

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Posgrado en Biotecnología

“HONGOS ENDÓFITOS DE PLANTAS MEDICINALES: BÚSQUEDA DE TAXOL FÚNGICO Y COMPUESTOS BIOACTIVOS”

TESIS

que para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

M. en C. Juan Moisés Galindo Solís

Matrícula: 2141800840

Correo electrónico: j.moises.galindo@gmail.com

Director:

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Jurado

Presidenta

Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Secretario

Dr. Octavio Loera Corral

Vocal

Dr. José Alberto Mendoza Espinoza

Vocal

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Iztapalapa, CDMX, 10 de marzo de 2023

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. *Pacopepe*, por todo el apoyo en la realización de este proyecto.

Al *Biólogo Abraham Escobar*, en conjunto realizamos la búsqueda y muestreo de Tejos mexicanos en el Parque Nacional El Chico. Adicionalmente, apoyó tanto en el aislamiento como en el mantenimiento de los endófitos.

Al Dr. *Ponciano García* y a la *Maestra Mónica Rincón* por su apoyo tanto en el establecimiento de las condiciones de análisis de espectrometría de masas, así como en el análisis de los resultados espectrofotométricos.

A la Dra. *Alejandra Orona* de la FQ-UNAM, amiga y colega que me apoyo incondicionalmente en lo personal y lo profesional. Un particular agradecimiento por la retroalimentación para el establecimiento de la TLC y las columnas de purificación.

A la Dra. *Araceli Tomasini* por sus comentarios y las facilidades para el uso del HPLC en el cual realicé los análisis. De la misma manera el Dr. *Alberto Mendoza* por toda la retroalimentación en relación con los análisis cromatográficos por las facilidades para el uso de las instalaciones de su laboratorio en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Al Dr. *Octavio Loera Corral* por todos sus comentarios y retroalimentaciones sobre el proyecto y mi carrera profesional. Así mismo, agradezco profundamente las facilidades para usar las instalaciones de su laboratorio en la UAM-I después del sismo de 2017.

A la Dra. *Mabel Fragoso* y al Dr. *Rogelio Pereda* por todo el apoyo técnico para la realización de los ensayos de citotoxicidad.

A la Dra. *Hypatia Arano* por el apoyo técnico para la identificación molecular de los hongos. Del mismo modo, agradezco profundamente el apoyo y enseñanzas de mis compañeros de laboratorio y colegas, Dr. *Omar Peralta*, Dra. *Wylma Perez*, Dr. *Ulises Carrasco*, Dra. *Leyda Cortez* y Dra. *Vanessa Polania*.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT) por la beca de manutención que me otorgó durante 2014-2019 para la realización de este trabajo y por los fondos económicos asignados a este proyecto.

Finalmente, un agradecimiento especial a mi familia y amigos que me acompañaron incondicionalmente en el camino *Cristina, Miguel Ángel, Miguel, Daniel, Rosario, Patricia, Ana, Cherry, Tavo, Ale y Vane*.

CONTENIDO

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE IMÁGENES	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN.....	13
MARCO TEÓRICO.....	15
Hongos que viven dentro de las plantas.....	15
Las comunidades de hongos endófitos son contexto-dependientes.....	16
La asociación de los hongos endófitos	18
¿Endófitos o patógenos?	20
Las endobacterias y los micovirus pueden modular el endofitismo	21
El metabolismo secundario y el endofitismo	25
Los terpenoides en las interacciones biológicas de los hongos	26
Los hongos endófitos de plantas medicinales producen importantes moléculas terapéuticas.....	28
Podofilotoxina.....	31
Los alcaloides Vinca	32
La camptotecina	32
Ácido fusídico	33
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS GENERALES.....	35
CAPÍTULO 1. HONGOS ENDÓFITOS DE <i>Taxus</i> , <i>Salvia ballotiflora</i> y <i>Krameria cystioides</i> . AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	36
1.1 OBJETIVOS PARTICULARES	36
1.2 MÉTODOS.....	37
1.2.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS	37
1.2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	43
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
Aislamiento y caracterización de los endófitos de <i>Taxus</i> , <i>Salvia ballotiflora</i> y <i>Krameria cystioides</i>	45
Sobre los hongos aislados y la diversidad de los hongos identificados	50
Actividad antimicrobiana de los endófitos aislados.....	59

Endófitos de <i>Salvia ballotiflora</i>	61
Endófitos de <i>Krameria cystisoides</i>	63
Endófitos de <i>Taxus</i> y la producción de taxol fúngico.....	64
1.4 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
1.5 CONCLUSIONES	68
CAPÍTULO 2 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE <i>Pestalotiopsis microspora</i> Y BÚSQUEDA DE TAXOL FÚNGICO	69
2.1 OBJETIVOS PARTICULARES	69
2.2 MÉTODOS.....	70
2.2.1 Determinación de la actividad citotóxica de extractos de <i>P. microspora</i>	70
2.2.2 Establecimiento de los métodos analíticos para la búsqueda de taxol fúngico..	73
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
Actividad citotóxica de los extractos de <i>P. microspora</i>	77
Métodos analíticos para la búsqueda de taxol fúngico.....	81
2.4 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	89
2.4 CONCLUSIONES	90
CAPÍTULO 3. EXPLORACIÓN DE LAS CONDICIONES DIFERENCIALES DE PRODUCCIÓN DE TAXOL FÚNGICO	91
LA VÍA DEL METIL JASMONATO REGULA LA PRODUCCIÓN DE TAXOL EN <i>Taxus</i> spp.	92
¿QUE REGULA LA BIOSÍNTESIS DE TAXOL EN HONGOS?.....	95
ANEXOS	98
REFERENCIAS	108

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Antagonismos balanceados de los hongos endófitos.....	20
Ilustración 2. A) <i>B. rhizoxinica</i> y un narnavirus son esenciales en la esporulación y la patogenicidad de <i>R. microsporus</i> . B) La infección con microvirus puede modular el endofitismo y la patogenicidad	23
Ilustración 3 Características morfológicas de un individuo de <i>Taxus globosa</i> Schltdl. (Thomas 2019)	38
Ilustración 4. Configuración de las regiones de ADN ribosomal de hongos.....	47
Ilustración 5. Estructura química de los taxanos usados (Fuente: PubChem).	74
Ilustración 6. Espectro de masas del estándar de taxol	85
Ilustración 7. Principales pasos en la biosíntesis del taxol en <i>Taxus</i> spp.	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de los hongos infectados con virus en las plantas hospederas	24
Tabla 2. Ejemplos de hongos endófitos que producen compuestos usados en medicina humana.....	29
Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación de los ITS.....	42
Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas para el ensayo de actividad antibacteriana	44
Tabla 5. Hongos endófitos identificados.....	51
Tabla 6. Relación de hongos endófitos aislados de diferentes tejidos de <i>Taxus</i> spp.....	55
Tabla 7. Relación de hongos endófitos aislados de diferentes tejidos de <i>Salvia</i> spp.	57
Tabla 8. Material biológico utilizado para determinar la citotoxicidad de los extractos.....	71
Tabla 9. Actividad citotóxica de compuestos de <i>Pestalotiopsis</i> spp.	80
Tabla 10. Resumen de la actividad citotóxica de tres policétidos de <i>P. microspora</i>	81
Tabla 11. Relación de mezclas de solventes para la TLC.....	82
Tabla 12. Resumen del análisis algunas corridas de LC-MS	86
Tabla 13. Morfotipos aislados por planta.....	98
Tabla 14. Actividad antimicrobiana de los hongos endófitos	99
Tabla 15. Extractos obtenidos a partir de cultivos líquidos de <i>P. microspora</i>	99
Tabla 16. Medio MID para la producción de taxol fúngico	102
Tabla 17. Medio M2D para la producción de taxol fúngico	102
Tabla 18. Medio S7 para la producción de taxol fúngico	102
Tabla 19. Medio GF para producción de taxol fúngico	103
Tabla 20. Medio RMPI para mantenimiento de las líneas celulares	103
Tabla 21. <i>Escherichia coli</i> ATCC®25922. Diámetros de zona de inhibición de la prueba de susceptibilidad a antibióticos por difusión en disco	104
Tabla 22. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25923. Diámetros de zona de inhibición de la prueba de susceptibilidad a antibióticos por difusión en disco	105
Tabla 23. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®9027. Diámetros de zona de inhibición de la prueba de susceptibilidad a antibióticos por difusión en disco	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de los morfotipos aislados por planta.....	46
Figura 2. Proporción de aislados dependientes/no dependientes del extracto de la planta hospedera.....	47
Figura 3. Actividad antibacteriana de algunos endófitos del Tejo El Chico.....	59
Figura 4. Actividad antibacteriana de algunos endófitos del Tejo Ponferrada	60
Figura 5. Actividad antibacteriana de algunos endófitos del <i>Salvia ballotiflora</i>	60
Figura 6. Actividad antibacteriana de algunos endófitos del <i>Krameria cystisoides</i>	61
Figura 7. Actividad citotóxica contra células HCT-15	78
Figura 8. Actividad citotóxica contra células MCF-7	78
Figura 9. Extractos citotóxicos	79
Figura 10. Porcentajes de recuperación de taxanos durante la extracción en fase sólida	85

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Amplicones del gradiente de temperatura de alineamiento de las cepas MR10 y ER01.	48
Imagen 2. Amplicones para ITS de ER01 y MR10 a temperatura de alineamiento de 51 °C	49
Imagen 3. TLC de algunos extractos y los tres estándares.....	83
Imagen 4. Cromatograma típico de los estándares de taxol, bacatina III y 10-desacetilbacatina III.....	84
Imagen 5. Inyección de extracto de <i>P. microspora</i> . Columna C18, µBondapak C18, 10 µm, 3.9 x 300 mm. Waters. Gradiente de elución: 0-10 min, 20-50% de acetonitrilo; 10-40 min, 50-80 % de acetonitrilo y 40-50 min, 80-20 % de acetonitrilo.....	100
Imagen 6. Inyección de extracto del endófito MR10. Columna C18, µBondapak C18, 10 µm, 3.9 x 300 mm. Waters. Gradiente de elución: 0-10 min, 20-50% de acetonitrilo; 10-40 min, 50-80 % de acetonitrilo y 40-50 min, 80-20 % de acetonitrilo.....	101
Imagen 7. Inyección de extracto del endófito ER01. Columna C18, µBondapak C18, 10 µm, 3.9 x 300 mm. Waters. Gradiente de elución: 0-10 min, 20-50% de acetonitrilo; 10-40 min, 50-80 % de acetonitrilo y 40-50 min, 80-20 % de acetonitrilo.....	101
Imagen 8. Cromatograma y lista de masas del estándar de taxol	107

RESUMEN

Los hongos endófitos habitan en el interior de los tejidos vegetales sin causar síntomas de enfermedad. Se caracterizan por colonizar intermitentemente la planta hospedera y por establecer múltiples antagonismos balanceados, tanto con la planta hospedera como con otros endófitos y fitopatógenos. La asociación de estos hongos con su hospedero consiste en una serie de interacciones complejas y delicadas, que pueden conducir a fortalecer el sistema de defensa de la planta hospedera y, a su vez, darle una ventaja ecológica ante estrés biótico y abiótico, en comparación con los individuos no colonizados. Durante esta serie de interacciones se producen una variedad de metabolitos secundarios con funciones ecológicas aún desconocidas, pero con diversas aplicaciones en terapéutica humana y agricultura. Los estudios prospectivos de endófitos de plantas medicinales han adquirido relevancia en la última década ya que muchos de ellos producen los compuestos bioactivos de su planta hospedera de manera independiente. Uno de los metabolitos más relevantes producidos por hongos endófitos es el taxol, un diterpeno con actividad anticancerígena aprobado para el tratamiento de una diversidad de tipos de cáncer. En este trabajo se aislaron e identificaron hongos endófitos de *Salvia ballotiflora*, *Krameria cystisoides*, dos especies de tejo. Se testó la actividad antimicrobiana de 20 de los endófitos y se exploró la actividad citotóxica de una cepa comercial de *Pestalotiopsis microspora*. En paralelo, se exploraron las condiciones para la producción de taxol en cultivo líquido con esta cepa y se establecieron las técnicas para el análisis de taxol en extractos orgánicos de los caldos de cultivo. Estas actividades se dividieron en tres capítulos, el primero consistió en el aislamiento e identificación de los hongos endófitos. Adicionalmente, se determinó la actividad antibacteriana de algunos hongos aislados. El segundo capítulo describe la determinación de la citotoxicidad y el establecimiento de las técnicas analíticas para la búsqueda de taxol en extractos orgánicos de *Pestalotiopsis microspora*. Finalmente, en el tercer capítulo se presenta una revisión general sobre las condiciones de cultivo para la biosíntesis de taxol fúngico y su regulación, todo esto en el marco de algunas de las observaciones realizadas en los capítulos uno y dos. Como resultado final, se lograron aislar 130 morfotipos de

hongos endófitos, de los cuales 16 fueron identificados con base en el análisis de sus ITS (Internal Transcribed Sequences). Los morfotipos ML03, IHH e IBH mostraron la actividad antimicrobiana más elevada entre los hongos testados. Los extractos de *Pestalotiopsis microspora* obtenidos de los medios de cultivo M2D y S7 mostraron la citotoxicidad más alta.

ABSTRACT

Endophytic fungi inhabit the interior of plant tissues without causing disease symptoms. They are characterized by intermittently colonizing the host plant and by establishing multiple balanced antagonisms, both with the host plant and with other endophytes and phytopathogens. The association of these fungi with their host consists of a series of complex and delicate interactions, which can strengthen the defense system of the host plant and, in turn, give it an ecological advantage against biotic and abiotic stress, compared to uncolonized individuals. During this series of interactions, a variety of secondary metabolites are produced with yet unknown ecological functions, but with diverse applications in human therapeutics and agriculture. Prospective studies of endophytes of medicinal plants have gained relevance in the last decade since many of them produce the bioactive compounds of their host plant independently. One of the most relevant metabolites produced by endophytic fungi is taxol, a diterpene with anticancer activity approved for the treatment of a variety of types of cancer. In this work, endophytic fungi from *Salvia ballotiflora*, *Krameria cystisoides*, two species of yew. The antimicrobial activity of 20 of the endophytes was tested, and the cytotoxic activity of a commercial strain of *Pestalotiopsis microspora* was explored. In parallel, the conditions to produce taxol in liquid culture with this strain were explored and the techniques for the analysis were established. These activities were divided into three chapters; the first consisted of the isolation and identification of endophytic fungi. Additionally, the antibacterial activity of some isolated fungi was determined. The second chapter describes the determination of cytotoxicity and the establishment of analytical techniques for the search for taxol in organic extracts of *Pestalotiopsis microspora*. Finally, in the third chapter, a general review of the culture conditions for the biosynthesis of fungal taxol and its regulation is presented, all within the framework of some of the observations made in chapters one and two. As a result, 130 morphotypes of endophytic fungi were isolated, of which 16 were identified based on the analysis of their ITS (Internal Transcribed Sequences). The ML03, IHH, and IBH morphotypes showed the highest antimicrobial activity among the fungi tested.

The extracts of *Pestalotiopsis microspora* obtained from the M2D and S7 culture media showed the highest cytotoxicity.

INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos son un grupo de hongos filogenéticamente muy diverso que colonizan los tejidos vegetales de manera intermitente, conduciendo a interacciones tanto saprofitas como mutualistas con su planta hospedera (Stone 2005, Schouten 2019). Con base en la gran cantidad de estudios sobre aislamientos y caracterización de estos microorganismos, podemos distinguir dos grandes categorías de hongos endófitos, 1) los pertenecientes a la familia *Clavicipitaceae*, (llamados “clavicipitaceos”) y 2) los que no pertenecen a la familia *Clavicipitaceae* (llamados “no clavicipitaceos”). Los primeros están representados por los géneros *Epichloë* and *Neotyphodium*, que se caracterizan por tener pocas plantas hospederas y por transmitirse preferentemente de manera vertical, es decir, por las semillas. El segundo grupo comprende un vasto número de géneros de Ascomycota, Mucormycota y Basidiomycota (Rodriguez, White Jr et al. 2009). Se caracterizan por tener un amplio espectro de plantas hospederas y por colonizarlas discretamente. Los géneros que se aíslan más frecuentemente incluyen *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Aspergillus* y *Xylaria* (Rashmi, Kushveer et al. 2019), sin embargo, la frecuencia con la que se aíslan unas especies u otras puede variar, ya que dicha frecuencia puede estar influenciada por la genética y contexto específico de la planta hospedera, como son: el genotipo, el tejido muestreado, la estación de muestreo y la geografía (Fisher and Petrini 1987, Arnold 2007, Junker, Draeger et al. 2012, Brader, Compant et al. 2017). Dado el contexto evolutivo y ecológico de los hongos endófitos, es interesante el que, independientemente del género y especies aisladas, las cepas endófitas poseen características muy distintas a las cepas no endófitas (Arnold 2007).

La interacción de los hongos endófitos involucra un complejo intercambio de señales químicas entre los diferentes reinos de los seres vivos. Esta “conversación química” incluye la modulación de los mecanismos de defensa de la planta hospedera, la regulación los factores de virulencia fúngicos, así como interacciones antagonistas y cooperativas con otros miembros del microbioma (Chagas, Pessotti et al. 2018). De este modo, un balance delicado entre la planta hospedera, los hongos endófitos

y el resto del microbioma, conduce a plantas sanas (Schulz, Haas et al. 2015). Adicionalmente, se ha observado que la presencia de hongos endófitos ayuda a mantener la salud de las plantas, incluso en condiciones de estrés biótico y abiótico (Eid, Salim et al. 2019, Terhonen, Blumenstein et al. 2019). Como consecuencia de todas estas interacciones, los hongos endófitos producen una plétora de metabolitos que podrían estar involucrados en este dialogo bioquímico (Kramer and Abraham 2012). Son estas moléculas las que han llamado la atención de la comunidad científica debido su potencial aplicación en la agricultura y en la salud humana (Eid, Salim et al. 2019).

Los hongos endófitos se han considerado una fuente de nuevas moléculas terapéuticas. Esta capacidad para producir gran variedad de metabolitos secundarios podría atribuirse a que el estilo de vida endofítico favorece la innovación en el metabolismo secundario. La evidencia nos muestra que el estilo de vida endofítico: 1) favorece la expansión de genes que diversifican el metabolismo secundario, 2) induce la expresión de estos genes y por lo tanto la producción de ciertos metabolitos secundarios y, 3) utiliza el metabolismo secundario como un apoyo en el establecimiento de una simbiosis con la planta hospedera (Zhou, Li et al. 2018).

El presente trabajo se dividió en tres capítulos: el primero consistió el aislamiento de los hongos endófitos de dos plantas medicinales donadas por el equipo de investigación de la Dra. María Salud Pérez de la UAM-X, y dos especies de tejo, además de la determinación de la actividad antibacteriana de 20 aislados; en el segundo se describen 1) la determinación de la actividad citotóxica de extractos orgánicos de *P. microspora* ATCC 11816, 2) la exploración de las condiciones de cultivo para la producción de taxol y otros taxanos por el mismo hongo y, 3) el establecimiento de las técnicas de análisis de los taxanos; en el tercer capítulo se presenta un panorama general actualizado al 2021 sobre las condiciones de cultivo que influyen en la producción de taxol fúngico. La información presentada en este capítulo es de utilidad para el establecimiento de los experimentos planteados en las perspectivas futuras presentadas al final de los capítulos uno y dos.

MARCO TEÓRICO

Hongos que viven dentro de las plantas

Inicialmente, el termino endófito fue usado por De Bary, en 1866 para referirse a todos los organismos que viven en el interior de los tejidos de las plantas (Hide 2008). Más tarde, en un estudio de hongos endófitos foliares, se acotó el término para hacer referencia a los hongos que viven en las plantas en algún momento de su ciclo de vida y que pueden colonizar los tejidos vegetales sin causar daño aparente. Dentro este grupo se incluyeron a los patógenos latentes, que pueden vivir en la planta hospedera asintóticamente por un tiempo (Petrini 1991). Debido a que el uso de este término se volvió muy popular y a que la acumulación de conocimiento sobre estos organismos aumentaba rápidamente, surgieron las confusiones con respecto a los que si se clasificaba como endófito y lo que no (Wennström 1994). Por dicha razón, en 1995, Wilson aclaró algunas confusiones y el mal uso del término “endófito”, de tal manera que enfatizó el hecho de que estos hongos colonizan los tejidos internos de las plantas, pero siempre sin provocar síntomas de enfermedad, definiendo a los hongos endófitos en términos de la naturaleza de su asociación con las plantas (Wilson 1995). En consecuencia, este tipo de hongos incluye todo el espectro de asociaciones entre las plantas y los hongos: parasitismo, comensalismo y mutualismo (Stone 2000). En la actualidad podemos destacar tres aspectos que definen a los hongos endófitos:

1. Colonizan las plantas de manera discreta y por un largo tiempo.
2. La colonización cesa temporalmente.
3. La colonización se reanuda debido a cambios fisiológicos o moduladores de la planta hospedera.

Aunque el endófito podría más adelante considerarse como un saprobio, un patógeno latente o un mutualista, es este crecimiento “episódico” lo que define el endofitismo (Stone 2005). Además, estos hongos se han encontrado en prácticamente todos los principales linajes de plantas terrestres, formando

pequeños ecosistemas dentro de ellas, y que las cepas de hongos endófitos son genéticamente distintas las cepas de hongos patogénicos (Schouten 2019).

Las comunidades de hongos endófitos son contexto-dependientes

Podemos dividir a los hongos endófitos en dos grandes grupos; el primero incluye a algunos miembros de la familia *Clavicipitaceae*, que agrupa hongos que colonizan pastos como simbiontes biotróficos obligados. Se ha demostrado que esta asociación aumenta la resistencia de estos pastos a diferentes tipos de estrés. *Epichloë* y *Neotyphodium* son los géneros más frecuentemente reportados de este grupo de endófitos. Otra característica destacable en ellos es que su espectro de hospederos es muy limitado y la transmisión se lleva cabo a través de las semillas. En contraste con el primer grupo, el segundo consiste en un conjunto de hongos filogenéticamente muy diverso de los filos Ascomycota, Mucormycota, y Basidiomycota, tienen un espectro de hospederos muy amplio y su transmisión es típicamente horizontal (Kuldau and Bacon 2008, Rodriguez, White Jr et al. 2009). Este trabajo se centra en el segundo de los grupos; por lo tanto, en adelante cuando se haga referencia a “hongos endófitos” haremos referencia a los que no pertenecen a la familia *Clavicipitaceae*.

Como se mencionó anteriormente, son un grupo filogenéticamente muy diverso. Se han encontrado viviendo dentro de prácticamente todas las plantas estudiadas hasta hoy formando pequeñas comunidades. En orden descendente, los géneros más frecuentemente reportados son *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Aspergillus* y *Xylaria* (Rashmi, Kushveer et al. 2019), aunque otros estudios apuntan a *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Leptosphaerulina*, *Nigrospora*, *Phoma*, *Phomopsis* y *Xylaria* (Zheng, Qiao et al. 2016). Muchos de estos géneros pueden colonizar al mismo tiempo los tejidos vegetales y su abundancia y diversidad dependen del contexto ecológico (Rana, Kour et al. 2019).

Tanto la diversidad como la especificidad y la especialización de las poblaciones de hongos endófitos están influenciadas por el genotipo y el estado fisiológico de la

planta hospedera, los tejidos muestreados, la época de muestreo y la geografía del hábitat de la planta (Arnold 2007). En relación con la influencia de la geografía, en un estudio sobre tres plantas nativas de Hawái que co-habitan a lo largo de un gradiente de altura (*Leptecophylla tameiameiae*, *Marchantia polymorpha*, *Vaccinium reticulatum*), se observaron diferentes patrones de diversidad y especialización de los hongos endófitos foliares con respecto a la elevación a la que habitan estas tres plantas hawaianas:

- a) En los extremos de la elevación hay una mayor diversidad y una menor especialización en las interacciones de las comunidades de hongos endófitos con su planta hospedera.
- b) La menor diversidad, pero la mayor especialización se observa en la elevación media.

En otras palabras, en los extremos de la elevación, las interacciones de las comunidades son menos específicas con sus hospederos y la diversidad de las poblaciones de endófitos es mayor (Cobian, Egan et al. 2019). Cuando se estudió la diversidad de especies de las comunidades de endófitos de la planta medicinal de los Himalayas *Glycyrrhiza glabra*, se observó que la localización geográfica influye en el reclutamiento de las comunidades de endófitos por la planta hospedera y que existen claras diferencias en la diversidad de especies dependiendo del clima. En este caso, la mayor riqueza de especies se observó en el clima subtropical (Arora, Wani et al. 2019). Similarmente, el análisis de 1400 hongos endófitos foliares de bosques desde boreales hasta tropicales mostró una alta riqueza de especies fúngicas en las hojas de manera general, en este caso se observaron estos dos patrones (Arnold and Lutzoni 2007) :

- a) Pocas especies y muchas clases en los bosques boreales y,
- b) muchas especies y pocas clases en los bosques tropicales.

