



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TÍTULO DE TESIS:

**AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE PLANTAS MEXICANAS
PRODUCTORAS DE METABOLITOS CON VALOR AGREGADO.**

**Tesis para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

SAMUEL DAVID ESPINOSA TORRES

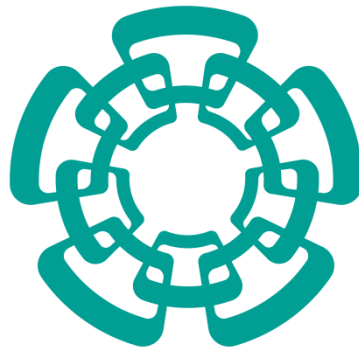
DIRECTOR:

Dr. en C. JAIME GARCÍA MENA

Abril, 2018.

I. AGRADECIMIENTO INSTITUCIONAL

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genómica Ambiental del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Jaime García Mena.



Cinvestav

Este trabajo fue financiado por el Cinvestav-IPN y apoyos CONACyT 163235 INFR-2011-01, FONCICYT 2 BMF-267416 para JGM.

Se agradece el apoyo técnico para la identificación de los hongos endófitos a la M. en C. Gloria López Jiménez y al M. en C. Khemlal Nirmalkar. a la Dra. en C. Rosa María Pineda Mendoza en extracción de DNA, el Dr. en C. Selvasankar Murugesan en análisis bioinformático, el Dr. en C. Jaime García Mena por brindarme su conocimiento, las instalaciones y equipo del laboratorio, al Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia con reactivos y al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con el material del laboratorio.

AGRADECIMIENTO PERSONAL

Agradezco enormemente a mis padres y a mis hermanos por todo su tiempo y apoyo para que lograra esta meta.

Un especial agradecimiento a Claudia Isabel por su apoyo incondicional.

A los compañeros y amigos del laboratorio 0 de Genética Ambiental del Cinvestav-Zacatenco.

I. INDICE.

1. Resumen	8
2. Introducción	10
2.1 Plantas medicinales	10
2.1.1 Los hongos	11
2.1.2 Interacción entre plantas y hongos	11
2.2 Producción de metabolitos secundarios	14
2.2.1 Planta <i>Datura stramonium</i>	16
3. Antecedentes	18
4. Justificación	21
5. Hipótesis	21
6. Objetivos	21
7. Material y Metodología	22
7.1 Colecta de la planta	23
7.2 Tratamiento para eliminar impurezas y microorganismos externos	23
7.3 Cultivos de las partes de la planta para primer aislamiento de hongos	24
7.4 Identificación de las colonias aisladas	25
7.5 Identificación por análisis filogenético molecular	25
7.5.1 Procedimiento de extracción de DNA genómico por fenol/cloroformo	26
7.5.2 Electroforesis en gel de agarosa para verificar la obtención de DNA genómico	27
7.5.3 Amplificación por PCR	27
7.5.4 Protocolo para secuenciación del producto de PCR	29
8. Resultados	31
9. Discusión	53
10. Conclusión	55
11. Referencias bibliográficas	56
12. Apéndice	60

II. INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Describen la relación entre hongo endófito, patógeno y la planta, refiriéndose al costo-beneficio	13
Figura 2 Interacción entre planta y hongo endófito.	14
Figura 3 Se muestra un ejemplar tomado por CONABIO de <i>Datura stramonium</i>	16
Figura 4 Se muestra un ejemplar de la planta <i>Datura stramonium</i>	22
Figura 5 Regiones ITS que se amplificaran por PCR Visualización del DNA genómico de los hongos en geles de agarosa	27
Figura 6 Hongo endófito 1 (ST1DI)	30
Figura 7 Hongo endófito 2 (ST2DI)	31
Figura 8 Hongo endófito 3 (ST3DI)	31
Figura 9 Hongo endófito 4 (ST4DI)	32
Figura 10 Hongo endófito 5 (ST5DI)	32
Figura 11 Hongo endófito 6 (ST6DI)	33
Figura 12 Hongo endófito 7 (ST7DI)	33
Figura 13 Hongo endófito 8 (ST8DI)	34
Figura 14 Hongo endófito 9 (ST9DI)	34
Figura 15 Hongo endófito 10 (ST10DI)	35
Figura 16 Hongo endófito 11 (SH1DI)	35
Figura 17 Hongo endófito 12 (SH2DI)	36
Figura 18 Hongo endófito 13 (SH3DI)	37
Figura 19 Hongo endófito 14 (SH4DI)	37
Figura 20 Hongo endófito 15 (SH5DI)	38
Figura 21 Hongo endófito 16 (SH6DI)	39
Figura 22 Hongo endófito 17 (SH6.1DI)	39
Figura 23 Hongo endófito 18 (SH7DI)	40
Figura 24 Hongo endófito 19 (SH8DI)	41
Figura 25 Hongo endófito 20 (SH9DI)	41
Figura 26 Hongo endófito 21 (SH10DI)	42
Figura 27 Hongo endófito 22 (SRDI)	43
Figura 28 Hongo endófito 23 (ST1DI2)	44
Figura 29 Hongo endófito 24 (SH1DI2)	45
Figura 30 Hongo endófito 25 (SH3DI2)	45
Figura 31 Hongo endófito 26 (SH6DI2)	46
Figura 32 Hongo endófito 27 (SR1DI2)	46
Figura 33 Hongo endófito 28 (SR2DI2)	47
Figura 34 Visualización del DNA genómico de los hongos endófitos en geles de agarosa	48

Figura 35 Visualización de la amplificación de las regiones ITS 49

III. INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Protocolo de las reacciones para la amplificación de ITS por PCR	26
Tabla 2 Condiciones para amplificación de las regiones ITS	27
Tabla 3 Protocolo de las reacciones para la secuenciación	28
Tabla 4 Condiciones para la secuenciación	28
Tabla 5 Caracterización de los hongos por técnica de microcultivo y caracterización Genética	49
Tabla 6 Género de los hongos con base a la secuencia ITS	51
Tabla 7 Cuantificación de la concentración y pureza de DNA genómico de los hongos endófitos de <i>Datura stramonium</i> .	60

IV. Abreviaturas

ITS: región espaciadora interna transcrita

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

DNA: Acido Desoxirribonucleico

SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

ng: nanogramo

µL: microlitro

m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar

r.p.m: revoluciones por minuto

1. RESUMEN

Las plantas tienen una gran importancia, ya que juegan un rol fundamental en la interacción con los seres vivos, uno de esos seres vivos es el ser humano, el cual, es éste el que realmente depende de esa interacción. Las plantas se usan con diversos fines, desde el ámbito alimenticio hasta en la medicina y en la biotecnología. Pero su uso irracional ha incrementado la extinción de un gran número de especies y la pérdida de sus beneficios, por esa causa es indispensable buscar nuevas alternativas en las que se obtengan los metabolitos secundarios bioactivos, sin hacer un alto consumo del producto primario (planta). Una de esas alternativas es el aislamiento de microorganismos endófitos que en varias investigaciones se han encontrado que son los productores de algunos metabolitos y no las plantas. El espécimen del cual se hizo el aislamiento de los hongos endófitos fue la planta *Datura stramonium* conocida como “toloache” que tiene una importante función, ya que produce metabolitos con carácter farmacéutico. Inicialmente se obtuvo la planta de un medio silvestre y con las mejores condiciones, de ella se escogieron las hojas, raíz, tallo, flor y fruto, que no tuvieran algún daño mecánico o estuvieran atacadas por patógenos, se les aplicó un tratamiento superficial para remover polvo y matar microorganismos epifitos, ese tratamiento fue (jabón con agua destilada, benzol al 10%, etanol al 70%, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrogeno al 3%, etanol absoluto y 15 minutos de radiación UV a 0.120 joules esto es a una longitud de onda de 254 nm), después del tratamiento se cortó con una navaja de bisturí estéril cada parte de la planta tratada y se fijaron en medio sólido de agar dextrosa sabouraud en placas petri, las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas por un periodo de 4 a 7 días. Se aislaron los hongos endófitos hasta tenerlos puros, se identificaron por medio de dos técnicas: por microcultivo, el cual nos mostró características macroscópicas y microscópicas para buscar su género por claves dicotómicas y la otra fue por técnicas moleculares iniciando con la extracción de DNA genómico (por técnica de fenol/cloroformo), después se amplificaron las regiones ITS1 e ITS2 del rDNA y se hicieron secuenciaciones de los productos de PCR. Los resultados se usaron para hacer una comparación en la base de datos NCBI para identificar cada hongo aislado hasta género o especie. La diferencia entre cada técnica es que con la molecular se logró identificar 27 hongos de

los 28 aislados, algunos hasta especie y por la técnica de microcultivo solo se identificaron 14 de las 28 cepas, solo hasta nivel de género. Por lo tanto esta investigación permitió saber que la técnica de microcultivo es menos efectiva que la identificación por técnicas moleculares, esto se debió a que varios de los hongos aislados no generaron cuerpo fructífero o esporas con las condiciones dadas en el laboratorio para poderse identificar por claves.

2. INTRODUCCIÓN.

México es considerado un país “megadiverso” ya que pertenece a las naciones que contienen la mayor cantidad y diversidad en plantas y animales con el 70% de la diversidad mundial de especies. En este grupo México ocupa el quinto lugar con cerca de 23500 especies de plantas vasculares descritas (Llorente y Ocegueda, 2008), de las cuales entre 10,000 a 13,000 son endémicas. Del total de especies de plantas en México, aproximadamente 4,000 especies con flores (el 17%) tienen atributos medicinales, sin embargo, se estima que solo el 5% de estas se han validado química, farmacológica y biomédicamente que contengan los principios activos para las que son usadas (Ocegueda *et al.*, 2005). El conocimiento y uso de las plantas con fines curativos es referido desde hace tiempo como fitoterapia, tratamiento con plantas medicinales o medicina tradicional. Esta práctica se ha venido ejerciendo en todas las civilizaciones, de tal forma que, es un conocimiento transmitido de generación en generación y para evitar la pérdida de esta valiosa información, especialistas se han encargado de llevar un registro completo y la forma de uso de una gran variedad de especies de plantas, con la finalidad de tener una base de datos sobre sus propiedades curativas (Giusiano, G., 2010).

2.1 Plantas medicinales.

Aproximadamente el 40% de los productos farmacéuticos que se consumen en los países desarrollados proceden de fuentes naturales, como por ejemplo; de **hongos** y de **plantas** especialmente de las que tienen carácter medicinal. Una planta medicinal se define como aquella que contiene principios activos o terapéuticos para curar ciertas afecciones en los humanos, estos agentes o principios activos se producen mediante vías metabólicas adicionales al metabolismo primario, conocido como metabolismo secundario por lo que dichos compuestos son llamados metabolitos secundarios (Salgado, R. *et al.*, 2012). Los metabolitos secundarios, juegan un papel muy importante para la planta, pues sirven como defensa contra bacterias, hongos, amebas, plantas, insectos y animales superiores, también como agentes en la simbiosis entre

microorganismo y plantas, nematodos e insectos y como efectores de diferenciación en la planta.

2.1.1 Los hongos.

Son organismos que se reproducen por esporas (ya sea sexual o asexualmente), carecen de clorofila, formados por estructuras somáticas, filamentosas y ramificadas, rodeadas por una pared celular hecha de celulosa, de quitina o ambas, son heterótrofos y su alimentación es por absorción, sus células son de forma tubular a las cuales se les llama hifas. Los hongos tienen una enorme importancia dentro de la naturaleza, pues es gracias a ellos que la materia orgánica muerta pase por un proceso de descomposición para que después se mezcle con el suelo, además es uno de los organismos que forma relaciones simbióticas altamente eficientes con animales y plantas en donde ambos salen beneficiados. Otros beneficios que aportan es que sirven como alimento y son utilizados en la farmacología y en la biotecnología. Pero no todo es benéfico sino también se comportan como patógenos tanto de plantas y animales causando enormes problemas de salud y pérdidas de recursos agronómicos y económicos (Ruiz J. 2001).

2.1.2 Interacción entre plantas y hongos endófitos.

Los hongos y bacterias han logrado adaptarse en todas las condiciones ambientales que hay en el planeta, como en suelos desérticos, suelos geotérmicos, océanos, en el ártico y en los demás ambientes (Chowdhary K. *et al.*, 2012). En esta investigación solo se tomó en cuenta a los hongos que en este caso se encuentran habitando dentro de las plantas, tales hongos son llamados endófitos, con los que ha desarrollado una estrecha relación como antagonismo, mutualismo o comensalismo (Benavente C., 2008).

Aproximadamente el 80% de las plantas terrestres están asociados a hongos en donde las plantas brindan resguardo y carbono a los hongos y los hongos les ayudan a obtener elementos como nitrógeno y fosforo. Se cree que esta asociación que se

generó hace unos 470 millones de años aproximadamente permitió a las plantas la colonización de la tierra, aunque no se sabe cómo fue (Dance A. 2017).

El término endófito fue usado inicialmente por el botánico, microbiólogo, algólogo y micólogo alemán Heinrich Anton de Bary en 1866 (de Bary A., 1866). Actualmente se define a un hongo endófito como aquel que habita (intercelular o intracelularmente) entre los tejidos de la planta tanto en hoja, tallo, fruto, raíces y semillas, sin causarle algún daño aparente (Wilson D. 1995, Strobel G. *et al.*, 2004).

Los hongos endófitos son un grupo altamente diverso y polifilético que se encuentran posiblemente en cada una de las 300,000 especies de plantas terrestres y cada planta con uno o más especies de hongos endófitos (Faeth and Fagan, 2002). Sin embargo, se estima que solo el 5% de los hongos en todo el mundo han sido descritos, por lo que se sugiere que hay un número amplio de nuevos hongos endófitos por descubrir (Malhadas C. *et al.*, 2017). Los hongos endófitos tienen una enorme importancia en la relación que forman con sus plantas hospederas ya que producen una serie de productos bioactivos con funciones que inducen en la planta su crecimiento por medio de hormonas, incrementan la resistencia a estrés biótico y abiótico ya que producen compuestos de tipo alcaloides, diterpenos, flavonoides, compuestos alifáticos, policétidos y péptidos y la acumulación de metabolitos secundarios (Jia *et al.*, 2016; Jouda *et al.*, 2016). Pero el humano ha encontrado en los metabolitos secundarios un recurso potencialmente benéfico en aplicaciones como la farmacéutica, en la agrícola y en la biotecnología (Strobel G. *et al.*, 2004).

Los hongos endófitos se clasifican en clavicipitáceos y no clavicipitáceos los cuales a su vez se dividen en tres clases, los clavicipitáceos son endófitos que colonizan los pastos, mientras que los no clavicipitáceos colonizan las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas. Los endófitos se pueden transferir a su planta hospedera por dos vías; 1) vía horizontal en donde el hongo se desplaza de la parte externa a la parte interna de la planta y 2) vía vertical donde el hongo se moviliza por esporas a través de las células de la planta hasta la semilla en donde permanece latente hasta que tenga las condiciones óptimas para su desarrollo (Rodríguez R. *et al.*, 2009).

