por un solo aislado correspondieron a *Fusarium*, *Stagonosporopsis*, *Didymocrea*, *Nigrospora*, *Curvularia* y *Arthrinium*. Estos resultados se muestran en la tabla 6.

**Tabla 10. Identificación molecular para diferentes aislados fúngicos obtenidos de *S. lepidophylla* (ITS).**

Aislado	pb	Resultado BLAST	Orden	% Identidad	QC	No. Acceso
Ri 39 (L)	513	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hypocreales	100.00%	100.00%	MN545303.1
Mi 1.1 (L)	505	<i>Epicoccum sorghinum</i>	Pleosporales	100.00%	100.00%	MK762588.1
Mi 5 (L)	605	<i>Didymocrea leucaenae</i>	Pleosporales	98.54%	100.00%	NR_164298.1
Mi 15.1 (S)	502	<i>Epicoccum sorghinum</i>	Pleosporales	100.00%	100.00%	MK762588.1
Mi 15.2 (S)	505	<i>Phoma herbarum</i>	Pleosporales	99.36%	100.00%	MN452486.1
Mi 19 (S)	516	<i>Didymella glomerata</i>	Pleosporales	98.86%	100.00%	MN068917.1
Mi 23.2 (S)	544	<i>Curvularia aerea</i>	Pleosporales	99.80%	100.00%	KP131940.1
Mi 30 (S)	502	<i>Phoma herbarum</i>	Pleosporales	99.79%	100.00%	MN452486.1
Mi 44 (L)	538	<i>Alternaria alternata</i>	Pleosporales	100.00%	100.00%	MK530695.1
Mi 26 (S)	509	<i>Didymella pinodella</i>	Pleosporales	100.00%	100.00%	MT274580.1
Ri 10 (L)	525	<i>Didymella sp.</i>	Pleosporales	99.15%	100.00%	MK100199.1
Ri 11 (L)	513	<i>Setophoma terrestris</i>	Pleosporales	99.58%	100.00%	MT032513.1
Ri 12 (L)	513	<i>Setophoma terrestris</i>	Pleosporales	98.76%	100.00%	MN522036.1
Ri 37 (L)	509	<i>Setophoma terrestris</i>	Pleosporales	99.79%	100.00%	MT032513.1
Ri 19.2 (S)	516	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	Pleosporales	100.00%	100.00%	MK690410.1
Ri 20.1 (S)	513	<i>Setophoma terrestris</i>	Pleosporales	99.57%	98.00%	KF251248.1
Ri 22 (S)	512	<i>Setophoma terrestris</i>	Pleosporales	99.79%	100.00%	MT032513.1
Ri 28 (S)	514	<i>Setophoma terrestris</i>	Pleosporales	98.52%	100.00%	MT276117.1
Ri 31.1 (L)	511	<i>Alternaria sp.</i>	Pleosporales	98.46%	100.00%	KY412160.1
Ri 31.2 (L)	513	<i>Setophoma terrestris</i>	Pleosporales	100.00%	99.00%	KF251248.1
Ri 40.1 (L)	512	<i>Setophoma terrestris</i>	Pleosporales	100.00%	100.00%	MT032513.1
Mi 25.1 (S)	528	<i>Nigrospora sphaerica</i>	Xylariales	97.98%	100.00%	MN215801.1
Ri 27 (S)	566	<i>Arthrinium sp.</i>	Xylariales	97.90%	99.00%	KM203599.1

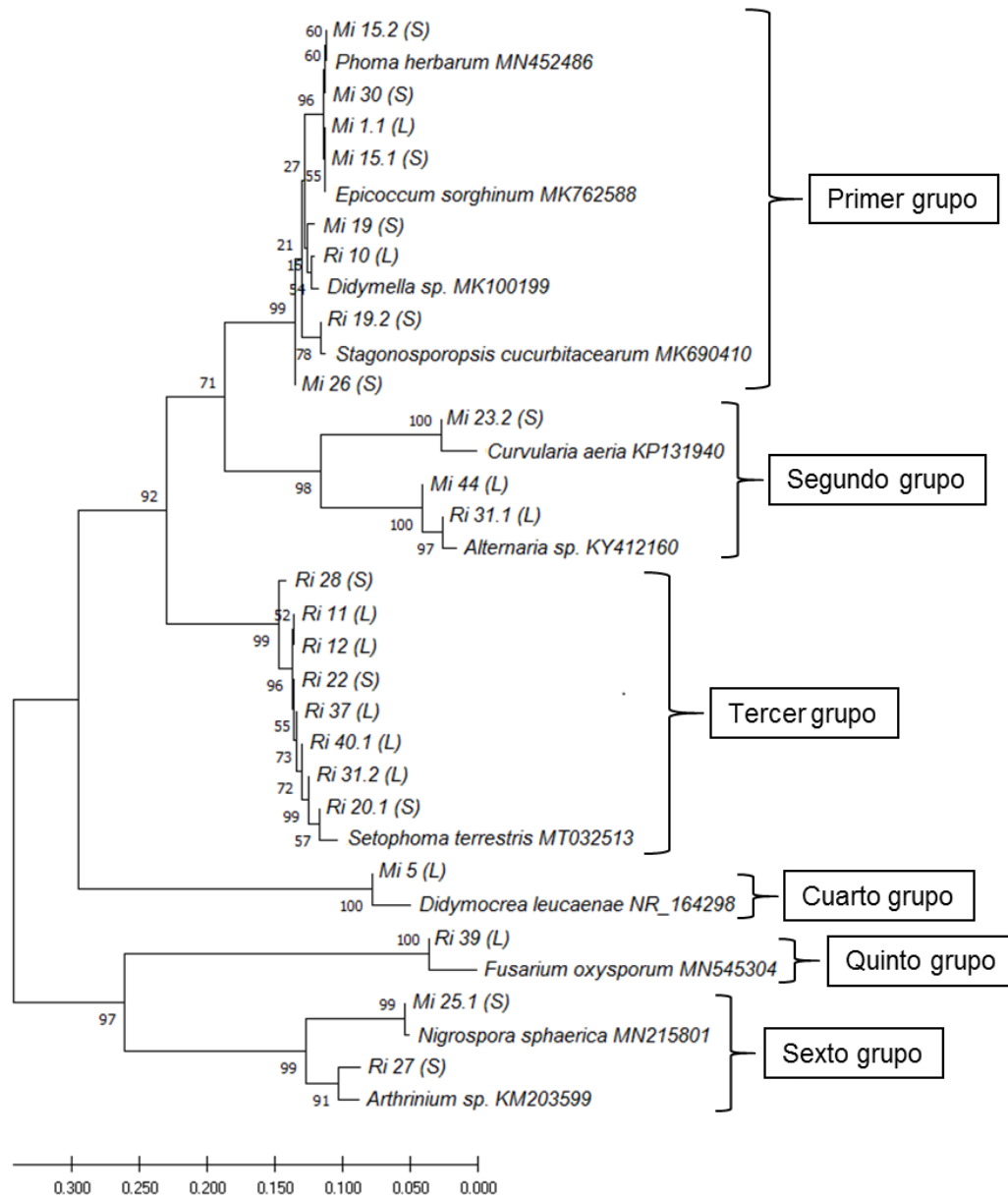
Mi = Micrófila (L) = Lluvias

Ri = Rizóforo (S) = Sequía

El análisis filogenético correspondiente a los hongos endófitos aislados de *S. lepidophylla*, mostró un total de seis grupos pertenecientes a géneros del filo Ascomycota (figura 20). Los números que se encuentran en las ramas correspondieron al porcentaje de soporte del valor de *Bootstrap*.