De manera similar a los endófitos de las raíces, la evidencia muestra que la diversidad y la riqueza de las especies en las poblaciones de hongos endófitos foliares están influenciadas por el contexto ambiental (Oita, Ibáñez et al. 2021) , pero además por la edad del árbol hospedero, observándose mayor diversidad y

riqueza de especies en los árboles más longevos (Arnold, Mejía et al. 2003, Yu, Ding et al. 2021).

Adicionalmente, otros aspectos específicos contribuyen en la estructuración de estas comunidades, por ejemplo, la disponibilidad de algunos nutrientes, de agua o la acumulación de ciertos metabolitos secundarios en las plantas hospederas (Dang, Zhang et al. 2021), o incluso de las proporciones físicas de la planta hospedera. Este último aspecto se estudió en diversas especies de pinos donde se observaron patrones de poblaciones de endófitos con relación a la especie, del espacio disponible y de la altura del tronco (Wang, Ren et al. 2019).

Además de los patrones de diversidad y estructura de las poblaciones, entre individuos (plantas hospederas) en diferentes contextos ecológicos se han observado diferencias más sutiles entre los tejidos de una misma planta hospedera. Así, aunque podemos encontrar ciertas especies de hongos habitando simultáneamente varios tejidos de un individuo se cree que estas cepas son genéticamente distintas, en otras palabras, la diversidad de las comunidades de un solo individuo es a nivel de genotipo. Aunque aún no hay estudios específicos donde se analicen todos los genomas de todos los endófitos de los diferentes tejidos y demuestren estas diferencias explícitamente, los estudios funcionales de hongos endófitos foliares y de raíces sostienen estas hipótesis. Es importante no perder de vista que la colonización de los tejidos de la planta hospedera se lleva a cabo en contextos substancialmente distintos, por ejemplo, las hojas son bioquímicamente más dinámicas que las raíces o la corteza, debido a que están más expuestas al daño ambiental a que juegan un papel crítico en la fotosíntesis (Arnold 2007).

La asociación de los hongos endófitos

Dentro de un ecosistema, algunos organismos interactúan positivamente en beneficio uno del otro (mutualismo), neutral o negativamente causando enfermedades o compitiendo por los recursos. Los hongos endófitos logran una asociación íntima, pero de un balance delicado, con su planta hospedera. En las primeras etapas de este acercamiento los dos organismos desencadenan un

complejo conjunto de respuestas que incluyen la evasión/supresión de los mecanismos de defensa de la planta hospedera, regulación de los factores de virulencia fúngicos y la mediación de la coexistencia de los hongos endófitos con otros hongos y bacterias que viven en la planta hospedera (Mattoo and Nonzom 2021). Así, el hongo endófito regula a la baja algunos mecanismos y produce metabolitos secundarios o mediadores químicos que le permiten lidiar con el resto del microbioma. El mantenimiento de esta serie de interacciones, o equilibrios múltiples, conduce a un conjunto de “antagonismos balanceados” que contribuyen a la salud de la planta hospedera (Schulz, Rabsch et al. 2019) (Ilustración 1). A diferencia de los hongos patógenos que continúan produciendo factores de virulencia después de la colonización de la planta, es precisamente la regulación a la baja en la producción de factores de virulencia lo que permite a los hongos endófitos habitar en el interior de las plantas sin provocar síntomas aparentes de enfermedad (Chagas, Pessotti et al. 2018). El desequilibrio de esta compleja relación del microbioma endófito y la planta puede comprometer su salud y transformar la relación mutualista del hongo endófito con la planta en una interacción patogénica (Steinert, Hentschel et al. 2000, Kogel, Franken et al. 2006). En las primeras etapas de la colonización, el destino de la interacción ya sea patogénica o endofítica, dependerá de las adaptaciones del hongo a un órgano específico, de su virulencia innata, del estado fenológico y respuesta de la planta hospedera y de factores ambientales (Schulz and Boyle 2005, Schulz, Haas et al. 2015, Schulz, Rabsch et al. 2019).

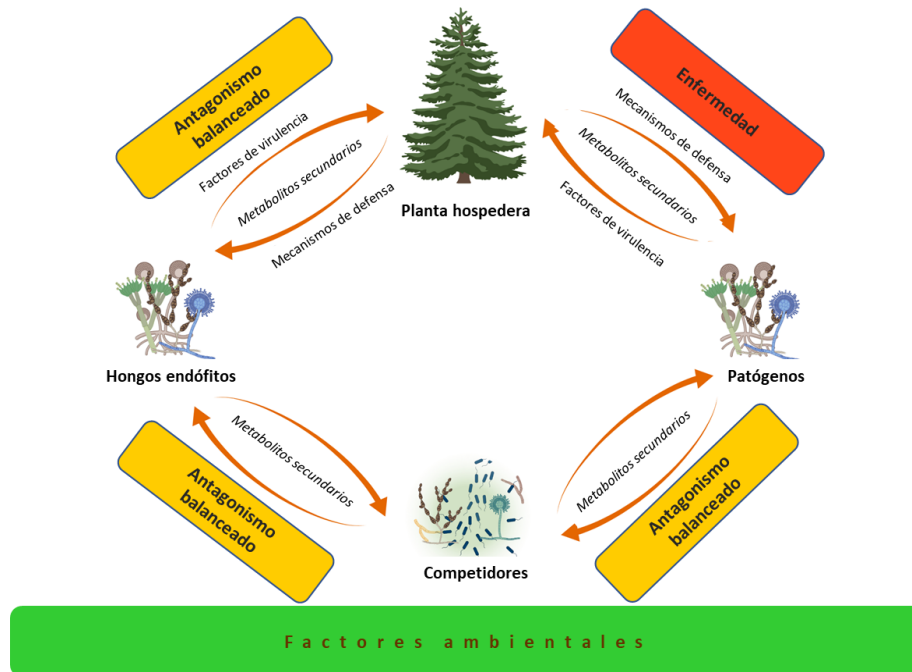


Ilustración 1. Antagonismos balanceados de los hongos endófitos

¿Endófitos o patógenos?

Estudios de los endófitos de *Arabidopsis thaliana* (Junker, Draeger et al. 2012) y *Marchantia polymorpha* (Nelson, Hauser et al. 2018) mostraron que:

- Los hongos endófitos de una planta sana pueden mostrar un comportamiento patogénico muy agresivo contra su misma planta hospedera cuando se prueban *in vitro* después del aislamiento.
- La mayoría de los endófitos promueven el crecimiento de su planta hospedera en experimentos *in vitro*.
- Algunos de los endófitos aislados pertenecientes al mismo género y aislados de un mismo individuo tienen efectos (*in vitro*) muy variados en la planta hospedera (positivos, negativos o neutros).

Muchos hongos endófitos pertenecen a especies de hongos típicamente patógenos o saprobios. En muchas plantas se ha observado que sus endófitos son capaces de causarle enfermedad cuando las condiciones ambientales cambian. Como se

explicó anteriormente, el destino final de la relación hongo-planta es complejo y multifactorial. Además de todos los factores ambientales, es importante no perder de vista que hay una clara diferencia funcional entre las cepas endófitas y las cepas patógenas y que estos dos tipos de cepas comúnmente co-existen en una sola población (Demers, Gugino et al. 2015, Brader, Compant et al. 2017). Por ejemplo, un estudio con 181 cepas patógenas de *Fusarium verticillioides*, aislados de plantas de maíz de diferentes campos de cultivo y en diferentes estados de crecimiento de la planta, demostró que el estado fenológico de las plantas de maíz regulaba el comportamiento fitopatogénico de la población de *F. verticillioides*, incluso “transformando” este patógeno en mutualista. Se demostró que es precisamente este estado fenológico el que actúa como presión selectiva en favor de la planta, en otras palabras este conjunto de factores ambientales y fisiológicos seleccionaron los genotipos que favorecían a la planta, los genotipos endófitos (Venturini, Assante et al. 2013). Este escenario podría complicarse si sumamos otros aspectos a la variabilidad del comportamiento de estas poblaciones típicamente patógenas, por ejemplo el genotipo de planta hospedera (Mandyam, Roe et al. 2013, Aguilar-Trigueros and Rillig 2016), o la presencia de endo-mico-bacterias o micovirus que se ha demostrado modulan este tipo de comportamientos en los hongos (Muñoz-Adalia, Fernández et al. 2016, Bastías, Johnson et al. 2020).

Las endobacterias y los micovirus pueden modular el endofitismo

La presencia de bacterias en el interior de los hongos endófitos y fitopatógenos ha mostrado influir positivamente en el desempeño de estos hongos; de hecho, se ha demostrado que estas bacterias ayudan al hongo hospedero en el establecimiento de su relación, ya sea patogénica o mutualista, con su planta hospedera (Bastías, Johnson et al. 2020). Por ejemplo, la simbiosis entre *Burkholderia rhizoxinica* y el hongo fitopatógeno *Rhizopus microsporus* induce la producción de rizoxina, una potente micotoxina que causa la roya de las semillas del arroz (Scherlach, Partida-Martinez et al. 2006), y rizonina, un ciclopéptido hepatotóxico. Estas dos toxinas facilitan el establecimiento de la infección (Partida-Martinez, Looß et al. 2007).

Estudios más detallados de la biología de esta endobacteria revelaron que *B. rhizoxinica* posee un sistema de secreción tipo III que es esencial para el mantenimiento de la simbiosis bacteria-hongo y que el hongo necesita a su simbionte para esporular, lo que significa que este fitopatógeno necesita a la endobacteria para lograr establecer una infección exitosa (Lackner, Moebius et al. 2011). Una investigación más reciente introdujo un cuarto elemento a esta interacción, los narnavirus. En esta investigación se demostró que dos de estos virus son también necesarios para que la reproducción sexual de *R. microsporus* sea exitosa (Ilustración 2A) (Espino-Vázquez, Bermúdez-Barrientos et al. 2020).

En relación con los hongos endófitos, se ha notado un comportamiento similar, es decir la presencia de ciertas endobacterias mejora el desempeño del mutualismo entre la planta hospedera y el hongo. La mayoría de estas bacterias se han encontrado en los hongos endófitos foliares y en su gran mayoría pertenecen a los Proteobacteria (Hoffman and Arnold 2010). Por nombrar un ejemplo, la asociación de *Luteibacter* sp. con el hongo endófito *Pestalotiopsis* aff. *Neglecta* potencia la producción de la auxina ácido indol-3-acético (IAA) y por tanto mejora el crecimiento de la planta hospedera. Cabe mencionar que esta bacteria es incapaz de producir IAA en ausencia de su hongo hospedero (Hoffman, Gunatilaka et al. 2013).

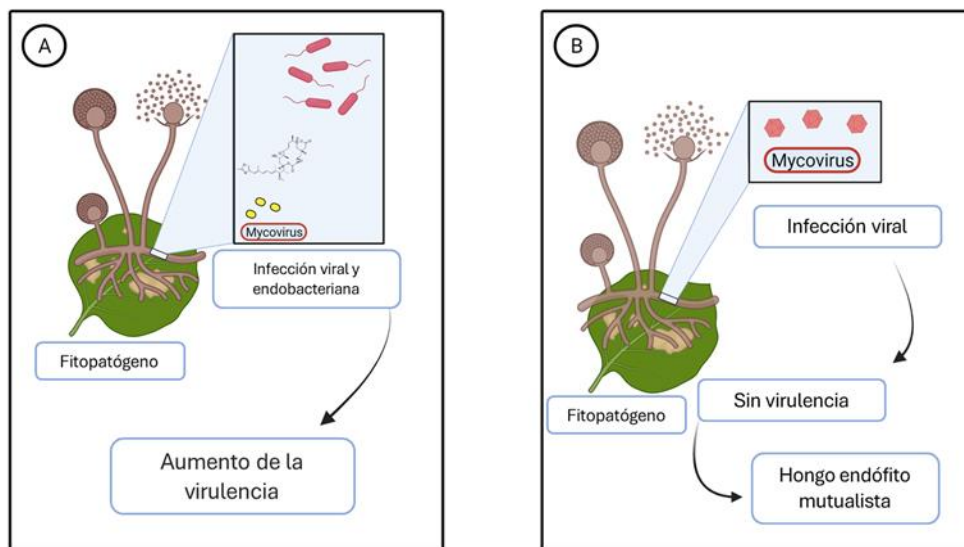


Ilustración 2. A) *B. rhizoxinica* y un narnavirus son esenciales en la esporulación y la patogenicidad de *R. microsporus*. B) La infección con micovirus puede modular el endofitismo y la patogenicidad

También los micovirus son comunes tanto en los hongos endófitos como en los fitopatógenos y, de hecho, la presencia de estos virus puede regular la virulencia de los hongos fitopatógenos (Ilustración 2B), con diferentes efectos en la planta hospedera (Tabla 1) (Xie and Jiang 2014). La infección de hongos fitopatógenos con ciertos virus se ha propuesto como una estrategia prometedora para el control de enfermedades fúngicas en ciertos cultivos. Sin embargo, el uso de estos micovirus está limitado, debido al poco entendimiento que tenemos hasta ahora sobre los mecanismos de transmisión entre diferentes especies, el impacto ecológico, la efectividad de su uso en campo y la persistencia en las poblaciones de hongos de suelo (Muñoz-Adalia, Fernández et al. 2016).

Más allá de la regulación de la virulencia, estudios recientes muestran como, por ejemplo, la presencia del virus SsHADV-1 de *Sclerotinia sclerotiorum*, un hongo fitopatógeno típicamente necrotrófico, lo convierte en un hongo endófito benéfico de su planta hospedera, *Brassica* (Ilustración 2B). Efectivamente, la infección del hongo con el virus condujo a un aumento en el rendimiento del cultivo y a mejoras en la resistencia del cultivo contra otros hongos patógenos (Zhang, Xie et al. 2020). Un comportamiento similar se observó cuando *Pestalotiopsis theae*, el fitopatógeno

de la planta del té (*Camellia sinensis*) está infectado por el PtCV1 (Zhou, Li et al. 2021).

Tabla 1. Efecto de los hongos infectados con virus en las plantas hospederas

Planta hospedera	Hongo endófito/patógeno	Micovirus	Efecto en el hongo/ planta hospedera	Referencia
<i>Camellia sinensis</i>	<i>Pestalotiopsis theae</i>	chrysovirus-1	Eliminación de la virulencia del hongo/conferencia de resistencia a enfermedades.	(Zhou, Li et al. 2021)
<i>Castanea dentata</i>	<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Cryphonectria hypovirus 1</i> (CHV1), <i>Cryphonectria parasitica</i> mitovirus 1 (CpMV1)	Hipovirulencia/no observado	(Shapira, Choi et al. 1991, Polashock and Hillman 1994)
Más de 64 géneros de plantas	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> hypovirulence-associated DNA virus 1 (SsHADV-1), Hubei sclerotinia RNA virus 1 (HuSRV1)	Hipovirulencia/promoción del crecimiento y rendimiento del cultivo y conferencia de resistencia a enfermedades	(Yu, Li et al. 2010, Azhar, Mu et al. 2019, Zhang, Xie et al. 2020)
<i>Cucumis sativus</i> , <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i> partitivirus 2 (BcPV2), <i>Botrytis cinerea</i> fusarivirus 1 (BcFV1)	Hipovirulencia/no observado	(Hao, Ding et al. 2018, Kamaruzzaman, He et al. 2019)
<i>Zea mays</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Double-stranded RNA (dsRNA)	Hipovirulencia/no observado	(Chu, Jeon et al. 2020)
<i>Dichanthelium lanuginosum</i>	<i>Curvularia protuberia</i>	<i>Curvularia thermal tolerance virus</i> (CThTV)	No observado/Conferencia de tolerancia al calor	(Redman, Sheehan et al. 2002, Márquez, Redman et al. 2007)
<i>Brassica napus</i>	<i>Leptosphaeria biglobosa</i>	Double-stranded RNA quadrivirus	Hipovirulencia/aumento de la resistencia a enfermedades	(Shah, Kotta-Loizou et al. 2020)

El metabolismo secundario y el endofitismo

Los productos de metabolismo secundario no son esenciales para el mantenimiento de las funciones mínimas necesarias para que el organismo viva, sin embargo, muchos juegan un papel importante en la interacción del organismo con otros miembros del ecosistema. Aunque actualmente desconocemos la función específica de la mayoría de los metabolitos secundarios, sabemos que tienen ciertas características generales (Demain and Fang 2000, Dewick 2009):

1. Muchos metabolitos secundarios son exclusivos de cierto grupo de organismos. Incluso algunos pueden ser específicos de una especie.
2. La mayoría se producen sólo bajo condiciones específicas de cultivo.
3. La producción de estos compuestos le da una ventaja competitiva en el ecosistema al organismo que los produce.
4. Muchos tienen actividades biológicas bien conocidas en otros organismos.

En el terreno de los metabolitos secundarios, los hongos endófitos son atractivos porque se consideran una fuente de nuevas moléculas con actividades farmacológicas diversas y aplicaciones en la agricultura (Rustamova, Bozorov et al. 2020). Esto es así porque se asume que las múltiples interacciones biológicas de los hongos endófitos (Ilustración 1) les confiere la capacidad para producir un arsenal de metabolitos, precisamente para mantener estas interacciones. Aunque la interacción tanto de fitopatógenos como mutualistas se lleva a cabo mediante un intercambio de señales químicas que incluyen gran cantidad de metabolitos secundarios (Chagas, Pessotti et al. 2018), estudios de genómica comparativa muestran un enriquecimiento de genes del metabolismo secundario en cepas de hongos endófitos en comparación con sus contrapartes fitopatógenas. Este es el caso del endófito mutualista de raíz *Colletotrichum tofieldiae* y el fitopatógeno *Colletotrichum incanum*. Estos estudios demostraron que el endófito evolucionó de un ancestro con un estilo de vida patógeno, quizás mediante cambios sutiles en el repertorio de genes en su genoma, específicamente reduciendo el conjunto de genes que promueven la infección fúngica y expandiendo los de proteínas relacionadas con el metabolismo secundario (Hacquard, Kracher et al. 2016). En

relación con la expresión de estos genes, un análisis de expresión genética de *Phomopsis liquidambari* durante la colonización de *A. thaliana*, reveló como genes del metabolismo secundario se sobreexpresan durante el estado endofítico del hongo (Zhou, Li et al. 2018). Una investigación más detallada indicó que los genes regulados a la alta fueron los de las enzimas farnesil difosfato farnesil transferasa, y la escualeno monooxigenasa, ambas enzimas involucradas en la biosíntesis de sesquiterpenoides y triterpenoides (Zhou, Li et al. 2017).

Los terpenoides en las interacciones biológicas de los hongos

Los terpenoides son moléculas de una diversidad química impresionante y representan el grupo más grande de productos naturales medicinales (moléculas bioactivas provenientes de animales, plantas y microorganismos). Hasta hace cinco años se habían caracterizado más de 80,000 terpenoides de plantas y microorganismos (Christianson 2017). Bioquímicamente se derivan de unidades de isopreno (C_5), de las rutas del mevalonato (MVA) y del metileritrol fosfato (MEP). De acuerdo a su esqueleto (C_5)_n se pueden clasificar como: hemiterpenoides (C_5), monoterpenoides (C_{10}), sesquiterpenoides (C_{15}), diterpenoides (C_{20}), sesterterpenoides (C_{25}), triterpenoides (C_{30}), y tetraterpenoides (C_{40}) (Gershenzon and Dudareva 2007, Dewick 2009). También podemos incluir a los meroterpenoides, que provienen parcialmente de las rutas de los terpenoides, aquí se incluyen por ejemplo a las furocumarinas, los retinoides y los alcaloides (Matsuda and Abe 2020).

El rol solo de algunos de estos compuestos en las interacciones entre organismos está documentado, aunque los detalles moleculares, en general, se desconocen (Gershenzon and Dudareva 2007). Los terpenoides volátiles representan el principal ejemplo de moléculas implicadas en la interacción entre organismos filogenéticamente muy distantes. Particularmente en hongos, se cree que juegan un papel central en la mediación de las interacciones hongo-planta hospedera y hongo-microbioma (Kramer and Abraham 2012, Farh and Jeon 2020). Se ha demostrado que los sesquiterpenoides volátiles participan en la comunicación entre bacterias,

hongos, plantas e insectos durante procesos de colonización, establecimiento de simbiosis o enfermedades; sin embargo, los mecanismos y determinantes de estas interacciones aún son desconocidos (Kramer and Abraham 2012, Ditengou, Müller et al. 2015). Lo que sí se sabe es que la emisión de mezclas de compuestos volátiles está relacionado con ciertas funciones ecológicas, por lo que en la práctica, el análisis de estas mezclas se ha usado para predecir diversas funciones ecológicas de los hongos, por ejemplo para saber si son micorrizas, patógenos o saprofitos (Müller, Faubert et al. 2013).

Entre los terpenos volátiles, el β -cariofileno, es uno de los más estudiados, debido a que tiene un efecto antagónico contra algunos patógenos de plantas (Huang, Sanchez-Moreiras et al. 2012), incluso puede actuar como promotor de crecimiento vegetal durante la asociación endofítica (Yamagiwa, Inagaki et al. 2011). Sin embargo, estos efectos no son generalizados, ya que bajo ciertas condiciones no se aprecia ni el efecto antagónico ni promotor de crecimiento (Bitas, McCartney et al. 2015). Estudios más complejos y realistas del papel ecológico de este compuesto han mostrado como la emisión de este sesquiterpenoide induce cambios globales en el microbioma de las plantas. Se sabe que, por ejemplo, *Bacillus amilolicuefaciens* induce la producción de β -cariofileno por sus plantas hospederas y su vez esto conduce a una modificación de toda la composición de bacterias rizosféricas de la planta. El mecanismo por el cual esto ocurre es desconocido, pero sabemos que el β -cariofileno induce la producción de grandes cantidades de ácido salicílico (Kong, Song et al. 2021) y que concomitantemente las raíces de las plantas emiten mezclas de compuestos orgánicos que estimulan la atracción de bacterias de los alrededores (Schulz-Bohm, Gerards et al. 2018). Adicionalmente, otros terpenoides y otras moléculas volátiles podrían estar induciendo directamente cambios en el metabolismo de los microorganismos endófitos, epífitos y del suelo. El análisis del metaboloma de compuestos volátiles de *Fusarium culmorum* mostró que varios de estos compuestos modulan la movilidad de dos bacterias rizosféricas *in vitro* (*Collimonas pratensis* Ter291 and *Serratia plymuthica* PRI-2C) (Schmidt, Etalo et al. 2016). El análisis de los transcriptomas confirmó cambios en la expresión de genes relacionados con la movilidad, la transducción de señales, la biogénesis

de la envoltura celular y la producción de metabolitos secundarios. Experimentos más detallados revelaron que al tiempo que estas bacterias “sensan” los compuestos volátiles del hongo, producen odorífero (Schmidt, Jager et al. 2017), un terpenoide volátil que se asume como una molécula de comunicación bacteriana a larga distancia (Kai and Piechulla 2018). Estos hallazgos ponen en evidencia la comunicación química a larga distancia entre hongos y bacterias (Schmidt, Etalo et al. 2016, Schmidt, Jager et al. 2017). Otros estudios aportan más evidencia sobre este intercambio de información a través de metabolitos secundarios entre planta-rizosfera (Lin, Owen et al. 2007), bacteria-bacteria (de la Porte, Schmidt et al. 2020), y bacteria-protista (Schulz-Bohm, Geisen et al. 2017).

En suma, sabemos que ciertas mezclas de terpenoides y otros metabolitos secundarios de hongos benéficos pueden influir positivamente en la salud de las plantas (Yamagiwa, Inagaki et al. 2011, Hung, Lee et al. 2013, Lee, Yap et al. 2016), por ejemplo:

1. Mejoran la talla de la planta.
2. Aumentan el número de raíces laterales.
3. Estimulan la floración.
4. Mejoran el rendimiento de los cultivos.
5. Inducen resistencia a fitopatógenos.

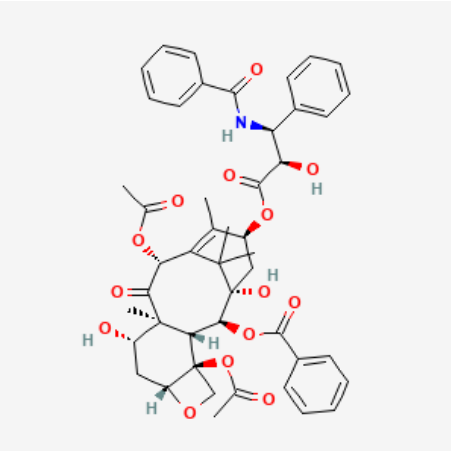
Por lo anterior, es esencial conocer los mecanismos moleculares y los principios biológicos que dirigen las diversas interacciones entre los hongos endófitos, las plantas y el resto de microbioma, así como lograr un manejo de cultivos inteligente y amigable con el ambiente (Kaddes, Fauconnier et al. 2019, Farh and Jeon 2020).