La forma en como un hongo deja de ser un organismo patógeno para convertirse en un relación simbiótica con su hospedero aún no se entiende por completo, se sabe que se

debe a cientos de años de constante evolución, sin embargo (Xu X., *et al.*, 2016) describen en unas de sus investigaciones que los hongos infectan a su hospedero y para no ser detectado como patógeno por la planta, secretan proteínas llamadas “efectoras” para manipular la inmunidad y la fisiología de la planta, de esa forma pasa desapercibido e induce la muerte celular de la planta. Un ejemplo de esas proteínas efectoras es la *LysM*, las cuales no tiene dominio de proteína de reconocimiento excepto por un motivo conocido como *LysM*, que puede interferir con la inmunidad de la planta, inducida por quitina y así promover la infección, además, los hongos pueden secretar enzimas que degradan los carbohidratos de la planta y así alimentarse de ella. Cuando los hongos son endófitos forman contactos intercelulares con las células de la planta generando una asociación mutualista, esto implica que los endófitos también hacen manipulación de las defensas y el metabolismo del hospedero. La comunicación entre ellos se logra gracias a la producción y secreción de proteínas y enzimas que se envían a las células de la planta.

Kusari S., Hertweck C., y Spiteller M. (2012). Describen la relación entre hongo endófito, patógeno y la planta, refiriéndose al costo-beneficio (Figura 1).

A1. Se muestra la hipótesis sobre al análisis antagónico entre el hongo endófito y la planta, desde que el hongo endófito evita la activación de las defensas del hospedero, se vuelve resistente a los metabolitos tóxicos y se desarrolla dentro de su hospedero sin causarle algún daño aparente.

B1. Los endófitos y los patógenos poseen factores de virulencia que son contrarrestados por los mecanismos de defensa de la planta, si estas dos acciones están en equilibrio la asociación permanece sin síntomas perjudiciales. Esta fase es tan solo un periodo de transición donde el medio ambiente juega un papel importante para desestabilizar el delicado balance antagónico, ya que si los mecanismos de defensa de la planta contrarrestan por completo los factores de virulencia del hongo, este perece y por el contrario si la planta no logra contrarrestar la virulencia del hongo daría paso a la enfermedad de la planta.

C1. Muchos endófitos pueden ser patógenos que se encuentran en estado latente y pueden estar influenciados por ciertos factores intrínsecos o ambientales para expresar los factores que conducen a la patogenicidad.

D1. Se ha revelado que la interacción endófito-planta no es justamente un equilibrio entre defensa y virulencia, sino es mucho más complejo.

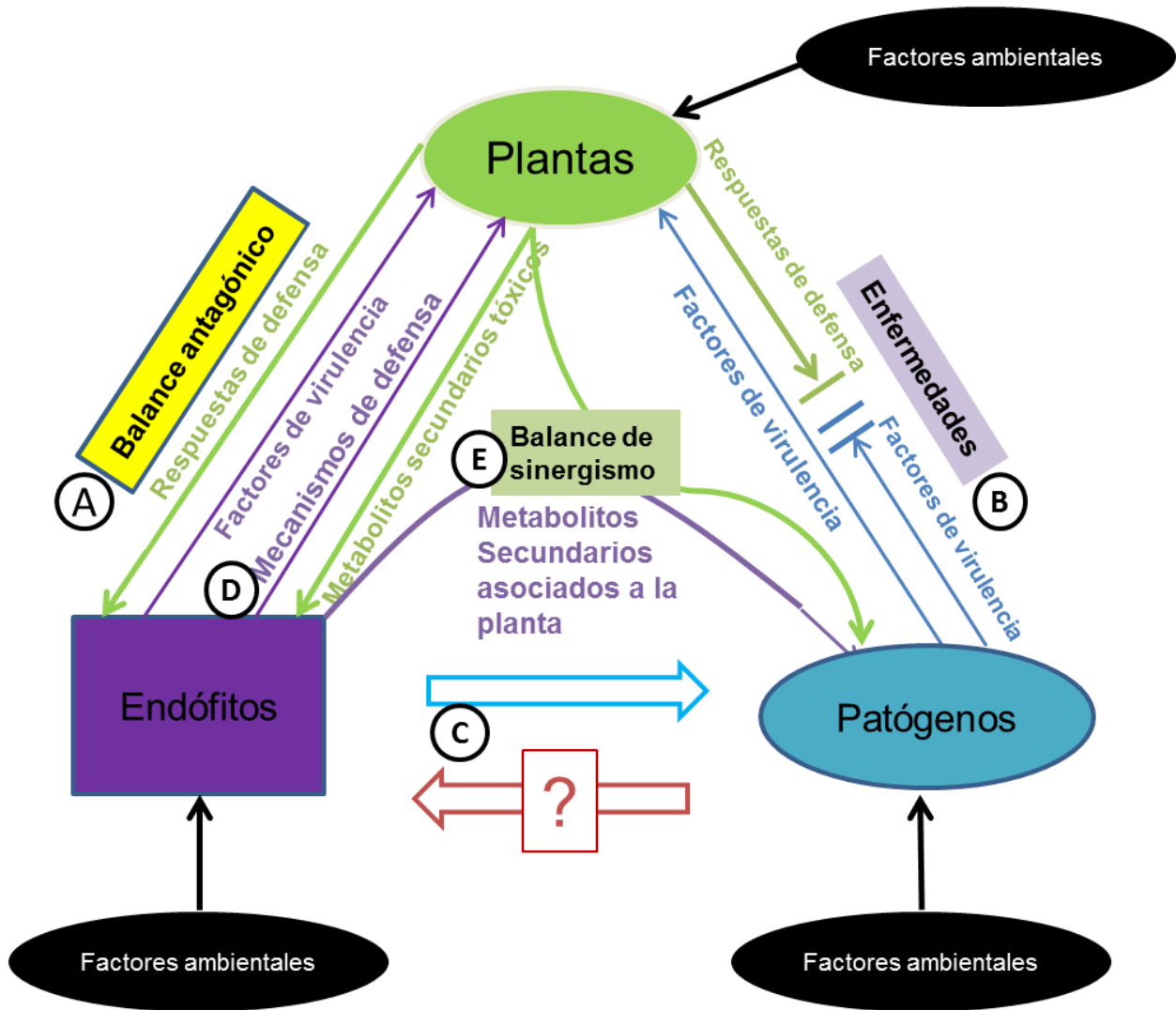


Fig. 1 A) Muestra la hipótesis del balance antagonístico. B) Enfermedad causada por hongo patógeno. C) Reciprocidad entre endófito y patógeno. D) Estrategia de supervivencia del endófito. E) Balance sinérgico. Modificada de Kusari, Hertweck y Spiteller, 2012.

2.2 Producción de metabolitos secundarios.

Sabiendo que los hongos endófitos confieren a su hospedero un mejor crecimiento, una mayor adecuación a su ambiente, aumenta la tolerancia del hospedero al estrés biótico y abiótico y que promueven la acumulación de metabolitos secundarios. La visión acerca de la importancia de la obtención de estos metabolitos secundarios se declina a

la diversidad y el aumento en su producción que se va a ver afectado por diversos factores; como las condiciones ambientales en donde crece la planta hospedera, el microambiente que genera la planta, la interacción entre el complejo de microorganismos que conforman al hospedero y los factores abióticos. El endófito y la planta hospedera pueden interactuar en varios niveles a) el endófito puede inducir en el metabolismo de la planta, b) la planta hospedera puede influir sobre el metabolismo del endófito, c) tanto endófito y el hospedero comparten una vía específica en donde ambos contribuyen parcialmente, d) el hospedero puede metabolizar productos del endófito y viceversa e) el endófito puede metabolizar compuestos secundarios del hospedero

Figura.2 (Ludwig-Müller, 2015).

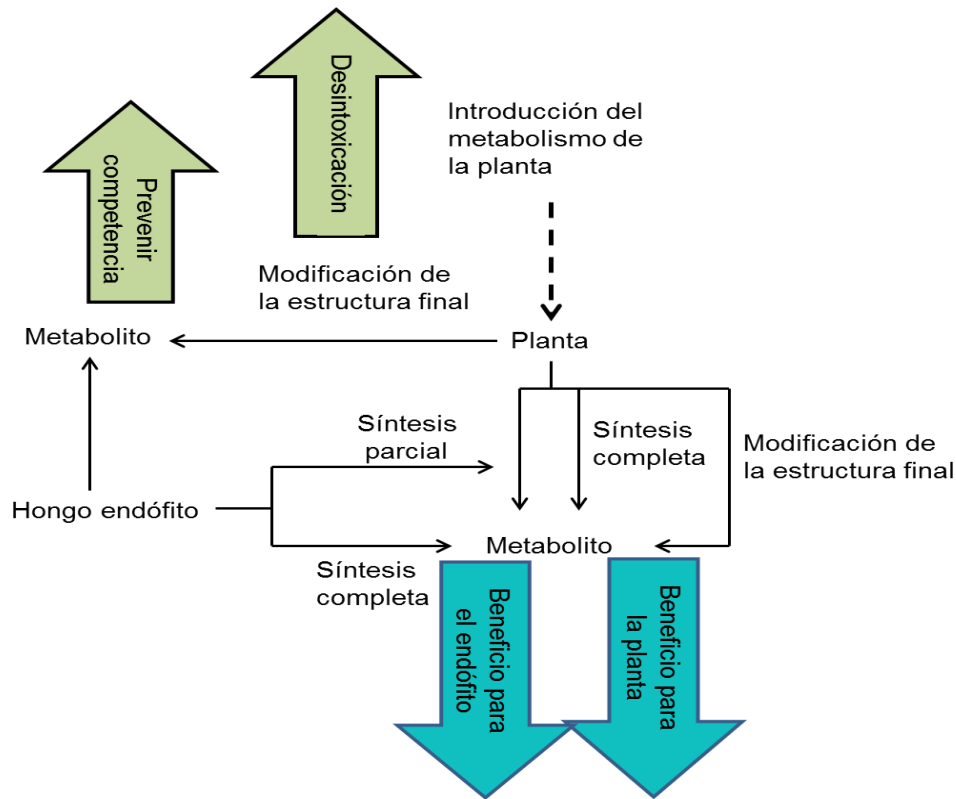


Fig. 2 El esquema muestra resumidamente la interacción y papales entre la planta hospedera y el endófito en la producción de metabolito y la contribución de los organismos respectivos a las otras vías metabólicas. La inducción del metabolismo de las plantas puede ser causada por señales ambientales tales como factores de estrés abiótico o patógenos / herbívoros, sino también por los propios endófitos. Las señales ambientales pueden inducir la síntesis de metabolitos secundarios en etapas definidas, por ejemplo los colores de las hojas o floración donde los pigmentos y los metabolitos volátiles son sintetizados. Modificado de Ludwig-Müller, 2015.

Se ha hablado de la producción de los metabolitos secundarios para el beneficio de la planta y el endófito, pero hay un campo que es por lo menos, para las personas es más importante ya que se puede obtener un enorme abanico de compuestos con actividades antimicrobiales, antiparasitarias, citotóxicas, anti-inflamatorias, antitumorales, antioxidante y neuroprotectoras que son para el bienestar de las personas (Gutiérrez *et al.*, 2012). Se tiene conocimiento de que los hongos endófitos producen metabolitos secundarios similares o incluso más activos que los que produce su propio hospedero (Yan *et al.*, 2014).

2.2.1 Planta *Datura stramonium*.

Datura stramonium pertenece al Reino; Plantae, al subreino; Traqueobionta (plantas vasculares), Superdivisión; Spermatophyta (plantas con semillas), División; Magnoliophyta (plantas con flor), Clase; Magnoliopsida (dicotiledóneas), Orden; Solanaceae.

Se ha registrado en gran parte del país, desde Baja California Sur hasta Chiapas, se encuentra tanto en regiones templadas y tropicales. Su forma de vida es hierba robusta, que puede llegar a medir desde los 30.0 cm hasta 1.0 m de altura, su tallo es glabrescente (con pelos), las hojas son con láminas ovadas de 2.5 a 20.0 cm de largo por 1.0 a 18.0 cm de ancho, sin pelos, de color verde oscuro en el haz con color un poco más claro en el envés y peciolo de 1.0 a 6.0 cm de largo. Las flores tienen pedúnculos que van de 5.0 a 10.0 mm de largo, cáliz tubular que va de 1.5 a 5.0 cm de largo por 0.5 a 1.0 cm de diámetro con dientecillos de alrededor de 5.0 mm de largo por 1.0 a 3.0 mm de ancho, corola blanca o violeta de 6.0 a 10.0 cm de largo, limbo plegado, pentalobado, con los ápices de los lóbulos subulados de 3.0 a 8.0 mm de largo, estambres unidos por debajo de la mitad de la corola, filamentos de 2.0 a 3.5 cm de largo con anteras de 3.0 a 5.0 mm de largo, ovario de placentación parietal, estilo simple, de 4.0 a 5.0 cm de diámetro. Los frutos tienen forma de capsula erecta, ovoide de alrededor de 4.0 cm de largo por 2.5 cm de diámetro, está rodeado de espinas agudas y largas, semillas reniformes, aplanadas de 3.0 a 4.0 mm de largo y negras (Figura 3).

Se encuentra desde el nivel del mar hasta los 2,600 m, en lugares arenosos, se propaga por semillas, es una especie anual o perenne de vida corta, florece en verano y fructifica hasta el principio del invierno. Su uso es medicinal para aliviar males como inflamación de las glándulas, hojas y semillas se utilizan como calmantes y narcóticas, en alta concentraciones causa la muerte. Algunos nombres que se le da comúnmente en México son toloache, tapat, toloatzin entre otros (Martínez, M., 1979).



Fig.3 Planta de *Datura stramonium*. CONABIO-Pedro L. 2001

3. ANTECEDENTES.

Como se mencionó en el apartado anterior, los hongos endófitos producen una importante cantidad de productos bioactivos (entre ellos metabolitos secundarios) que tienen un beneficio para los humanos, uno de ellos y muy importante es el taxol un metabolito secundario que tiene propiedades anticancerígenas, inicialmente este compuesto fue aislado y caracterizado del tallo y hojas de un árbol llamado *Taxus brevifolia*, con un enorme inconveniente, la cantidad del metabolito era mínima y se necesitaba un gran porcentaje de material vegetal. Fue en 1994 donde por primera vez se había aislado de otra especie de árbol *Taxus* spp un microorganismo denominado *Taxomyces andreanae* que podía producir el metabolito secundario “taxol” en muy bajas concentraciones (Stierle *et al.*, 1994). Pero fue en los Himalayas a una altura entre los 1500 y 3000 m.s.n.m, donde se aisló a un hongo endófito *Pestalotiopsis microspora* del árbol *Taxus wallachiana*, este hongo produce taxol en un medio de cultivo y es biológicamente activo contra líneas de células cancerígenas. La identificación del hongo se realizó por medio de una descripción microscópica a través de micrografía electrónica de barrido y cabe mencionar que el hongo produce el metabolito por si solo (Strobel, G. *et al.*, 1996).