El primer grupo presentó un 99% de soporte estadístico, siendo conformado por 4 géneros, entre ellos *Phoma*, *Epicoccum*, *Didymella* y *Stagonosporopsis*. Estos géneros, se ha observado, se encuentran íntimamente relacionados, debido a ello su diversidad (Cornejo-Espinoza, 2014). El segundo grupo estuvo formado por dos géneros, *Curvularia* y *Altenaria* (98% de soporte), los cuales son géneros que han sido reportados como hermanos anamórficos dentro de la familia Pleosporaceae (Bao & Roossinck, 2013). El tercer, cuarto y quinto grupo estuvieron compuestos cada uno por un único género, *Setophoma*, *Didymocrea* y *Fusarium*

respectivamente, los cuales presentaron soportes de entre el 99-100% de *Bootstrap*. Finalmente, el sexto grupo estuvo conformado por los géneros *Nigrospora* y *Arthrinium*, con un 99% porcentaje de soporte; estos géneros se han reportado como un clado hermano, a pesar de ser filogenéticamente diferentes (Wang *et al*, 2017).



**Figura 19. Construcción del árbol filogenético a partir de las secuencias analizadas de 23 aislados fúngicos identificados.** La filogenia se generó utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ) basada en la región ITS. El soporte se indica en los nodos y representa el porcentaje de 1000 réplicas de arranque.

Los reportes encontrados a partir de los géneros de hongos endófitos identificados nos permitieron vislumbrar diferentes mecanismos a partir de los cuales estos

hongos pueden ayudar en la promoción del crecimiento en las plantas, como se presenta en la tabla número 11.

**Tabla 11. Características y mecanismos reportados para la promoción de crecimiento vegetal por diferentes géneros de hongos endófitos aislados de *S. lepidophylla*.**

Aislado	Resultado BLAST	Características de Promoción del Crecimiento Vegetal			% Identidad	No. Acceso	Estudios reportados	Mecanismo	Referencias
		Producción AIA	Producción Sideróforos	Solubilización PO <sub>4</sub>					
Ri 39 (L)	<i>Fusarium oxysporum</i>	B	-	-	100.00%	MN545303.1	Promoción del crecimiento en plantas de Chile ( <i>Capsicum annuum</i> L.)	Producción de compuestos volátiles orgánicos.	Rodríguez-Serrano, 2019
Mi 6.1 (L)	<i>Fusarium oxysporum</i>	B	-	-	-	-			
Mi 6.2 (L)	<i>Fusarium oxysporum</i>	B	-	-	-	-			
Ri 16 (L)	<i>Fusarium oxysporum</i>	B	-	-	-	-			
Mi 1.1 (L)	<i>Epicoccum sorghinum</i>	M	Tipo hidroxamato +	-	100.00%	MK762588.1	Producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica	Producción de poliquétidos (flavipina, epicolactona), derivados de poliquétidos, sideróforos, carotenoides	Mesquita-Braga <i>et al</i> , 2018
Mi 15.1 (S)	<i>Epicoccum sorghinum</i>	M	-	-	99.60%	MK762588.1			
Mi 15.2 (S)	<i>Phoma herbarum</i>	B	Tipo hidroxamato +	-	99.36%	MN452486.1	Promoción de crecimiento en tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) Mejora en la germinación y promoción de crecimiento en arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	Producción de compuestos orgánicos volátiles  Producción de AIA, flavonoides y cotenidos fenólicos	Naznin <i>et al</i> , 2013; Khan <i>et al</i> , 2017; Hamayun <i>et al</i> , 2010
Mi 30 (S)	<i>Phoma herbarum</i>	B	Tipo hidroxamato +	-	99.79%	MN452486.1	Promoción de crecimiento en cultivo de pepino ( <i>Cucumis sativus</i> )		
Mi 19 (S)	<i>Didymella glomerata</i>	B	-	-	98.86%	MN068917.1	Promoción de crecimiento en <i>Arabidopsis thaliana</i>	Producción de AIA, sideróforos y solubilización de fosfatos	Turbat <i>et al</i> , 2020
Mi 26 (S)	<i>Didymella pinodella</i>	B	-	-	100.00%	MT274580.1			
Ri 10 (L)	<i>Didymella sp.</i>	B	Tipo hidroxamato +	-	99.15%	MK100199.1			
Mi 44 (L)	<i>Alternaria alternata</i>	B	Tipo hidroxamato +	-	100.00%	MK530695.1	Actividad antimicrobiana y antifúngica contra <i>Plasmopora viticola</i> en plantíos de vino	Producción de metabolitos secundarios (diketopiperazinas, fumitremorgina B, C, ácido helvólico, ciclo-(Phe-Ser)	Feng & Ma, 2010; Musetti <i>et al</i> , 2017; Al-Rashdi <i>et al</i> , 2020
Ri 31.1 (L)	<i>Alternaria sp.</i>	B	Tipo catecol +	-	98.46%	KY412160.1	Actividad antimicrobiana contra <i>Fusarium sp.</i>	Producción de Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's)	
Ri 11 (L)	<i>Setophoma terrestris</i>	M	-	-	99.58%	MT032513.1	N/R	N/R	N/R