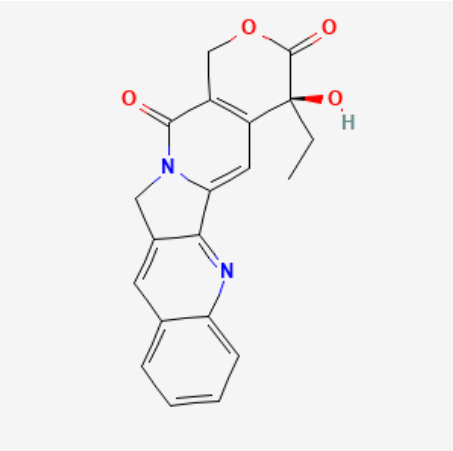
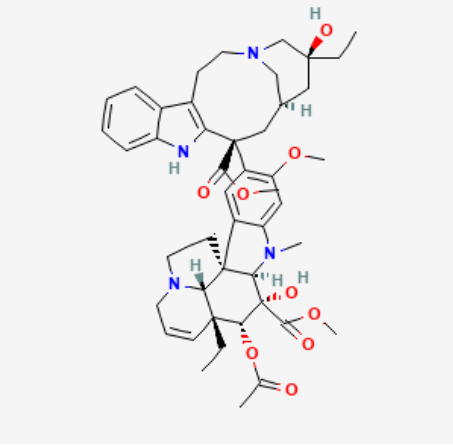
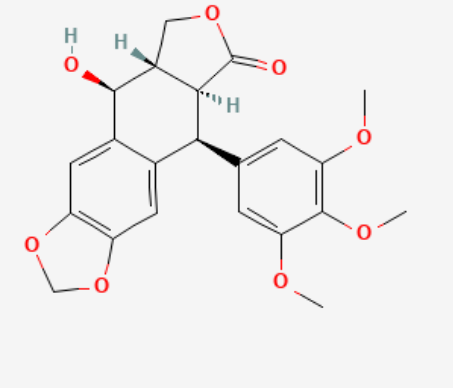
Los hongos endófitos de plantas medicinales producen importantes moléculas terapéuticas

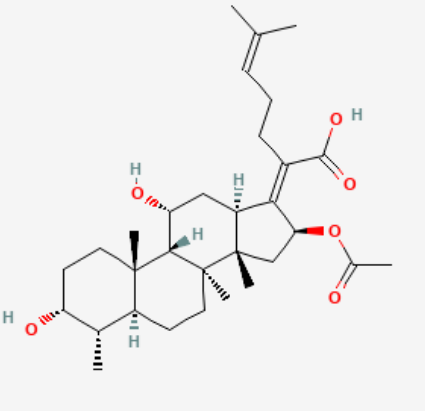
Aunque muchos microorganismos de diferentes nichos ecológicos producen metabolitos secundarios con actividades terapéuticas muy variadas (Demain 1999, Bérdy 2005), los hongos endófitos de plantas medicinales han llamado la atención

por la variedad de moléculas bioactivas de importancia en la medicina y en la agricultura que son capaces de producir, incluso en condiciones de laboratorio. Por nombrar algunos ejemplos, la diversidad de metabolitos que producen incluye desde reguladores del crecimiento vegetal, moléculas antagonistas de fitopatógenos hasta anticancerígenos, antibióticos y antivirales. Se ha estudiado durante décadas la capacidad de los hongos endófitos de importantes plantas medicinales para producir los mismos compuestos que su planta hospedera. En la Tabla 2 se muestran ejemplos representativos de hongos endófitos de plantas medicinales productores de cuatro notables agentes anticancerígenos aprobados para uso en humanos, que originalmente fueron aislados de su planta hospedera (Gouda, Das et al. 2016): el paclitaxel, la podofilotoxina, los alcaloides Vinca (vinblastina y vincristina) y la camptotecina, originalmente producidos por *Taxus*, *Sinopodophyllum*, *Catharanthus roseus* y *Camptotheca*, respectivamente. También se incluye en la Tabla 2 el ácido fusídico ya que, aunque solo se ha detectado su producción en hongos, es uno de los últimos agentes antimicrobianos fúngicos ampliamente utilizados en el tratamiento de cierto tipo de infecciones cutáneas en humanos

Tabla 2. Ejemplos de hongos endófitos que producen compuestos usados en medicina humana

Nombre/Uso	Hongos endófitos representativos	Referencias
 Taxol/quimioterapéutico	<i>Aspergillus candidus</i>, <i>Chaetomella raphigera</i>, <i>Cladosporium cladosporioides</i>, <i>Cladosporium oxysporum</i>, <i>Lasiodiplodia theobromae</i>, <i>Penicillium aurantiogriseum</i>, <i>Periconia</i> sp., <i>Pestalotiopsis microspora</i>, <i>Pestalotiopsis versicolor</i>, <i>Phoma betae</i>, <i>Phomopsis</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Phyllosticta citricarpa</i>, <i>Phyllosticta melochiae</i>	(Strobel, Yang et al. 1996, Li, Sidhu et al. 1998, Kumaran, Muthumary et al. 2008, Kumaran, Muthumary et al. 2008, Gangadevi and Muthumary 2009, Kumaran and Hur 2009, Zhang, Zhou et al. 2009, Zhang, Zhou et al. 2009, Kumaran, Kim et al. 2010, Pandi, Kumaran et al. 2011, Kumaran, Choi et al. 2012, Yang, Zhao et al. 2014, Gokul Raj,

		Manikandan et al. 2015)
 Camptotecina/ quimioterápéutico	<i>Fusarium solani</i>, <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>Entrophospora infrequens</i>, <i>Trichoderma atroviride</i>, <i>Neurospora</i> sp., <i>Alternaria alstroemeriae</i>, <i>Alternaria burnsii</i>, <i>Alternaria</i> sp., <i>Alternaria alternata</i>, <i>Xylaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus niger</i>	(Puri, Verma et al. 2005, Rehman, Shawl et al. 2008, Kusari, Zühlke et al. 2009, Liu, Ding et al. 2010, Shweta, Zuehlke et al. 2010, Pu, Qu et al. 2013, Shweta, Gurumurthy et al. 2013, Musavi, Dhavale et al. 2015, Ran, Zhang et al. 2017, Aswini and Soundhari 2018, Mohinudeen, Kanumuri et al. 2021, Mohinudeen, Pandey et al. 2021)
 Vinblastina/ quimioterápéutico	<i>Alternaria alternata</i> sp, <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>Talaromyces radicus</i>, <i>Curvularia verruculosa</i>, <i>Botryosphaeria laricina</i>	(El-Sayed , Kumar, Patil et al. 2013, Palem, Kuriakose et al. 2015, Parthasarathy, Shanmuganathan et al. 2020, Bandara, Siriwardhana et al. 2021)
 Podofilotoxina/ quimioterápéutico	<i>Phialocephala fortinii</i> , <i>Alternaria tenuissima</i>, <i>Mucor fragilis</i>, <i>Trametes hirsuta</i>, <i>Alternaria</i> sp. <i>Fusarium solani</i>	(Yang, Guo et al. 2003, Eyberger, Dondapati et al. 2006, Puri, Nazir et al. 2006, Nadeem, Ram et al. 2012, Huang, Zhang et al. 2014, Liang, Zhang et al. 2015)

 Ácido fusídico/antibiótico	<i>Acremonium pilosum</i>	(Tian, Gao et al. 2021)
---	----------------------------------	--------------------------------

Podofilotoxina

La podofilotoxina es un metabolito anticancerígeno producido por diversas plantas, muchas de ellas con propiedades medicinales conocidas (Biswas, Biswas et al. 2020). Se considera antimitótico porque previene el ensamble de los microtúbulos en la mitosis, aunque también se ha reportado que algunos compuestos derivados poseen actividad inhibitoria de la topoisomerasa II durante el cáncer metastásico de pulmón (Utsugi, Shibata et al. 1996). La podofilotoxina es precursora de otras tres importantes moléculas quimioterapéuticas: etoposido, teniposido y fosfato de etoposido (Kumari, Singh et al. 2017). El etopósido es ampliamente usado para el tratamiento de varios tipos de cáncer y recientemente se propuso para el tratamiento junto con inmunosupresores en pacientes críticos con COVID-19 (Lovetrue 2020, M, L et al. 2020).

Se han reportado relativamente pocos hongos endófitos capaces de producir podofilotoxina, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 2. Todos estos hongos fueron aislados de plantas productoras de podofilotoxina pertenecientes a las familias *Berneriaceae* y *Cupressaceae*. Los rendimientos de este anticancerígeno en los cultivos fueron de 0.5-277 µg/g de masa seca (Biswas, Biswas et al. 2020). Se han reportado dos patentes relacionadas con la identificación de hongos productores de podofilotoxina, la producción y la recuperación de cultivos fúngicos (Torres-Mendoza, Ortega et al. 2020).

Los alcaloides Vinca

La vinblastina y la vincristina, conocidos como alcaloides Vinca, y sus derivados semisintéticos, vinorelbina, vindesina y vinflunina, son agentes quimioterapéuticos ampliamente utilizados en para el tratamiento de neoplasias hematológicas y linfáticas. Químicamente, los alcaloides Vinca son indol terpenoides que detienen la mitosis de dos maneras: 1) a bajas concentraciones inhiben la formación de los microtúbulos y, 2) a altas concentraciones inhiben la despolimerización de los microtúbulos (Martino, Casamassima et al. 2018). Son producidos por la planta venenosa *Catharanthus roseus*, originaria de Madagascar, aunque crece de manera silvestre en el centro y sur de México. Aquí se considera una especie venenosa para humanos y animales y en términos ecológicos se clasifica como invasora.

Como se aprecia en la Tabla 2, son pocos los hongos endófitos reportados como productores de estos compuestos. El estudio de su producción por cultivo con estos hongos se ha visto limitada debido a que la vinblastina y vincristina se sintetizan sólo bajo condiciones muy específicas de cultivo (El-Sayed , Palem, Kuriakose et al. 2015) y en algunos casos es necesaria la adición de agentes inductores de la producción (Bandara, Siriwardhana et al. 2021). Experimentalmente se ha observado que la presencia de ciertos hongos endófitos en *Catharanthus roseus* está relacionada con una mayor acumulación de estos terpenoides, por lo que se han utilizado para infectar plantas libres de endófitos y cultivos de células vegetales en suspensión para potenciar su acumulación en la planta hospedadora (Tang, Rao et al. 2011), este es el caso de los hongos endófitos *Curvularia* sp. CATDLF5 y *Choanephora infundibulifera* CATDLF6, que demostraron potenciar la producción de vindolina y regular positivamente genes de la planta relacionados con la biosíntesis de alcaloides (Pandey, Singh et al. 2016).

La camptotecina

Junto con el taxol y los alcaloides Vinca, la camptotecina, incluidos sus análogos, son las drogas quimioterapéuticas más importantes para el tratamiento de una variedad de tipos de cáncer. Químicamente es un terpen-alkalioide extraído de la corteza de *Camptotheca acuminata*, un árbol nativo de China (Wall, Wani et al.

1966). La camptotecina es precursora de dos moléculas análogas con mayor potencia anticancerígena, el topotecan y el irinotecan. A diferencia del taxol y los alcaloides vinca, que son inhibidores de la mitosis, la camptotecina y sus análogos son inhibidores de la topoisomerasa, específicamente las camptotecinas inhiben la topoisomerasa 1, una enzima detectada en altos niveles en muestras de cirugías de algunos tipos de cáncer (Wall and Wani 1995, Martino, Casamassima et al. 2018).

Para fines comerciales, la camptotecina se obtiene de *Camptotheca. acuminata* y *Nathapodyes nimmoniana* con rendimientos de hasta 0.3 % de peso seco (Padmanabha, Chandrashekar et al. 2006). La mayoría de los hongos endófitos productores de camptotecinas han sido aislados de estas dos plantas, aunque también se han reportado en otras plantas como *Piper betel*, *Miquelia dentata* y *Apodytes dimidiata* (Shweta, Zuehlke et al. 2010, Shweta, Gurumurthy et al. 2013, Aswini and Soundhari 2018). De los endófitos productores reportados (Tabla 2), los rendimientos más altos se obtuvieron en *Trichoderma atroviridae*, 197.82 µg/l (Pu, Qu et al. 2013). A pesar de que este rendimiento es alto para un hongo, aún se considera un rendimiento bajo para su explotación industrial (Kai, Wu et al. 2015).

Ácido fusídico

A diferencia de los cuatro compuestos descritos anteriormente, el ácido fusídico, primero, es un antibiótico, y segundo, no es típico de plantas, se descubrió en caldos de cultivo de un hongo, *Fusidium coccineum* (Godtfredsen, Jahnsen et al. 1962), aunque se reportó que la planta *Corchorus aestuans* también acumula este compuesto (Ramadevi and Ganapathy 2012). Químicamente es un triterpenoide tetracíclico con un esqueleto de fusidano, que detiene la síntesis de proteínas procariotas mediante la inhibición del factor de elongación EF-G (Wilson 2014). Este antibiótico es particularmente importante en el tratamiento de infecciones por estafilococos, incluyendo las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Verbist 1990).

Recientemente se reportó que el hongo endófito de *Mahonia fortunei*, *Acremonium pilosum*, produce ácido fusídico y tres de sus análogos 1) ácido 16-desacetil fusídico, 2) ácido 3 β ,20-dihidroxi-protosta-16,24-dien-29-oic (previamente reportados) y, 3) acremonidiol A (reportado por primera vez) (Tian, Gao et al. 2021). Unos pocos endófitos más de plantas como *Oryza rufipogon* (Zhang, Du et al. 2021) y *Anoectochilus setaceus* (Ratnaweera, Williams et al. 2014) (Tabla 2) han demostrado producir antibióticos de este tipo, incluyendo el ácido helvónico.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

Dada la importancia del taxol como agente quimioterapéutico de origen natural y la falta de conocimiento sobre los aspectos bioquímicos de producción de taxol en hongos endófitos, la motivación inicial de este trabajo fue estudiar la ruta de biosíntesis de taxol en hongos, con un enfoque transcriptómico (RNA-seq).

Para el estudio de la expresión diferencial mediante el enfoque RNA-seq, es crucial establecer las condiciones “diferenciales” *in vitro*. En este trabajo se planteó establecer las condiciones “diferenciales” como: “producción de taxol” y “no producción de taxol” mediante el uso de medios de cultivo reportados para la producción de taxol fúngico y de inductores. A su vez, para lograr lo anterior era clave conocer las condiciones estándar en las que se produce el taxol, sin embargo, fue complicado incluso establecer estas condiciones estándar de producción del diterpenoide en la cepa productora control *Pestalotiopsis microspora*. Para superar los retos anteriores, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Aislar, identificar y seleccionar hongos endófitos de dos tejidos y testar la producción de taxol por los mismos. Seleccionar al mejor para el experimento.
2. Establecer los métodos analíticos para determinar taxol a partir de caldos de cultivo.
3. Establecer las condiciones de producción de taxol tanto en *P. microspora* como en los hongos aislados.

Durante el transcurso del proyecto, se estableció una colaboración con el grupo “Fuentes naturales de compuestos con actividad biológica” de la UAM-X, liderado por la Dra. María Salud Pérez Gutiérrez, el cual se centra en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas de plantas medicinales. A partir de esta colaboración se donaron especímenes de *Salvia ballotiflora* y *Krameria cystisoides* de los cuales se aislaron sus hongos endófitos.

CAPÍTULO 1. HONGOS ENDÓFITOS DE *Taxus*, *Salvia ballotiflora* y *Krameria cystisoides*. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

1.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Con base en los censos de poblaciones de tejos en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México, buscar especímenes de tejos y recolectar muestras de hojas y ramas.
2. Aislar hongos endófitos de un presunto tejo del Parque Nacional El Chico y del Parque Nacional de Valdeza, Ponferrada, España.
3. Aislar hongos endófitos de hojas de *Salvia ballotiflora* y *Krameria cystisoides*.
4. Identificar a los hongos mediante el análisis de las secuencias de sus ITS.
5. Evaluar la actividad antibacteriana de extractos orgánicos de caldos de cultivo de los hongos.

1.2 MÉTODOS

1.2.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Muestreo de tejos en el Parque Nacional el Chico

Con base en los estudios de la Universidad Autónoma Chapingo, en los cuales se realizaron censos preliminares de la población de tejos juveniles y adultos en el Parque Nacional El Chico, en el estado de Hidalgo, se realizó la ubicación satelital de las coordenadas reportadas en dicho estudio y se eligió la zona más accesible para hacer una visita de campo para la búsqueda de especímenes de *Taxus globosa* (Chávez 2001, Zavala-Chávez, Soto-Hernández et al. 2001). Las características morfológicas de las hojas y frutos descritas en estudios previos se utilizaron para la identificación de los árboles.

Los especímenes se identificaron según las características morfológicas de la especie (Ilustraciones 3 y 4). De los árboles presuntamente identificados como *Taxus*, se tomaron tres muestras de hojas y ramas de la una altura de aproximada de 3 m de cada árbol, siempre sin dañarlos. Para hacer los cortes se usaron tijeras para jardín previamente esterilizadas en flama de alcohol y sanitizadas con etanol al 70 %.





Ilustración 3 Características morfológicas de un individuo de Taxus globosa Schltl. (Thomas 2019)

Las muestras de *Salvia ballotiflora* y *Krameria cystisoides* para el aislamiento de endófitos y la preparación de extractos vegetales metanólicos fueron amablemente donadas por la Dra. María Salud Pérez Gutiérrez, investigadora de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X). Estas dos plantas fueron colectadas en Las Comadres, Municipio de Guadalcázar estado de San Luis Potosí, e identificadas por el taxónomo José García Pérez. Un espécimen de cada una de las plantas se depositó en el Herbario Isidro Palacios de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Aislamiento de los hongos endófitos

Una vez que las muestras se llevaron al laboratorio, se mantuvieron a 4 °C hasta comenzar el siguiente procedimiento para todos los tejidos:

1. Se lavaron con abundante agua destilada estéril.

2. Se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2.5 % durante 10 min.
3. Se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces.
4. Se sumergieron en etanol al 70 % durante 5 minutos.
5. Se lavaron nuevamente con agua destilada estéril.
6. En el caso de las ramas se les retiró cuidadosamente la corteza con un bisturí estéril.
7. De manera independiente, las hojas, las ramas y la corteza se cortaron en trozos de aproximadamente 5 × 2 mm con un bisturí estéril.
8. Los trozos de material vegetal se colocaron en placas con medio PDA suplementado con estreptomycin y con un extracto metanólico de la planta hospedera (ver apartado siguiente).
9. Todas las placas se incubaron a 24 ± 2 °C en oscuridad, hasta observar crecimiento (de 4 a 21 días).

Conforme se fue observando la aparición de colonias, con la ayuda de un bisturí estéril se transfirió una punta de hifa a medio fresco hasta observar colonias puras.

Preparación del extracto metanólico de planta hospedera

Para la preparación de los extractos de la planta hospedera, se modificó la metodología propuesta por Cseke y colaboradores para la purificación de taxol de hojas de *Taxus* spp. (Cseke, Kirakosyan et al. 2016). El procedimiento fue el siguiente:

1. Las plantas se lavaron con abundante agua destilada y se eliminó el exceso de agua.
2. Se lavaron con etanol al 70 % y se secaron a temperatura ambiente.
3. Se maceraron 2 g de planta en un mortero con pistilo. En el caso de los tejidos del tejo, previo a la maceración las ramas pequeñas se trocearon en piezas lo más pequeñas posible.
4. Se agregaron 10 ml de metanol frío y se continuó la maceración.

5. El contenido del mortero se colocó en un tubo y se centrifugó a 6000 r.p.m. durante 10 min. Se utilizaron aproximadamente 5 ml más de metanol para limpiar el mortero.
6. Se recuperó el sobrenadante y se repitió la centrifugación (cuando fue necesario). Este paso se repitió hasta obtener un sobrenadante libre de sólidos suspendidos.
7. Para evaporar el metanol, el sobrenadante final se transfirió a un cristizador y se colocó en la campana de extracción durante aproximadamente 8 h.
8. El sólido se resuspendió en 5 a 7 ml de metanol frío para luego aforarlo a 10 ml con metanol frío.
9. El extracto se filtró con un filtro de nylon de 0.25 μm y se volvió a aforar con metanol frío.
10. Los extractos se almacenaron en un frasco ámbar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizó 1 ml de extracto para suplementar los medios de aislamiento y mantenimiento. La suplementación se realizó con el medio estéril y antes de solidificar en condiciones asépticas.

Mantenimiento y conservación de los aislados

Los cultivos axénicos cada cepa se recultivaron en PDA, sin extracto metanólico. Inicialmente, todos los cultivos puros se transfirieron a medio Power (ver Anexos) para producir esporas. Sin embargo, en la mayoría de los cultivos no se observó esporulación, por lo que se decidió mantener las cepas en PDA de la siguiente manera:

1. **Micelio en glicerol al 30 %:** A partir de una colonia en PDA se tomó un tozo de micelio y se inoculó en PDB (caldo de papa y dextrosa). Se incubó de 2 a 8 días (dependiendo la cepa) a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ausencia de luz. El cultivo se filtró con gasa estéril, el micelio se recuperó y se resuspendió en una solución de glicerol al 30 %. La mezcla se homogenizó y se guardaron alícuotas de 1 ml a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2. **Micelio en agua estéril:** Un trozo de micelio de aproximadamente 5 × 5 mm del cultivo puro se recultivó en una placa de PDA fresco. Se incubó de 2 a 8 días (dependiendo la cepa) a 26 °C, en ausencia de luz. Con la ayuda de un bisturí se cortaron trozos de micelio de aproximadamente 5 × 5 mm y se colocaron en el fondo de microtubos de 1.5 ml con 1 ml de agua destilada estéril.
3. **Resiembra periódica:** Un trozo de micelio de aproximadamente 5 × 5 mm del cultivo puro se recultivó en una placa de PDA fresco. Se incubó de 2 a 8 días (dependiendo la cepa) a 26 °C en ausencia de luz. Las placas se sellaron con “Parafilm” y se almacenaron a 4 °C. La resiembra se llevó a cabo cada 2 meses.

Identificación mediante el análisis de los ITS

En la Ilustración 4 de la página 47 se muestra la estructura del ADN ribosomal, con las regiones de los espaciadores transcritos internos (ITS, por sus siglas en inglés) incluidas. Las flechas en rojo indican la ubicación de los *primers* usados en este trabajo (Tabla 3). El amplicón esperado es de aproximadamente 600 pb, incluye las regiones ITS1, ITS2, 5.8S y parte de los genes ribosomales 18S y 28S.

Extracción de ADN

Las extracciones de ADN se realizaron según las especificaciones del kit comercial Wizard® DNA Purification (Promega), partiendo de macerados fúngicos que se prepararon de la siguiente manera:

1. A partir de un cultivo líquido de 2 a 7 días, dependiendo del hongo, se recuperó el micelio por filtración.
2. El micelio se lavó con aproximadamente 20 ml NaCl al 0.8 % estéril.
3. Se eliminó el exceso de líquido usando papel de filtro estéril
4. El micelio se colocó en un mortero con pistilo (ambos estériles y previamente enfriados), se agregó N₂ líquido y se maceró hasta obtener un polvo blanco fino.

5. El macerado se colocó en pequeñas cantidades (aproximadamente 100 µl) en tubos estériles de 1.5 ml (previamente enfriados a -70 °C) y se mantuvieron a esta temperatura hasta su uso.

El ADN se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop™2000 y se verificó la integridad del mismo en un gel de agarosa al 1 %. Se ajustó la concentración del ADN a 50 ng/µl.

Condiciones de PCR

La mezcla de PCR para 50 µl y las condiciones son las que se muestran en la Tabla 3

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación de los ITS

Reactivo	Volumen (μL)	Condiciones de amplificación
Agua libre de nucleasas	35.75	95 °C, 3 min 51 °C, 30 s 72 °C, 1 min 72 °C, 5 min 37 ciclos
dNTP mix	1	
MgCl2	5	
Buffer “Taq”	5	
ITS’ 5-R (0.2 μM)	0.5	
ITS5 (5’-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3’)		
ITS’ 4B-F (0.2 μM)	0.5	
ITS4b (5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’)		
ADN (50 ng/ μl)	2	
Taq polimerasa (5u/μl)	0.25	

Los amplicones se sometieron a una electroforesis en agarosa al 1.5 % y se purificaron según las especificaciones para el kit comercial Wizard® "SV Gel and PCR Clean-up System" (Promega). Los amplicones purificados se enviaron al servicio de secuenciación tipo Sanger en la empresa MacroGen. La calidad y edición de las secuencias se realizaron con el programa ChromasPro. Se eliminaron las lecturas de baja calidad de los extremos y las secuencias editadas se sometieron al análisis bioinformático "blastn" de la herramienta BLAST®.

1.2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

En esta etapa se determinó actividad antibacteriana de extractos metanólicos de caldos de cultivo de 21 hongos endófitos procedentes de las cuatro plantas.