Otro estudio realizado por (Qadri, M. *et al.*, en el 2013) en donde se aislaron 72 cepas de hongos endófitos de coníferas, en donde a cada hongo aislado se le identifico inicialmente por una tinción usando lactofenol, con el fin de observar sus estructuras microscópicas a través de un microscopio, pero para una mejor identificación de los microorganismos se les realizo pruebas moleculares a través de la amplificación de la región variable ITS1 e ITS2 (ITS: región espaciadora interna transcrita) del gen ribosomal, se secuencio y se hizo un alineamiento con las secuencias del GenBank (base de datos de secuenciación genética de NCBI) por Blast (Herramienta básica de búsqueda de alineación local). Finalmente obtuvieron 70 cepas Ascomycetes y 2 Bacidiomycetes.

En otro estudio realizado por (Fouda A. *et al.*, 2015) donde se aislaron tres endófitos diferentes de una planta medicinal (*Asclepias sinaica*) en Egipto, los endófitos fueron aislados de las hojas e identificados solo guiándose con manuales estándares donde observaron su morfología y características taxonómicas por medio de un microscopio. Los hongos endófitos aislados fueron *Penicillium chrysogenum* Pc_25, *Alternaria alternata* Aa_27 y un hongo sin identificación (hifa estéril) Sh_26. Estos endófitos producen varias enzimas extracelulares incluyendo amilasa, pectinasa, celulasa, gelatinasa, xilanasas y tirosinasa, estos hongos aislados tuvieron un impacto considerable en los parámetros de crecimiento de la planta.

Los estudios genómicos que se realizan en la actualidad han permitido detectar la ausencia o la expresión de los genes de las células en un organismo vivo. A través de esta técnica se logró detectar que en los hongos hay una gran variedad de genes que permiten la producción de metabolitos secundarios y que no se expresan cuando se tratan bajo las condiciones estándares de laboratorio. En un estudio elaborado por (Sun J. *et al.*, 2012) donde se aislaron 14 cepas de hongos endófitos de la planta *Datura stramonium* L. que pertenece a la familia de la *Solanaceae* que produce compuestos importantes como alcaloides, la escopolamina e hiosciamina que es un potente antagonista del receptor de acetil-colina. Para identificar a los hongos endófitos aislados, se inició con la extracción del DNA por medio de isoamilo-fenol-cloroformo, se amplificaron por PCR y por último se amplificó la región variable ITS (región espaciadora interna transcrita) del rDNA (DNA ribosomal) del hongo, usando los iniciadores ITS1 e ITS4. Se les controló el ambiente de crecimiento, el cual consistía en la inhibición de la DNA metiltransferasa por 5 azacitidina y la inhibición de la histona deacetilasa por medio de ácido hidroxámico suberoilánilida. Como resultado se obtuvieron cinco compuestos diferentes nuevos.

La planta *Datura stramonium* tiene compuestos con funciones anticolinérgicas la cual puede ser útil como alternativa en el uso de la atropina para el tratamiento de los síntomas muscarínicos por la toxicidad de los compuestos organofosforados. Se aislaron microorganismos endófitos de *D. stramonium* que en este caso fueron de la clase Actinomycetes (*Streptomyces* sp.) se usó la metodología de Johannes y colaboradores en el 2006, para el aislamiento de endófitos, también se realizó la identificación de los endófitos por medio de su morfología usando características como la coloración del micelio, de la espora y de difusión. Se realizó la identificación filogenética, haciendo extracción de DNA genómico total y amplificando con iniciadores universales del gen 16S rRNA para bacterias por PCR, el producto fue purificado y para la secuenciación se usaron dos fragmentos de 27F y 1492R, por último los resultados se metieron en GenBank para buscar su homología con Blast (Herramienta básica de búsqueda de alineación local). A los hongos endófitos aislados de la planta *Datura stramonium*, se les evaluó el poder inhibitorio de la α -glucosidasa y su acción antioxidante. Estas investigaciones dieron como resultado que su actividad antioxidante podría ser utilizada para prevenir o retardar el proceso de diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo según (Christudas and Kumar, 2013). La identificación de los hongos fueron a través de la región espaciadora interna transcrita por sus siglas en inglés (ITS: internal transcribed spacer).

El análisis filogenético molecular de los hongos se realiza mediante el grupo de genes ribosomales los cuales codifican tres subunidades RNA ribosomal 18S, la 5.8S, la 28S y las regiones variables intermedias ITS (región espaciadora interna transcrita) identificadas como ITS1 e ITS2. Los genomas de los hongos pueden llegar a contener más de 200 copias. Algo muy importante de las secuencias ITS para la investigación filogenética molecular es que muestran variaciones significativas entre hongos estrechamente relacionados, estas variaciones son causadas por inserciones, deleciones y mutaciones puntuales, que se conservan porque las regiones ITS1 e ITS2 codifican moléculas de RNA no funcionales. Los genes que codifican productos funcionales están sujetos a una presión evolutiva más fuerte que tienden a amortiguar la variación (Money, 2016).

4. JUSTIFICACIÓN.

Se ha reportado que las plantas con propiedades medicinales producen metabolitos secundarios, a los cuales se les ha encontrado un alto valor en la farmacología y en la biotecnología. También que las plantas forman una estrecha relación con hongos endófitos, haciendo que la producción de metabolitos secundarios aumenten y sean más diversos. Esto ha provocado que la adquisición de estos metabolitos, se extingan varias especies de plantas medicinales, de hongos endófitos y la pérdida enorme de metabolitos secundarios. Por eso es necesario hacer el aislamiento de los hongos endófitos de la planta *Datura stramonium* colectada en el municipio de Texcoco, estado de México los cuales podrían ser candidatos para producir metabolitos secundarios de gran importancia.

5. HIPOTESIS.

En la planta *Datura stramonium* existen hongos endófitos candidatos para producir metabolitos secundarios bioactivos con valor agregado.

6. OBJETIVOS.

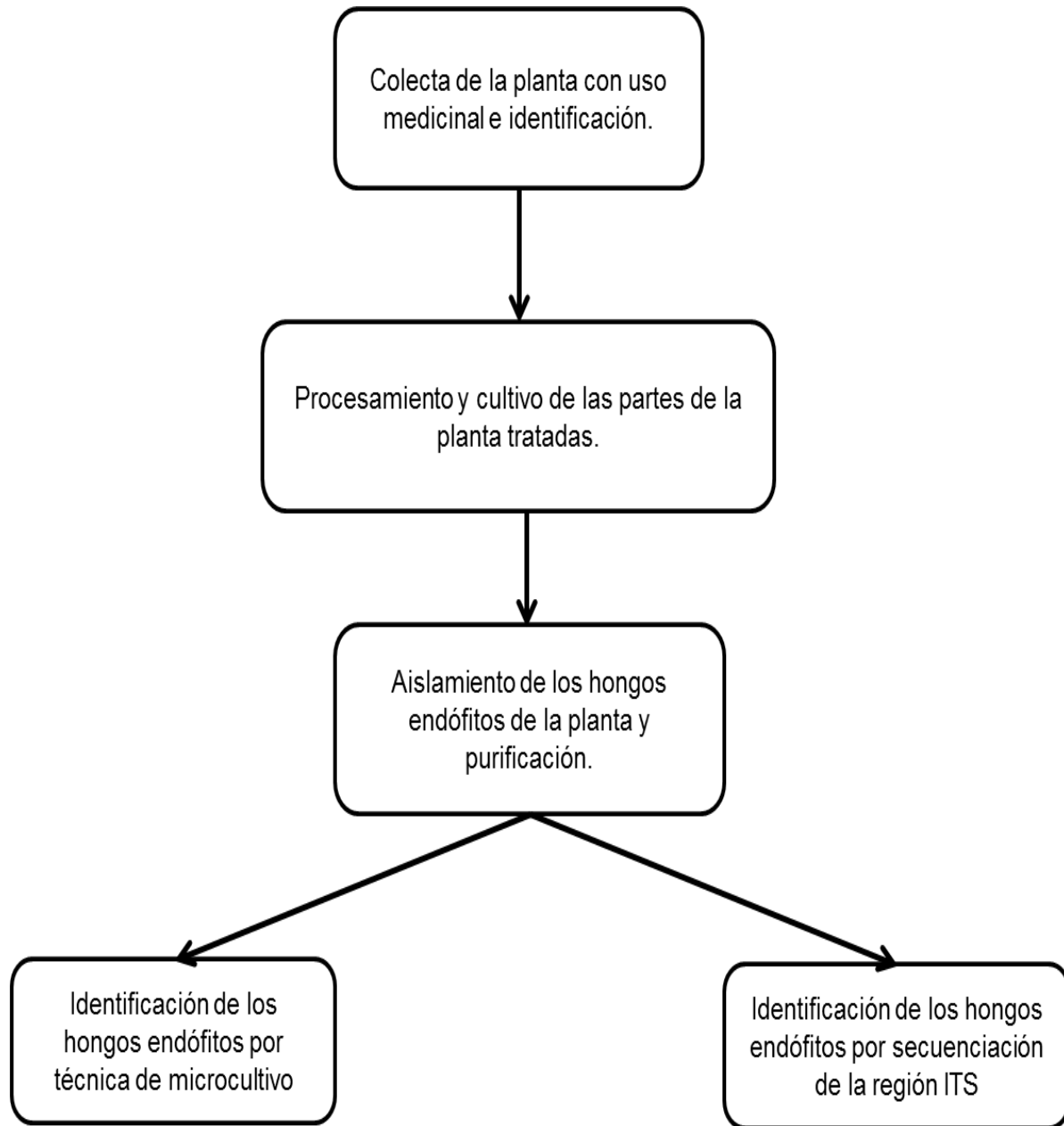
General: aislamiento de los hongos endófitos de la planta *Datura stramonium* que puede ser posibles candidatos para producir metabolitos secundarios.

Particulares:

- 1.- Identificación de los hongos endófitos aislados por técnica de microcultivo y usando claves taxonómicas.
- 2.- Identificación de los hongos endófitos aislados por análisis filogenético molecular.
- 3.- Desarrollo de un método para el aislamiento de los hongos endófitos y su crecimiento.

7. MATERIALES Y METODOLOGÍA.

Plan de trabajo



7.1 Colecta de la planta.

Se seleccionó la planta *Datura stramonium* que es conocida comúnmente como toloache (Fig. 4) de forma dirigida y se extrajo completamente desde la raíz, ya que se utilizaron cinco partes importantes de la planta; como la raíz, tallo, hoja, flor y fruto las cuales fueron elegidas de tal forma que no estuvieran dañadas o enfermas por algún insecto o patógeno. La planta se colecto en Texcoco estado de México, con coordenadas 19°30'39.68"N y 98°53'20.68"W, a 2,252 msnm. La planta se llevó a la Doctora Raquel Galván Villanueva que labora en el herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN para su correcta identificación.



Fig. 4 Se muestra un ejemplar de la planta *Datura stramonium* a) flor, b) hoja y c) fruto

7.2 Tratamiento para eliminar las impurezas y microorganismo externos.

Después de la selección de cada parte de la planta (raíz, tallo, hojas y flores) pasaran por un tratamiento de asepsia para eliminar toda impureza y microorganismos externos. El tratamiento consistió en tomar las partes de la planta seleccionadas utilizando guantes estériles y depositarlos en un recipiente estéril, enseguida se le agrego agua destilada estéril con detergente líquido para lavarlas por tres minutos seguidos, después se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y enseguida se sumergieron en benzal al 10% durante tres minutos, después de ese tiempo se retira el benzal. Sin enjuagar se sumergieron en etanol al 70% por 30 segundos y se retira el etanol, a continuación se adiciono hipoclorito de sodio por tres minutos más, después de ese tiempo se retiró y se adicionó a las muestras peróxido de hidrogeno al 3% por

otros tres minutos. Después se aplicó etanol absoluto con agua destilada 1:1 por solo 10 segundos y al final se les dio tres lavados con agua destilada estéril. Finalmente se irradió las muestras con luz ultravioleta por 15 minutos a 0.120 joules que corresponde a una longitud de onda de 254 nm. Este método se desarrolló en el laboratorio de Genómica Ambiental en el departamento de genética y Biología Molecular (CINVESTAV - Zacatenco).

7.3 Cultivo de las partes de la planta para primer aislamiento de hongos endófitos.

Después del último paso de la eliminación de impurezas todas las partes de la planta se colocaron en un área completamente estéril y fueron cortadas en diferentes dimensiones con una navaja de bisturí y pinzas estériles, cada trozo ya seccionado se colocó dentro de las cajas petri sobre el medio de cultivo (medio SDA: Agar Dextrosa Sabouraud), con la parte expuesta o por donde se realizó el corte, se fijaron y se sellaron las cajas petri con parafilm. Al medio se le aplicó cloranfenicol que es un antibiótico con una concentración de 34.0 mg/ml, los cultivos se incubaron a temperatura de 22°C por 7 días. Durante ese periodo los cultivos se observaron para notar el crecimiento de los microorganismos que se desarrollaron alrededor de las partes de la planta sembrada (cabe mencionar que solo se aislaron los hongos que crecieron donde se realizó el corte). Los hongos resultantes se aislaron en nuevas cajas con medio hasta lograr tener las colonias puras o axénicas. A partir del primer día del aislamiento se observó el crecimiento del hongo llevando un registro de la morfología tomando en cuenta las siguientes características:

- 1.- Diámetro de la cepa, forma, elevación, margen, densidad, textura, superficie, condensación y color de ambos lados de la caja.
- 2.- Superficie: lisa, ondulada, radiada, concéntrica y rugosa.
- 3.- Textura: algodonosa, aterciopelada.
- 4.- Densidad de la luz: qué tanto deja pasar la luz. Por ejemplo, transparente, opaco y traslúcido.
- 5.- Pigmentación: qué colores presenta.
- 6.- Observaciones; por ejemplo, si se genera condensación en la tapa de la caja Petri.

7.4 Identificación de las colonias aisladas por microcultivo.

La forma más sencilla para la identificación de las colonias es por técnica de Microcultivo. La técnica de microcultivo según Riddell Casas (1994) consiste en preparar una cámara húmeda estéril: en una caja Petri, se vierte agua destilada estéril y se colocan dos varillas de vidrio, por debajo de las varillas se pone algodón o papel filtro previamente esterilizados esto se realiza para que no se deseque el medio en donde se siembra el hongo, sobre las varillas se puso un portaobjeto estéril y se coloca un cuadro de 1.0 cm² de medio de cultivo (ADS). Después con un asa micológica estéril se tomó micelio del cultivo y sembramos sobre el cuadro de medio Sabouraud por los vértices y finalmente se colocó un cubreobjetos estéril sobre el cuadro inoculado con el hongo y se incubo por 7 días o el tiempo que tarde en esporular el hongo a una temperatura de 22°C. Una vez terminado el periodo de incubación, se retira el cubreobjetos con unas pinzas estériles y se coloca sobre un portaobjetos nuevo y estéril con una gota de azul de lactofenol, se dejó pasar 5 minutos y después se observó en un microscopio óptico de la marca Leica DM500 a 40X, las estructuras (células, esporas y cuerpos fructíferos) nos sirvieron para su identificación con claves dicotómicas (Barnett, H. and Hunter, B., 1972 y Watanabe, T. 2010).