Ri 12 (L)	<i>Setophoma terrestris</i>	M	-	-	98.76%	MN522036.1			
Ri 37 (L)	<i>Setophoma terrestris</i>	M	Tipo hidroxamato +	-	99.79%	MT032513.1			
Ri 20.1 (S)	<i>Setophoma terrestris</i>	B	Tipo catecol +	-	99.57%	KF251248.1			
Ri 22 (S)	<i>Setophoma terrestris</i>	M	-	-	99.79%	MT032513.1			
Ri 28 (S)	<i>Setophoma terrestris</i>	B	-	-	98.52%	MT276117.1			
Ri 31.2 (L)	<i>Setophoma terrestris</i>	A	Tipo catecol +	-	100.00%	KF251248.1			
Ri 40.1 (L)	<i>Setophoma terrestris</i>	A	-	-	100.00%	MT032513.1			
Mi 5 (L)	<i>Didymocrea leucaenae</i>	B	-	-	98.57%	NR_164298.1	N/R	N/R	N/R
Mi 23.2 (S)	<i>Curvularia aerea</i>	B	-	-	99.80%	KP131940.1	Producción de moléculas bioactivas con actividad antifúngica Conferencia de termotolerancia en plantas de <i>Dichantheium lanuginosum</i> Mejora en la capacidad de termotolerancia en plantas de <i>Hedyotis diffusa</i> y arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	Producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares (fenol oxidasa)  Producción de osmoprotectores (trehalosa, glicina-betaina)	Sharma <i>et al</i> , 2016; Khiralla <i>et al</i> , 2018; Redman <i>et al</i> , 2012; Zhou <i>et al</i> , 2015
Ri 19.2 (S)	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	B	-	-	100.00%	MK690410.1	Actividad antibacteriana y promoción del crecimiento en plantas de regaliz ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.)	Producción de AIA y metabolitos secundarios	Arora <i>et al</i> , 2019
Mi 25.1 (S)	<i>Nigrospora sphaerica</i>	M	-	-	97.98%	MN215801.1	Promoción de crecimiento en plantas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) Actividad antimicrobiana contra fitopatógenos	Producción de amoniaco, AIA, solubilización de fosfatos Producción de metabolitos secundarios (phomolactona, nigrosporinas, lactonas)	Saad & Badry, 2020; Santos <i>et al</i> , 2015
Ri 27 (S)	<i>Arthrinium sp.</i>	B	-	-	97.90%	KM203599.1	Actividad antifúngica en tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) Promoción de crecimiento en arroz y <i>Atriplex gemelinii</i> Promoción de crecimiento en <i>Lolium perenne</i>	Producción de metabolitos secundarios Producción de giberelinas Producción de AIA, sideróforos	Zhang <i>et al</i> , 2018; Khan <i>et al</i> , 2009 ; Furtado <i>et al</i> , 2019
Mi 8 (L)	<i>Trichoderma sp.</i>	-	Tipo catecol +	-	-	-	Promoción de crecimiento en tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ), arroz ( <i>Oryza sativa</i> ), maíz ( <i>Zea mays</i> ) y trigo ( <i>Triticum sp.</i> )	Producción de auxinas, giberelinas, solubilización de fosfatos, producción de enzimas catalíticas	Hernández-Melchor <i>et al</i> , 2019
Mi 9 (L)	<i>Trichoderma sp.</i>	-	Tipo catecol +	-	-	-			
Ri 1 (L)	<i>Trichoderma sp.</i>	M	Tipo catecol +	-	-	-			

Mi = Micrófila (L) = Lluvias  
Ri = Rizóforo (S) = Sequía  
AIA= Ácido indolacético  
PO<sub>4</sub>= Fosfatos

## 7.6. Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM)

El análisis de correspondencia múltiple es una técnica multivariada gráfica diseñada para explorar las relaciones de variables categóricas.

La caracterización por época de colecta, tipo de tejido y características de promoción de crecimiento vegetal (producción de AIA, sideróforos y solubilización de fosfatos) a partir de los aislados fúngicos obtenidos de *S. lepidophylla* (n= 81) se muestran en la tabla 12. Del análisis de correspondencia múltiple (ACM), una solución de dos dimensiones se consideró la más adecuada (porcentaje acumulado igual a 83.14%); los valores de la dimensión 1 y 2 presentadas fueron, respectivamente, 0.299 y 0.232 de *Eigen-value*.

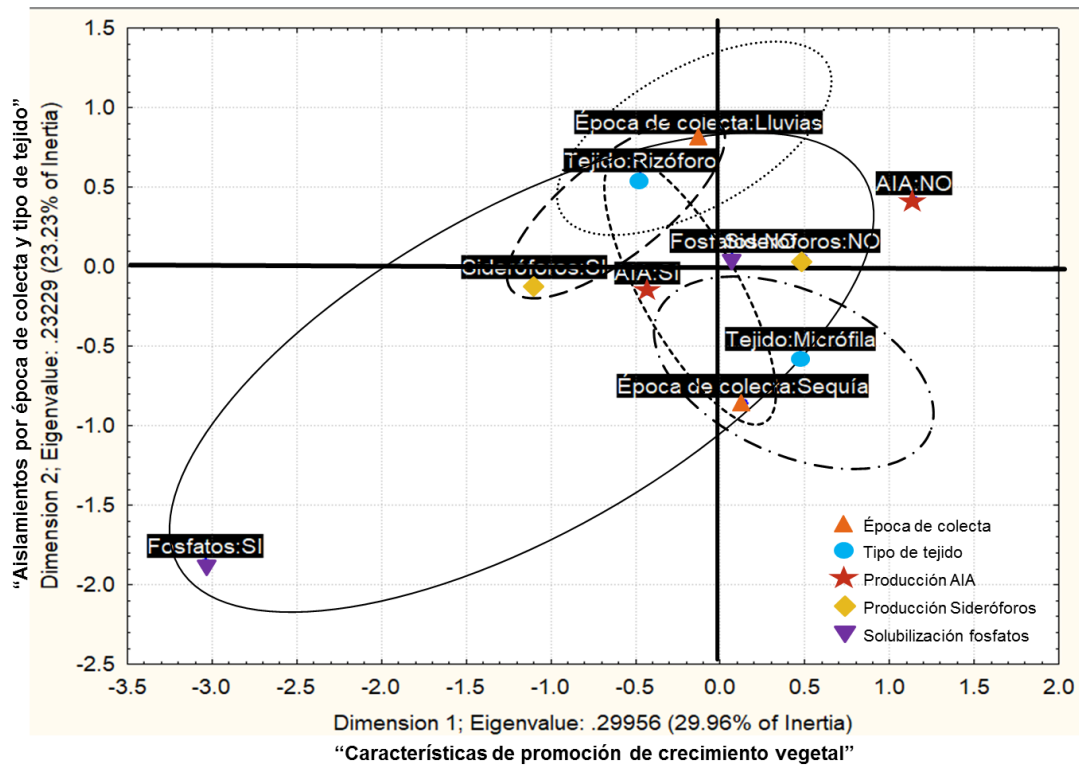
**Tabla 12. Resultados del Análisis de Correspondencia Múltiple de los aislados fúngicos de *S. lepidophylla*.**

Análisis de correspondencia múltiple		% de n	Inercia dimensiones		Significancia
Aislados	n= 81		Dim 1	Dim 2	
<b>Endófitos/Tejido</b>					
<b>Rizóforo</b>	41	50.61	0.074	0.135	0.104
<b>Micrófila</b>	40	49.38	0.075	0.138	0.106
<b>Endófitos/Época</b>					
<b>Lluvia</b>	42	51.85	0.005	0.284	0.144
<b>Sequía</b>	39	48.14	0.005	0.306	0.155
<b>Características de Promoción de Crecimiento Vegetal</b>					
<b>AIA SI</b>	59	72.83	0.088	0.014	0.051
<b>AIA NO</b>	22	27.16	0.237	0.039	0.138
<b>Sideróforos SI</b>	25	30.86	0.247	0.003	0.125
<b>Sideróforos NO</b>	56	69.13	0.11	0.001	0.055
<b>PO<sub>4</sub> SI</b>	2	22.46	0.151	0.074	0.112
<b>PO<sub>4</sub> NO</b>	79	97.53	0.003	0.001	0.002

Se obtuvieron medidas de discriminación así como un gráfico bidimensional con puntos de categorías a partir de las variables evaluadas (Figura 20). De acuerdo con los resultados, todas las medidas de discriminación fueron inferiores a 0.5, con un valor máximo de 0.247 (sideróforos NO) para la dimensión 1 y 0.306 (época de colecta: sequía) para la dimensión 2. Las variables más discriminantes para la dimensión 1 fueron, jerárquicamente, producción de sideróforos, producción de AIA, solubilización de fosfatos, tipo de tejido y época de colecta; con respecto a la dimensión 2, las variables fueron época de colecta, tipo de tejido, solubilización de fosfatos, producción de AIA y producción de sideróforos. A partir de los resultados y su visualización gráfica, la dimensión 1 se denominó como “Características de



promoción de crecimiento vegetal” y la dimensión 2 como “Aislamientos por época de colecta y tejido”.