Preparación de los cultivos y obtención de los extractos

Los 21 hongos seleccionados para esta prueba se cultivaron en placas de PDA durante 5 días. Se cortó un tozo de agar de la zona más joven de la colonia y se usó para inocular 50 ml de medio líquido M2D. Los matraces se incubaron a 120 r.p.m y 26 °C durante 4 días en la oscuridad. Los extractos se prepararon de la siguiente manera:

1. Se tomaron 20 ml del sobrenadante de cultivo y se centrifugaron a 6000 r.p.m. durante 30 min. Se recuperó el sobrenadante y se repitió el paso anterior.
2. El sobrenadante final se congeló a -70 °C en un ultra-congelador durante 24 h.
3. El congelado se sometió a liofilización hasta eliminar la totalidad del agua.
4. El liofilizado se resuspendió en 3 ml de metanol al 50 %. La suspensión se agitó en vortex hasta homogenizar la muestra.
5. La suspensión se dejó en reposo durante una noche.
6. Se agitó nuevamente hasta homogeneidad y se centrifugó a 600 r.p.m. durante 30 min.
7. Se recuperó el sobrenadante y se aforó a 3 ml con metanol al 50 %.
8. El volumen se redujo en un desecador a presión reducida durante una noche.
9. El extracto se resuspendió en 1 ml de DMSO al 30 % y se almacenó en refrigeración hasta su uso.

Determinación de la actividad antimicrobiana en placa

La determinación de la actividad antibacteriana se realizó con una adaptación del método de Difusión en Disco del Manual CLSI, Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing (2021). En el caso de las pruebas de control de calidad de las bacterias control, el método se desarrolló exactamente como indica el manual mencionado, utilizando discos de antibióticos con las concentraciones

especificadas para el control de calidad de las cepas de referencia. Se realizaron nueve repeticiones de cada antibiótico para cada bacteria. Una vez que estas cepas pasaron el control de calidad (Anexos), se testaron los extractos. Es importante mencionar que no hay tablas de control de calidad para todas las bacterias.

Cepas bacterianas

Las bacterias usadas fueron cepas de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC) en el segundo repique, es decir, de la segunda resiembra a partir de la cepa comercial original, Tabla 4. Este aspecto es vital para garantizar la susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas control y por tanto dar certeza a los resultados.

Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas para el ensayo de actividad antibacteriana

Material biológico	ID de Referencia
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Salmonella entérica</i>	ATCC 14028
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579

Preparación de los inóculos bacterianos

Las suspensiones bacterianas se prepararon por resuspensión directa de las colonias en solución salina, de la siguiente manera: se tomaron de una a cuatro colonias de la bacteria con un asa bacteriológica y se colocaron en un tubo con 3 ml de NaCl al 0.05 %. La suspensión se homogenizó en vortex durante 3 s y se midió la turbidez en un nefelómetro, ajustando con NaCl al 0.05 % hasta obtener una turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland.

Ensayo de actividad antibacteriana

Se prepararon placas de Agar Mueller-Hinton 24 h antes del ensayo. Pasadas las 24, se inocularon con las suspensiones bacterianas de la siguiente manera:

1. En el caso de las bacterias Gram negativas se tomó un hisopo estéril y se sumergió en la suspensión varias veces, para después presionarlo sobre las paredes del tubo, con el fin de eliminar el exceso de inóculo en el hisopo; en el caso de las Gram positivas el protocolo es idéntico, salvo que debe evitarse presionar el hisopo contra las paredes.
2. Las placas se inocularon deslizando el hisopo por la superficie del agar, rotando la placa 60° hasta obtener una distribución uniforme por toda la superficie. Las placas se dejaron reposar abiertas en el gabinete de bioseguridad durante 5 min para permitir la absorción del exceso de líquido.
3. Con la ayuda de unas pinzas estériles se colocaron en la superficie del agar discos de papel de filtro con celulosa estériles, de 0.51 mm de espesor.
4. Sobre los discos de papel se colocaron lenta y cuidadosamente 15 µl del extracto. Cada extracto se colocó en tres discos distintos en cada placa.
5. Las placas se dejaron abiertas durante 5 min. Posteriormente se incubaron 15 min a 4°C.
6. Finalmente, las placas se incubaron a 35 °C durante 20 h y se midió el diámetro de los halos de inhibición con un vernier.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y caracterización de los endófitos de *Taxus*, *Salvia ballotiflora* y *Krameria cystisoides*

Una vez que se observó la morfología colonial de cada aislado después de tres recultivos, se eliminaron los aislamientos con la misma morfología que pertenecían al mismo tejido y misma planta. Finalmente se obtuvieron un total de 130 morfotipos. Entiéndase por **morfotipo**, una morfología colonial específica (tamaño, textura, bordes, elevación, color, olor, u otra característica perceptible a simple vista) de un aislado de un tejido específico de una muestra de planta específica. En la Tabla 13

de los Anexos se concentraron el total de las claves de identificación final asignadas a cada morfotipo para cada planta estudiada. Como se observa en la *Figura 1*, el mayor número de morfotipos se obtuvo de *Kramería cystisoides*, seguido por el Tejo de El Chico, El Tejo de Ponferrada y en último lugar *Salvia ballotiflora*.

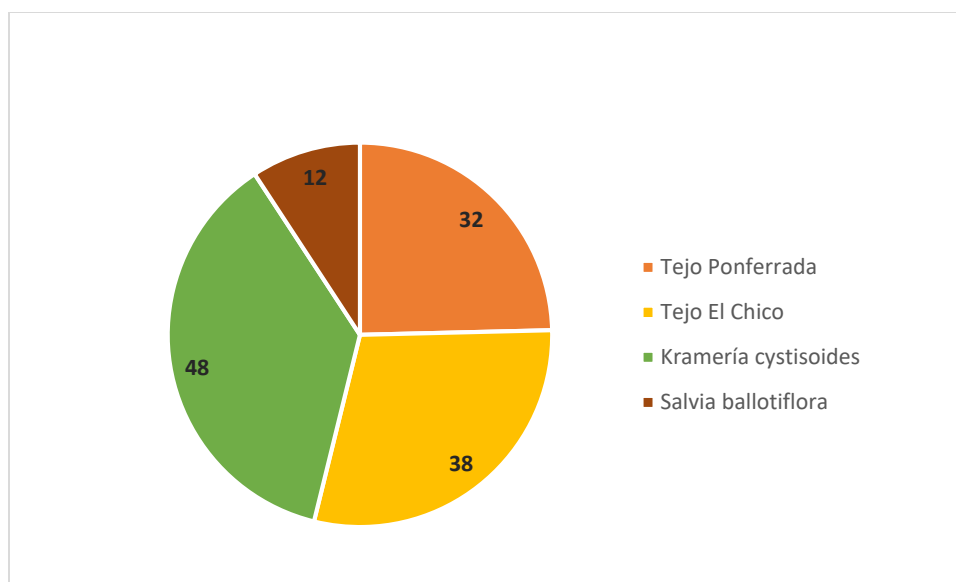


Figura 1. Representación gráfica de los morfotipos aislados por planta

En relación con el tiempo de crecimiento, y para fines prácticos, los hongos se dividieron en tres grupos. Inicialmente, esta clasificación fue útil para determinar el tiempo de incubación de cada grupo:

- De **rápido crecimiento**: Crecían de 3 a 5 días.
- De **lento crecimiento**: Crecían de 6 a 12 días.
- De **muy lento crecimiento**: crecían de 13 a 21 días.

Interesantemente, casi el total de los aislados de **lento crecimiento** y **muy lento crecimiento** no crecieron después del tercer recultivo en ausencia del extracto de su planta hospedera. En la Figura 2 se muestra una representación gráfica de las proporciones de endófitos que fueron dependientes o no dependientes del extracto de la planta hospedera.

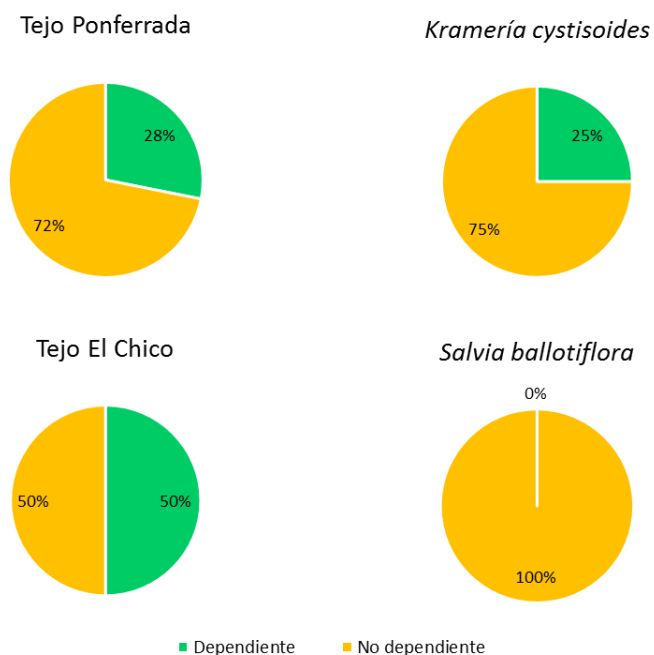


Figura 2. Proporción de aislados dependientes/no dependientes del extracto de la planta hospedera

Con los hongos sobrevivientes, es decir los que no dependían del extracto de planta hospedera, se realizó la identificación con base en el análisis de las regiones ITS1, 5.8S en ITS2 de los genes del ARN ribosomal, que se muestran en la Ilustración 4.

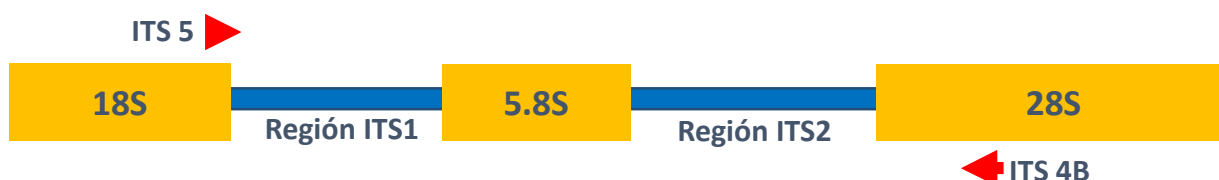


Ilustración 4. Configuración de las regiones de ADN ribosomal de hongos

Los amplicones de las cepas MR10 y EL01 obtenidos en un gradiente de temperatura (Imagen 1) se muestran como ejemplo de la estandarización de la temperatura de alineamiento en la PCR. Como se podrá notar, la temperatura óptima de amplificación fue de 51 °C, ligeramente distinta a las anteriormente reportadas (Ko, Hong et al. 1997). El resultado de la amplificación en estas condiciones se muestra en la Imagen 2, donde se observa la amplificación esperada de aproximadamente 600 bp.

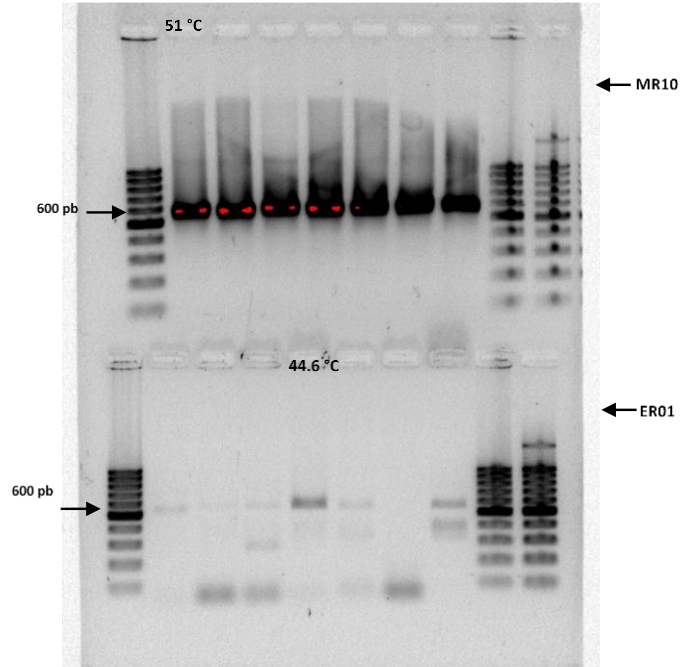


Imagen 1. Amplicones del gradiente de temperatura de alineamiento de las cepas MR10 y ER01.
(Gel de agarosa, 1.5 %, 80 V, 60 minutos).

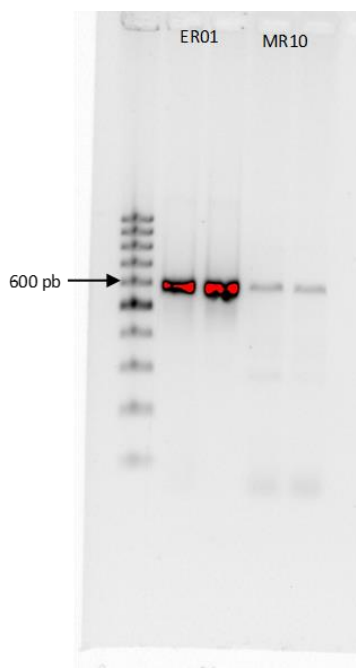


Imagen 2. Amplicones para ITS de ER01 y MR10 a temperatura de alineamiento de 51 °C (Gel de agarosa, 1.5 %, 80 V, 60 minutos)

Según lo esperado, la mayoría de las identificaciones se lograron hacer a nivel género, con algunas especies candidatas (Tabla 5). Estos resultados son consistentes con la mayoría de los estudios donde se usa el análisis de los ITS para la determinación de la diversidad fúngica, aunque es común en ciertos estudios de endófitos encontrar dificultades para la identificar hasta el nivel de especie. En este sentido, la resolución a nivel de especie y el éxito de amplificación en la PCR dependen de varios factores (Toju, Tanabe et al. 2012, Xu 2016):

1. De la **región a amplificar** que a su vez depende del par de “**primers**” usados para la amplificación. En nuestro caso, el par de “primers” incluye una parte del gen rARN de la subunidad grande 28S (Ilustración 4), lo que confiere un poco más de resolución para algunos grupos taxonómicos.
2. Del **grupo taxonómico** a identificar: el éxito de la amplificación y la confiabilidad del amplicón varían en algunos grupos taxonómicos, por ejemplo, pude llegar al 100 % de éxito para Pezizomycotina en donde se agrupan la mayoría de los ascomicetos, y Saccharomycotina, que incluye a

la mayoría de las levaduras. Por el contrario, para otros grupos taxonómicos como Mortierellomycotina, Mucoromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina, Entomophthoromycotina, Chytridiomycotina, Neocallimastigomycota y Blastocladiomycota, este porcentaje disminuye hasta el 65 %, y logrando identificaciones solo a nivel de género (Schoch, Seifert et al. 2012).

3. Ligado al punto anterior está el aspecto del **nicho ecológico** de estudio, es decir, hay ambientes donde se ha estudiado muy poco la diversidad fúngica, en los cuales hay especies aún desconocidas y en consecuencia poca información en las bases de datos para comparar. Uno de estos ambientes poco explorados es el interior de las plantas. Por ejemplo, según un análisis reciente de información de secuenciación masiva en las bases de datos públicas, la mayoría de las especies desconocidas de hongos son hongos asociados a líquenes y a tejidos de plantas (Baldrian, Větrovský et al. 2022).

Sobre los hongos aislados y la diversidad de los hongos identificados

Se ha observado que la cantidad de morfotipos y la diversidad de aislamientos son variables multifactoriales aun difíciles de predecir. En general, la cantidad de aislados y morfotipos depende de la cantidad de muestras por tejido, del número de plantas muestreadas y de asegurar la esterilización de la superficie exterior de los tejidos vegetales, para tener la certeza de que los hongos aislados efectivamente son endófitos (Oita, Carey et al. 2021). Obsérvese en las Tablas 5 y 6, que el número de aislados varía de 1 en un solo tejido hasta miles cuando se muestrean árboles de diversas localidades (Tabla 6). Con respecto al número de morfotipos, este varía entre géneros de plantas, tejidos, y otros factores que discutiremos más adelante, pero frecuentemente es mucho menor al número de aislamientos, por ejemplo, en el caso de los endófitos de *Taxus chinensis* var. *Mairei*, Wu et al. encontraron sólo 145 morfotipos seleccionados, de los 2442 aislados originales (Wu, Han et al. 2013). Un ejemplo más cercano podría ser de Rivera-Orduña y colaboradores, que aislaron 57 morfotipos de varias (los autores no especifican la cantidad) muestras de *Taxus globosa* (Rivera-Orduña, Suarez-Sanchez et al. 2011), un número más cercano al

número de aislamientos totales del Tejo de Ponferrada y del Tejo de El Chico (Figura 1).

Tabla 5. Hongos endófitos identificados

ID de aislamiento	Organismos con mayor % de similitud en BLAST	ID NCBI:	Identificación
Tejo El Chico			
MR08	<i>Periconia pseudobyssoides</i> (100) <i>Periconia byssoides</i> (100)	MN944517.1 MK907734.1	<i>Periconia</i> spp.
MR14	Uncultured Pleosporales (94.57) <i>Montagnula chiangraiensis</i> (89.39) <i>Herpotrichia striatispora</i> (97)	KP114363.1 MT214349.1 MW724120.1	----
MR13	<i>Alternaria blumeae</i> (100) <i>Alternaria</i> sp. (100) <i>Alternaria zinniae</i> (99.8)	MN612548.1 MK640610.1 LC440614.1	<i>Alternaria</i> spp.
MR10	<i>Xylaria cubensis</i> (100) <i>Colletotrichum</i> sp. (99)	GU373810.1 ON155414.1	-----
Tejo Ponferrada			
EL01	<i>Fusarium</i> sp. (99.8) <i>Fusarium tricinctum</i> (99.8) <i>Fusarium acuminatum</i> (99.8)	ON599031.1 ON566025.1 ON533534.1 ON054309.1	<i>Fusarium</i> spp.
ER08	<i>Fusarium oxysporum</i>	ON597617.1	<i>Fusarium oxysporum</i>
ER01	<i>Alternaria alternata</i> (99.28) <i>Alternaria angustiovoidea</i> (99.11)	MH553296.1 OM319822.1	<i>Alternaria</i> spp
Salvia ballotiflora			
IRH4	<i>Fusarium oxysporum</i> (100)	ON796002.1	<i>Fusarium oxysporum</i>
PRH4	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria tenuissima</i>	ON796496.1 ON796493.1	<i>Alternaria</i> spp.
PRH1A	<i>Fusarium oxysporum</i> (100) <i>Fusarium</i> sp. (100)	ON796001.1 ON514214.1	<i>Fusarium</i> spp.
IRH	<i>Fusarium oxysporum</i> (99) <i>Fusarium</i> sp. (99)	MN588215.1 KT269030.1	<i>Fusarium</i> spp.
Krameria cystisoides			
MRK23	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MT635286.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
MRK31	<i>Xylaria berteri</i> (100) Xylariaceae sp (99) <i>Xylaria curta</i> (99)	GU324750.1 JF773596.1 EU715623.1	<i>Xylariaceae</i> spp.
MRK 26	<i>Penicillium griseoroseum</i> <i>Penicillium Rubens</i> <i>Penicillium camemberti</i>	MT635309.1 MT558923.1 MT529868.1	<i>Penicillium</i> spp.

MRK11	<i>Dothiorella citrícola</i> <i>Spencermartinsia sp.</i> <i>Dothiorella plurivora</i> <i>Dothiorella viticola</i>	MT587397.1 KC898221.1 MN634035.1 MN653626.1	<i>Dothiorella spp.</i>
MRK5	<i>Periconia pseudobyssoides</i> <i>Periconia byssoides</i> <i>Pleosporales sp</i>	MN944517.1 MK370654.1 MN486543.1	<i>Periconia spp.</i>
MRK23	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (100) <i>Cladosporium xylophilum</i> (100)	MT635286.1 MT361092.1	<i>Cladosporium spp.</i>
IHK2B	<i>Didymellaceae sp.</i> <i>Coniothyrium sp.</i> <i>Microsphaeropsis olivácea</i> (100) <i>Coniothyrium pyrinum</i> <i>Phoma sp.</i> (100) <i>Platychora ulmi</i> (100)	MT453292.1 MT032468.1 MN944412.1 MN853866.1 MH860858.1 MF788203.1 KX822126.1	-----
MRK1	<i>Penicillium griseoroseum</i> <i>Penicillium goetzii</i> <i>Penicillium rubens</i>	MT635309.1 MT558933.1 MT558923.1	<i>Penicillium spp.</i>

En El Chico se muestrearon seis tejos, de cada uno se tomaron dos muestras de hoja y rama, una de corteza y una de raíz por individuo, sin embargo, solo se tuvo la capacidad de infraestructura y técnica para aislar a los endófitos de una muestra de cada tejido de un solo individuo. Por lo tanto, los resultados presentados corresponden a los aislamientos de un solo individuo. A pesar de ello, se obtuvo un número considerable de morfotipos, en comparación con la mayoría de los ejemplos de las Tablas 6 y 7. Además, el número de morfotipos podría estar relacionado con el hecho de que se usó el extracto de planta hospedera durante el aislamiento, el cual no se usó en ninguno de los ejemplos que se muestran en las Tablas 6 y 7. Es interesante que muchos de los aislados fueron dependientes de la planta hospedera (Figura 2), lo que podría implicar que se aislaron hongos que no se reportan frecuentemente como endófitos, hongos con algún requerimiento nutricional especial y/o con una dependencia estricta de la planta hospedera. Debido a que no se realizaron las pruebas de identificación pertinentes, y estas cepas se perdieron no fue posible poner a prueba esas hipótesis. Con respecto a estos hongos, sería interesante reaislar los hongos de los tejos con esta misma metodología, identificar

las especies y poner a prueba las hipótesis antes mencionadas tratando de mantener a los hongos “dependientes” en medios ricos en micronutrientes.

La diversidad y la estructura de las poblaciones de endófitos en una planta hospedera o un ecosistema, son parámetros a menudo explorados en estudios de este tipo de hongos. En este trabajo no fue posible obtener esta información debido a que se identificaron pocos morfotipos de total de los aislamientos (Tabla 5). A pesar de ello, sabemos por otros reportes, que estos dos aspectos están influenciados por una variedad de factores, por ejemplo, el ambiente-clima, la geografía y la genética de la planta hospedera (Wu, Han et al. 2013). Repitamos, por ejemplo, el caso de la diversidad y la configuración de las poblaciones de hongos endófitos en plantas endémicas de Hawái a lo largo de una gradiente de elevación: al analizar estas poblaciones se observaron ciertos patrones, específicamente que los extremos de la elevación hay más especies de hongos endófitos interactuando con estas plantas, sin embargo, estas interacciones son menos especializadas (Cobian, Egan et al. 2019). Parece haber una tendencia a encontrar más factores que afectan la diversidad conforme se aumenta el área de muestreo y conforme se incluye un mayor número de especies de plantas hospederas (Zimmerman and Vitousek 2012, Darcy, Swift et al. 2020). .

Ya que el objetivo inicial de este trabajo fue aislar y seleccionar hongos productores de taxol a partir de tejos, no se registraron las cantidades de aislamientos por tejido. Es importante mencionar que solo de los tejos se realizaron aislamientos de hoja, rama (corteza) y raíz. Para *Krameria cystisoides* y *Salvia ballotiflora*, el total de los aislamientos fueron de hojas. Sobre la diversidad en distintos tejidos, se cree que la diversidad se da a nivel de genotipo de los endófitos. Esto tiene sentido si consideramos las claras diferencias en la actividad bioquímica y medio ambiental de cada tejido, por ejemplo, las hojas son metabólicamente más dinámicas por su rol esencial en la fotosíntesis y expuesta al viento, la luz solar, al ataque de insectos y otros organismos; estas condiciones contrastan con las de las raíces, por ejemplo (Arnold 2007). Hay suficiente evidencia para afirmar que las hojas y las raíces responden metabólicamente de manera muy distinta ante diferentes estímulos

ambientales (Hsiao and Xu 2000, Kang, Babar et al. 2019), por lo que es congruente pensar que el tejido también ejercerá una cierta presión selectiva sobre las cepas de endófitos.

Tabla 6. Relación de hongos endófitos aislados de diferentes tejidos de *Taxus* spp.