7.5 Identificación por análisis filogenético molecular.

Otra forma para la identificación de las colonias es por una vía molecular que es uno de los métodos más confiables. Para esto inicialmente se hizo un cultivo de cada hongo en medio Agar dextrosa Sabouraud, se deja crecer por un lapso de seis días, después en un espacio estéril se raspo con una navaja de bisturí también estéril toda la superficie del medio donde creció el hongo hasta extraerlo por completo y se depositó en un mortero igualmente estéril. A continuación se agregó nitrógeno líquido para que con la ayuda del pistilo se rompiera la pared celular de las hifas y se pudiera obtener el DNA de las células, el macerado se colocó cuidadosamente en tubos de polipropileno de 1.5mL. El siguiente paso fue la extracción del DNA genómica de cada hongo endófito.

7.5.1 Procedimiento de extracción de DNA genómico por la técnica de fenol/cloroformo.

Ya que se tenían los tubos de polipropileno de 1.5 mL con la muestra.

- 1.- Se adiciono 500 µl de agua grado PCR con 500 µl de fenol y se agito en vortex por 5 minutos vigorosamente,
- 2.- Después se centrifugo a 14,000 r.p.m. durante un periodo de 5 a 10 minutos eso dependerá de lo que tarde en precipitarse toda la muestra.
- 3.- Al finalizar la centrifugación se rescató en otro tubo de polipropileno de 1.5 mL 500 µl del sobrenadante y se adiciono 500 µl de cloroformo, se da una agitación en el vortex por 30 segundos y se centrifugo de nuevo a 14,000 r.p.m. por 5 minutos.
- 4.- Al terminar de centrifugar se obtuvieron de 300 a 500 µl de sobrenadante de la parte más superficial y se depositó en otro tubo de polipropileno de 1.5 mL.
- 5.- Luego se adiciono 1/10 de acetato de sodio al 3M del volumen obtenido y se mezcló por inversión, enseguida se adiciono 2 volúmenes de etanol absoluto, es decir el doble de volumen de etanol del volumen rescatado de la última centrifugación, el etanol debe de estar previamente frio a una temperatura de 4° C.
- 6.- A continuación se agito ligeramente hasta observar un precipitado lechoso y se pone a centrifugar por 30 minutos a 14,000 r.p.m.
- 7.- Se decantó el sobrenadante para recuperar el pellet o la pastilla.
- 8.- Se le aplico a la pastilla 500µl de etanol al 70.0% y se centrifugo por 5 minutos como se ha venido manejando, esto se realizó para enjuagar o eliminar el etanol absoluto (Repetir este pasó).
- 9.- Después de deajo secar por 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar el etanol al 70.0%.
- 10.- Finalmente se resuspende en 100 µl de agua grado PCR.
- 11.- Las muestras se almacenan a -20° C hasta su uso.

Para continuar se verifica que se tenga DNA genómico, para esto se usó la técnica de electroforesis para separar los ácidos nucleicos de los demás moléculas.

7.5.2 Electroforesis en gel de agarosa para verificar la obtención de DNA genómico de los hongos endófitos.

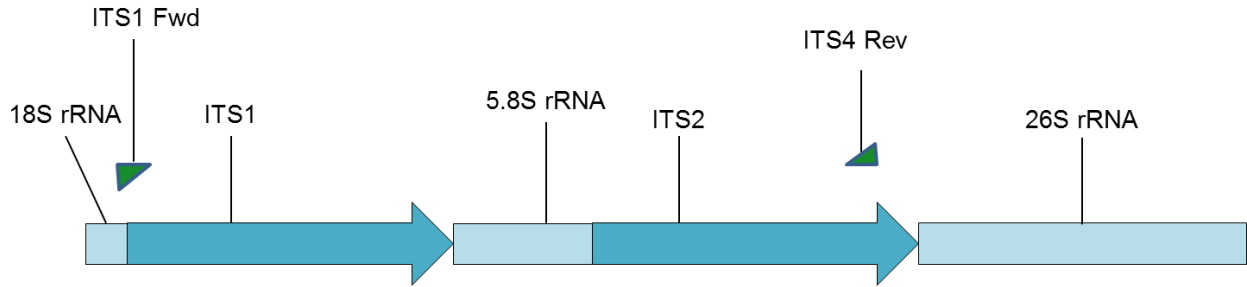
Para cerciorarnos que se realizó con éxito la extracción del DNA genómico de los hongos se preparó un gel de agarosa al 0.8% para un volumen de 20 mL, se agregó 0.7 µl de Midori Green (colorante para teñir el DNA, sustituto de bromuro de etidio). Para depositar el DNA genómico en el gel, se realizó con un buffer de carga (azul de bromofenol 6X) en proporción de 1 µl de buffer con 2 µl de muestra (DNA genómica) del hongo endófito. Después se evaluó la pureza y concentración de cada muestra con la cuantificación de DNA por el espectrofotómetro Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific, E.U.

7.5.3 Amplificación por PCR.

Amplificación de la región ITS de la subunidad 5.8S rDNA con iniciadores universales ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 una secuencia reversa (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), se usó como control positivo a *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 5) y como control negativo la mezcla sin el DNA templado, se trabajó con un volumen final de 50 µl. Se usaron las siguientes condiciones y sustancias que a continuación se describen (tabla 1 y tabla 2)

Tabla 1. Protocolo de las reacciones para la amplificación de las regiones ITS por PCR.

REACTIVOS	STOCK	REACCIÓN	VOLUMEN/MUESTRA
Buffer	10x	1x	5.0 µL
MgCl ₂	25.0 mM	2.0 mM	4.0 µL
dNTPs	10.0 mM	0.2 mM	1.0 µL
Taq polimerasa	5 unidades/µL	0.025 unidades/µL	0.25 µL
Iniciador sentido	10.0 µL	0.2 mM	1.0 µL
Iniciador antisentido	10.0 µL	0.2 mM	1.0 µL
Agua			Variable
DNA		20.0 ng/µL	Variable
Volumen final			50.0 µL



Saccharomyces cerevisiae cepa CHFY0901.
 Gen 18S rRNA, secuencia parcial; región espaciadora interna transcrita 1 (ITS1), gen 5.8S rRNA, y región espaciadora interna transcrita 2 (ITS2), secuencia completa y gen 26S rRNA, secuencia parcial.

Figura 5. Se muestra las regiones y el segmento de 841pb que se va a amplificar del rDNA de *Saccharomyces cerevisiae* cepa CHFY0901, Número de Acceso: EU649673

Condiciones para la amplificación de las regiones ITS del rDNA.

Tabla 2. Muestra las condiciones para la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 del rDNA en el termociclador.

	Temperatura °C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	5 minutos	} 25 ciclos
Desnaturalización	94	1 minuto	
Alineamiento	56	1 minuto	
Extensión	72	1 minuto	
Extensión final	72	10 minutos	
	10	10 minutos	

La amplificación por PCR se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 de Applied Biosystems. Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % teñido con 0.8 µL con un colorante llamado Midori Green Advanced (1:15) utilizando un regulador de corrimiento TBE, mezclando 1.0 µL de azul de bromofenol o buffer de carga y 5.0 µL de producto de reacción. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®), la electroforesis se corrió a 100 Volts por un periodo de 50 minutos y después se reveló a través del equipo Molecular Imager Gel Doc XR de Bio Rad. Ya que se verificó la amplificación, continuamos con la secuenciación del producto de PCR.

7.5.4 Protocolo para secuenciación del producto de PCR.

El resultado de la concentración del producto de PCR que fue de 20ng/ μL .

Se trabajó con 2 tubos por cada muestra en donde cada uno tenía el iniciador ITS1 y en el otro el reverso ITS4. Para la secuenciación de los productos se siguió un protocolo (Tabla 3).

Tabla 3. Protocolo de las reacciones para la secuenciación usando los mismos iniciadores.

Agua PCR	14.0 μL depende del vol. de DNA
Buffer	2.0 μL
DNA	1.0 μL
Mix	1.0 μL
Primers	1.0 μL
DMSO	1.0 μL
Volumen final	20.0 μL

Se mezcla con cuidado para que no se formen burbujas ya que puede interferir con la secuenciación. Lo siguiente fue llevar las muestras al termociclador con las siguientes condiciones (Tabla 4):

96°C	1 minuto
96°C	10 segundos
50°C	5 segundos
60°C	4 minutos
4°C	10 minutos

} 25 ciclos

5.- Después del termociclador se hizo una limpieza del producto de PCR

6.- Se centrifugo brevemente la reacción de secuenciación y se transfirió a un tubo de polipropileno de 1.5 mL.

7.- Se le adiciono al nuevo tubo con la muestra 5 μL de EDTA a 125 mM con un pH 8 con 60 μL de etanol absoluto, se mezcla levemente y se centrifuga para bajar la

muestra, se deja reposando por 30 minutos a temperatura ambiente. Y se vuelve a centrifugar por 20 minutos a velocidad máxima (13,500 r.p.m.)

8.- Continuando con el procedimiento, se remueve el sobrenadante con una punta de pipeta inmediatamente después de centrifugarse.

9.- Se lavó con 250 μ L de etanol al 70.0 % y se volvió a centrifugar por 5 minutos a máxima velocidad con la misma operación y se retira el sobrenadante.

10.- Se repitió el paso 9.

11.- Se removió con punta todo lo que más se pueda del sobrenadante y se dejó secar por 5 minutos.

12.- Finalmente se manda a secuenciar o se almacena a 4° C hasta su uso.

Después de la secuenciación se realizó el alineamiento con el software Vector NTI advance 11 para observar la parte más consensa o donde se alineen el iniciador y el reverso, se hace una comparación en la base de datos en la National Center for Biotechnology Information (NCBI) para la identificación del hongo endófito haciendo un blast que es un programa informático de alineamiento de secuenciación de tipo local.

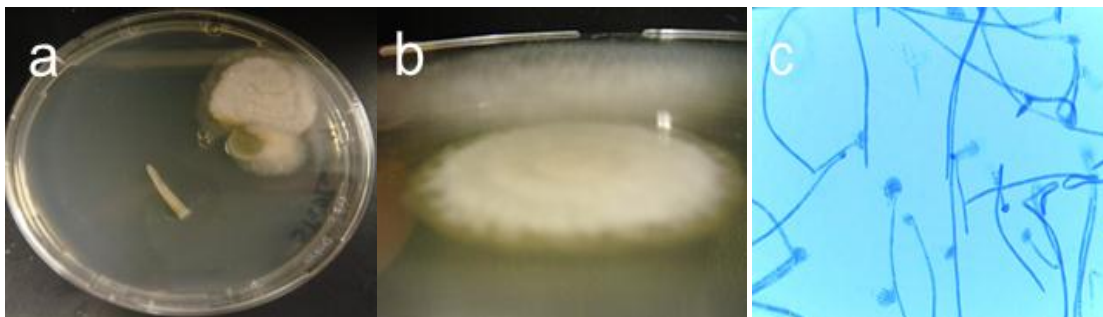
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

8. RESULTADOS.

Identificación de los hongos endófitos por descripción morfológica y técnica de microcultivo

Los hongos aislados son de una planta del Municipio de Texcoco estado de México llamada *Datura stramonium* mejor conocida como toloache, de la cual se obtuvieron 28 cepas de hongo endófitos crecidos en un medio selectivo Sabouraud dextrosa agar a un pH de 5.6 y a temperatura ambiente. Por medio de imágenes se obtuvo un registro del hongo desde a) el primer aislamiento de la planta, b) la purificación del hongo (donde se muestra su morfología) y c) fotomicrografías del hongo para su identificación por la técnica de microcultivo, las muestras se observaron a 40X con un microscopio óptico marca Leica DM500, después de una tinción con azul de lactofenol, la cual tiene como función destruir la flora acompañante, conservar las estructuras fúngicas y dar coloración a las paredes de la célula.

Figura 6. Hongo endófito 1 (ST1DI)

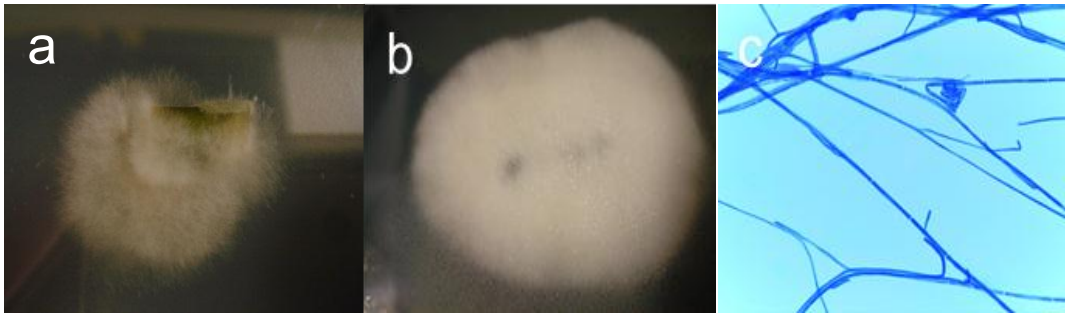


a) Primer aislamiento del hongo endófito de tallo después de 4 días

b) Descripción del crecimiento del hongo ya purificado a los 5 días. Tomándose en cuenta características morfológicas los cuales sirven para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 34 mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, con micelio aéreo, margen filiforme, densidad opaca y translúcida a las orillas, textura algodonosa, superficie concéntrica, generación de condensación y coloración blanca por encima y por abajo coloración beige.

c) Fotomicrografía del micelio, tiene hifa septada, con conidióforos compactos y conidia oscuras la cual permitió su identificación hasta genero *Epicoccum* spp.

Figura 7. Hongo endófito 2 (ST2DI)

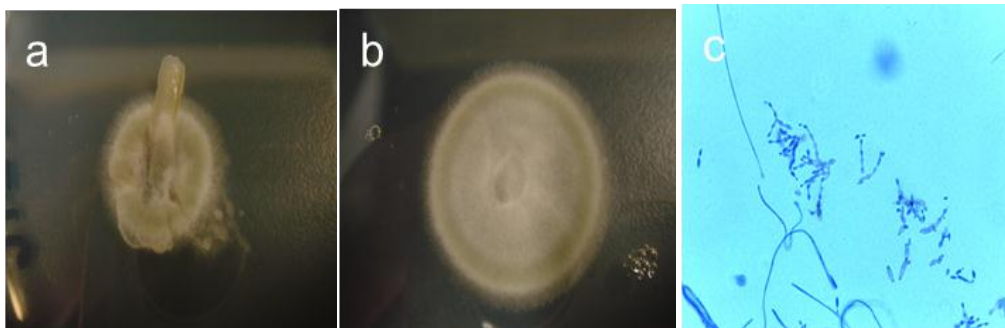


a) Primer aislamiento del hongo endófito de tallo después de 4 días

b) Descripción del crecimiento del hongo ya purificado a los 5 días. Tomándose en cuenta características morfológicas los cuales ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 33mm de diámetro, forma filamentososa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie ondulada, sin condensación y coloración verde oscura de en medio y blanco a su alrededor por encima y por debajo blanca.

c) Fotomicrografía del hongo, donde solo se logró ver a las hifas que son de tipo septado, que dan origen al micelio con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo

Figura 8. Hongo endófito 3 (ST3DI)

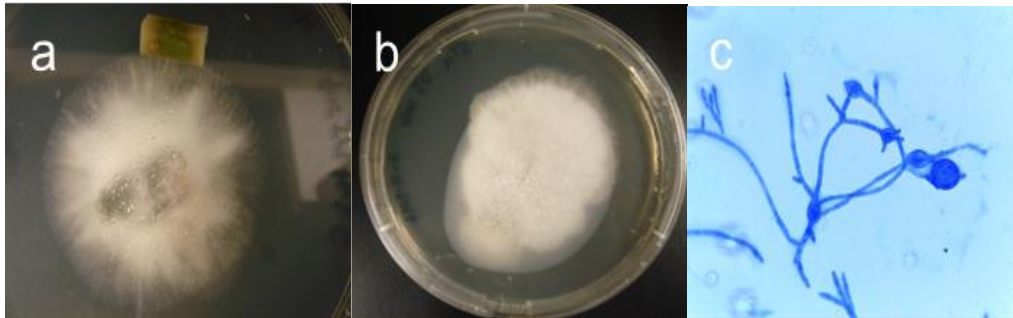


a) Muestra el crecimiento del hongo endófito de una parte del tallo a los 4 días de crecimiento.

b) Se muestra el crecimiento del hongo ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas los cuales ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 17mm de diámetro es forma circular, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca y translúcida a las orillas, textura algodonosa, superficie lisa, sin condensación y coloración verde oscura por encima y por abajo también verde oscura solo en el centro y blanca alrededor

c) Fotomicrografía del hongo, donde se muestra conidióforos altos, conidias oscuras, blastosporos oscuros, de una a dos células, de forma ovoide a cilíndrica e irregular, tentativamente el hongo pertenece al género *Cladosporium* spp.