**Figura 20. Gráfico del análisis de correspondencia múltiple a partir de los resultados del aislamiento de hongos endófitos de *S. lepidophylla*.**

El análisis del ACM en conjunto con los valores resultantes de cada variable sirvieron para identificar las posibles relaciones entre cada una de las dimensiones. La primera relación observada fue con base en la época en que los aislados se obtuvieron y el tejido del cual se aislaron; en este sentido, se observó que durante la época de lluvias el aislamiento de los hongos endófitos estuvo asociado a los rizóforos, mientras que durante la época de sequía se encontraron asociados con las micrófilas. Así mismo, se pudo observar que la capacidad para producir AIA y sideróforos se encontró asociado a los hongos aislados a partir de los rizóforos aunque, particularmente, la síntesis de AIA estuvo asociada a la época de sequía, en tanto que la producción de sideróforos presentó mayor asociación con la época de lluvias. La capacidad para solubilizar fosfatos tuvo el mismo nivel de asociación con la época de colecta y el tipo de tejido del cual se aislaron los hongos.

## 8. Discusión

Las plantas se encuentran expuestas constantemente a diferentes tipos de estrés, siendo el más común el causado debido al déficit de agua; sin embargo, algunas han desarrollado diversos mecanismos que les permiten contender contra este tipo de estrés, por lo que son conocidas como *plantas de resurrección* (Covarrubias, 2007; Yobi *et al.*, 2013). Dentro de este grupo de plantas se encuentra *S. lepidophylla*, que es conocida por su capacidad de sobrevivir largos periodos en deshidratación. Ahora bien, a pesar de que se creía que su capacidad para tolerar la deshidratación era atribuida a los altos niveles de trehalosa que sintetiza, se han reportado estudios que sugieren que este azúcar no es indispensable para conferir la tolerancia a la deshidratación (Yobi *et al.*, 2012) y que, además, gran parte de la síntesis de trehalosa por parte de esta planta se debe a la presencia de diversos organismos asociados a ella (Pampurova *et al.*, 2014), dentro de los cuales se encuentran los hongos endófitos. Debido a que se conoce que este grupo de organismos puede jugar diferentes papeles relacionados al desarrollo y crecimiento de las plantas, así como coadyuvar como agentes de protección frente a distintos tipos de estrés (Barrow *et al.*, 2008; Hassan, 2017), es que resultó de interés su aislamiento y caracterización para el estudio de la microbiota endófito fúngica asociada a *S. lepidophylla*.

En este estudio, se obtuvieron diversos hongos endófitos aislados a partir de las micrófilas y rizóforos de plantas colectadas de *S. lepidophylla*, en dos estados fisiológicos (hidratado y deshidratado).

A pesar de que no se encontró una diferencia significativa entre el número de aislados obtenidos a partir de las micrófilas respecto de los rizóforos, sí se observó una variación entre el número de hongos endófitos aislados entre ambas épocas; de esta manera, se observó un aumento en el número de aislados durante la época de estiaje en las micrófilas, así como una disminución en el número de aislados en los rizóforos durante esta época. Esta variación en el número de aislados por tejido en ambos estados quizá se deba a la capacidad de los organismos endófitos para adaptarse al tejido en el cual puedan tener un mejor desarrollo, así como a las condiciones del ambiente y el suelo; asimismo, es probable que el número de hongos endófitos sea mayor en las micrófilas durante la época de estiaje debido a que poseen mayor contenido de nutrientes, en comparación a los rizóforos. Pérez *et al.*, (2009) atribuyen la diversidad y estructura de los endófitos en las plantas a varios factores, como la fisiología de la planta, la presencia de diferentes tipos de estrés ambiental, la interacción con otros microorganismos patógenos o parásitos y diversos componentes biogeográficos.

Con el fin de determinar la influencia de los hongos endófitos asociados a *S. lepidophylla*, con base en las características de promoción de crecimiento vegetal, se evaluó su capacidad para producir ácido indolacético (AIA), sideróforos y solubilizar fosfatos.

Se ha reportado que bacterias, levaduras y hongos del suelo y/o endófitos asociados a las plantas son capaces de sintetizar AIA (Chutima & Lumyong, 2012); esta fitohormona constituye uno de los principales agentes en la regulación de respuesta de las plantas a los cambios ambientales, así como en la promoción del crecimiento de las mismas (Vega-Celedón *et al.*, 2016).

Con base en los resultados obtenidos para la producción de AIA, se observó que la mayor producción se dio en presencia con triptófano; a pesar de esto, también se pudo detectar la capacidad de ciertos hongos para producir AIA en ausencia y presencia de triptófano y, de manera particular, un aislado que sólo presentó producción en ausencia del mismo. Estos datos son comparables con los resultados de Hassan (2017), quien reportó la capacidad de diferentes aislados de hongos endófitos de *Teucrium polium* L., para producir AIA con o sin triptófano como precursor. Así mismo, se sabe que la síntesis de AIA por parte de los microorganismos se puede dar a través de dos vías principales: la vía dependiente de triptófano y la vía independiente de triptófano, siendo la primera la más común para la producción de la auxina (Gravel *et al.*, 2007). Con base en esto, el hecho de que algunos de los hongos aislados tuvieran capacidad para producir AIA en ausencia y/o presencia de triptófano, nos puede dar una idea de la posible vía de síntesis que tienen para sintetizar esta hormona.

El hierro es un elemento que juega un papel muy importante para el metabolismo de las plantas; sin embargo, la mayor parte se encuentra en formas que no son fácilmente asimilables para éstas (Restrepo-Correa *et al.*, 2017). En respuesta, los microorganismos asociados a las plantas, han desarrollado la capacidad para sintetizar diferentes agentes quelantes con capacidad de solubilizar el hierro férrico del medio ambiente, siendo conocidos como sideróforos (Hu & Xu, 2011).