Planta hospedera	Tejido/ número de aislados	Número de Aislados/morfotipos	Hongos Identificados por secuenciación de los ITS	Referencia	Medios de cultivo de aislamiento
<i>Taxus globosa</i>	Hoja/17 Ramas/11 Raíz/5 Corteza/24	116 aislados 57 morfotipos	<i>Alternaria</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp., <i>Cochliobolus</i> sp., <i>Coprinellus domesticus</i> , <i>Hypoxydon</i> sp., <i>Polyporus arcularius</i> , <i>Xylaria juruensis</i> , <i>Xylariaceae</i> , <i>Annulohypoxydon</i> , <i>Cercophora</i> , <i>Conoplea</i> , <i>Daldinia</i> , <i>Lecythophora</i> , <i>Letendraea</i> , <i>Massarina</i> , <i>Phialophorophoma</i> , <i>Sporormia</i> , <i>Xylomelasma</i> , <i>Coprinellus</i> , <i>Polyporus</i> y <i>Trametes</i>	(Rivera-Orduña, Suarez-Sanchez et al. 2011)	ACz PDA AMS
<i>Taxus x media</i>	Hojas/NR Corteza/NR	82 aislados 29 morfotipos	<i>Phoma</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Nigrospora</i> , <i>Gibberella</i> , <i>Glomerella</i> , <i>Phomopsis</i> , <i>Guignardia</i> y <i>Colletotrichum</i> .	(Xiong, Yang et al. 2013)	PDA
<i>Taxus baccata</i> L.	Corteza/29 Rama/11 (80 muestras)	125 aislados 40 morfotipos	<i>Absidia spinosa</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria atra</i> , <i>Alternaria longipes</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pseudodictyosporium elegans</i> , <i>Cladosporium basi-inflatuma</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Cladosporium perangustum</i> , <i>Coniothyrium</i> sp., <i>Cyclothyrium</i> sp., <i>Cytospora leucostoma</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>Geniculosporium serpens</i> , <i>Lecanicillium lecanii</i> , <i>Nigrospora oryzae</i> , <i>Paraphoma fimetl</i> , <i>Phoma pratoruma</i> , <i>Phomopsis archer</i> , <i>Sclerostagonospora cycadis</i> , <i>Seimatosporium</i> cf. <i>Pezizoidesa</i> , <i>Seimatosporium</i> sp., <i>Stachybotrys chartarum</i> , <i>Truncatella angustata</i> , <i>Xylaria</i> .	(Jam Ashkezari and Fotouhifar 2017)	AW PDA
<i>Taxus chinensis</i> var. <i>Mairei</i>	Corteza/NR Ramas/91	2442 aislados 145 morfotipos	Géneros dominantes:	(Wu, Han et al. 2013)	PDA

	Hojas/NR (3 localidades Número de árboles) muestreado s NR		<i>Phomopsis</i> , <i>Guignardia</i> / <i>Phyllosticta</i> (anamorfo de <i>Guignardia</i>), y <i>Glomerella</i> / <i>Colletotrichum</i> (anamorfo de <i>Glomerella</i>).		
<i>Taxus chinensis</i>	Corteza/NR Rama/NR	115 aislados 30 morfotipos	<i>Diaporthe eres</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Paraconiothyrium brasiliense</i> , <i>Pyrenochaeta romeroi</i> , <i>Trichoderma saturnisporum</i> , <i>Diaporthe phaseolorum</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Paraconiothyrium brasiliense</i> , <i>Acremonium alternatum</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Trichoderma gamsii</i> , <i>Xylaria venosula</i> , <i>Cladosporium tenuissimum</i> , <i>Sordaria macrospora</i> , <i>Neonectria radícolá</i> , <i>Pezicula sporulosa</i> , <i>Epacris microphylla</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Cryptococcus flavescens</i> , <i>Hypocrea lixii</i> , <i>Ascomycete sp.</i> , <i>Preussia flanagani</i> , <i>Diaporthe phaseolorum</i> , <i>Pezicula sporulosa</i> , <i>Botryosphaeria obtuse</i> , <i>Coniothyrium diplodiella</i> , <i>Ceratobasidium sp.</i> , <i>Epacris microphylla</i>	(Liu, Ding et al. 2009)	PDA
<i>T. baccata</i> ssp. <i>wallichiana</i>	Corteza/60 (varias localizaciones)	60 aislados	NR	(Garyali, Kumar et al. 2014)	PDA
<i>T. wallichiana</i> var. <i>mairei</i>	Corteza/428	428 aislados	NR	(Zaiyou, Li et al. 2017)	PDA
<i>Taxus</i> sp.	Ramas/NR Corteza/NR Hojas/NR	100 aislados	NR	(Kumar, Singh et al. 2019)	MMA

--	--	--	--	--	--

NR: No Reportado; **PDA:** Agar Papa y dextrosa; **ACz:** Agar Czapek; **AMS:** Agar Maltosa Sabouraud; **MMA:** Agar Micológico Modificado; **AW:** Agar Agua

Tabla 7. Relación de hongos endófitos aislados de diferentes tejidos de *Salvia* spp.

Planta hospedera	Tejido/ número de aislados	Número de Aislados/morfotipos	Hongos Identificados por secuenciación de los ITS	Referencia	Medios de cultivo de aislamiento
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Raíz/NR	57 aislados 14 morfotipos	<i>Alternaria</i> sp., <i>Pleosporales</i> sp., <i>Leptosphaeria</i> sp., <i>Peyronellaea</i> sp., <i>Phoma</i> sp., <i>Phoma</i> sp., <i>Xylomelasma</i> sp., <i>Bionectria</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Sarocladium</i> sp., <i>Sarocladium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Petriella</i> sp., <i>Cadophora</i> sp.	(Jingfeng, Linyun et al. 2013)	PDA
<i>Salvia abrotanoides</i>	Raíz/NR Hojas/NR	56 aislados 21 morfotipos	<i>Paraphoma radicina</i> , <i>Coniolaria</i> sp., <i>Coniolaria</i> sp., <i>Phaeoacremonium rubrigenum</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>Psathyrella candolleana</i> , <i>Trichoderma asperellum</i> , <i>Alternaria chlamydosporigena</i> , <i>Thielavia</i> <i>microspore</i> , <i>Acremonium sclerotigenum</i> , <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Monocillium ligusticum</i> , <i>Simplicillium cylindrosporum</i> , <i>Talaromyces</i> <i>verruculosus</i> , <i>Talaromyces</i> sp., <i>Penicillium</i> <i>canescens</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium</i> <i>charlesii</i> , <i>Penicillium murcianum</i> .	(Teimoori- Boghsani, Ganjeali et al. 2020)	PDA
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Hoja/NR	1	<i>Chaetomium globosum</i>	(Yang, Zhao et al. 2019)	NR

<i>Salvia przewalskii</i>	Raíz/NR	1	<i>Alternaria tenuissima</i>	(Wang, Luo et al. 2014)	PDA
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.f. alba	Raíz/7 Rama/1 Hoja/1 Flor/5	14 aislados	<i>Alternaria</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Schizophyllum</i> sp. y <i>Trametes</i>	(Li, Xin et al. 2015)	PDA
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Hoja/NR	1	<i>Phoma glomerata</i>	(Li, Zhai et al. 2016)	PDA
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Raíz/NR	1	<i>Mucor circinelloides</i>	(Chen, Qi et al. 2021)	MS

NR: No Reportado; **PDA:** Agar Papa y dextrosa; **MS:** Medio Murashige & Skoog

Actividad antimicrobiana de los endófitos aislados

En la Tabla 14 de los Anexos se han enumerado los resultados de la actividad antibacteriana de los caldos de cultivo concentrados de 20 endófitos. Para una mejor apreciación de estos datos, los resultados se muestran en las Figuras 3, 4, 5 y 6. En ellas se observan en el eje de ordenadas las abreviaturas asignadas a cada morfotipo durante el aislamiento y en eje de abscisas los halos de inhibición expresados en milímetros, según el manual M100 del CLSI. Al mismo tiempo que se realizaron las pruebas para cada extracto, se hicieron las pruebas de control de calidad de *P. aeruginosa*, *E. coli*, y *S. aureus* para los antibióticos recomendados por el Manual ya mencionado (Tablas 21, 22 y 23 de los Anexos). En las tablas se presentan los resultados de seis repeticiones. El criterio para determinar si la prueba está dentro de rango (DR) fue que el promedio $\pm$ una desviación estándar cayera dentro del rango control de calidad. Cuando se presentaron valores fuera de rango se tomó una nueva alícuota de la cepa conservada en ultracongelación y se repitió la prueba.

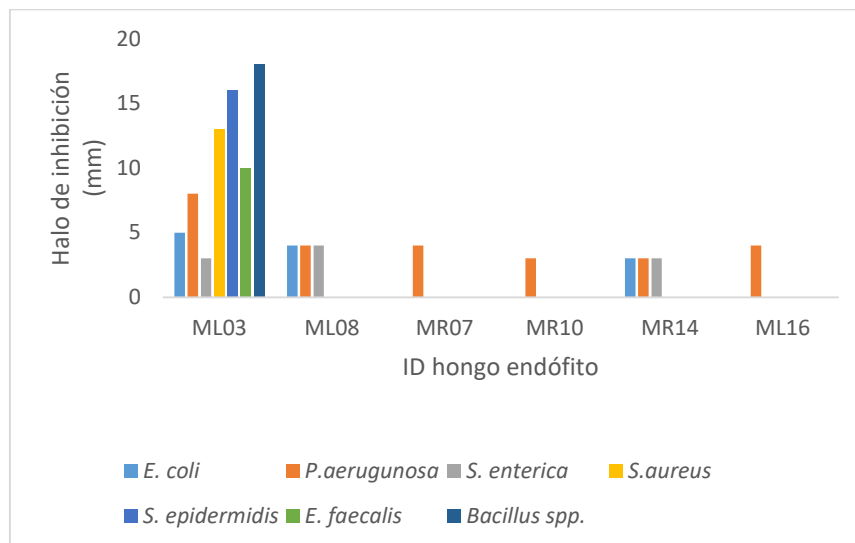


Figura 3. Actividad antibacteriana de algunos endófitos del Tejo El Chico

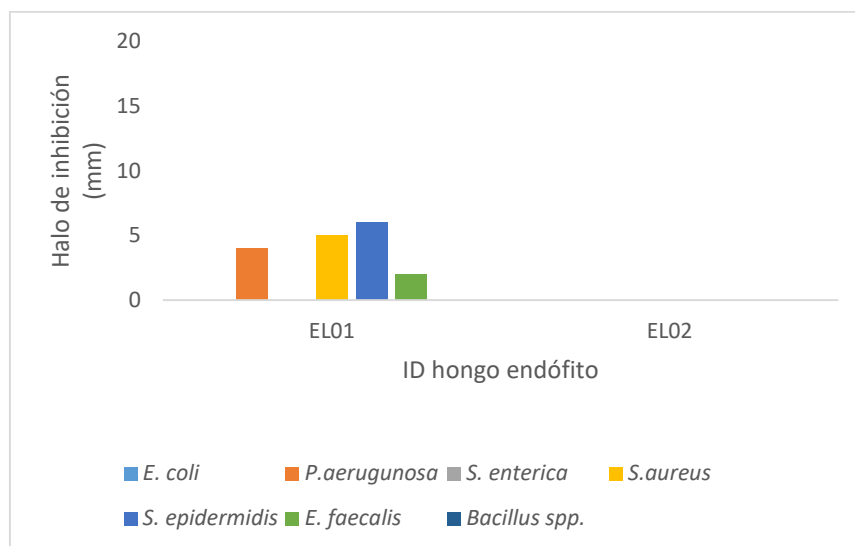


Figura 4. Actividad antibacteriana de algunos endófitos del Tejo Ponferrada

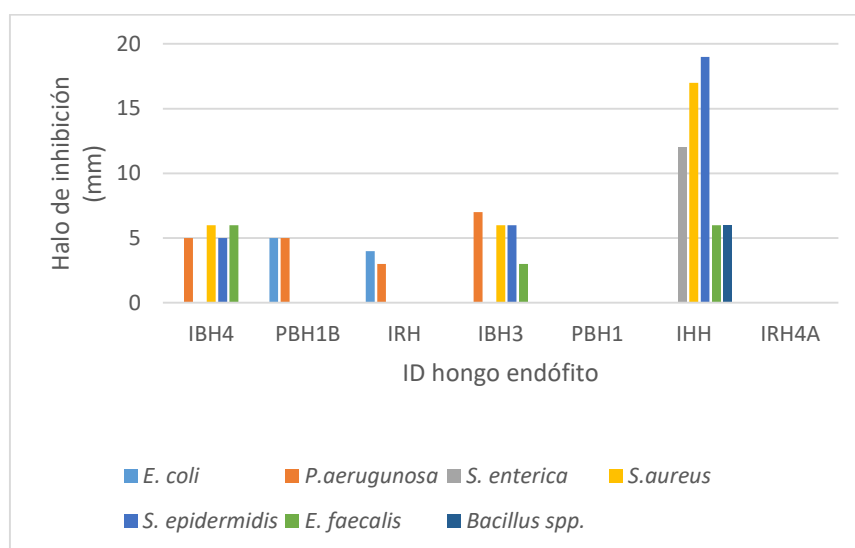


Figura 5. Actividad antibacteriana de algunos endófitos del *Salvia ballotiflora*

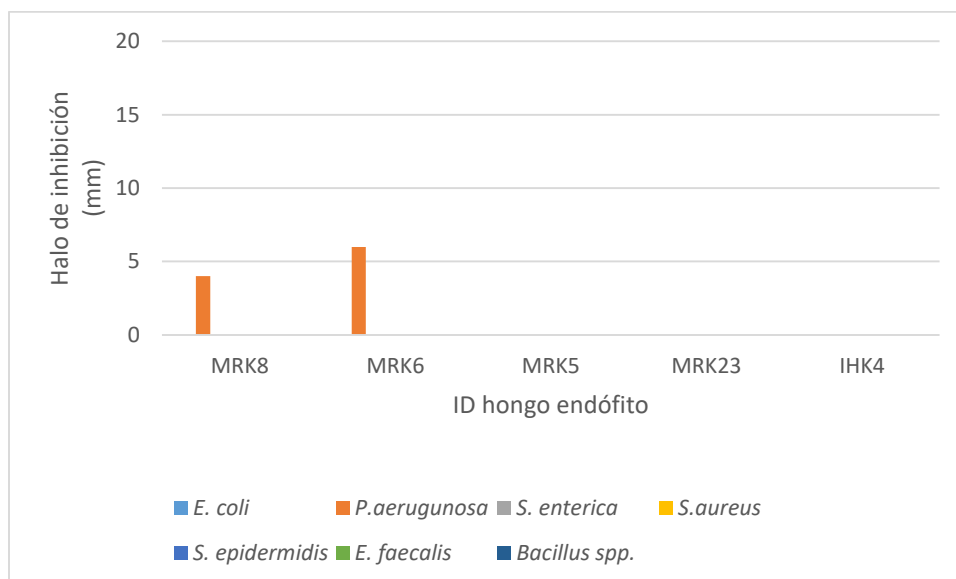


Figura 6. Actividad antibacteriana de algunos endófitos del *Krameria cystisoides*

Endófitos de *Salvia ballotiflora*

Salvia ballotiflora es una planta herbácea de la familia *Lamiaceae*, que incluye una gran cantidad de plantas con propiedades medicinales, culinarias e industriales. Estudios filogenéticos sugieren que dentro de *Salvia* spp. están incluidos cinco géneros: *Dorystaechas*, *Meriandra*, *Perovskia*, *Rosmarinus*, y *Zhumeria* (Drew, González-Gallegos et al. 2017). Se conocen a detalle algunos diterpenos con actividad antibacteriana aislados de la raíz de *Salvia viridis*: salviviridinol, viridinol, viridona, 1-oxoferruginol, ferruginol, aethiopinona y microstegiol. El 1-oxoferruginol es muy activo contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* y *Proteus mirabilis* (Ulubelen, Öksüz et al. 2000). Adicionalmente, en *Salvia abrotonoides* se ha aislado la cryptotanshinona, que confiere las actividades antitumoral, antiviral, antiinflamatoria, neuroprotectora, cardioprotectora, típicas de *Salvia* spp. (Wu, Wu et al. 2020).

En relación con los hongos endófitos de *Salvia* spp., la gran mayoría se han reportado para: *S. miltiorrhiza*, *S. abrotonoides*, *S. aegyptiaca*, *S. officinalis*, *S. przewalskii* y *S. yanguii*, siendo aislados más frecuentemente de las raíces, luego de las ramas y menos comúnmente en hojas y semillas. La principal bioactividad

reportada en raíces de algunas especies es la citotóxica contra una amplia gama de líneas celulares (Jassbi, Zare et al. 2016), en segundo lugar la actividad antimicrobiana en endófitos tanto de hojas como de raíces (Zimowska, Bielecka et al. 2020).

De manera similar a lo que ocurre con el tejo, en el que algunos de sus endófitos son capaces de producir los compuestos bioactivos de la planta hospedera en cultivos axénicos, algunos endófitos de salvia producen también el principal compuesto bioactivo de muchas especies de *Salvia*. Se ha demostrado que *Penicillium canescens*, *Penicillium murcianum*, *Paraphoma radicina* y *Coniolaria hispánica* (endófitos de las raíces de *S. abrotanoides*) producen cryptotanshinona *in vitro* en ausencia de la planta hospedera (Jassbi, Zare et al. 2016).

Con respecto a la actividad antibacteriana, a continuación, se describen ejemplos en los cuales se han encontrado compuestos o extractos de endófitos de *Salvia* spp. con actividad antibacteriana:

1. Los extractos orgánicos de *Sarocladium kiliense* y *Alternaria* sp. presentaron una fuerte actividad antibacteriana contra *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Clavibacter michiganensis* y *Pseudomonas lachrymans* (Jingfeng, Linyun et al. 2013).
2. *Xylomelasma* sp., un ascomiceto aislado de *Salvia miltiorrhiza* Bunge produce cinco derivados de cromona (derivado de benzopirano sustituido con un grupo cetona en el anillo de pirano) con actividad antibacteriana. El isoeugenitol presentó notable actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* y la 8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocumarina es activa contra *B. subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Xanthomonas vesicatoria* (Lai, Li et al. 2021).
3. *Alternaria* sp. aislada de raíces de *Salvia miltiorrhiza* produce dibenzo- α -pironas. altenuisol, 4-hidroxi-alternariol-9-metil éter y alternariol, que tienen actividad antimicrobiana contra *Agrobacterium tumefaciens*, *B. subtilis*, *Pseudomonas lachrymans*, *Ralstonia solanacearum*, *Staphylococcus hemolyticus* y *Xanthomonas vesicatoria* (Tian, Fu et al. 2017).

A pesar de estos antecedentes, no existen reportes de endófitos aislados de la especie *S. ballotiflora*. En este trabajo se reporta el aislamiento de 12 morfotipos de una muestra de rama y hojas (Figura 5) de los cuales se logró identificar tres morfotipos de *Fusarium* spp. y uno de *Alternaria* spp. Del total de los morfotipos, el denominado como IHH mostró la más alta actividad antibacteriana (Figura 5), con una tendencia a ser más activo contra las bacterias Gram positivas probadas en este trabajo. Este hongo no se identificó, debido a que el amplicón que se envió a secuenciar fue de mala calidad. Dada la actividad de este morfotipo, sería conveniente concluir con la identificación de este aislado repitiendo la PCR y realizando una adecuada purificación del amplicón. Adicionalmente, se podría concluir la identificación microscópica y complementar los datos la secuenciación de los ITS.

Endófitos de *Krameria cystisoides*

Krameria es un género de plantas hemiparásitas nativas de América que se pueden encontrar desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Brasil. El género, que comprende varias especies, es popularmente conocido como “ratania” y posee una variedad de usos tradicionales, todos relacionados con las propiedades astringentes de los extractos táníferos de las raíces. Su uso medicinal fue popularizado por los europeos entre 1820 y 1920, aunque los nativos ya usaban masticar frecuentemente hojas de “ratania” con fines que se desconocen (Simpson 1991). En México, la raíz de *Krameria cystisoides* es usada en la medicina tradicional otomí de algunas zonas de los estados de México e Hidalgo para el tratamiento del dolor de estómago y de heridas (Hersch-Martínez 1997, Sánchez-González, Granados-Sánchez et al. 2008). Más recientemente, estudios farmacológicos han probado la actividad antiinflamatoria *in vitro* de su principal compuesto bioactivo, la kramecina (Pérez-Gutiérrez, Sánchez-Mendoza et al. 2012). Hasta la fecha no se han reportado endófitos en este género, sin embargo, en este trabajo el mayor número de morfotipos se aisló de esta planta (Figura 6). Aunque la mayoría de los hongos identificados se aislaron de esta planta, los

hongos con una modesta actividad antibacteriana (Figura 6) no se lograron identificar.

La falta de reportes de endófitos de esta planta podría atribuirse a que *Krameria cystisoides* es una planta medicinal poco estudiada en todos los aspectos, en comparación con otras plantas medicinales. Este sería el primer reporte de hongos endófitos en el género *Krameria*. Resultaría interesante seguir con el estudio de estos hongos y documentar la actividad antiinflamatoria y otras actividades farmacológicas probadas por Perez-Gutierrez y colaboradores.

Endófitos de *Taxus* y la producción de taxol fúngico

Taxus es un género de árboles coníferos de zonas montañosas, que comprende diez especies distribuidas en todo el mundo de manera restringida. La especie mexicana, *Taxus globosa*, se puede encontrar desde la parte central de Nuevo León, la cuenca del Golfo y el eje neovolcánico. Debido a su baja población, a que crece en hábitats restringidos y a que se conoce poco sobre la dinámica de sus poblaciones en los ecosistemas mexicanos, se ha catalogado como especie protegida (Chávez 2001, Chávez 2002).

En relación con los hongos endófitos del tejo, la mayoría de las investigaciones se centran en buscar hongos productores de taxol y sus condiciones de producción. Probablemente este compuesto es el producto natural más famoso producido por hongos endófitos. El taxol (o su nombre común, paclitaxel) es un diterpenoide altamente funcionalizado con actividad antimetabólica que se aisló originalmente de la corteza del tejo *Taxus brevifolia*. Fue el primer taxano que mostró tener actividades antileucémica e inhibitoria de tumores (Wani, Taylor et al. 1971). En 1993 se reportó el primer hongo endófito productor de paclitaxel y otros taxanos, *Taxomyces andreanae*. El hongo fue aislado de la corteza interior de *T. brevifolia* y demostró su capacidad para producir taxanos cuando se incubó en un medio definido semisólido (Stierle, Strobel et al. 1993). Ahora sabemos que los hongos endófitos productores de taxol pueden ser aislados de otras plantas medicinales hospedadoras distintas a los tejos. De hecho, estos hongos han demostrado alcanzar concentraciones de

taxol en los caldos de cultivo incluso más elevadas en comparación con los endófitos del tejo (Gangadevi, Murugan et al. 2008, Gangadevi and Muthumary 2009, Pandi, Kumaran et al. 2011, Kumaran, Choi et al. 2012). Por ejemplo, *Cladosporium oxysporum*, aislado de la planta medicinal, *Moringa oleifera* alcanza concentraciones de 550 µg/l en cultivo líquido (Gokul Raj, Manikandan et al. 2015), una concentración alta considerando que *Taxomyces andreanae* alcanza sólo 0.05 µg/l en condiciones similares de cultivo. De mismo modo, *Phoma betae*, endófito de hojas de *Ginkgo biloba* alcanza rendimientos de 795 µg/L (Kumaran, Choi et al. 2012). A la fecha se han reportado miles de hongos endófitos productores de taxol tanto del tejo como de otras plantas usadas en la medicina tradicional (Naik 2019), además de algunas patentes para la producción de taxol con distintos enfoques, tales como 1) la optimización del proceso de producción, 2) los métodos de purificación de los caldos de cultivo y 3) métodos para el “screening” de hongos productores de taxol (Torres-Mendoza, Ortega et al. 2020).

Con respecto a la actividad antimicrobiana, *Fusarium solani* aislado de la corteza del tejo del Himalaya, exhibe fuerte a moderada actividad contra, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Shigella flexneri* (Tayung, Barik et al. 2011). Un comportamiento similar contra estos patógenos se observó en extractos de algunos endófitos de hoja y corteza de esta misma especie de árbol. Resalta que en el trabajo de Gauchan colaboradores, se exploraron la actividad citotóxica, antioxidante y antimicrobiana de 16 morfotipos que en conjunto presentaron esta gama de bioactividades (Gauchan, Kandel et al. 2020). En concordancia con estas investigaciones, en este trabajo el morfotipo ML03 (aislado del tejo mexicano) presentó la actividad antimicrobiana mas elevada y de más amplio espectro (Figura 3).

A pesar de las grandes limitaciones técnicas en el estudio de los hongos endófitos y después de casi cuatro décadas desde el descubrimiento del primer hongo endófito productor de taxol (Stierle, Strobel et al. 1993), estos organismos siguen teniendo la atención de los interesados en sus múltiples aplicaciones tanto en el campo del descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas, como en el estudio de

la complejidad de sus múltiples interacciones con otros organismos, en parte debido a todo lo que aún desconocemos sobre este grupo, tan diverso, de hongos.

1.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

Ya que los extractos de los morfotipos ML03 e IHH mostraron actividad antibacteriana considerable, convendría seguir indagando en qué compuestos en el extracto confieren esta actividad biológica. Para ello se propone preparar nuevos extractos y hacer un “screening” de la actividad antibacteriana por la técnica *bio-autografía TLC* (bio-autografía por Cromatografía de Capa Fina), determinar los “factores de retardo” (Rf) de las manchas bioactivas, fraccionar mediante TLC semi-preparativas, recuperar los compuestos en metanol y analizar directamente por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas a la vez que se verifica la actividad antibacteriana de las fracciones. Este mismo enfoque se puede usar para la búsqueda de compuestos con otras actividades biológicas, por ejemplo, antiinflamatoria, citotóxica o antiviral, que son actividades biológicas que se han demostrado en diversos estudios para las plantas examinadas en este trabajo.