Figura 9. Hongo endófito 4 (ST4DI)

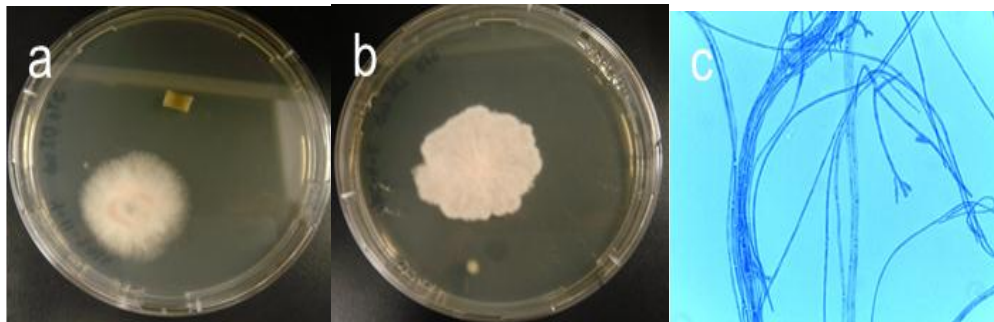


a) Muestra el crecimiento del hongo endófito de una parte del tallo a los 4 días.

b) Crecimiento del hongo ya purificado a los 5 días. Se tomaron en cuenta características morfológicas que ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 43mm de diámetro, forma filamentosa, elevación plana con micelio aéreo, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie ondulada, sin condensación y coloración verde en medio y blanco a su alrededor por encima, por debajo blanca.

c) Fotomicrografía del hongo donde se muestran las hifas que son de tipo septado con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo.

Figura 10. Hongo endófito 5 (ST5DI)

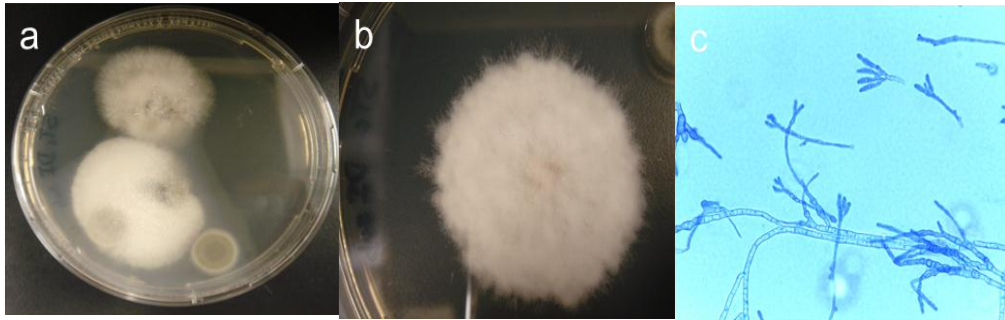


a) Crecimiento del hongo endófito de una parte del tallo a los 4 días.

b) Se muestra el hongo aislado describiéndose con características morfológicas las cuales ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 35mm de diámetro, forma filamentosa, elevación pulvinada con micelio aéreo, margen ondulado, densidad opaca, textura algodonosa, superficie ondulada, sin condensación y coloración blanco con tonalidades anaranjadas en ambos lados.

c) Fotomicrografía del hongo donde solo se logró ver las hifas que son de tipo septado con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo.

Figura 11. Hongo endófito 6 (ST6DI)



a) Crecimiento del hongo endófito de una parte del tallo a los 4 días.

b) Se muestra el hongo aislado ya puro a los 5 días tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 34mm de diámetro, forma filamentososa, elevación pulvinada con micelio aéreo, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie ondulada, sin condensación y coloración blanco arriba y beige abajo.

c) Fotomicrografía del hongo donde solo se logró ver las hifas que son de tipo septado con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo.

Figura 12. Hongo endófito 7 (ST7DI)

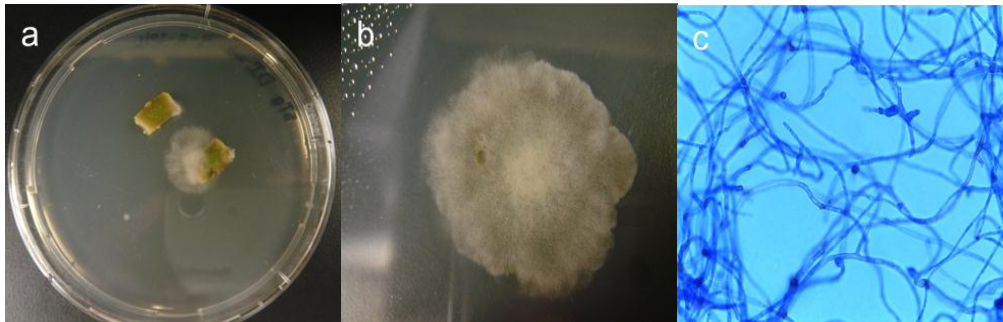


a) Crecimiento del hongo endófito de una parte del tallo a los 4 días.

b) Se muestra crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días tomando en cuenta características morfológicas los cuales ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 13mm de diámetro, forma irregular, elevación plana, margen filiforme, densidad opaca, textura aterciopelado, superficie ondulada, sin condensación y coloración verde arriba y verde oscuro abajo.

c) Fotomicrografía del hongo, descripción: conidióforos altos, oscuros conidia: blastosporas oscuras, de una a dos células, forma ovoide a cilíndrica e irregular, tentativamente pertenece al género *Cladosporium* spp.

Figura 13. Hongo endófito 8 (ST8DI)

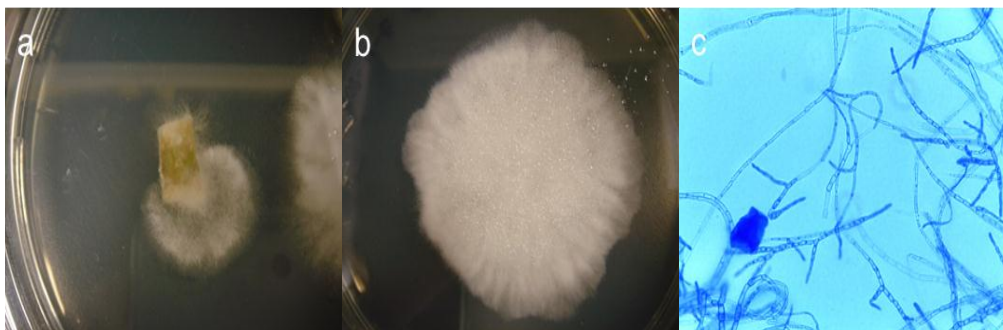


a) Crecimiento del hongo endófito de una parte del tallo a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días tomándose en cuenta características morfológicas para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 23mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, sin condensación y coloración verde arriba y verde abajo.

c) Fotomicrografía del hongo donde solo se logró ver las hifas que son de tipo septado con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo.

Figura 14. Hongo endófito 9 (ST9DI)

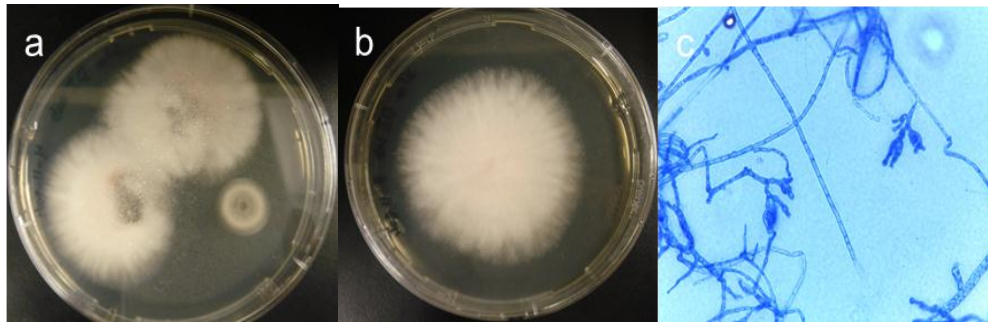


a) Crecimiento del hongo endófito de una parte del tallo a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas los cuales ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 44mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie radial, sin condensación y coloración blanca por ambos lados.

c) Fotomicrografía del hongo donde solo se logró ver las hifas que son de tipo septado con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo (sin identificar).

Figura 15. Hongo endófito 10 (ST10DI)

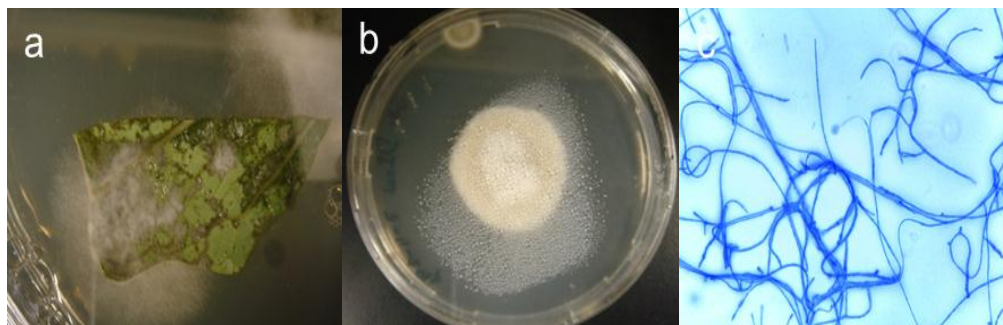


a) Crecimiento del hongo endófito de una parte del tallo a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas que ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 47mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie algo radiada, sin condensación y coloración blanca arriba y por abajo naranja en el centro y en las orillas de color blanco.

c) Fotomicrografía del hongo en donde solo se logra ver las hifas que son de tipo septado con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo.

Figura 16. Hongo endófito 11 (SH1DI)

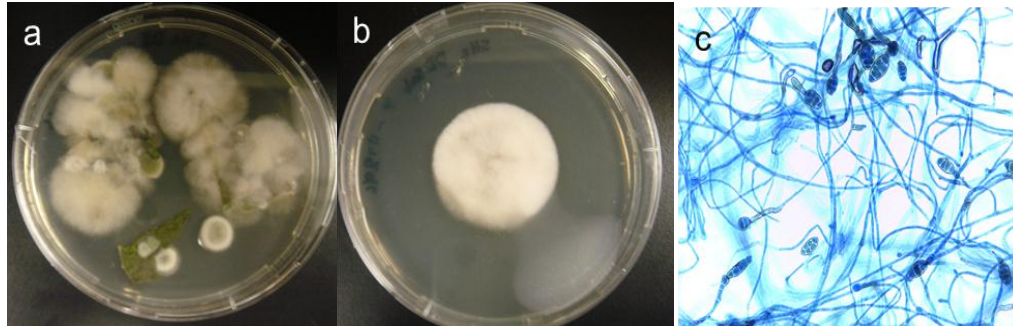


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas las cuales permitirán o no para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 30mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, condensación y coloración blanco arriba en el centro y amarillo a los lados, abajo amarillento.

c) Fotomicrografía del hongo donde solo se logró ver las hifas que son de tipo septado con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo.

Figura 17. Hongo endófito 12 (SH2DI)

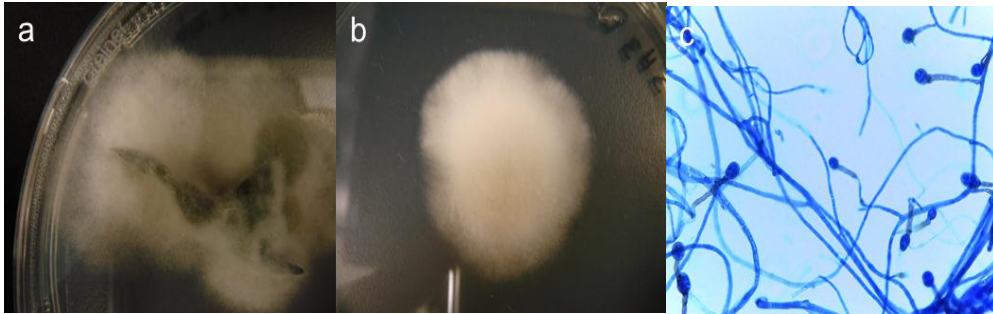


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudaron para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 30mm de diámetro, forma filamentososa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, sin condensación y coloración blanco arriba en el centro y amarillo a los lados, abajo amarillento con manchas oscuras.

c) Fotomicrografía del hongo donde se muestran las estructuras más importantes que son el micelio que es septado, producción de conidias que son esporas asexuales, grandes, multicelulares, con tabiques transversales y longitudinales. La forma de las conidias es variada de claviforme a elipsoidal y presentan un apéndice apical simple o dividido. El número de células de los conidios varía según la especie. Las conidias pueden formar cadenas de hasta 9 conidias juntas. Se trata de hongos generalmente saprófitos sobre mucho tipo de plantas silvestres, cultivables y otro tipo de sustratos. Tentativamente pertenece al género *Alternaria* spp.

Figura 18. Hongo endófito 13 (SH3DI)



a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudaron para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 28mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, sin condensación y coloración blanco arriba y amarillo abajo.

c) Fotomicrografía del hongo donde se muestran las estructuras más importantes son el micelio que es septado, producción de conidias que son esporas asexuales, grandes, multicelulares, con tabiques transversales y longitudinales. La forma de las conidias es variada de claviforme a elipsoidal y presentan un apéndice apical simple o dividido. El número de células de los conidios varía según la especie. Las conidias pueden formar cadenas de hasta 9 conidias juntas. Se trata de hongos generalmente saprófitos sobre mucho tipo de plantas silvestres, cultivables y otro tipo de sustratos. *Alternaria* spp.