Nuestros resultados mostraron la capacidad de diferentes aislados fúngicos para producir sideróforos. Las mediciones en el cambio de color, expresado como la relación entre la formación de halos en el medio CAS respecto al crecimiento del micelio, fue similar en casi todos los aislados evaluados, observándose la mayor estimación en el aislado Mi 29. Cabe destacar que la forma de expresar la producción de sideróforos para este estudio (mm/día), no representa una cuantificación exacta de la capacidad de estos organismos para quelar el hierro, pero sirvió como una aproximación para determinar las diferencias en cuanto a la respuesta en el cambio de color del medio por parte de los aislados (Milagres *et al.*, 1999).

Algo interesante que se observó fueron las diferencias en términos del cambio de color en el medio por la reacción de CAS de algunos aislados, observándose cambios en la coloración de azul a rosado en lugar de naranja, que es color típico descrito en la literatura por la remoción del metal en el medio (Schwyn & Neilands, 1987). Estos resultados pueden compararse con los reportados por Pérez-Miranda *et al.*, (2007), quienes observaron cambios de color en el medio CAS de aislados fúngicos y bacterianos de suelo y agua; Milagres *et al.*, (1999), también documentaron cambios en el color del medio CAS de diferentes aislados de las clases Basidiomycota, Zygomycota y Ascomycota. Estas diferencias en la respuesta de la reacción de CAS (rosa o naranja) podrían estar relacionadas a la diferencia estructural de los tipos de sideróforos (de tipo catecol o hidroxamato) secretados

por estos organismos, como lo reportado por Pérez-Miranda y colaboradores (2007), quienes explican que los sideróforos de tipo hidroxamato (el tipo de sideróforo más común reportado para hongos), se presentan de color rojo-anaranjado o naranja cuando se difunde en el medio; por otro lado, los sideróforos de tipo catecol, se difunden con una coloración rosado-púrpura. La producción de sideróforos de tipo catecol se han reportado en hongos, pero su aparición es rara (Hipol *et al.*, 2019), por lo que el hecho de que nuestros aislados mostraran la presencia de ambos tipos de sideróforos, nos da un indicio de la versatilidad que tienen para producir estos agentes, promoviendo así una mejor adquisición del metal.

El fósforo (P) es un elemento fundamental para el crecimiento vegetal, pero es uno de los menos disponibles en el suelo, debido a que se encuentra en formas no asimilables para las plantas (Hernández-Leal *et al.*, 2011). Este nutriente, sin embargo, puede ser facilitado por la acción de algunos grupos de hongos y bacterias que poseen la capacidad de solubilizarlo, por medio de la excreción ácidos orgánicos, los cuales disuelven minerales ricos en fósforo o quelan cationes unidos a éste para liberarlo en formas funcionales para las plantas (Tejera-Hernández *et al.*, 2013).

De acuerdo con nuestros resultados, sólo dos aislados fúngicos, Ri 24 y Mi 46, presentaron capacidad de solubilizar fosfatos. El hecho de que sólo estos aislados pudieran solubilizar el fosfato de medio, no es indicativo de que el resto careciera de capacidad solubilizadora. Hernández-Leal y colaboradores (2011), mencionan que la ausencia de halos de solubilización en el medio de cultivo puede deberse a que el tipo de medio no sea lo suficientemente sensible para detectar esta actividad en algunos microorganismos. Debido a ello, es necesario recurrir a medios líquidos para obtener resultados más precisos. Algo importante de resaltar es que el porcentaje del número de aislados que presentaron capacidad para solubilizar fosfato fue del 2% respecto al total de los endófitos aislados, un porcentaje mayor al reportado en otros estudios, en los cuales se ha visto que sólo un pequeño porcentaje de los aislados fúngicos poseen esta habilidad, constituyendo del 0.1 al 0.5% de organismos con dicha actividad (Beltrán-Pineda, 2015).

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas evaluadas, se llevó a cabo la identificación molecular de aquellos aislados que presentaron una o más características de promoción del crecimiento, basado en el análisis de las secuencias a partir de la región ITS, así como por sus características morfológicas. Con base en esto, se lograron identificar aislados pertenecientes a los géneros *Setophoma*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Didymella*, *Stagonosporopsis*, *Phoma*, *Didymocrea*, *Nigrospora*, *Arthrinium*, *Trichoderma* y *Fusarium*.

Al hacer una comparación de los aislados identificados con otros trabajos, se han descrito que algunos de estos géneros tienen la capacidad para promover el crecimiento vegetal, a través de distintos mecanismos, como la producción de auxinas (AIA, giberelinas), producción de sideróforos, solubilización de fosfatos y la producción de otros compuestos bioactivos (compuestos orgánicos volátiles (VOC's) y trehalosa).

En estudios anteriores se ha observado el efecto de especies de los géneros *Trichoderma* (Hernández-Melchor *et al.*, 2019), *Nigrospora* (Saad & Badry, 2020), *Arthrinium* (Khan *et al.*, 2009), *Phoma* (Hamayun *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2017), *Stagonosporopsis* (Arora *et al.*, 2019) y *Didymella* (Turbat *et al.*, 2020) para promover el crecimiento en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*), arroz (*Oryza sativa*) y pepino (*Cucumis sativus*), regaliz (*Glycyrrhiza glabra* L.), raigrás criollo (*Lolium perenne*), así como en la planta de sal, *Atriplex gmelinii*, y *Arabidopsis thaliana*, mediante la producción de AIA y giberelinas. La promoción del crecimiento en cultivos como jitomate (*Solanum lycopersicum*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum sp.*) y *A. thaliana*, a través de la capacidad de hongos endófitos para solubilizar fosfatos se ha demostrado en especies de géneros como *Trichoderma* (Hernández-Melchor *et al.*, 2019), *Nigrospora* (Saad & Badry, 2020) y *Didymella* (Turbat *et al.*, 2020).

La capacidad que poseen los géneros *Epicoccum* (Mesquita-Braga *et al.*, 2018), *Didymella* (Turbat *et al.*, 2020) y *Arthrinium* (Furtado *et al.*, 2019) para producir sideróforos se ha visto juega un papel importante para la protección contra diferentes microorganismos fitopatógenos, así como en la promoción de crecimiento de diferentes especies de plantas, tales como *A. thaliana* y *Lolium perenne*. Asimismo, se han descrito otros mecanismos por los que los hongos pueden promover el crecimiento y proteger a sus hospederas frente a diferentes tipos de estrés. Dentro de estos mecanismos se encuentran la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) y la síntesis de diversos compuestos bioactivos con actividad antifúngica y antimicrobiana, los cuales se han reportado en géneros como *Fusarium* (Rodríguez-Serrano, 2019), *Alternaria* (Al-Rashdi *et al.*, 2020), *Phoma* (Naznin *et al.*, 2013) y *Curvularia* (Sharma *et al.*, 2016; Khiralla *et al.*, 2018), éste último también reportado como un género asociado en conferir termotolerancia en especies como *Dichanthelium lanuginosum*, *Hedyotis diffusa* y arroz (*O. sativa*).