Como se mencionó en la sección “Resultados y Discusión”, en relación con dar continuidad a la identificación de los morfotipos, sería relevante concluir la identificación de todos los morfotipos, con énfasis en los morfotipos con mayor actividad antibacteriana. Como no hay reportes de hongos endófitos en *Salvia ballotiflora* y *Krameria cystisoides*, y mucho menos de las actividades biológicas de sus metabolitos secundarios, sería relevante complementar y reportar esta información en un artículo científico.

1.5 CONCLUSIONES

1. Se encontró el sitio donde habita una población de tejos adultos y juveniles en el Parque Nacional El Chico, según lo reportado por el equipo de Zavala-Sánchez.
2. Se aislaron un total de 130 morfotipos distintos de hongos endófitos.
3. Con la metodología usada en este trabajo, hasta el 50 % de los morfotipos fueron dependientes de la planta hospedera.
4. Se identificaron 16 morfotipos a nivel de especie.
5. Los morfotipos ML03, IHH e IBH mostraron la actividad antimicrobiana más elevada entre los hongos testados.
6. El número de total morfotipos podría estar relacionado con el hecho de que se usó el extracto de planta hospedera durante el aislamiento.
7. Se aislaron 12 morfotipos de una muestra de rama y hojas de *Salvia ballotiflora*, el primer reporte de hongos endófitos en esta especie.
8. El mayor número de morfotipos se obtuvo de una muestra de hoja y rama de *Krameria cystisoides*, no hay reportes de endófitos aislados de este género de plantas.

CAPÍTULO 2 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE *Pestalotiopsis microspora* Y BÚSQUEDA DE TAXOL FÚNGICO

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Preparar extractos de caldos de cultivo de *P. microspora* usando los medios y condiciones de crecimiento reportadas para la producción de taxol.
2. Testar la actividad citotóxica de extractos contra dos líneas celulares de cáncer.
3. Establecer las mezclas solventes para el análisis de taxol, bacatina III y 10-deacetil bacatina III en extractos orgánicos de caldos de cultivo de hongos, por cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés).
4. Establecer las condiciones de análisis de taxol, bacatina III y 10-desacetil bacatina III en extractos orgánicos de caldos de cultivo de hongos, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).
5. Establecer las condiciones de análisis de taxol, bacatina III y 10-desacetil bacatina III en extractos orgánicos de caldos de cultivo de hongos, extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés).
6. Establecer las condiciones de análisis de taxol, bacatina III y 10-desacetil bacatina III en extractos orgánicos de caldos de cultivo de hongos, cromatografía líquida acoplada espectrometría de masas (LC-MS, por sus siglas en inglés).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Determinación de la actividad citotóxica de extractos de *P. microspora*

Ya que el objetivo inicial de este trabajo fue estudiar la producción de taxol fúngico, los medios utilizados en esta etapa son medios típicamente utilizados para la producción de este anticancerígeno (Tablas 16-20)

Cultivo líquido y extracciones

El medio MID es el más comúnmente reportado para la producción de taxol fúngico (Stierle, Strobel et al. 1993), tanto con especies de *Pestalotiopsis* como con otros géneros fúngicos. Otros medios de producción utilizados han sido el medio S7, un símil del floema de plantas (Stroble, Stierle et al. 1993), y el medio M2D (variación del medio MID con modificaciones en las concentraciones de fosfato, Mg, Mn y Zn). El medio MID se modificó en algunos de sus componentes para obtener el medio que llamamos GF (GFs cuando este se enriqueció con harina de soya). La composición de estos medios de cultivo se muestra en las Tablas 16-20 de los Anexos.

Los cultivos fúngicos se comenzaron inoculando los medios líquidos (matraces de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo) con un trozo de micelio de aproximadamente 5 × 5 mm proveniente de un cultivo de 5 días. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 °C a 120 r.p.m. y en oscuridad por 3, 6, 10, 14, 15, 16 y 21 días. Los cultivos se filtraron dos veces con gasa y posteriormente con papel de filtro Whatman® 4. Se midió el volumen del filtrado y se añadieron 0.25 g de NaCO₃ por litro. A partir del filtrado se realizaron extracciones líquido-líquido con 3 volúmenes de diclorometano. El diclorometano se eliminó en un evaporador rotatorio. El extracto sólido se recuperó en metanol y se colocó en un cristizador, para secar por evaporación en una campana de extracción. Cada extracto se pesó y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Estos extractos se utilizaron tanto para los ensayos biológicos, como para los análisis cromatográficos.

Determinación de la actividad citotóxica

El método usado en este trabajo para la determinación de la actividad citotóxica de los extractos es un método colorimétrico para el “screening” *in vitro* de citotoxicidad de una gran cantidad de muestras. Esencialmente, consiste en la determinación indirecta de la densidad celular mediante la cuantificación de la proteína de células adherentes usando sulforrodamina B (SFB) (Skehan, Storeng et al. 1990, Lin, Shieh et al. 1993, Vichai and Kirtikara 2006). Los extractos se probaron a 2 µg/ml y 20 µg/ml y la densidad celular se midió a las 48 h. Como control positivo se usó vinblastina.

Se consideraron extractos con actividad citotóxica aquellos que inhibieron la proliferación celular en un 50 % o menos, en comparación con las células que crecieron en ausencia del extracto.

En la Tabla 8 se muestran los detalles de las líneas celulares de cáncer usadas para la determinación la actividad citotóxica de los extractos.

Tabla 8. Material biológico utilizado para determinar la citotoxicidad de los extractos

Material Biológico	ID de Referencia
Línea celular de carcinoma de seno MCF-7	ATCC®HTB-22
Línea celular de carcinoma de colon HCT-15	ATCC®CCL-225™
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	ATCC®11816

Los extractos se disolvieron en un volumen de dimetilsulfóxido (DMSO) de manera que tuvieran una concentración final de 4 mg/ml. Todos los extractos fueron esterilizados por filtración con filtro de nylon de 0.25 µm y colocados en microtubos de 1.5 ml estériles. Finalmente, se hicieron diluciones con DMSO para obtener dos concentraciones de cada extracto, 2 y 20 µg/ml.

Preparación de las líneas celulares y proliferación en presencia de los extractos

Suspensiones celulares, provenientes de crioviales conservados en nitrógeno líquido, fueron inoculadas en el medio RMPI (Tabla 20) y cultivadas en cajas de 75 cm² durante 24 h a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂.

El medio se desechó en un frasco y la capa celular se lavó con 15 ml de PBS (buffer de fosfatos salino) con la finalidad de eliminar los restos de suero que podrían neutralizar el efecto de la tripsina. Se agregó 1 ml de tripsina, para despegar las células, y se incubó durante 5 min a 37 °C. La solución se homogenizó pipeteando 50 veces sobre la pared de la caja para deshacer los grumos celulares. Posteriormente las células se contaron en una cámara de Neubauer y se realizó una dilución tal que permitiera sembrar 1.5×10^6 células/ml en cada caja de cultivo. Finalmente se agregó el volumen necesario de RMPI para un volumen final de 15 ml. Las placas se incubaron 24 h a 37 °C, con una atmósfera de 5% de CO₂.

A día siguiente el proceso se repitió para obtener una suspensión de 1.5×10^6 células/ml. En cajas de 96 pozos estériles se colocaron por triplicado 10 µl de las diluciones de los extractos. Se utilizó vinblastina como control positivo. Finalmente se agregaron 190 µl de la suspensión celular y se mezcló suavemente. Las placas se incubaron 72 h a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂. 1 ml de cada suspensión celular se colocó en crioviales con DMSO al 100 % y se conservaron en nitrógeno líquido.

Control inicial día cero: En una caja distinta a la caja del ensayo se colocaron 190 µl de la suspensión celular más 10 µl de DMSO 10 %, se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C.

Determinación del porcentaje de crecimiento

1. Fijación de las células

Después de 72 h de crecimiento, las células se fijaron de la siguiente manera: por cada placa se añadieron 100 µl de ácido tricloroacético al 20 % frío por pozo, se incubaron a 4 °C durante 30 min, el ácido se decantó y las placas se lavaron

cuatro veces con agua corriente y se secaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 h.

2. Desarrollo del color y lectura

Se agregaron 100 µl de SRB a cada pozo y se dejó reposar durante 30 min. El colorante se decantó y el exceso de éste se eliminó con cuatro lavados con ácido acético al 1%. Las placas se secaron a temperatura ambiente en una campana de extracción durante 1 h. El colorante asociado a la proteína celular se solubilizó agregando 200 µl de Tris-base 10 mM y mezclando en un agitador de placas durante 5 min. El color se midió en un lector de placas de ELISA a 510 nm.

3. Cálculo del porcentaje de crecimiento

El crecimiento celular se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{(OD \text{ células} + \text{muestras}) - (OD \text{ células día cero})}{(OD \text{ células} + DMSO \text{ 10\%}) - (OD \text{ células día cero})} \times 100$$

Todos los extractos y controles se probaron por triplicado. Cuando los controles no presentaron el comportamiento esperado, la placa se repitió. Los resultados son el promedio del porcentaje de crecimiento de cada medición.

2.2.2 Establecimiento de los métodos analíticos para la búsqueda de taxol fúngico

A la vez que se intentaba inducir la producción de taxol en cultivos de *Pestalotiopsis mirospora*, se comenzaron a hacer pruebas con la finalidad de establecer los métodos para:

1. *Detectar taxanos* mediante TLC
2. *Concentrar los taxanos* y eliminar impurezas por SPE
3. *Cuantificar los taxanos* por HPLC
4. *Confirmar los taxanos* por LC-MS

Es importante recalcar las razones para incluir la SPE para el análisis de las muestras: 1) concentrar las muestras para poder lograr la cuantificación de los taxanos, un aspecto relevante ya que los cultivos líquidos realizados en este

trabajo fueron a pequeña escala, en comparación con otros trabajo (obsérvense volúmenes de la Tabla 15 delos Anexos); 2) eliminar impurezas como residuos de los materiales plásticos utilizados durante la extracción de los taxanos y que pueden interferir durante el análisis de LC-MS.

Para el establecimiento de todas las técnicas antes mencionadas se usaron estándares grado HPLC de tres taxanos comunes: 10-desacetilbacatina III, bacatina III y taxol (Ilustración 5).

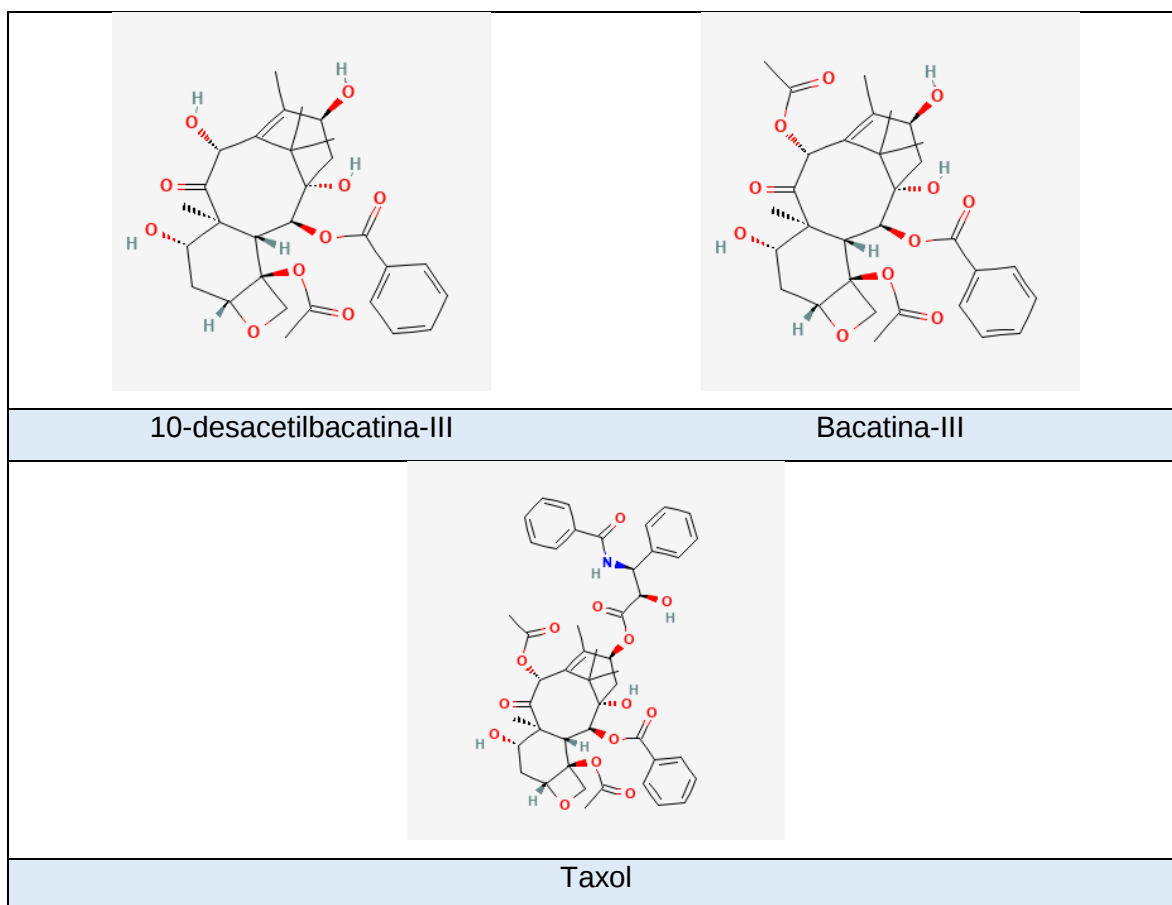


Ilustración 5. Estructura química de los taxanos usados (Fuente: PubChem).

Cromatografía de capa fina (TLC)

Se usaron como referencia algunas mezclas de solventes previamente reportadas para la identificación y purificación de taxol por TLC (Strobel, Yang et al. 1996). Con base en estas, se prepararon más mezclas para separar adecuadamente los tres

taxanos y establecer los factores de retardo (R_f) de cada compuesto en diferentes mezclas de solventes.

Se utilizaron placas de vidrio y placas de aluminio de 2 mm de grosor. Las placas de aluminio se revelaron con una solución de vainillina ácido sulfúrico (0.5 g de vainillina en 100 ml de una solución ácido sulfúrico al 2 % en de etanol al 95 %).

Cromatografía líquida (HPLC)

Se usaron tres columnas disponibles en el laboratorio para resolver los tres taxanos en la misma corrida cromatográfica: 1) C18, Eclipse XDB-C18, 3.5 μm , 4.6 $\times$ 150 mm. Agilent; 2) C18, μ Bondapak C18, 10 μm , 3.9 $\times$ 300 mm. Waters y, 3) Sílica-Pentafenilpropil, Discovery HS F5-5 Supelco, esta última columna se utilizó en el trabajo de (Havlíková, Matysová et al. 2008) para la cuantificación simultanea de bacatina III y taxol. Se utilizó agua grado HPLC como Fase A y las siguientes opciones como Fase B: 1) metanol con 0.1 % de ácido acético, 2) metanol con 0.1 % de ácido fórmico, 3) acetonitrilo con ácido acético 0.1 % y, 4) acetonitrilo con 0.1 % de ácido fórmico. La elución se realizó en gradiente aumentando el porcentaje de Fase B. Se probaron volúmenes de inyección de 10 y 20 μl y flujos de 0.5, 1 y 1.5 ml/min.

Concentración por Extracción en Fase Sólida (SPE)

Se utilizaron cartuchos de C-18 Hypersep, Thermoscientific de 1 ml y estándares grado HPLC de los tres taxanos, siguiendo las especificaciones del fabricante. El proceso consistió en la activación de los cartuchos, la carga de la muestra, el lavado y finalmente la elución.

La cuantificación de los estándares de los taxanos recuperados se cuantificaron por HPLC de la siguiente manera: en la etapa de elución se agregaron 2 volúmenes de 500 μl de metanol al 30 %, dos al 40 %, dos al 60, dos al 80 y tres al 100 %; las fracciones se colectaron independientemente, se filtraron con una membrana de 0.22 μm , se aforaron a 1 mL y 20 μL de esta solución se inyectaron al HPLC por triplicado.

Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de masas (LC-MS)

Para esta etapa se utilizó un UHPLC Dionex Ultimate 3000 acoplado a un espectrómetro de masas micrOTOF II Focus™. Se usó una columna PoroShell 120 EC-C-18, 2.7 µm, 4.6 × 50 mm. Se probaron gradientes de acetonitrilo. Los extractos se inyectaron en metanol con 0.05 % de ácido acético grado HPLC. Las corridas cromatográficas se realizaron en Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas de la UAM-I (LDEM UAM-I), bajo la supervisión del responsable del área, el Dr. Ponciano García Gutiérrez. El análisis de los espectros de masas de algunos extractos fue realizado por la Maestra Mónica Rincón Guevara, actualmente responsable del LDEM UAM-I.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad citotóxica de los extractos de *P. microspora*

En las Figuras 7 y 8 se presentan de manera gráfica los resultados de la actividad citotóxica de todos los extractos contra las células MCF-7 y HCT15. En el eje “x” se colocaron las abreviaturas asignadas a cada extracto (Tabla 15 de Anexos). Los resultados se presentan como porcentaje de crecimiento de las células en presencia de 20 y 2 $\mu\text{g/ml}$ del extracto. Los porcentajes se calcularon comparando el crecimiento con células tratadas únicamente con 1.5 % de DMSO, es decir, el crecimiento en esta condición se consideró el 100 % de crecimiento. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. El cálculo de las células iniciales y los controles positivo y negativo fue el promedio de 10 repeticiones. Los extractos se consideraron citotóxicos cuando inhibieron la proliferación celular al menos al 50 % a la concentración más alta del extracto, 20 $\mu\text{g/ml}$.

En la Tabla 15 de los Anexos se enlistan todos los extractos testados en esta etapa, además, se incluyó el volumen total con que se comenzó la extracción y el rendimiento de extracto en mg y detalles sobre el cultivo. Los extractos activos se marcaron en color verde.

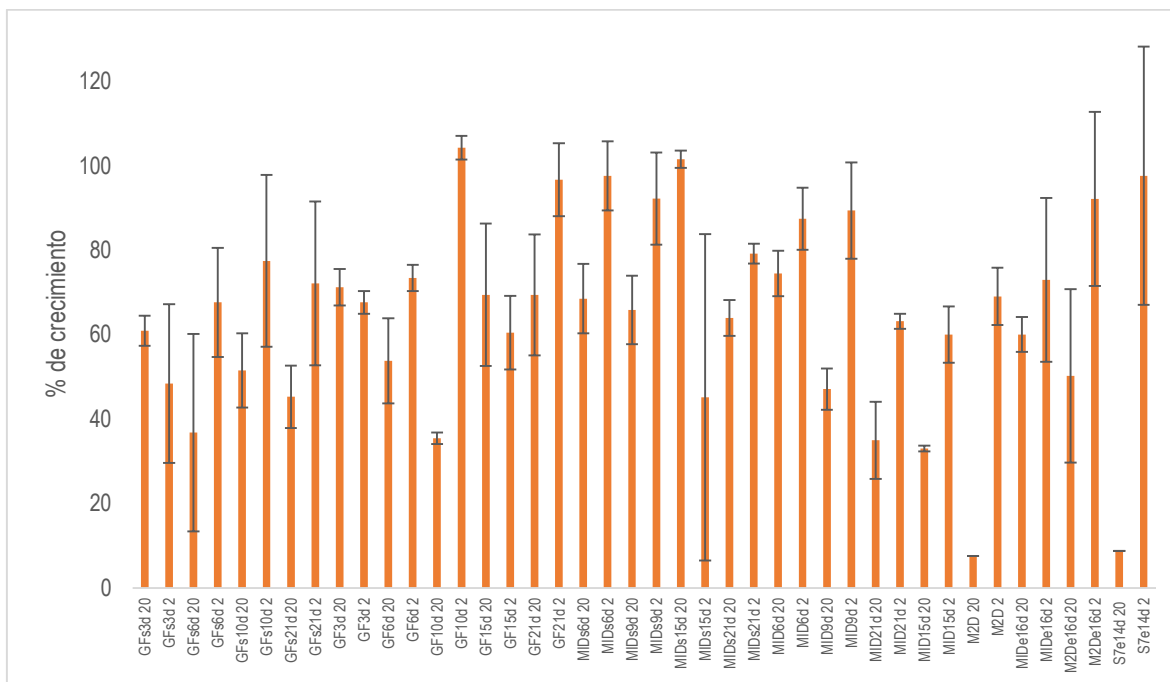


Figura 7. Actividad citotóxica contra células HCT-15

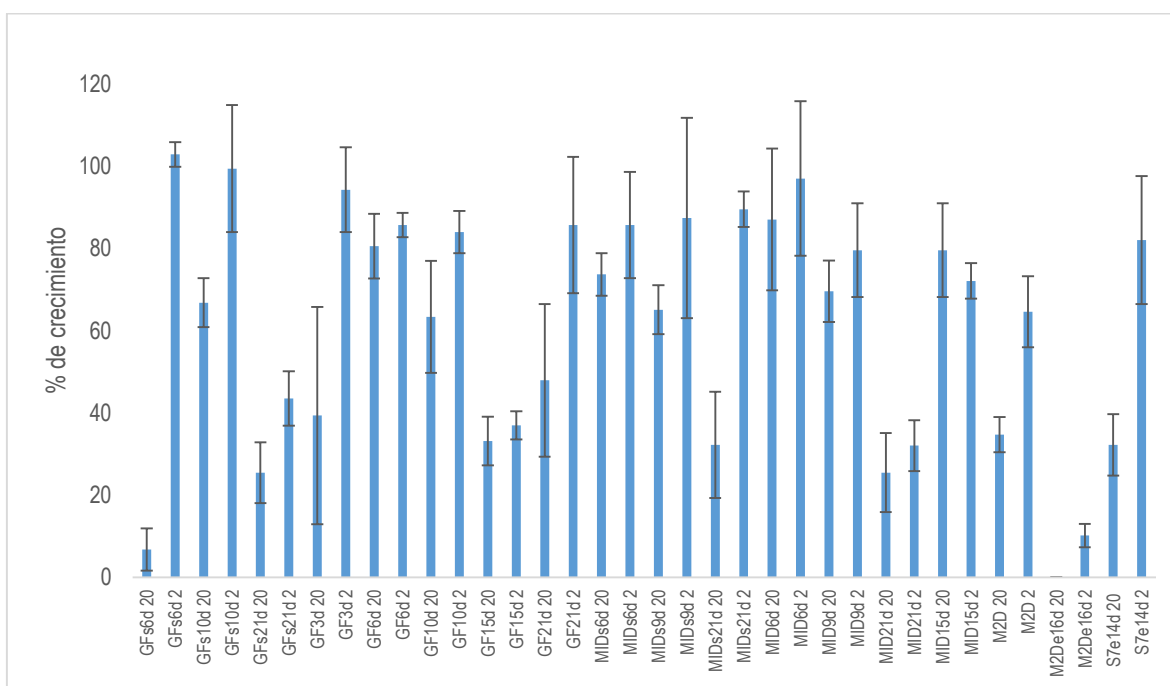


Figura 8. Actividad citotóxica contra células MCF-7

Para una mejor apreciación, en la Figura 9 se concentraron los extractos citotóxicos. Nótese que cinco extractos fueron activos contra al menos una línea celular, mientras que cuatro de ellos fueron activos contra las dos. Particularmente, los extractos M2D y S7e14d fueron más citotóxicos contra HCT-17 que contra MCF-7. Adicionalmente, el extracto M2D16e no fue activo contra HCT-15, sin embargo, exhibe una fuerte actividad contra MCF-7 (nótese que incluso a la concentración más baja de extracto inhibe el crecimiento hasta al 10 ± 2.83 %). De manera similar, los extractos M1D21d, GFs21d y GFs15d inhiben el crecimiento a menos del 50 % en la concentración más baja de extracto (Figura 7 y 8).

Retomando los extractos M2D y M2D16e, es interesante notar que tienen un comportamiento particular: mientras que M2D inhibe el crecimiento de HCT-15 a menos del 10%; M2D16e ni siquiera se consideró citotóxico contra esta línea celular. Si se observa la Tabla 15 (Anexos) la única diferencia entre estos dos extractos fue la agitación del cultivo (M2D con agitación constante, M2D16e agitación 3 días, estático 12 días). Estas condiciones de cultivo han sido reportadas por algunos autores para la producción de compuestos citotóxicos por hongos endófitos (Zhang, Li et al. 2012, Garyali, Kumar et al. 2013, Rajagopal 2017), sin embargo, ningún trabajo se ha enfocado en estudiar la influencia de esta condición en los rendimientos de taxol y otros taxanos.