Figura 19. Hongo endófito 14 (SH4DI)

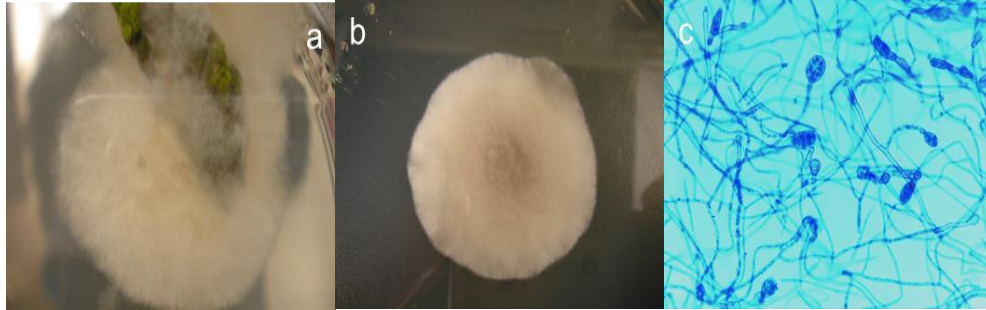


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudaron para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 35mm de diámetro, forma filamentosa, elevación plana, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, sin condensación y coloración blanco arriba y naranja abajo.

c) Fotomicrografía del hongo, descripción células hifas septadas, conidióforos compactos y oscuros, conidia de color oscuro. Posible genero *Epicoccum* spp.

Figura 20. Hongo endófito 15 (SH5DI)

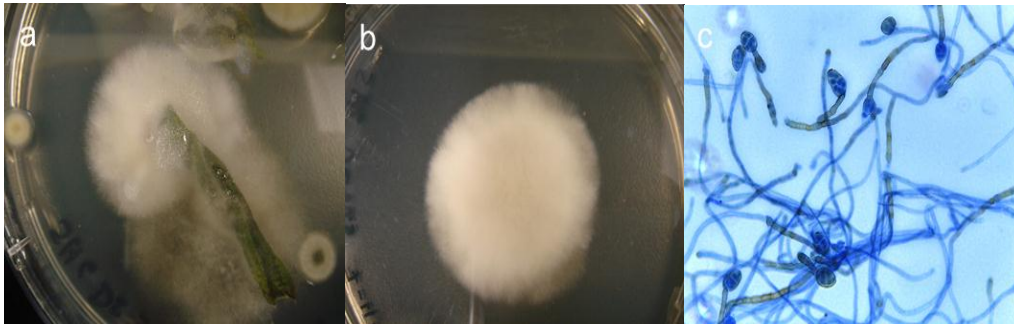


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días tomándose en cuenta características morfológicas los cuales nos ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 30mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, sin condensación y coloración blanco arriba con el centro café por abajo algo amarillo con café.

c) Fotomicrografía del hongo que describe las estructuras más importantes que son: hifas del tipo septado, producción de conidias que son esporas asexuales, grandes, multicelulares, con tabiques transversales y longitudinales. La forma de las conidias es variada de claviforme a elipsoidal y presentan un apéndice apical simple o dividido. El número de células de los conidios varía según la especie. Las conidias pueden formar cadenas de hasta 9 conidias juntas. Se trata de hongos generalmente saprófitos sobre mucho tipo de plantas silvestres, cultivables y otro tipo de sustratos. *Alternaria* spp.

Figura 21. Hongo endófito 16 (SH6DI)

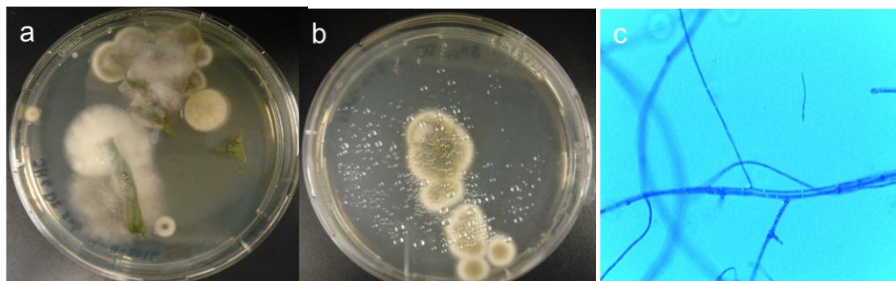


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudaron para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 29mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, sin condensación y coloración blanco arriba y abajo amarillento.

c) Fotomicrografía del hongo, donde se describen estructuras microscópicas: hifa septada, producción de conidias que son esporas asexuales, grandes, multicelulares, con tabiques transversales y longitudinales. La forma de las conidias es variada de claviforme a elipsoidal y presentan un apéndice apical simple o dividido. El número de células de los conidios varía según la especie. Las conidias pueden formar cadenas de hasta 9 conidias juntas. Se trata de hongos generalmente saprófitos sobre mucho tipo de plantas silvestres, cultivables y otro tipo de sustratos. *Alternaria* spp.

Figura 22. Hongo endófito 17 (SH6.1DI)

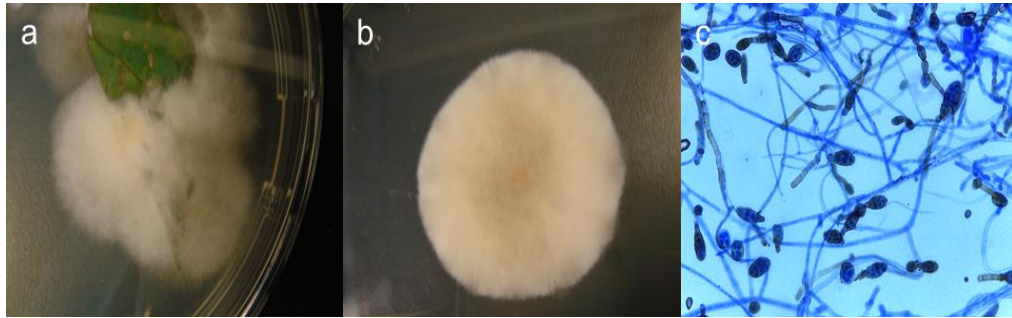


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudaron para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 39mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen ondulado, densidad opaca, textura aterciopelada, superficie lisa, ligera condensación, coloración verde claro con blanco en el margen y abajo verde amarillento.

c) Fotomicrografía del hongo donde solo se logra ver las células que son de tipo septado con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo.

Figura 23. Hongo endófito 18 (SH7DI)

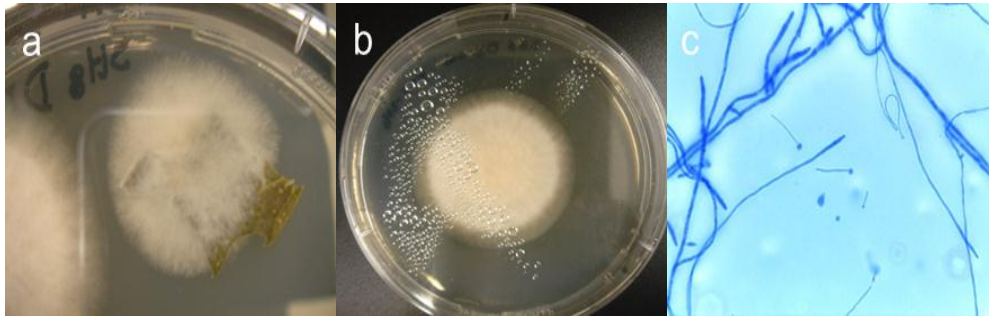


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudaron para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 29mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, sin condensación y coloración anaranjado claro en el centro con bordes blancos arriba y abajo amarillento.

c) Fotomicrografía del hongo en donde se hace una descripción microscópica: Las estructuras más importantes son las hifas que son de tipo septadas, producción de conidias que son esporas asexuales, grandes, multicelulares, con tabiques transversales y longitudinales. La forma de las conidias es variada de claviforme a elipsoidal y presentan un apéndice apical simple o dividido. El número de células de los conidios varía según la especie. Las conidias pueden formar cadenas de hasta 9 conidias juntas. Se trata de hongos generalmente saprófitos sobre mucho tipo de plantas silvestres, cultivables y otro tipo de sustratos. *Alternaria* spp.

Figura 24. Hongo endófito 19 (SH8DI)

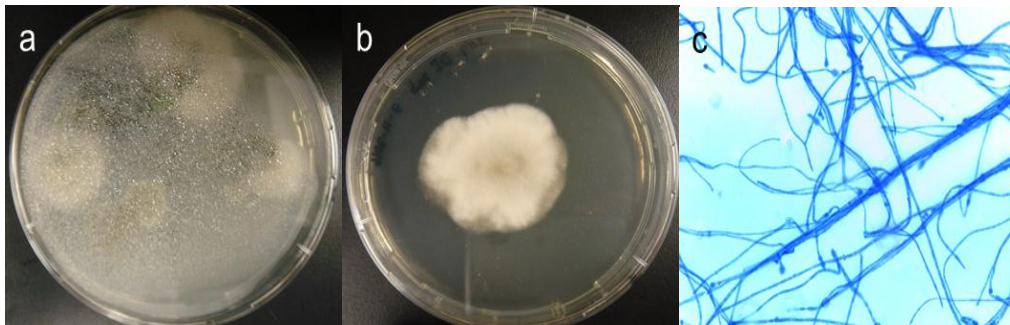


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 37mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, sin condensación y coloración blanco arriba y abajo anaranjado.

c) Fotomicrografía del hongo donde se muestra hifas septadas, conidióforos compactos y oscuros, conidia de color oscuro. Posible género *Epicoccum* spp.

Figura 25. Hongo endófito 20 (SH9DI).

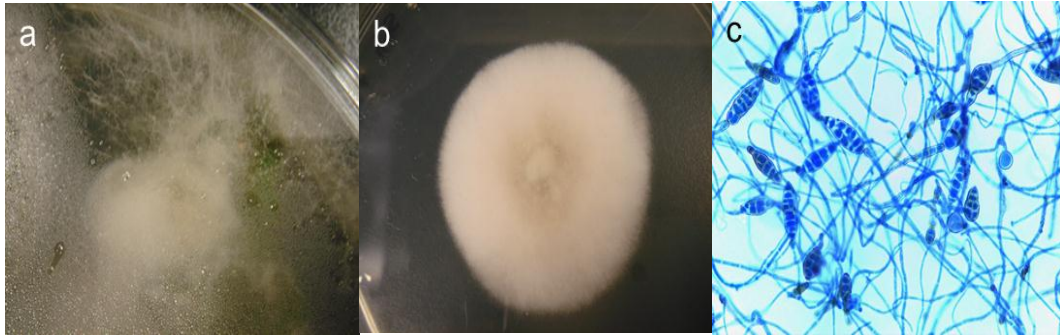


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudaron para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 34mm de diámetro, forma filamentosa, elevación umbonada, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, sin condensación y coloración blanco arriba y abajo amarillento.

c) Fotomicrografía del hongo donde solo se logró ver las células (hifas) que son de tipo septado con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo, no se logró identificar el género.

Figura 26. Hongo endófito 21 (SH10DI)

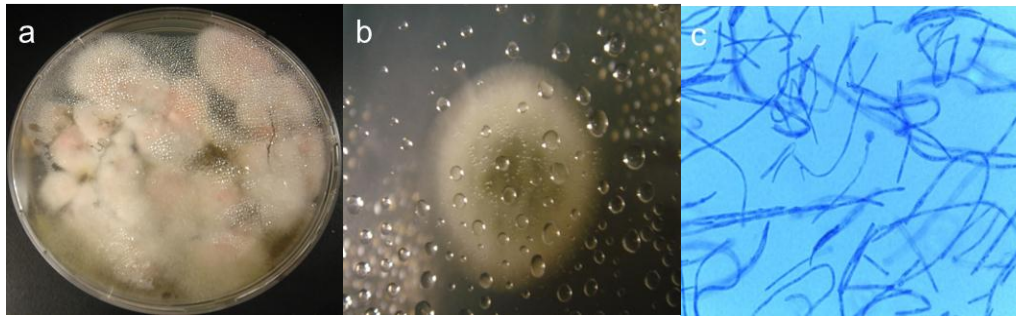


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 35mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, sin condensación y coloración blanco arriba y abajo amarillento-café en el centro y alrededor blanco.

c) Fotomicrografía del hongo donde se describe microscópicamente las estructuras más importantes que son las células hifas de tipo septado, producción de conidias que son esporas asexuales, grandes, multicelulares, con tabiques transversales y longitudinales. La forma de las conidias es variada de claviforme a elipsoidal y presentan un apéndice apical simple o dividido. El número de células de los conidios varía según la especie. Las conidias pueden formar cadenas de hasta 9 conidias juntas. Se trata de hongos generalmente saprófitos sobre mucho tipo de plantas silvestres, cultivables y otro tipo de sustratos. *Alternaria* spp.

Figura 27. Hongo endófito 22 (SRDI)

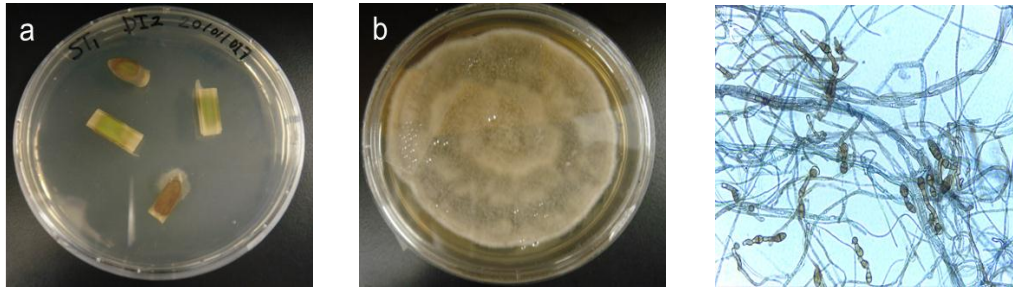


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas que ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 18mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura aterciopelada, con condensación, coloración de la superficie verde en el centro con un margen grisáceo y la coloración por abajo verde oscuro.

c) Fotomicrografía del hongo en donde solo se logra ver las células que son de tipo septado con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo, sin lograr su identificación.

Figura 28. Hongo endófito 23 (ST1DI2)

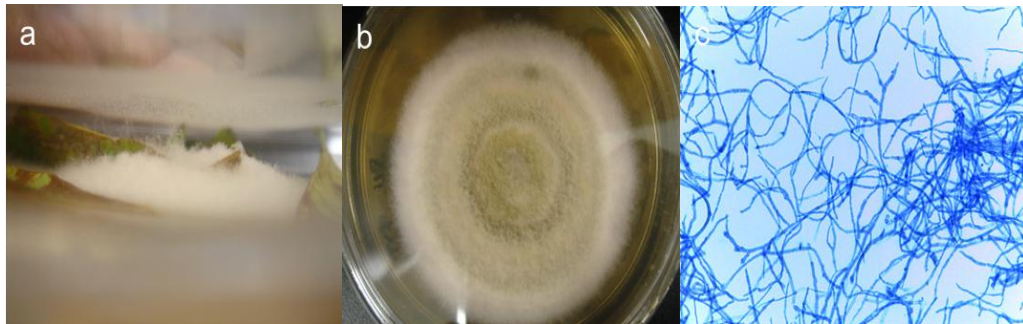


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudaron para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 76mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, superficie lisa, ligera condensación y coloración superficial café con manchas oscuras y abajo amarillento-café en el centro y alrededor beige.

c) Fotomicrografía del hongo donde se hace la descripción microscópica: Las estructuras más importantes que son las células (hifas) que son de tipo septadas, producen conidias que son esporas asexuales, grandes, multicelulares, con tabiques transversales y longitudinales. La forma de las conidias es variada de claviforme a elipsoidal y presentan un apéndice apical simple o dividido. El número de células de los conidios varía según la especie. Las conidias pueden formar cadenas de hasta 9 conidias juntas. Se trata de hongos generalmente saprófitos sobre mucho tipo de plantas silvestres, cultivables y otro tipo de sustratos. Posible género *Alternaria* spp.