Pese a que se conoce que los hongos de los géneros *Didymocrea* y *Setophoma* son causantes de enfermedades en diferentes tipos de plantas y que algunas especies pueden estar presentes como endófitos (Aveskamp *et al.*, 2010) no se encontró información acerca de su posible rol como promotores de crecimiento o como agentes de biocontrol contra otros organismos fitopatógenos.

Finalmente, la realización de un análisis de correspondencia múltiple (ACM), nos permitió concluir que los principales mecanismos por medio del cual los hongos endófitos asociados a *S. lepidophylla* podrían estar proporcionando algún beneficio a ésta se da a través de la producción de AIA y sideróforos, y éstos, a su vez, están asociados, principalmente, a hongos aislados a partir de los rizóforos de la planta.

## 9. Conclusiones

- ✓ La abundancia y distribución de los hongos endófitos aislados de *S. lepidophylla* varía de acuerdo con la disponibilidad de humedad en el ambiente.
- ✓ Diversos aislados fúngicos de *S. lepidophylla* presentaron características de promoción de crecimiento vegetal.
- ✓ Los hongos endófitos aislados de *S. lepidophylla* sintetizan preferencialmente ácido indolacético (AIA) y producen sideróforos.

## 10. Perspectivas

- Concluir la identificación de los aislados endófitos fúngicos de *Selaginella lepidophylla*.
- Cuantificar los niveles de trehalosa en los HE.
- Evaluar la capacidad de promoción del crecimiento de los aislados fúngicos de *S. lepidophylla* en plantas modelo como *A. thaliana* y especies de interés agronómico (maíz, chile, frijol).

## 11. Bibliografía

1. Adnan, M., Alshammari, E., Ashraf, S. A., Patel, K., Lad, K., & Patel, M. (2018). *Physiological and molecular characterization of biosurfactant producing endophytic fungi Xylaria regalis from the cones of Thuja plicata as a potent plant growth promoter with its potential application*. BioMed Research International. 2018(3): 1-11
2. Aguilar, M. I., Benítez, W. V., Colín, A., Bye, R., Ríos-Gómez, R., & Calzada, F. (2015). *Evaluation of the diuretic activity in two Mexican medicinal species: Selaginella nothohybrida and Selaginella lepidophylla and its effects with ciclo oxigenases inhibitors*. Journal of Ethnopharmacology. 163(2): 167-172.
3. Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). *Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria*. Biology and Fertility of Soils. 12(1): 39-45.
4. Andreote, F. D., Gumiere, T., & Durrer, A. (2014). *Exploring interactions of plant microbiomes*. Scientia Agricola. 71(6): 528-539.
5. Arora, P., Wani, Z. A., Ahmad, T., Sultan, P., Gupta, S., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2019) *Community structure, spatial distribution, diversity and functional characterization of culturable endophytic fungi associated with Glycyrrhiza glabra L*. Fungal Biology. 123(5): 373-383.
6. Aveskamp, M. M., Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., & Crous, P. W. (2010). *Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise Phoma and related pleosporalean genera*. Studies in Micology. 65(1): 1-60.
7. Banks, J. A. (2009). *Selaginella and 400 Million Years of Separation*. Annual Review of Plant Biology. 60(1): 223-238.
8. Bao, X., & Roossinck, M. T. (2013). *Multiplexed interactions: Viruses of endophytic fungi*. Advances in Virus Research. 86(1): 37-58.
9. Barrow, J. R., Lucero, M. E., Reyes-Vera, I., & Havstad, K. M. (2008). *Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress?* Communicative & Integrative Biology. 1(1): 69-73.
10. Bayman, P., & Otero, J. T. (2006). *Microbial endophytes of orchid roots*. Soil Biology. 9(1): 163-181.
11. Beltrán-Pineda, M. E. (2015). *La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal*. Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 15(1): 101-113.
12. Benjumeda, D. (2017). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones* [Licenciatura. Universidad de Sevilla, España].
13. Bezerra, J. D. P., Nascimento, C. C. F., Barbosa, R. do N., Da Silva, D. C. V., Svedese, V. M., Silva-Nogueira, E. B., & Souza-Motta, C. M. (2015). *Endophytic fungi from medicinal plant Bauhinia forficata: Diversity and biotechnological potential*. Brazilian Journal of Microbiology. 46(1): 49-57.
14. Brighigna, L., Bennici, A., Tani, C., & Tani, G. (2002). *Structural and ultrastructural characterization of Selaginella lepidophylla, a desiccation-tolerant plant, during the rehydration process*. Flora. 197(1): 81–91.

15. Bose, A., Shah, D., & Keharia, H. (2013). *Production of indole-3-acetic-acid (IAA) by the white rot fungus Pleurotus ostreatus under submerged condition of Jatropha seedcake*. Mycology. 4(2): 103-111.
16. Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2006) *Responses to abiotic stresses*. Biochemistry & Molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. USA. pp 1158-1165.
17. Cornejo-Espinoza, F.J. (2014). *Diversidad de hongos endófitos relacionados con lesiones necróticas en fréjol común (Phaseolus vulgaris L.) en la provincia de Loja, Ecuador, 2013*. [Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito].
18. Covarrubias, A. (2007). *Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua*. Biotecnología. 14(1): 253-262.
19. Chutima, R. & Lumyong, S. (2012). *Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi*. Symbiosis 56(1): 35-44.
20. De Souza-Motta, C. M., De Queiroz, M. A., Fernández, M. J., Massa, D. M., Nascimento, J. P., & Laranjeira, D. (2003). *Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (Helianthus annuus L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin*. Brazilian Journal of Microbiology. 34(1): 1-9.
21. Furtado, B.U., Szymańska, S. & Hryniewicz, K. (2019). *A window into fungal endophytism in Salicornia europaea: deciphering fungal characteristics as plant growth promoting agents*. Plant Soil. 445(1): 577-594.
22. Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2007). *Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with Pseudomonas putida or Trichoderma atroviride: Possible role of indole acetic acid (IAA)*. Soil Biology and Biochemistry, 39(8), 1968–1977.
23. González F., H., & Fuentes M., N. (2017). *Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal*. Revista de Ciencias Agrícolas. 34(1): 17-31.
24. Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L. et al. (2010). *Growth promotion of cucumber by pure cultures of gibberellin-producing Phoma sp. GAH7*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 26(1): 889–894.
25. Hamzah, T. N. T., Lee, S. Y., Hidayat, A., Terhem, R., Faridah-Hanum, I., & Mohamed, R. (2018). *Diversity and characterization of endophytic fungi isolated from the tropical mangrove species, Rhizophora mucronata, and identification of potential antagonists against the soil-borne fungus, Fusarium solani*. Frontiers in Microbiology. 9(1): 1-17.
26. Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., & Sessitsch, A. (2015). *The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 79(3): 293-320.
27. Hassan, S. E. D. (2017). *Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of Teucrium polium L.* Journal of Advanced Research. 8(6): 687-695.