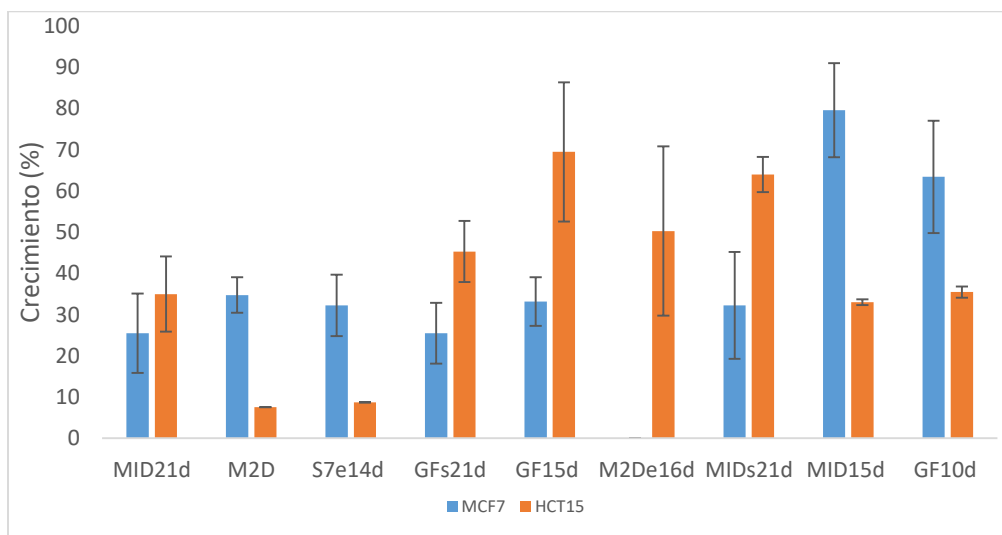


Figura 9. Extractos citotóxicos

La producción de compuestos anticancerígenos en el género *Pestalotiopsis* se ha reportado previamente: en la Tabla 9 se resumen los reportes de compuestos puros y extractos con actividad citotóxica en *Pestalotiopsis* spp., que dan un total de 10 compuestos puros y químicamente caracterizados y dos extractos, activos contra al menos 1 de 13 líneas celulares de cáncer, una de las cuales fue probada en este trabajo, MCF7.

Tabla 9. Actividad citotóxica de compuestos de *Pestalotiopsis* spp.

Compuestos	Línea celular	Referencia
Pestalotioprolida C Pestalotioprolida D	L5178Y (linfoma de ratón) A2780 (cancer de ovario, humano)	(Liu, Dai et al. 2016)
Extracto orgánico	Ensayo de letalidad en cerebro de camarón (BSLA)	(Taofeeq, Saheed et al. 2018)
Pestaltoliol A Pestaltoliol B Pestaltoliol D	HL_60 8 (leucemia) SMMC-7721 (hepatocarcinoma) A549 (adenocarcinoma de pulmón) MCF-7 (cáncer de mama) SW480 (cáncer de colon)	(Li, Xie et al. 2015)
Ácido torreyanico	NEC-8 (carcinoma testicular) A549 (adenocarcinoma de pulmón)	(Lee, Strobel et al. 1996)
(6S,7S,8R)- hydroxipestalotin (+)-pinoresinol	P388 (leucemia de murino)	(Riga Riga 2019)
Ácido (+)-sydowico	P388 (leucemia de murino)	(Riga, Happyana et al. 2020)
Nanopartículas de plata a partir de un extracto	B16F10 (melanoma de ratón) SKOV3 (carcinoma de ovario, humano) PC3 (carcinoma de próstata, humano)	(Netala, Bethu et al. 2016)
7-epi-10-deacetiltaxol	HepG2 (hepatocarcinoma)	(Netala, Bethu et al. 2016)

Un comportamiento similar de citotoxicidad al de los extractos de este trabajo, fue observado por Jung Li y colaboradores en 2015 al determinar la actividad citotóxica

de tres policétidos aislados de *P. microspora*. En su estudio determinaron la actividad citotóxica de estos compuestos contra las siguientes líneas celulares: HL-60 (leucemia), SMMC-7721 (hepatocarcinoma), A-549 (adenocarcinoma de pulmón) MCF-7 (cáncer de mama) y SW480 (cáncer de colon). Ellos observaron que mientras que los pestalpoliols A y D son activos contra todas las líneas celulares, el pestalpoliol B es activo solo contra A-549 (Li, Xie et al. 2015). No sobra resaltar que, aunque los tres compuestos fueron activos contra la línea celular A-549, el pestalpoliol A prestó la IC50 más baja del total de los ensayos contra esta línea celular (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen de la actividad citotóxica de tres policétidos de *P. microspora*

Compuesto	IC50 (μM)				
	HL-60	SMMC-7721	A-549	MCF-7	SW480
Pestalpoliol A	10.4	11.3	2.3	13.7	12.4
Pestalpoliol B	SA	SA	10.6	SA	SA
Pestalpoliol D	15.7	31.2	10.7	23.7	21.4

Construida a partir de datos de (Li, Xie et al. 2015). SA: *Si Actividad*

Dados los trabajos previamente mencionados y sus resultados, podemos pensar que esta actividad, diferenciada en los diferentes extractos testados en este trabajo, podría atribuirse a la contribución parcial de algunos de los compuestos citados en la Tabla 9.

Métodos analíticos para la búsqueda de taxol fúngico

Cromatografía de capa fina

En la Tabla 11 se alinearon los resultados de los Rf de las diferentes mezclas probadas para los tres taxanos. En verde se marcaron las mezclas más convenientes para detectar y separar los tres taxanos. Estas mezclas se usaron seleccionar algunos extractos para su análisis en por HPLC.

Tabla 11. Relación de mezclas de solventes para la TLC

Núm.	Mezcla	Rf Taxol	Rf 10-DBIII	Rf BIII
1	Cloroformo:metanol 87.5:12.5	0.9	0.9	0.9
2	Cloroformo:acetato de etilo 25:75	0.25	0.20	NP
3	Cloroformo:acetato de etilo 75:25	0.55	0.5	0.4
4	Cloroformo:isopropanol 25:75	0.1	0.1	0.1
5	Cloroformo:isopropanol 75:25	0.1	0.1	0.1
6	Cloroformo:acetona 25:75	0.53	0.5	0.3
7	Cloroformo:acetona 25:75	0.1	0.1	0.1
8	Cloroformo:acetona: acetato de etilo 50:25:25	0.3	0.22	NP
9	Cloroformo:Acetonitrilo 70:30	0.33	0.35	0.22
10	Acetato de etilo-isopropanol 95:5	0.9	0.9	0.9
11	Diclorometano metanol 98:2	1	NP	NP
12	Diclorometano metanol 96:4	1	1	1
13	Diclorometano metanol 92:8	1	1	1
14	Diclorometano metanol 90:10	1	1	1
15	Diclorometano:metanol 85:25	1	1	1
16	Diclorometano:metanol 80:20	1	NP	NP
17	Diclorometano:metanol 75:25	1	NP	NP
18	Diclorometano:metanol 50:50	1	NP	NP

NP: No probado

En la Imagen 3 se muestra una de las placas en las que se usaron las mezclas antes mencionadas. La placa se reveló en una cámara de UV 256 nm. Las manchas se marcaron con lápiz y se determinaron los Rf, estos Rf se compararon con los de estándares de los tres taxanos. Los extractos de *P. microspora*, MR01, MR10 y ER01 presentaron una mancha con el mismo Rf que el taxol y la BIII, mientras que MR01 además de taxol y BIII mostró una mancha con el Rf de la 10 dBIII. Esta placa se corrió con 3 mezclas: primero con la 1, luego con la 9 y finalmente con la 6.

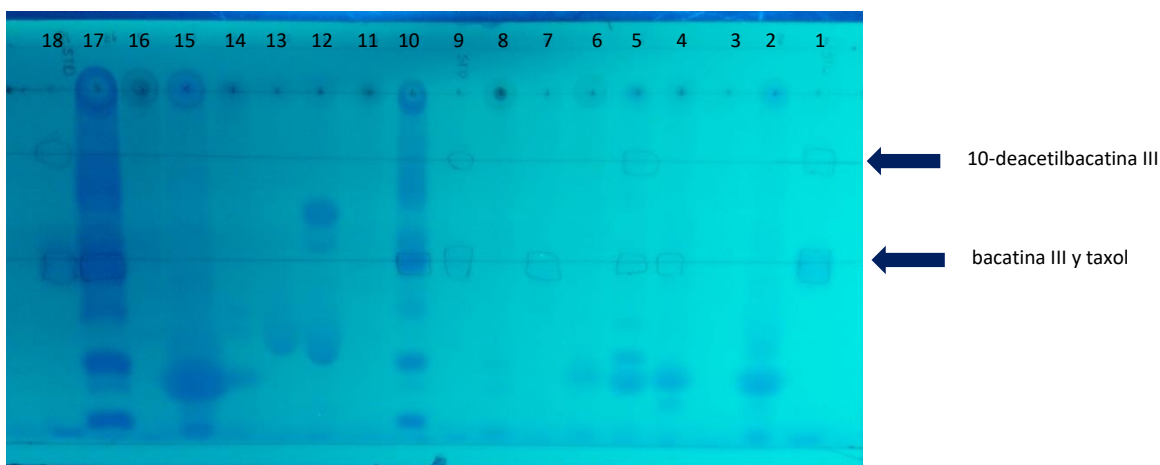


Imagen 3. TLC de algunos extractos y los tres estándares

Carril 1 - estándares	Carril 7 - MR10	Carril 13 - EL03
Carril 2 - <i>P. microspora</i> 10 µl	Carril 8 - MR11	Carril 14 - MSL07
Carril 3 - <i>P. microspora</i> 5 µl	Carril 9 - estándares	Carril 15 EL0115 µl
Carril 4 - <i>P. microspora</i> 15 µl	Carril 10 - ER01 10 µl	Carril 16 MSL07
Carril 5 - MR01	Carril 11 - EL01	Carril 17 ER01 15 µl
Carril 6 - MR02	Carril 12 - EL02	Carril 18 - estándares

Cromatografía líquida

Los tres taxanos se lograron cuantificar en una sola inyección utilizando la columna Discovery HS F5-5. 4.6 mm × 250 mm, un volumen de inyección de muestra de 20 µl, detector UV 228 nm y el siguiente gradiente de elución utilizando como Fase A agua y Fase B acetonitrilo 0.1 % de ácido fórmico: 0 min 95 % A, 5 % B; 10 min 65 % A, 35 % B; 27 min 45 % A, 55 % B; 30 min 45 % A, 55 %, 33 min 95 % A, 5 %. Con el objetivo de estabilizar adecuadamente la línea base, adicionalmente se dejaron 7 min después del término de la corrida para hacer la siguiente inyección.

En la Imagen 4 se muestra un cromatograma típico de los estándares y sus tiempos de retención: 10-desacetilbacatina III, 6.81 ± 0.01 min; bacatina III, 12.43 ± 0.05 min y taxol, 25.84 ± 0.06 min.

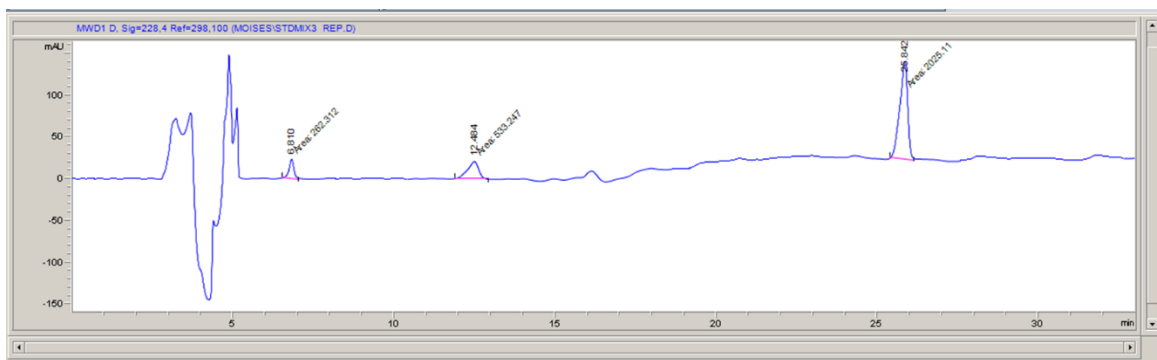


Imagen 4. Cromatograma típico de los estándares de taxol, baccatin III y 10-desacetilbaccatin III

Extracción en fase sólida (SPE)

La idea de establecer este procedimiento durante la búsqueda de taxol fúngico surge de dos observaciones: 1) cuando se inyectaron los primeros extractos de *P. microspora* en el cromatógrafo se observó que muy cerca de los tiempos de retención del taxol también eluían otros compuestos que causaban ruido durante la cuantificación y, 2) el pico correspondiente al taxol en los extractos tenía un área tan pequeña que no podía ser cuantificado e incluso era difícil diferenciarlo del ruido de la línea base. Por lo tanto, la finalidad de establecer las condiciones de la SPE fue concentrar los taxanos y eliminar compuestos que podrían causar interferencia en la cuantificación en HPLC y, como se verá más adelante, eliminar contaminantes que interfieren en la LC-MS.

En la Figura 10 se muestran los perfiles de elución de los tres taxanos. La mayor cantidad de 10-desacetil-baccatin III se recuperó con un 40 % de metanol, la de baccatin III con 60 % y el taxol se recuperó casi en partes iguales al 60 y 80 % de metanol. Con base en estos datos se determinó resuspender los extractos en 20 % de metanol y hacer los lavados (ver métodos) con metanol al 20 %.

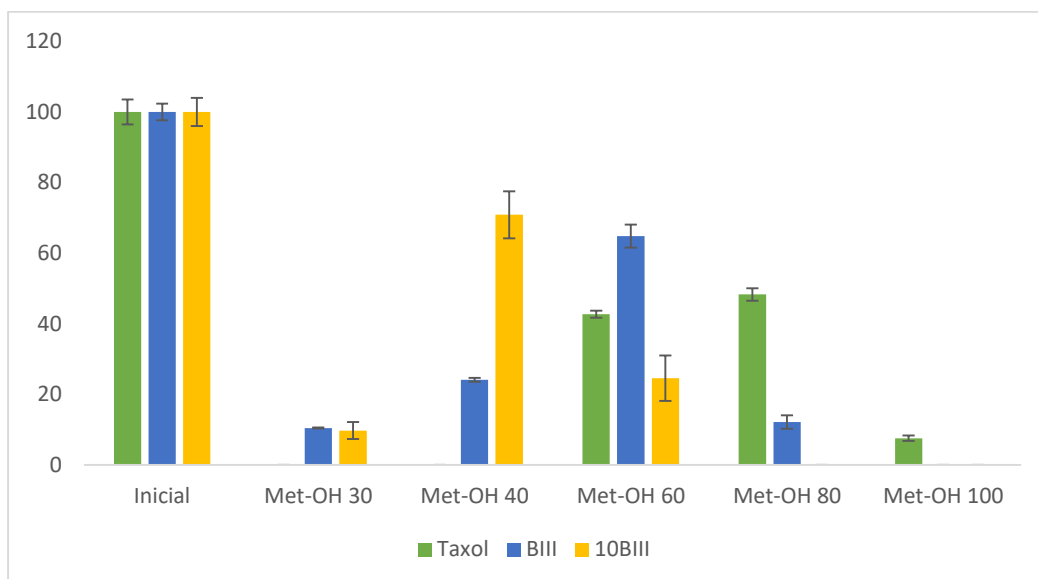


Figura 10. Porcentajes de recuperación de taxanos durante la extracción en fase sólida

Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Inicialmente solo se tenía el estándar de taxol, por lo tanto, este fue el único que se analizó por esta técnica. En la Ilustración 6 se presenta el espectro de masas del estándar. La masa isotópica más abundante fue $M+Na$ 876.3 y el tiempo de retención de 13.7-13.8 min. Los extractos analizados tanto por TLC como por HPLC en los cuales se observó el R_f o tiempo de retención respectivamente, de algún taxano, se analizaron por esta técnica, sin embargo, sólo se presentan los resultados de la Tabla 12, que fueron algunos de los extractos de *P. microspora* que presentaron actividad citotóxica.

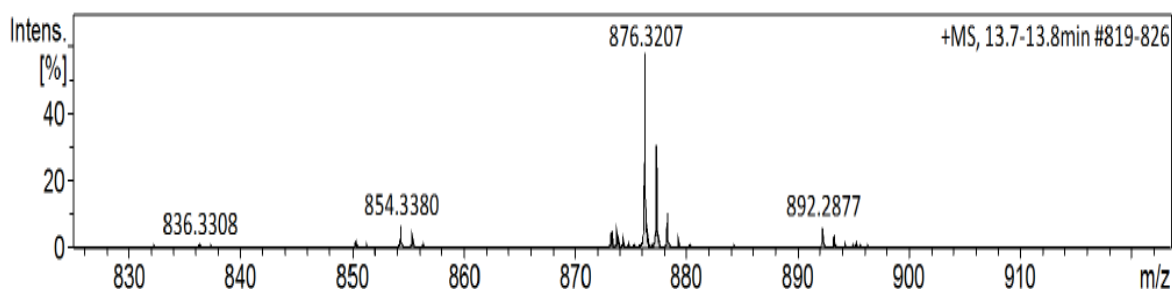


Ilustración 6. Espectro de masas del estándar de taxol

Inicialmente se realizaron gradientes de acetonitrilo de 15 min para realizar la separación de los extractos, aunque posteriormente se lograron mejores separaciones de algunos extractos con gradientes de acetonitrilo de 45 min.

El análisis de las corridas se realizó haciendo la búsqueda las masas de 4 taxanos, con las siguientes masas y diferentes márgenes de error:

- Baccatina III ($C_{31}H_{38}O_{11}$; M-H⁺: 587.2486 Da; M-Na⁺: 609.2306 Da)
- 10-desacetil baccatina III ($C_{29}H_{36}O_{10}$; M-H⁺: 545.2381 Da; M-Na⁺: 567.2200 Da)
- Cefalomannina ($C_{45}H_{53}NO_{14}$; M-H⁺: 832.3538 Da; M-Na⁺: 876.3201 Da)
- Taxol ($C_{47}H_{51}NO_{14}$; M-H⁺: 854.3382; M-Na⁺: 876.3201

En este análisis preliminar solo se buscaron las señales de las masas antes mencionadas, independientemente del tiempo de retención del estándar de taxol. En la Tabla 12 se resumen los resultados del análisis de los extractos M2De16d, S7e14d, M2D y el estándar de taxol con los dos gradientes de acetonitrilo

Tabla 12. Resumen del análisis algunas corridas de LC-MS

ID muestra	Baccatina III $C_{31}H_{38}O_{11}$ M-H ⁺ : 587.2486 Da M-Na ⁺ : 609.23 Da	10-deacetil baccatina III $C_{29}H_{36}O_{10}$ M-H ⁺ : 545.2381 Da M-Na ⁺ : 567.2200 Da	Taxol $C_{47}H_{51}NO_{14}$ M-H ⁺ : 854.3382 Da M-Na ⁺ : 876.3201 Da	Cefalolamina $C_{45}H_{53}NO_{14}$ M-H ⁺ : 832.3538 Da M-Na ⁺ : 854.3358 Da
Estándar taxol (gradiente 45 min)	M-H ⁺ : Min 31, 35	M-H ⁺ : Min 26.5 M-Na ⁺ : Min. 26.5	M-H ⁺ : Min. 23 M-Na ⁺ : Min. 23	M-H ⁺ : Min. 23 M-Na ⁺ : --
Estándar taxol (gradiente 15 min)	M-H ⁺ : -- M-Na ⁺ : --	M-H ⁺ : -- M-Na ⁺ : --	M-H ⁺ : Min. 13.8 M-Na ⁺ : Min. 13.8	M-H ⁺ : -- M-Na ⁺ : Min. 13.8
M2D	M-H ⁺ : Min. 30; 34 M-Na ⁺ : Min. 30	M-H ⁺ : Min. PEG M-Na ⁺ : Min. 29.3	M-H ⁺ : Min. 28.6 (PEG); 33.7. M-Na ⁺ : 28.6; 31.1; 35.6 (PEG)	M-H ⁺ : Min. 36 M-Na ⁺ : Min. 28.6; 31.2 (PEG)
S7e14d	M-H ⁺ : Min. 34	M-H ⁺ : Min. 31.1; 33.2	M-H ⁺ : Min. 28.5 (PEG)	M-H ⁺ : Min. 28.5; 35.5

	M-Na ⁺ : min. 29.1; 30.1	M-Na ⁺ : Min. 29.2	M-Na ⁺ : --	M-Na ⁺ : 25.8 (Polim)
Mide16d	M-H ⁺ : Min. 30; 33.3; 34.2 M-Na ⁺ : 18; 23; 30	M-H ⁺ : Min. 31.1; 33.2 M-Na ⁺ : Min. 29.2	M-H ⁺ : 28.5; 35.6 (PEG) M-Na ⁺ : 35.5 (PEG)	M-H ⁺ : Min. 36; 37 M-Na ⁺ : 28.6; 31.3

Sólo se pudo identificar, con un error menor a 5 ppm, la molécula de taxol, en la muestra donde se encontraba el estándar de taxol. En el resto de los extractos todos los compuestos se identificaron con errores mayores a 5 ppm. Además, se observó la aparición de “*clusters*” de polímeros como los de polietilenglicol (PEG) y del polipropilenglicol (PPG). En algunos casos, estos *clusters* coinciden con las masas esperadas de algunos de los compuestos de interés, como ocurre en los casos del taxol en los tres extractos y la 10-desacetil baccatina III y la cefalomanina en el extracto M2D16d (Tabla 12). En la imagen 8 se presenta el ejemplo de estándar de taxol, con las siguientes masas destacables:

- 216.9, que coincide con la masa del tetrámero de PEG [M+Na]⁺,
- 194.9, que coincide con la masa del tetrámero de PEG [M+H]⁺ y,
- 98.98 que coincide con la masa del tetrámero de PPG [M+Na]⁺

Debido a lo anterior, es necesario inyectar nuevamente los extractos evitando la contaminación con PEG y PPG. Para la repetición de estos experimentos, es clave tomar en cuenta que esta contaminación afecta negativamente a parámetros críticos en la LC-MS, tales como la sensibilidad, la resolución, la reproducibilidad y el tiempo de vida de la columna. Ya que los extractos que se analizaron no fueron sometidos a ningún tipo de purificación previa, representan matrices complejas, que pueden contener moléculas interferentes, tales como el PEG. Particularmente este compuesto puede interferir en la ionización e incluso suprimirla (Tran and Doucette 2006). De hecho, después de las primeras inyecciones, ya se habían identificado por el encargado del LDEM UAM-I la presencia de varios contaminantes en el sistema, incluidos el PEG. Para descartar que los contaminantes se estén arrastrando durante todo el proceso de extracción, es crucial un adecuado tratamiento de la muestra, y es en este aspecto donde se pudo haber fallado en el establecimiento de esta metodología, ya que no se tomaron las consideraciones

pertinentes. Haciendo un análisis de todo el procedimiento que se siguió para el tratamiento de los extractos, se lograron detectar dos fuentes potenciales de contaminación: los filtros de jeringa de nylon utilizados para el filtrado de los extractos metanólicos y los tubos de plástico utilizados para contener y manipular los extractos (Tran and Doucette 2006, Keller, Sui et al. 2008). Estas observaciones también motivaron el establecimiento de la SPE. Aunque todos los extractos de la mayoría de los hongos endófitos aislados fueron tratados tomando en cuenta estas consideraciones y sometidos a la SPE, no fue posible su análisis en el HPLC y LC-MS debido a la clausura del edificio “S” de la UAM-I en 2017, lugar donde se encontraban las instalaciones para la realización de estos análisis.

2.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

Puesto que para la realización de los cultivos se utilizó una incubadora de uso común, no fue posible controlar estrictamente la ausencia de luz durante los largos periodos de incubación que fueron necesarios. Si bien las investigaciones de taxol fúngico recomiendan mantener los cultivos en la oscuridad, porque los hongos endófitos producen naturalmente taxol en ausencia de luz, el efecto de la luz en la producción de taxol no había sido demostrado experimentalmente. En 2018, Soliman y su equipo demostraron que, como se sospechaba, la luz influencia negativamente la acumulación de taxol en cultivos líquidos con el endófito *Paraconiothyrium* spp. De hecho, en los cultivos incubados en la luz, la acumulación de taxol disminuyó casi a cero. Adicionalmente, se observó un cambio de color en los cultivos en medio sólido (Soliman and Raizada 2018). Estos hallazgos enfatizan la importancia del control de la incubación en estricta ausencia de luz.

Cabe señalar que tomando en cuenta los resultados del equipo de Soliman, se realizaron cultivos con los endófitos de los tejos cubriendo completamente los matraces con papel aluminio, desafortunadamente, los extractos obtenidos no pudieron ser analizados por ninguno de los métodos analíticos presentados previamente debido a la clausura de los laboratorios donde se realizaban los análisis. Por lo tanto, como perspectiva futura se plantearía obtener nuevamente los extractos con todos los hongos endófitos y analizarlos con los métodos establecidos en este trabajo.