Figura 29. Hongo endófito 24 (SH1DI2)



a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudaron para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 63mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura algodonosa, sin condensación, coloración de la superficie café en el centro con un margen blanco y abajo de color oscuro con aros o bordes rojizos a beige.

c) Fotomicrografía del hongo donde solo se logró ver las células (hifas) que son de tipo septado, no desarrolló conidióforos o estructuras reproductivas con las condiciones y el medio en el que se creció.

Figura 30. Hongo endófito 25 (SH3DI2)

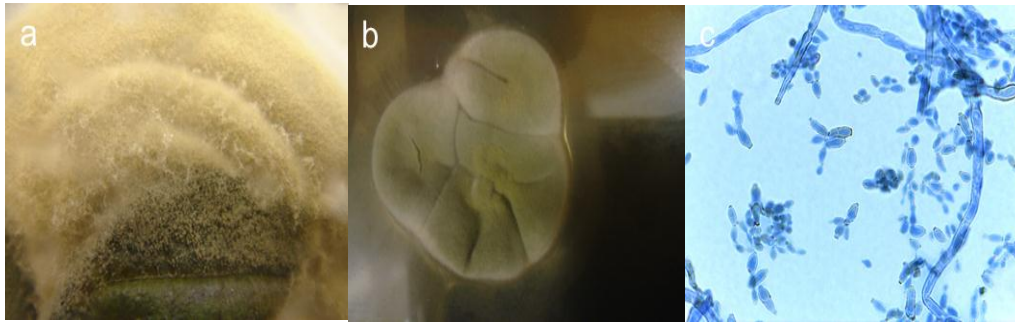


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas que ayudaron para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 21mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen filiforme, densidad opaca, textura aterciopelada, sin condensación, coloración de la superficie verde en el centro con un margen grisáceo y la coloración por debajo es verde oscuro con margen beige.

c) Fotomicrografía del hongo en donde se hace descripción de las estructuras microscópicas: conidióforos altos y oscuros, conidia, blastosporas oscuras, de una a dos células, forma ovoide a cilíndrica e irregular, tentativamente pertenece al género *Cladosporium* spp.

Figura 31. Hongo endófito 26 (SH6DI2)

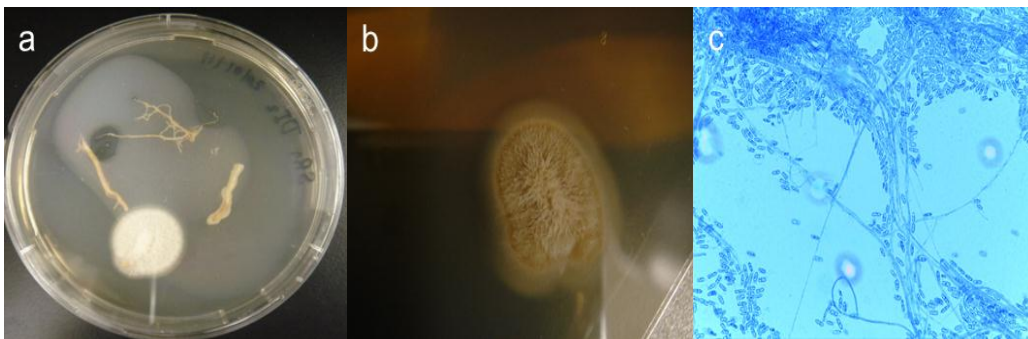


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 35mm de diámetro, forma irregular, elevación convexa, margen ondulada, densidad opaca, textura aterciopelada, sin condensación, coloración de la superficie verdosa y por abajo, verde oscuro con un borde beige.

c) Fotomicrografía del hongo donde se muestran particularidades microscópicas como conidióforos altos, conidias oscuras, blastosporas oscuras, de una a dos células, forma ovoide a cilíndrica e irregular, tentativamente pertenece al género *Cladosporium* spp.

Figura 32. Hongo endófito 27 (SR1DI2)

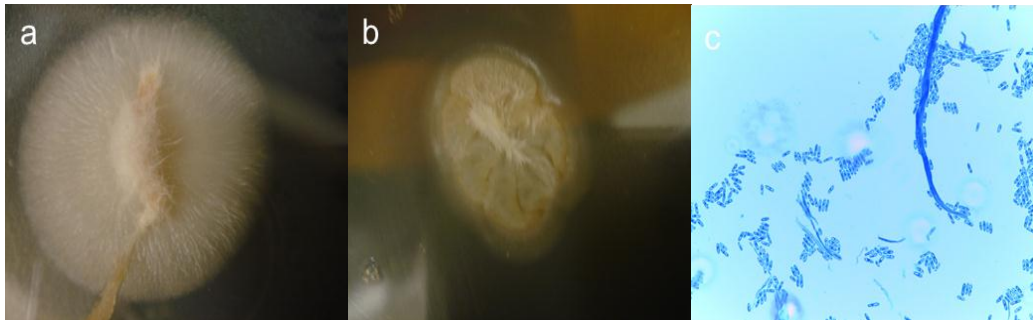


a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas las cuales ayudaron para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 27mm de diámetro, forma filamentososa, elevación convexa, margen ondulada, densidad opaca, textura aterciopelada, sin condensación, coloración blanca y por abajo color café.

c) Fotomicrografía del micelio en microcultivo en medio Sabourad pH 5.6. A los cuatro días 22° C A un aumento de 40X con microscopio óptico marca Leica DM500. Solo se logró ver las células que son de tipo septado y posibles esporas con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo.

Figura 33. Hongo endófito 28 (SR2DI2)



a) Crecimiento del hongo endófito de un pedazo de hoja a los 4 días.

b) Se muestra el crecimiento del hongo aislado ya purificado a los 5 días, tomándose en cuenta características morfológicas los cuales nos ayudan para su identificación por claves dicotómicas. Crecimiento 32mm de diámetro, forma filamentosa, elevación convexa, margen ondulada, densidad opaca, textura aterciopelada, sin condensación, coloración blanca y por abajo color café.

c) Fotomicrografía del hongo donde solo se pudo ver las células (hifas) que son de tipo septado y estructuras que posiblemente eran esporas, con las condiciones y el medio en el que se creció el hongo no se logró identificar por esta técnica.

Identificación de los hongos por técnicas moleculares.

Cuantificación del DNA genómico y verificación en geles de agarosa.

Los hongos endófitos que se lograron aislar de la planta *Datura stramonium* mejor conocida como “toloache” fueron 28 cepas en total, pertenecientes a cada parte de esta (raíz, tallo, hoja y flor), que fueron tratadas con el proceso de esterilización, cultivados en medio solido selectivo Agar dextrosa Sabouraud con un pH de 5.6 a temperatura ambiente. A cada uno se le hizo extracción de DNA por método de fenol/cloroformo con modificaciones según (Sun J. *et al.*, 2012) y se verifico la obtención de DNA genómico en geles de agarosa al 1% como se muestra en la figura 34. También se cuantifico el grado de pureza (260/280) y la concentración (ng/μL) del DNA genómico por medio del Nanodrop 2000 (tabla 7).

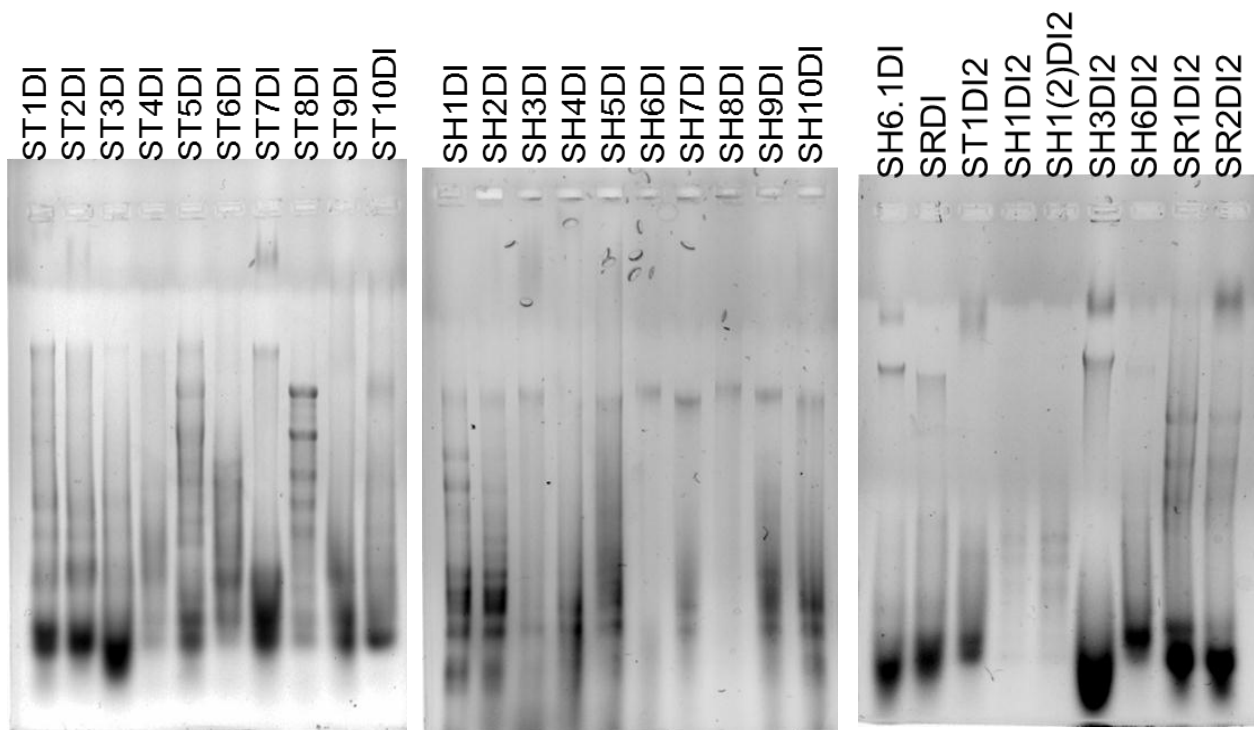


Figura 34. Resultado de la obtención de ácidos nucleicos totales (DNA genómico) de los 28 hongos endófitos aislados de *Datura stramonium* en geles de agarosa al 1%.

Amplificación de las regiones ITS por PCR

Después de la obtención del DNA genómico, se realizó la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 del rDNA por técnica de PCR, se corrieron en geles de agarosa al 1% para verificar el amplificado o el producto, figura 35.

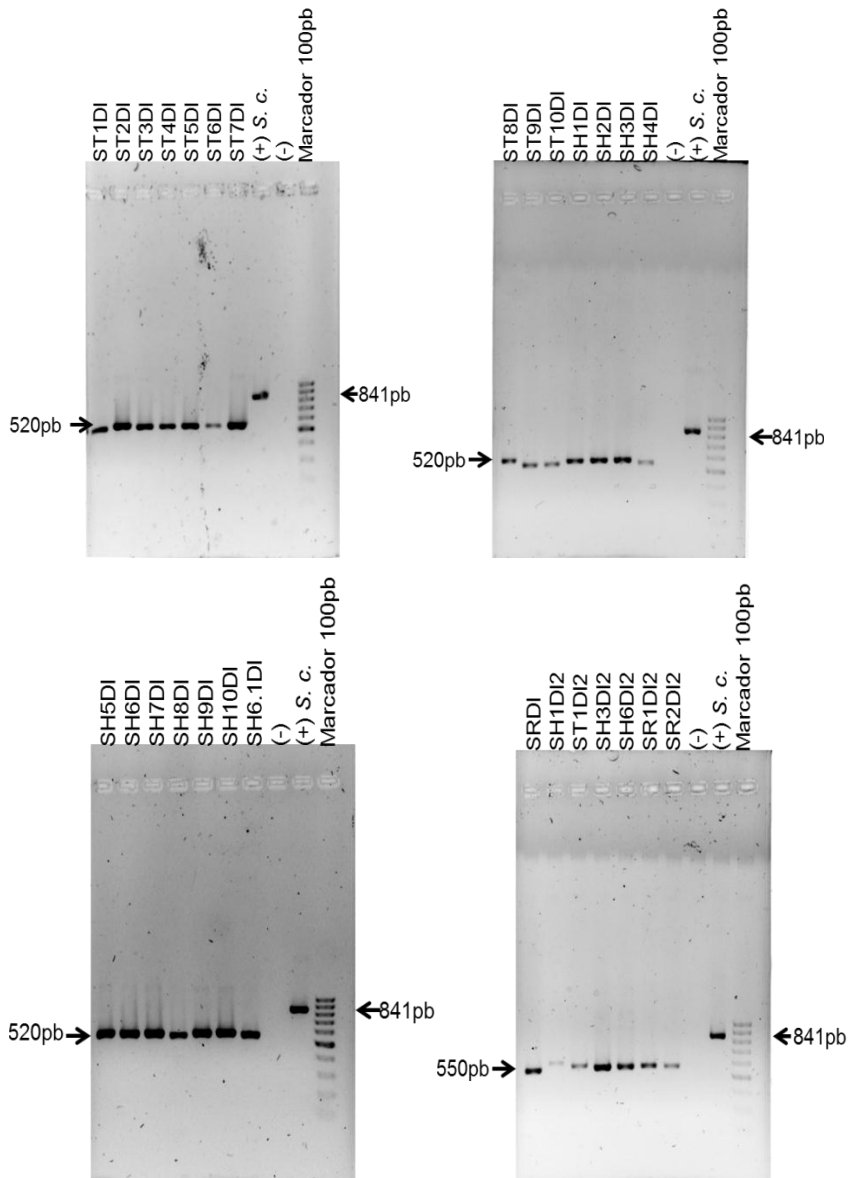


Figura 35. Amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 en geles de agarosa al 1% donde se muestran el amplificado de PCR con iniciadores ITS1F e ITS4R, donde los tamaños aproximados son de 500 a 550pb de las 28 muestras de hongos endófitos, usando como control positivo DNA de *Saccharomyces cerevisiae* (+) y el control negativo (-) no tiene DNA.

Géneros a los que pertenece cada hongo endófito.

Finalmente los productos de PCR son secuenciados por la técnica sanger y comparados en la base de datos NCBI haciendo Blast a cada uno de ellos, donde se obtuvieron 7 géneros diferentes identificándose 27 de los 28 hongos aislados por técnicas moleculares, mientras que con microcultivo solo se lograron 3 géneros e identificaron 14 de los 28 hongos.