28. Hernández-Leal, T. I., Carrión, G., & Heredia, G. (2011). *Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*. 45(8): 881-892.
29. Hernández-Melchor, Dulce Jazmín, Ferrera-Cerrato, Ronald, & Alarcón, Alejandro. (2019). *Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial*. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*. 35(1), 98-112.
30. Hipol, R. (2019). *The soil fungi producing siderophores of Mt. Yangbew, Tawang, La Trinidad, Benguet*. *Studies in Fungi*. 4(1): 1-13.
31. Hu Q. P., & Xu J. G. (2011). *A simple double-layered chrome azurol S agar (SDCASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent Bacillus*. *African Journal of Microbiology Research*. 5(25): 4321-4327.
32. Iturriaga, G., Suárez-Rodríguez, R., & Nova-Franco, B. (2009). *Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling*. *International Journal of Molecular Sciences*. 10(9), 3793-3810.
33. Iwen, P. C., Hinrichs, S. H., & Rupp, M. E. (2002). *Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens*. *Medical Mycology*. 40(1): 87-109.
34. Feng, C., & Ma, Y. (2010). *Isolation and Anti-phytopathogenic Activity of Secondary Metabolites from Alternaria sp. FL25, an Endophytic Fungus in Ficus carica*. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*. 16(1): 76-78.
35. Jia, M., Chen, L., Xin, H. L., Zheng, C. J., Rahman, K., Han, T., & Qin, L. P. (2016). *A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review*. *Frontiers in Microbiology*. 7(1): 906.
36. Khan, S.A., Hamayun, M., Kim, H. *et al.* (2009). *A new strain of Arthrinium phaeospermum isolated from Carex kobomugi Ohwi is capable of gibberellin production*. *Biotechnology Letters*. 31(1): 283–287.
37. Khan, A.L., Gilani, S.A., Waqas, M. *et al.* (2017). *Endophytes from medicinal plants and their potential for producing indole acetic acid, improving seed germination and mitigating oxidative stress*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*. 18(2): 125–137.
38. Khiralla, A., Spina, R., Saliba, S., & Laurain-Mattar, D. (2018). *Diversity of natural products of the genera Curvularia and Bipolaris*. *Fungal Biology Reviews*. 33 (2): 101-122.
39. Lilley, J. H., & Chinabut, S. (2000). *DNA-based studies on Aphanomyces invadans, the fungal pathogen of epizootic ulcerative syndrome (EUS)*. *FAO Fisheries Technical Paper*. 395(1): 83-87
40. Lizarazo-Medina, P. X., Mendoza-Salazar, M. M., & Gutiérrez- Gallo, A. I. (2014). *Diversidad de la microbiota endófito de Cattleya percivaliana y Cattleya trianaei cultivadas en invernadero*. *Actualidades Biológicas*. 37(102): 307-318.
41. Martin, K. J., & Rygiewicz, P. T. (2005). *Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts*. *BMC Microbiology*. 5(28): 1-11.

42. Mesquita-Braga, R., Padilla, G., & Araújo, W. L. (2018). *The biotechnological potential of Epicoccum spp.: diversity of secondary metabolites*. Critical Reviews in Microbiology. 44(6): 759-778.
43. Mier, T., Rivera-Becerril, F., Ayala-Zermeño, M. A., Toriello, C., Ogarrio, S. A., & Ulloa, M. (2013). *Métodos experimentales para el estudio de los hongos microscópicos*. Ciudad de México, México: UNAM.
44. Milagres, A.M., Machuca, A., & Napoleao, D., (1999). *Detection of siderophores production from several fungi and bacteria by a modification of chromeazuroil S (CAS) agar plate assay*. Journal of Microbiology Methods. 37(1): 1-6.
45. Musetti, R., Polizzotto, R., Vecchione, A., Borselli, S., Zulini, L., D'Ambrosio, M., di Toppi, L. S., & Pertot, I. (2007). *Antifungal activity of diketopiperazines extracted from Alternaria alternata against Plasmopara viticola: an ultrastructural study*. Micron. 38(6), 643–650.
46. Naznin, H. A., Kimura, M., Miyazawa, M., & Hyakumachi, M. (2013). *Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungus Phoma sp. GS8-3 for growth promotion effects on tobacco*. Microbes Environ. 28(1): 42-49.
47. Pampurova, S., & Van Dijck, P. (2014). *The desiccation tolerant secrets of Selaginella lepidophylla: What we have learned so far?* Plant Physiology and Biochemistry. 80(1): 285-290.
48. Pampurova, S., Verschooten, K., Avonce, N., & Van Dijck, P. (2014). *Functional screening of a cDNA library from the desiccation-tolerant plant Selaginella lepidophylla in yeast mutants identifies trehalose biosynthesis genes of plant and microbial origin*. Journal of Plant Research. 127(6):803-13.
49. Paris, M. (2016). *Diversidad y distribución de hongos endófitos en endemismos canarios* [Licenciatura. Universidad de la Laguna, España].
50. Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). *O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection*. Journal of Microbiological Methods. 70(1): 127-131.
51. Pérez, A., Rojas, S., Vale, S., & Helson, M. (2009). *Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas*. Revista Colombiana de Ciencias. 1(2): 286-301.
52. Rafsanjani, A., Brulé, V., Western, T. L., & Pasini, D. (2015). *Hydro-responsive curling of the resurrection plant Selaginella lepidophylla*. Scientific Reports. 5(8064): 1-6.
53. Redman, R., Sheehan, K., Stout, R., Rodriguez, R., & Henson, J. (2002). *Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis*. Science. 298(1): 1581.
54. Renshaw, J. C., Robson, G. D., Trinci, A. P. J., Wiebe, M. G., Livens, F. R., Collison, D., & Taylor, R. J. (2002). *Fungal siderophores: Structures, functions and applications*. Mycological Research. 106(10): 1123-1142.
55. Restrepo-Correa, S. P. (2017). *Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: una revisión sistemática*. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 18(2): 335-351.

56. Rodríguez-Serrano, C. (2019). *Análisis de la promoción de crecimiento vegetal de Fusarium spp. aislados de la rizósfera de Zea mays L.* [Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México].
57. Saad, M. M. G., & Badry, H. H. (2020). *Phytohormones Producing Fungal Endophytes Enhance Nutritional Status and Suppress Pathogenic Fungal Infection in Tomato.* Journal of Agricultural Science & Technology. 22(5): 1383-1395.
58. Samaniego-Gámez, B. Y., Reyes-Ramírez, A., Moreno-Valenzuela, O. A., & Tun-Suárez, J. M. (2017). *Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria Bacillus spp.* Revista de Protección Vegetal. 32(1): 10-22.
59. Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, M. Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, C. M., & Macías-Rubalcava, M. L. (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.
60. Santos, I. P., Silva, L. C. N., Silva, M. V., Araújo, J. M., Cavalcanti, M. S., & Lima, V. L. M. (2015) *Antibacterial activity of endophytic fungi from leaves of Indigofera suffruticosa Miller (Fabaceae).* Frontiers in Microbiology. 6:350.
61. Sharma, R., Prakash, O., Sonawane, M., Nimonkar, Y., Golellu, P., & Sharma, R. (2016). *Diversity and Distribution of Phenol Oxidase Producing Fungi from Soda Lake and Description of Curvularia lonarensis sp. nov.* Frontiers in Microbiology. 7:1847.
62. Schwyn, B., & Neilands, J.B. (1987). *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores.* Analytical Biochemistry. 160(1): 47–56.
63. Séne, S., Avril, R., Chaintreuil, C., Geoffroy, A., Ndiaye, C., Dieddhiou, A.G., & Sadio, O. (2015) *Ectomycorrhizal fungal communities of Coccoloba bauvifera L. mature trees and seedlings in the neotropical coastal forests of Guadeloupe.* Lesser Antilles. 1(25): 547–559.
64. Shi, Y., Zhang, X., & Lou, K. (2013). *Isolation, Characterization, and Insecticidal Activity of an Endophyte of Drunken Horse Grass, Achnatherum inebrians.* Journal of Insect Science. 13(1): 1-12.
65. Siverio, F., & López, M. (1994). *Producción de sideróforos y de proteínas de la membrana externa en medios deficientes en hierro* [Ebook. pp. 107-117].
66. Soriano, A. (1980). *Ecofisiología del estrés en las plantas.* Revista de la Facultad de Agronomía. 1(1):1-12.
67. Strobel, G. A. (2003). *Endophytes as sources of bioactive products.* Microbes and Infection 5(1): 535–544.
68. Suárez-Rodríguez, R., Raya Pérez, J.C., & Iturriaga De La Fuente, G. (2015). *La trehalosa: un azúcar osmoprotector con capacidad de señalización.* Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 3(1): 1-13.
69. Sultana, F., Hossain, M., Kubota, M., & Hyakumachi, M. (2009). *Induction of systemic resistance in Arabidopsis thaliana in response to a culture filtrate from a plant growth-promoting fungus, Phoma sp. GS8-3.* Plant Biology. 11(1): 97-104.

70. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Liew, E. C. Y., Laurence, M. H., Bullock, S., Petrovic, T., Bentley, A. R., Howard, C. G., Peterson, S. A., Walsh, J. L., & Burgess, L. W. (2011) *Fusarium species associated with plants in Australia*. *Fungal Diversity*. 46(1): 1-27.
71. Syamsia, Kuswinanti, T., Syam'un, E., & Masniawati, A. (2015). *The Potency of Endophytic Fungal Isolates Collected from Local Aromatic Rice as Indole Acetic Acid (IAA) Producer*. *Procedia Food Science*. 3(1): 96-103.
72. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., & Kumar, S. (2013). *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725–2729.
73. Taylor, T. N., Krings, M., & Taylor, E. L. (2015). *Fungal diversity in the fossil record*. *The Mycota VII Part B, Systematics and Evolution*. 2(10): 259-278.
74. Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Botina, S. G., & Netrusov, A. I. (2007). *Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin*. *Microbiology Research*. 162(1): 69-76.
75. Tejera-Hernández, B., Heydrich-Pérez, M., & Rojas-Badía, M. M. (2013). *Aislamiento de Bacillus solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz*. *Agronomía Mesoamericana*. 24(2), 357-364.
76. Turbat, A., Rakk, D., Vigneshwari, A., Kocsubé, S., Thu, H., Szepesi, A., Bakacsy, L., Škrbić, B. D., Jigjiddorj, E., Vágvölgyi, C., & Szekeres, A. (2020). *Characterization of the plant growth-promoting activities of endophytic fungi isolated from Sophora flavescens*. *Microorganisms*. 8(1): 2-15.
77. VanBuren, R. (2017). *Desiccation tolerance: Seedy origins of resurrection*. *Nature Plants*. 3(1) : 1-2.
78. Vanburen, R., Wai, C. M., Ou, S., Pardo, J., Bryant, D., Jiang, N., Michael, T. P. (2018). *Extreme haplotype variation in the desiccation-tolerant clubmoss Selaginella lepidophylla*. *Nature Communications*. 9(13): 1-8.
79. Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). *The importance of the microbiome of the plant holobiont*. *New Phytologist*. 206(4): 1196-1206.
80. Vargas, M., Rocha, M., Iturriaga, P., Jiménez, S., & Bertozzi, G. (2009). *Estudio del estrés abiótico de la planta de "resurrección" Selaginella lepidophylla* [Ebook. Colegio Marymount].
81. Vázquez-Ramírez, M. A., Meléndez-Camargo, M. E., & Arreguín Sánchez, M. L. (2005). *Estudio etnobotánico de Selaginella lepidophylla (Hook. et Grev.) Spring (Selaginellaceae-Pteridophyta) en San José Xicohténcatl Municipio de Huamantla, Tlaxcala, México*. *Polibotánica*. 19(1): 105-115.
82. Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). *Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias*. *Cultivos Tropicales*, 1(37), 33-39.
83. Walmagh, M., Zhao, R., & Desmet, T. (2015). *Trehalose analogues: Latest insights in properties and biocatalytic production*. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(6), 13729-13745.
84. Wang, L., Xu, B., Wang, J. et al. (2012). *Bioactive metabolites from Phoma species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant Arisaema erubescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(1): 1231–1239.

85. Wang, M., Liu, F., Crous, P. W., & Cai, L. (2017). *Phylogenetic reassessment of Nigrospora: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens*. *Persoonia*. 39(1): 118-142.
86. Wang, Y., Yang, M. H., Wang, X. B., Li, T. X., & Kong, L. Y. (2014). *Bioactive metabolites from the endophytic fungus Alternaria alternata*. *Fitoterapia*. 99(1): 153-158.
87. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., Innis, M., Gelfand, D., & Sninsky, J. (1990). *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. pp. 315-322.
88. Yobi, A., Wone, B. W. M., Xu, W., Alexander, D. C., Guo, L., Ryals, J. A., Oliver, M. J., & Cushman, J. C. (2012). *Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of Selaginella reveals insights into the resurrection trait*. *The Plant Journal*. 72(6): 983-999.
89. Yobi, A., Wone, B. W. M., Xu, W., Alexander, D. C., Guo, L., Ryals, J. A., Oliver, M. J., & Cushman, J. C. (2013). *Metabolomic profiling in Selaginella lepidophylla at various hydration states provides new insights into the mechanistic basis of desiccation tolerance*. *Molecular Plant*. 6(2): 369-385.
90. Zhang, P., Li, X., Yuan, X. L., Du, Y. M., Wang, B. G., & Zhang, Z. F. (2018). *Antifungal Prenylated Diphenyl Ethers from Arthrinium arundinis, an Endophytic Fungus Isolated from the Leaves of Tobacco (Nicotiana tabacum L.)*. *Molecules*. 23(12): 3179.
91. Zhou, W., White, J. F., Soares, M. A., Torres, M. S., Zhou, Z., & Li, H. (2015). *Diversity of fungi associated with plants growing in geothermal ecosystems and evaluation of their capacities to enhance thermotolerance of host plants*. *Journal of Plant Interactions*. 10(1): 305-314.