Tabla 5. Caracterización de los hongos por técnica de microcultivo y caracterización Genética

Muestra	Caracterización por Microcultivo (*)	ITS rDNA (**)
ST1 DI	<i>Epicoccum</i> spp.	<i>Epicoccum nigrum</i> (99)
ST2 DI	No identificado	<i>Alternaria tenuissima</i> (100)
ST3 DI	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.(99)
ST4 DI	No identificado	<i>Fusarium</i> spp. (100)
ST5 DI	No identificado	<i>Fusarium</i> spp (86)
ST6 DI	No identificado	<i>Fusarium</i> spp. (93)
ST7 DI	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.(99)
ST8 DI	No identificado	<i>Bipolaris cynodontis</i> (98)
ST9 DI	No identificado	<i>Fusarium equiseti</i> . (98)
ST10 DI	No identificado	No identificado
SH1 DI	No identificado	<i>Alternaria</i> spp. (97)
SH2 DI	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp. (86)
SH3 DI	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Alternaria tenuissima</i> (99)
SH4 DI	<i>Epicoccum</i> spp.	<i>Epicoccum nigrum</i> . (89)
SH5 DI	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp. (99)
SH6 DI	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Alternaria alternata</i> .(99)
SH6.1 DI	No identificado	<i>Cladosporium</i> spp.(98)
SH7 DI	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Alternaria alternata</i> (99)
SH8 DI	<i>Epicoccum</i> spp.	<i>Epicoccum</i> spp.(97)
SH9 DI	No identificado	<i>Alternaria</i> spp. (97)
SH10 DI	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Alternaria tenuissima</i> (99)
SR1 DI	No identificado	<i>Cladosporium</i> spp. (99)
ST1 DI2	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Alternaria alternata</i> (99)
SH1 DI2	No identificado	<i>Pleosporaceae</i> spp.(96)
SH3 DI2	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.(99)
SH6 DI2	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.(99)

SR1 DI2	No identificado	<i>Plectosphaerella</i> spp.(99)
SR2 DI2	No identificado	<i>Plectosphaerella</i> spp.(97)

Muestra la especie o el género al que corresponde cada hongo aislado después de haber secuenciado el producto de PCR haciendo una comparación entre la obtención de los resultados de las dos técnicas.

(*) Caracterización de los hongos por Microcultivo

(**) Caracterización de los hongos por técnicas moleculares.

Tabla 6. Género de los hongos con base a la secuencia ITS de los hongos aislados.

Género	Cantidad de hongos por género
<i>Alternaria</i> sp.	10
<i>Bipolaris</i> sp.	1
<i>Cladosporium</i> sp.	6
<i>Epicoccum</i> sp.	3
<i>Fusarium</i> sp.	4
<i>Plectosphaerella</i> sp.	2
<i>Pleosporaceae</i> sp.	1

Se obtuvieron en total 7 géneros, con una mayor cantidad el género *Alternaria* spp, con 10 hongos, el siguiente es el género *Cladosporium* spp, con 6 individuos y con 4 y 3 individuos son los géneros *Fusarium* spp. y *Epicoccum* spp. Correspondientemente.

9. DISCUSIÓN.

En este estudio los hongos endófitos que se lograron aislar de la planta *Datura stramonium* de sus partes (hoja, tallo y raíz) después de un proceso aséptico que permitió eliminar basura y patógenos externos. Se lograron aislar un total de 28 cepas de hongos endófitos de todas las partes de la planta *Datura stramonium* y su identificación fue a través de dos técnicas diferentes. Por la técnica de microcultivo y usando claves taxonómicas se lograron identificar 14 de esos hongos y solo hasta nivel de género, esto quiere decir que solo el 50% se logró identificar, una razón de ese resultado fue que varios hongos no producen cuerpos fructíferos en las condiciones de cultivo que se les dio en el laboratorio los cuales son parte fundamental para su identificación. Es tal como se mostró en la identificación morfológica y microscópica de Actinomycetes aislados de la planta medicinal llamada *Azadirachta indica*, donde solo usaron el fenotipo para llegar al género o especie de cada hongo endófito (Verma V. *et al.*, 2009).

La otra técnica fue por análisis filogenético molecular con la que se pudo identificar 27 de los 28 hongos endófitos hasta género y varios hasta especie, con más del 95% de identidad genética, esto se puede comparar con el trabajo de investigación realizado por (Chowdhary K. and Kaushik N. 2015) en donde aislaron 90 hongos endófitos de una planta medicinal de India llamada *Ocimum sanctum*, con los que llegaron a 17 géneros, para su identificación se usó la misma técnica molecular, en la región ITS del rDNA para amplificar con los iniciadores universales ITS1 e ITS4, pero solo realizaron el aislamiento por filogenia molecular.

En este otro estudio los hongos endófitos aislados fueron caracterizados por ambas técnicas; por la técnica de microcultivo y descripción morfológica (Morales y Rodríguez, 2006) y por análisis filogenético molecular en donde amplificaron las regiones ITS del rDNA usando iniciadores universales ITS1F e ITS4R (Rodríguez *et al.*, 2004). La caracterización genética resulta ser el mejor método para lograr identificar a los hongos endófitos ya que en la de microcultivo para hacer la identificación, es necesario obtener o hacer esporular al hongo y no en todos los casos se logró con las condiciones dadas.

Solo hay en la literatura dos trabajos en donde hacen el aislamiento de hongos endófitos de la planta *Datura stramoniu*. Uno de esos trabajos fue el hecho por Sun J. y colaboradores en el 2012, donde aislaron 14 cepas pero su trabajo solo se reduce al género *Alternaria* sp. Es decir no describe los demás géneros, sin embargo en nuestros resultados el hongo que más se aisló es el del genero *Alternaria* sp. Lo que da a entender que se concentraron en ese género por repetirse más.

También se propuso una metodología se asepsia de las partes de la planta con mayor efectividad que las vistas en los artículos, ya que el implemento de las sustancias y procesos es mucho mayor permitiendo que se amplié el rango de esterilización o eliminación de microorganismo. La metodología más usada es el implemento de etanol al 70%, hipoclorito de sodio, agua destilada estéril y en algunos casos usan peróxido de hidrogeno (Qadri M. *et al.*, 2013, Miller K. *et al.*, 2012) mientras que la metodología desarrollada por el laboratorio de genómica ambiental implementa Benzal, etanol absoluto y radiación UV, haciendo que el área externa de las partes tratadas de la planta sean falsos positivos al momento del aislamiento de los hongos.

10. CONCLUSIÓN.

- Se lograron identificar algunos de los hongos endófitos por microcultivo es muy útil ya que nos da una perspectiva general de la forma o bien del fenotipo de cada hongo.
- La identificación de la filogenia de los hongos endófitos por biología molecular no nos muestra las estructuras morfológicas, pero si nos da la certeza de que el género o la especie a la que estamos llegando es la correcta.
- Ambas técnicas son necesarias para la caracterización de los hongos, pues ambas son complementarias.
- El proceso de asepsia es muy completo en comparación de otros usados en las investigaciones citadas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Benavente, C., (2008). Micófilas, endófitos fúngicos y alcaloides en poblaciones en *Melica stuckertii* (*Poaceae*) del centro de Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 43:3-4.

Chowdhary K., Kaushik N., Gonzalez A. and Cabrera M. (2012). Endophytic fungi and their metabolites isolation from Indian medicinal plant. Phytochem 11: 467-485.

Chowdhary K. and Kaushik N. (2015). Fungal endophyte diversity and bioactivity in the Indian medicinal plant *Ocimum sanctum* Linn. Plos One 10(11): e0141444.

Christhudas, N., and Kumar, P. (2013). In Vitro α -glucosidase Inhibition and Antioxidative Potential of an Endophyte Species (*Streptomyces* sp. Loyola UGC) Isolated from *Datura stramonium* L. Curr Microbial 67: 69-76.

Dance A. (2017). Special relationship between fungi and plants may have spurred changes to ancient climate. Proceedings of the National Academy of Sciences. 114 (16): 12089-12091.

De Bary, A. (1866). Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany, Volume II (Leipzig, Germany:Engelmann).

Faeth S. and Fagan W. (2002). Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. Integr Comp Biol. 42:360-368.

Giusiano, G., (2010). Hongos endófitos en dos plantas medicinales del noreste Argentino. I: análisis morfotaxonómico de sus comunidades foliares.

Fouda A., Hassan S., Eid A. and Ewais E. (2015). Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica*. Annals of Agricultural Science. 60:95-104.

Gutierrez R., Gonzalez A., Ramirez A. (2012). Compounds derived from endophytes: a review of phytochemistry and pharmacology. *Curr Med Chem* 19: 2992-3030.

Jia M., Chen L., Xin H., Zheng C., Rahman K., Han T. and Qin L. (2016). A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review. *Frontiers in Microbiology* 7:906.

Johannes H., Gabriele B., Barbara S. (2006). Isolation procedures for endophytic microorganisms. Springer, Berlin, p 299.

Kusari S., Spiteller M. and Hertweck C. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry and Biology*.19:792-798.

Llorente-Bousquets, J., y Ocegueda, S. (2008). Estado del conocimiento de la Biota, en Capital natural en México, Vol. 1: Conocimiento actual de la Biodiversidad. CONABIO, México. 283-322.

Ludwig-Muller J. (2015). Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnol Lett.* 37:1325-1334.

Malhadas C., Malheiro R., Pereira J., Baptista P. and Guedes de Pinho P. (2017). Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *Microbiol Biotechnol* 33:46.

Martínez, M., (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. México D.F.

Money N. (2016). "Fungal Diversity". The fungi. In Elsevier (pp 1-36).

Miller K. Qing C. Yuen D. Roufogalis B. and Neilan B. (2012). Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity. *Microb Ecol* 64:431-449.

Ocegueda S. Moreno E. y Koleff P (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas* 62:12-15

Qadri M., Johri S., Shah B., Khajuria A., Sidiq T., Lattoo S., Abdin M. and Hassan S. (2013). Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the western Himalayas. Springer plus 2:8.

Rodríguez R., White J., Arnold A. and Redman R. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytologist 182: 314-330.

Ruiz J. (2001). El asombroso reino de los hongos. Avance y Perspectiva 20: 275-281.

Salgado, R., Esquivel, E., Noriega, R., Bello, M. y Saavedra, A. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. Biologicas 14(1):45-52.

Stierle A., Stierle, D., Strobel, G., Bignami, G. and Grothaus, P. (1994). Bioactive metabolites of the endophytic fungi of Pacific yew, *Taxus brevifolia*. In Taxane Anticancer Agents (American Chemical Society Symposium Series no. 583), 81-97.

Strobel G., Yang X., Sears J., Kramer R., Sidhu R. and Hess W. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. Microbiology 142, 435-440.

Strobel G, Daisy B, Castillo U. and Harper J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. J Nat Prod 67:257-268.

Sun J., Awakawa T., Noguchi H. and Abe I. (2012). Induce production of mycotoxins in an endophytic fungus from the medicinal plant *Datura stramonium* L. Bioorganic and Medicinal chemistry Letters 22:6397-6400.

Verma V, Gond S, Kumar A, Mishra A, Kharwar R, and Gange A. (2009). Endophytic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss. Isolation diversity and anti-microbial activity. Microb Ecol. 57:749-756

Watanabe, T. (Editors: Taylor and Francis Group.)(2010). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. New York, United States: CRC Press.

Wilson D. (1995). Endophyte the evolution of a term and clarification of its use and definition *Oikos* 73, 274-276.

Xu X., He Q., Chen C. and Zhang C. (2016). Differential communication between fungi and host plants revealed by secretome analysis of phylogenetically related endophytic and pathogenic fungi. *Plos One* 11(9).

Yan J, Qi N, Wang S, Gadhava K, Yang S, (2014). Characterization of secondary metabolites of an endophytic fungus from *Curcuma wenyujin*. *Curr Microbial* 69:740-744.

12. APÉNDICE.

(DIBICO® presentación 500g. Catalogo 1007-E).Formula en gramos por litro: Agar 15.0, dextrosa 40.0, peptona especial 10.0 y pH 5.6 ± 0.2 . La peptona proporciona factor de crecimiento y fuente de nitrógeno, la dextrosa es la fuente de energía para el crecimiento del microorganismo y debe de estar a un pH ácido 5.6 el cual favorece el crecimiento de los hongos y ayuda a la inhibición de la flora contaminante.

Material del tratamiento para eliminar las impurezas y microorganismo externos.

- 1.- Detergente líquido (manual marca Extran MA O² neutro concentrado, No EX1007-4, contenido frasco con 4L)
- 2.- Agua destilada estéril.
- 3.- Benzal al 10% (farmacéuticas Altamirano de México S.A de C.V, marca Antibenzil, concentrado rojo, frasco con 3.750L).
- 4.- Etanol al 70% (contenido 20L, alcohol etílico calidad 96°, No. de lote 20140213AZ98).
- 5.- Hipoclorito de sodio (CLORALEX o blanqueador de ropa concentrado, fabricado y distribuido por AIEEn del Norte S.A. DE C.V. lote P, contenido 950ml).
- 6.- Peróxido de hidrógeno al 3% (agua oxigenada concentración del 2.5 al 3.5% marca farmacias del ahorro, contenido 480ml).
- 7.- Etanol absoluto-agua destilada concentración 1:1 (contenido 20L, alcohol etílico calidad 96°, No. de lote 20140213AZ98).
- 8.- Luz ultravioleta a 0.120 joules que es a 254 nm por 15 minutos usando el equipo Vilber Lourmat UV-Crosslinker BLX- E254, serial No. V03 8320.
- 9.- Cronómetro.
- 10.- Recipientes estériles.

Tabla 7. Cuantificación de la concentración y pureza de DNA genómico de los hongos endófitos de *Datura stramonium*.

Muestra	Concentración ng/ μ L	Pureza 260/280
ST1 DI	2034.7	2.11
ST2 DI	3468.6	2.10
ST3 DI	2028.3	2.10
ST4 DI	495.6	2.02
ST5 DI	1469.1	2.10
ST6 DI	921.2	2.07
ST7 DI	1150.4	2.06
ST8 DI	500.1	2.01
ST9 DI	1030.3	2.04
ST10 DI	765.0	2.01
SH1 DI	1000.3	2.11
SH2 DI	2507.4	2.09
SH3 DI	2459.7	2.04
SH4 DI	1894.9	2.09
SH5 DI	2436.9	2.04
SH6 DI	751.8	1.96
SH6.1 DI	1077.8	2.06
SH7 DI	913.5	2.03
SH8 DI	554.7	2.01
SH9 DI	1096.4	2.02
SH10 DI	1407.1	2.05
SR1 DI	923.4	2.06
ST1 DI2	664.4	1.99
SH1 DI2	212.4	1.98
SH3 DI2	3362.0	2.09
SH6 DI2	706.4	2.00
SR1 DI2	2141.2	2.03
SR2 DI2	1202.3	1.99

La cuantificación de la concentración y de la pureza se realizó con Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific®. Notación de cada hongo aislado (S: Nombre de la persona que los aisló, R: hongo aislado de la raíz, H: hongo aislado de la hoja, T: hongo aislado del tallo, Fr: hongo aislado del fruto, el número para identificación, DI: que corresponde a *Datura stramonium* y el 2: describe que corresponde a una segunda planta de *datura stramonium*).