2.4 CONCLUSIONES

1. Los extractos obtenidos a partir de caldos de cultivo de *P. microspora* usando medios y condiciones de cultivo reportadas para la producción de taxol, mostraron actividad citotóxica.
2. Los extractos obtenidos de los medios de cultivo M2D y S7 mostraron la citotoxicidad más alta.
3. Se encontraron cinco mezclas ideales para trabajar extractos de diclorometano de caldos de cultivo de hongos endófitos.
4. Se establecieron las técnicas de análisis de los tres taxanos en caldo de cultivo.

CAPÍTULO 3. EXPLORACIÓN DE LAS CONDICIONES DIFERENCIALES DE PRODUCCIÓN DE TAXOL FÚNGICO

El objetivo de esta etapa fue explorar qué condiciones de cultivo y/o moléculas inductoras/inhibidoras podrían influir en la producción de taxol en *P. microspora* y, de esta manera, realizar el análisis de expresión diferencial. Como consecuencia de lo anterior, la hipótesis central es que “el análisis de los transcriptomas de *Pestalotiopsis microspora* en condiciones de producción, no producción de taxol o inhibición/inducción, revelaría genes putativos de la biosíntesis de taxol en los hongos endófitos.

Dada la importancia del taxol como agente anticancerígeno, la pregunta ¿Qué genes están involucrados en la biosíntesis de taxol en *Taxus brevifolia*? fue una de las primeras preguntas que surgieron tras el descubrimiento de este diterpeno en la corteza del tejo. Han pasado 45 años desde este descubrimiento, 28 años desde su aprobación para el tratamiento del cáncer, y la respuesta a esta pregunta aún está incompleta. A la fecha conocemos casi toda la ruta de biosíntesis de taxol en *Taxus* spp., sin embargo, aún quedan muchas dudas sobre la regulación de esta compleja ruta metabólica (Kuang, Sun et al. 2019). En la Ilustración 7 se muestran los principales pasos en la ruta metabólica de biosíntesis de taxol y sus enzimas en *Taxus spp.* Observe que en algunos casos se ha identificado más de una enzima que puede catalizar una reacción.

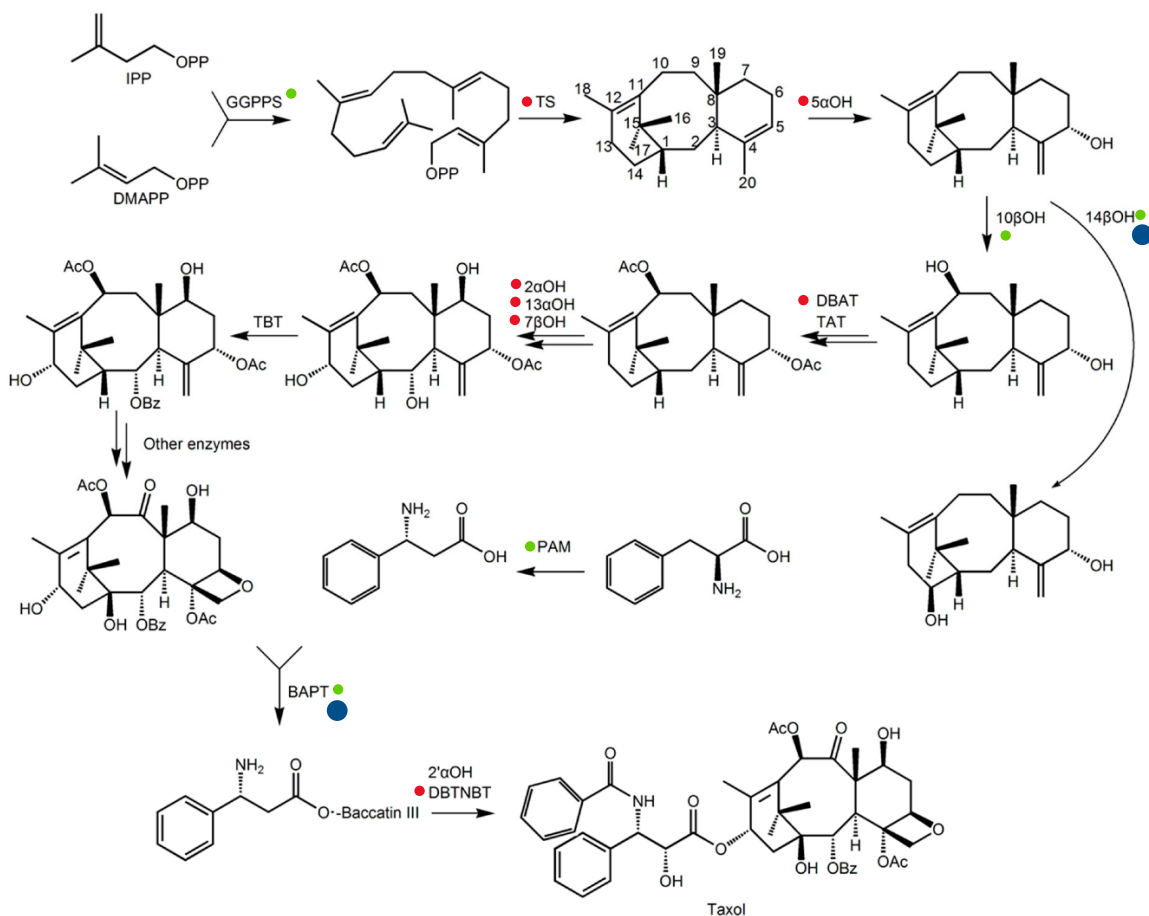


Ilustración 7. Principales pasos en la biosíntesis del taxol en *Taxus* spp.

La lista de enzimas es la siguiente: GGPPS, di-geranil pirofosfato sintasa; TS, taxadieno sintasa; 5αOH, taxadieno 5α hidroxilasa; 10βOH, Taxol 10β hidroxilasa; 14βOH, ‘violet Cedar’ 14β hidroxilasa; TAT, taxadieno-5α-ol-acetiltransferasa; DBTNBT, 3'-N-desfenilada paclitaxel-N-benzoiltransferasa; TBT, taxano 2 α-O-fenilacetiltransferasa; DBAT, 10-deacetylbaaccatin III-10-O-acetiltransferasa; 13αOH, taxano 13α hidroxilasa; BAPT, fenilpropioniltransferasa; 2αOH, Taxol 2α hidroxilasa; 7βOH, paclitaxel 7β hidroxilasa; PAM, fenilalanina isomerasa; 2'αOH, paclitaxel 2'α hidroxilasa. Modificado de: (Cui, Mao et al. 2019).

LA VÍA DEL METIL JASMONATO REGULA LA PRODUCCIÓN DE TAXOL EN *Taxus* spp.

Los jasmonatos son fitohormonas derivadas de los lípidos. El primero que se descubrió fue el metil jasmonato, que es el responsable del olor de las flores de *Jasminium grandiflorum*. Desde entonces, se ha estudiado su papel en la respuesta a numerosos tipos de estrés y procesos de desarrollo en plantas (Lakehal, Ranjan

et al. 2020). Ya que los jasmonatos influyen globalmente en el metabolismo vegetal, su efecto en la biosíntesis de taxol fue explorado desde las primeras etapas de las investigaciones en este tema. En 1996, Yukimune y su equipo pusieron a prueba el efecto de tres jasmonatos (metil cucurbato, metil jasmonato y ácido jasmónico) sobre los rendimientos de taxol y bacatina III en cultivos de células en suspensión de tres especies de *Taxus*. Sus resultados evidenciaron que el metil jasmonato induce la mayor acumulación de taxol, alcanzando hasta 110 mg de taxol por litro de cultivo (Yukimune, Tabata et al. 1996). El análisis del perfil metabolómico de cultivos de células en suspensión de *Taxus x media* estimulados con metil jasmonato, reveló que, además del taxol, una gran cantidad de taxanos son acumulados después de la estimulación, especialmente los taxanos oxigenados en el C-13 (Ketchum, Rithner et al. 2003). Estudios de expresión diferencial dan más evidencia del papel del metil jasmonato en la ruta del metabolismo del taxol. El transcriptoma de *Taxus chinensis* reveló que junto con la acumulación de taxol, un conjunto de genes de la biosíntesis de taxanos, de fenil propanoides y de fitohormonas se sobreexpresan con la adición de metil jasmonato a los cultivos. Adicionalmente, una gran cantidad de factores de transcripción, también se sobreexpresaron (Li, Zhang et al. 2012). Un estudio más detallado de estos factores de transcripción demostró que estos pertenecen a familia de factores de transcripción MYC y que, de hecho, regulan algunas enzimas de la ruta. En la Ilustración 7 se marcaron con círculos las enzimas reguladas por estos factores de transcripción: en rojo las enzimas que están fuertemente reguladas positivamente, en azul las moderadamente reguladas a la alta y en azul las que pueden estar reguladas positivamente por un MYC, pero y negativamente por otro (Cui, Mao et al. 2019). Además de estos factores de transcripción se conocen otros que pueden regular la biosíntesis de taxol:

- ❖ TcJAMYC1, TcJAMYC1y TcJAMYC4, un tipo de factores de transcripción de la familia bHLH (base/hélice-loop-hélice) encontrados en animales y plantas. Se ha encontrado que regulan negativamente la expresión de los genes de la biosíntesis de taxol en respuesta a jasmonato (Lenka, Nims et al. 2015).

- ❖ TcMYC2a podría regular positivamente la expresión de TS, TAT, DBTNBT, 13 α OH a 5 α OH, mediante la vía del factor de respuesta a etileno (ERF), que a su vez depende de la ruta de señalización del jasmonato (Zhang, Jin et al. 2018).
- ❖ TmMYB3, perteneciente a la familia de factores de transcripción MYB, que regula el metabolismo secundario en plantas, activa la expresión de TBT y TS (Yu, Luo et al. 2020).

Aunque se ha avanzado considerablemente en el entendimiento de la regulación de la ruta de biosíntesis de taxol en *Taxus* spp. los detalles moleculares de esta regulación aún son desconocidos. Más aún, no conocemos todas las enzimas que actúan en la ruta y, por otro lado, desconocemos la influencia de otras rutas de señalización. Por ejemplo, se sabe que otros compuestos como la fenilalanina, el ácido benzoico, la benzoglicina y la glicina mejoran los rendimientos de taxol en cultivo de células en suspensión, sin embargo, no se han realizado estudios detallados en relación al metabolismo del taxol (Fett-Neto, Melanson et al. 1994) y menos en el caso de los hongos endofíticos. Con respecto a las enzimas que catalizan cada paso, recientemente se completó la secuenciación del genoma de *Taxus chinensis* var. Mairei a nivel de cromosoma. Interesantemente, este árbol posee dos taxadieno sintasas (TS, Ilustración 7) una activa en ausencia de metil jasmonato y la otra activa solo en presencia de esta fitohormona (Xiong, Gou et al. 2021). Todo lo anterior pone en evidencia la complejidad de esta ruta metabólica y el largo camino que aún queda para lograr entender el lugar de la biosíntesis de taxol en el metabolismo global de las plantas, en las diferentes rutas de señalización y arroja infinidad de incógnitas sobre cómo podrían estar relacionados estos hallazgos con el conocimiento que hemos acumulado sobre la biosíntesis de taxol en hongos endófitos, no solo de *Taxus*, sino de todas las plantas en las que han sido aislado hongos productores de taxol.

¿QUE REGULA LA BIOSÍNTESIS DE TAXOL EN HONGOS?

Cuando se descubrió el primer hongo productor de taxol, saltó a la vista la extremadamente baja concentración de éste en los caldos de cultivo (Stierle, Strobel et al. 1993). Desde entonces comenzaron los esfuerzos por encontrar las condiciones de cultivo en las que se podían elevar los rendimientos. Aunque, como ya se vio en *Taxus* spp., el metil jasmonato juega un papel central en la acumulación de taxol, no fue el metil jasmonato el que se probó como inductor en hongos. Los primeros esfuerzos para alcanzar altos rendimientos de taxol fúngico e, indirectamente responder a la pregunta ¿Qué regula la biosíntesis de taxol en los hongos endófitos?, se dieron en la optimización de los medios de cultivo. Destaca la optimización del medio MID, un medio originalmente modificado para activar cultivos atenuados de un hongo fitopatógeno (uno de los medios de cultivo utilizados en este trabajo, Tabla 16, de los Anexos). La optimización se hizo en *Pestalotiopsis microspora*, para lo cual se probaron los efectos del MnSO_4 , el MgSO_4 , el ZnSO_4 , los fosfatos, las fuentes de carbono y nitrógeno, encontrándose que la concentración de fosfatos en el medio tiene la influencia más fuerte en la acumulación de taxol en los cultivos (Li, Sidhu et al. 1998). Debido a este reporte, en este trabajo se utilizó casi en todos los experimentos el medio M2D, que es como se le llamó al medio MID con las concentraciones ajustadas de MnSO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 y fosfatos (Tabla 17). Li y su equipo, también probaron el efecto de algunos inhibidores de la biosíntesis de esteroides, encontrando que la adición de triadimefon y tubeconazol elevan hasta diez veces la concentración de taxol en los cultivos (Li, Sidhu et al. 1998). En esta tesis se probó el efecto de estos dos compuestos en la cepa control *P. microspora*, sin embargo, no se detectó por HPLC ninguno de los taxanos en los caldos de cultivo. Como se mencionó en el capítulo anterior, es necesario repetir estos experimentos aplicando el conocimiento generado en esta tesis. Recientemente, se estudió en profundidad la inhibición de la biosíntesis de esteroides y su efecto sobre la biosíntesis de taxol en el endófito *Aspergillus flavipes*. Se encontró que el fluconazol podría estar inhibiendo la entrada de IPP y DMAPP a la ruta de esteroides, permitiendo así la acción de la GGPPS en la ruta del taxol (Ilustración 7). Análisis más detallados revelaron que las enzimas HMG-Co-

reductasa y GGP se sobreexpresan junto con el regulador transcripcional pbcR (El-Sayed, Ali et al. 2019). Cabe mencionar que este factor de transcripción regula la biosíntesis de diterpenos en *Aspergillus nidulans* (Bromann, Toivari et al. 2012)

Continuando con la optimización de medios de cultivo, en el presente trabajo también se probó el medio S7, usado para el aislamiento del primer hongo endófito productor de taxol (Stierle, Strobel et al. 1993) (Tabla 18 de los Anexos). Este medio contiene una proporción de azúcares que lo asemeja a los azúcares del floema de las plantas y está suplementado con diversos elementos traza, entre los que se destaca el benzoato de sodio. Como se discutió en el Capítulo 2, fue en los medios M2D y S7 sin agitación donde presuntamente se identificaron algunos taxanos (Tabla 12), lo que hace preguntarse si influyó, o qué tanto influyó la composición de este medio de cultivo en el resultado o la condición estática del cultivo. En relación con el benzoato, se ha observado un efecto moderado en el aumento de las concentraciones de taxol en cultivos con el hongo endófito de *Taxus x media*, *Paraconiothyrium* SSM001 (Soliman and Raizada 2013). De manera similar, esta misma cepa responde a clorometano (un compuesto volátil producido por hongos degradadores la de madera) y a quitina. Interesantemente, se observó una sobreexpresión de algunos genes presuntamente involucrados en la biosíntesis de taxol y en el proceso de exocitosis (Soliman, Greenwood et al. 2015).

Recientemente, el ácido salicílico se usó para mejorar la producción de taxol en cultivos del endófito de *Taxodium mucronatum*, *Pestalotiopsis microspora*. Además de los efectos positivos del ácido salicílico en el aumento del rendimiento de taxol, se observó el aumento de la actividad de algunas enzimas antioxidantes, de la ruta de la HMG-CoA reductasa (vía del mevalonato), la disminución de contenido de lípidos y la sobreexpresión de la GGPP (Ilustración 7). Considerando estos hallazgos y dado que el hongo que se usó en esta tesis fue del mismo género y especie, quizás convendría reproducir este experimento. Cabe mencionar que las condiciones de cultivo utilizadas fueron: cultivos de 500 ml en matraces de 2 L, temperatura constante de 25 °C, periodos de luz/oscuridad de 12 h, tiempo total de cultivo de 21 días en el medio MID (Subban, Subramani et al. 2019). Con respecto

al efecto de la luz, parece ser crucial en los rendimientos de taxol en *Paraconiothyrium* SSM001 (Soliman and Raizada 2018)

Otros enfoques usados para la estimulación y aumento de los rendimientos de taxol consisten en la adición de extractos de corteza de la planta hospedera u otros árboles leñosos y el co-cultivo con otros microorganismos, tanto epífitos como endófitos, de la planta hospedera (hongos y/o bacterias). Las concentraciones de taxol aumentaron hasta 30 veces usando estos enfoques (Soliman and Raizada 2013). Un análisis proteómico y de las actividades enzimáticas del endófito *Aspergillus flavipes* en co-cultivo con una cepa de *Bacillus subtilis* asilada de la corteza de la planta hospedera, reveló que esta interacción potencia la biosíntesis de taxol, la remodelación de la cromatina y la sobre expresión de TS, DBAT y BPAT. Interesantemente, la expresión de estos genes correlacionó casi perfectamente con la expresión de la nucleósido difosfato quinasa (NDPK) (El-Sayed, Shindia et al. 2021); esta enzima ayuda a mantener los niveles de GTP, esenciales para la activación de las proteínas G.

En resumen, los factores que podrían regular la producción de taxol en cultivos líquidos de hongos endófitos son: luz, fosfato, benzoato, agitación, la interacción con otros microorganismos y la adición de algún compuesto químico (clorometano, quitina, ácido salicílico, p.ej.). En conjunto, estos factores ambientales podrían activar vías de regulación transcripcional, epigenética y/o señalización de proteínas G.

ANEXOS

Tabla 13. Morfotipos aislados por planta

Planta hospedera	Número de morfotipos	Claves de Identificación final
Tejo Ponferrada	32	ER01, ER02, ER03, ER07, ER08, ER12, ER13, ER14, ER15, ER16, ER17, EL01, EL02, EL03, EL04, EL05, EL06, EL07, EL08, EL09, EL10, ESL05, ESL07, ESL08, ESL09, ESL10, ESL11, ESL12, ESL13 y ESL14
Tejo El Chico	38	MR01, MR02, MR03, MR04, MR05, MR06, MR07, MR08, MR10, MR11, MR12, MR13, MR14, ML01, ML02, ML03, ML04, ML05, ML06, ML07, ML08, ML09, ML10, ML11, ML12, ML13, ML14, ML15, ML16, MSL01, MSL02, MSL03, MSL04, MSL05, MSL06, MSL07, MSL08 y MSL09
<i>Kramería cystisoides</i>	48	MRK1A, MRK1B, MRK2, MRK3, MRK4, MRK5, MRK6, MRK7, MRK9, MRK10, MRK11, MRK12, MRK13, MRK14, MRK14B, MRK15, MRK16, MRK17, MRK18, MRK20, MRK21, MRK22, MRK23, MRK24, MRK25, MRK26, MRK27, MRK28, MRK29, MRK30, MRK31, MRK32, MRK33, IHK 1, IHK 2, IHK2B, IHK2C, IHK4, IHK5, IHK6A, , IHK6B, , IHK8, IHK9, IHK10, IHK11, IHK12, IHK13 y IHK14
<i>Salvia ballotiflora</i>	12	IRH, IRH2, IRH4A, IRH4B, IHH, IBH2, IBH3, IBH4, PBH1, PBH2, PRH1A y PRH1B.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana de los hongos endófitos

ID hongo	Diámetro del halo de inhibición (mm)						
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Tejo El Chico							
ML03	5	8	3	13	16	10	18
ML08	4	4	4	0	0	0	0
MR07	0	4	0	0	0	0	0
MR10	0	3	0	0	0	0	0
MR14	3	3	3	0	0	0	0
ML16	0	4	0	0	0	0	0
Tejo Ponferrada							
EL01	0	4	0	5	6	2	0
EL02	0	0	0	0	0	0	0
Salvia ballotiflora							
IBH4	0	5	0	0	5	6	0
PBH1B	5	5	0	0	0	0	0
IRH	4	3	0	0	0	0	0
IBH3	0	7	0	6	6	3	0
PBH1	0	0	0	0	0	0	0
IHH	0	0	12	17	19	6	6
IRH4A	0	0	0	0	0	0	0
Kremaria cystisoides							
MRK8	0	4	0	0	0	0	0
MRK5B	0	6	0	0	0	0	0
MRK5A	0	0	0	0	0	0	0
MRK23	0	0	0	0	0	0	0
IHK4	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 15. Extractos obtenidos a partir de cultivos líquidos de *P. microspora*

ID del extracto	Medio de cultivo	Tiempo de cultivo (días)	Volumen del sobrenadante (ml)	Rendimiento (mg)	Actividad citotóxica
GF3	GF	3	61	1.6	Sin actividad
GF6	GF	6	69	1.3	Sin actividad
GF10	GF	10	62	2.1	HCT-15
GF14	GF	14	78	1.9	Sin actividad
GF15	GF	15	93	1.8	MCF-7
GF16	GF	16	95	2.1	Sin actividad
GF21	GF	21	65	2.1	Sin actividad
GFs3	GFs	3	73	1.2	Sin actividad
GFs6	GFs	6	70	1.5	Sin actividad
GFs10	GFs	10	63	0.7	Sin actividad
GFs14	GFs	14	79	1.2	Sin actividad
GFs15	GFs	15	73	1.5	Sin actividad

GFs16	GFs	16	68	1.5	Sin actividad
GFs21	GFs	21	62	1.1	MCF-7
MID3	MID	3	81	1.6	Sin actividad
MID6	MID	6	78	1.6	Sin actividad
MID10	MID	10	78	1.8	Sin actividad
MID14	MID	14	73	1.5	Sin actividad
MID15	MID	15	95	0.8	HCT-15
MID16	MID	16	73	1.6	Sin actividad
MID21	MID	21	87	1.6	MCF-7 y HCT-15
MIDs3	MIDs	3	85	0.9	Sin actividad
MIDs6	MIDs	6	85	1.2	Sin actividad
MIDs10	MIDs	10	78	1.1	Sin actividad
MIDs14	MIDs	14	85	1.8	Sin actividad
MIDs15	MIDs	15	89	1.7	Sin actividad
MIDs16	MIDs	16	73	1.7	Sin actividad
MIDs21	MIDs	21	83	0.6	MCF-7
M2D16e*	M2D	16	166	4.5	MCF-7 y HCT-15
M2D	M2D	16	170	5.5	MCF-7 y HCT-15
S714e*	S7	14	170	4.2	MCF-7 y HCT-15

*cultivos sin agitación

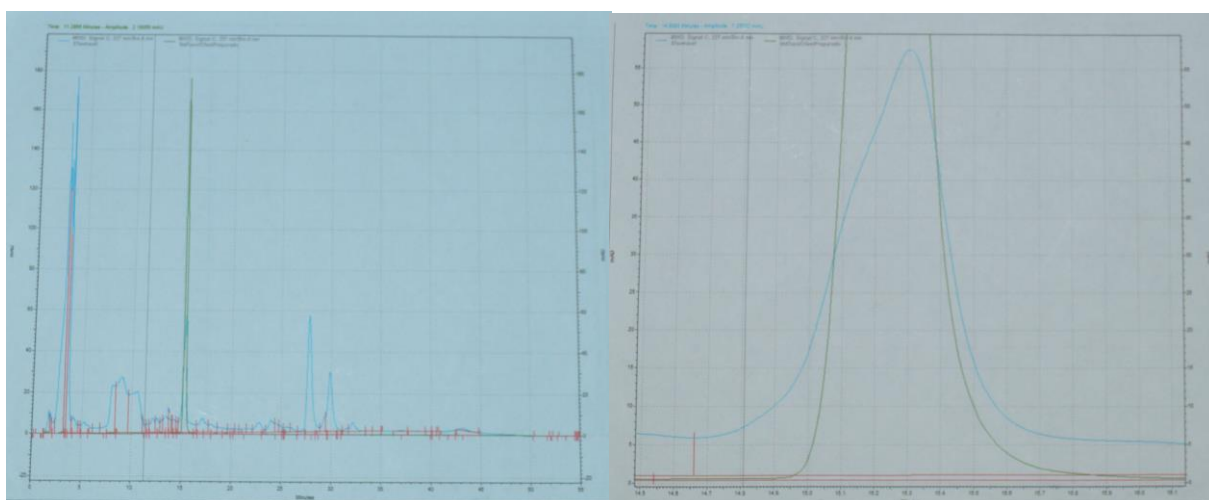


Imagen 5. Inyección de extracto de *P. microspora*. Columna C18, μ Bondapak C18, 10 μ m, 3.9 x 300 mm. Waters. Gradiente de elución: 0-10 min, 20-50% de acetonitrilo; 10-40 min, 50-80 % de acetonitrilo y 40-50 min, 80-20 % de acetonitrilo

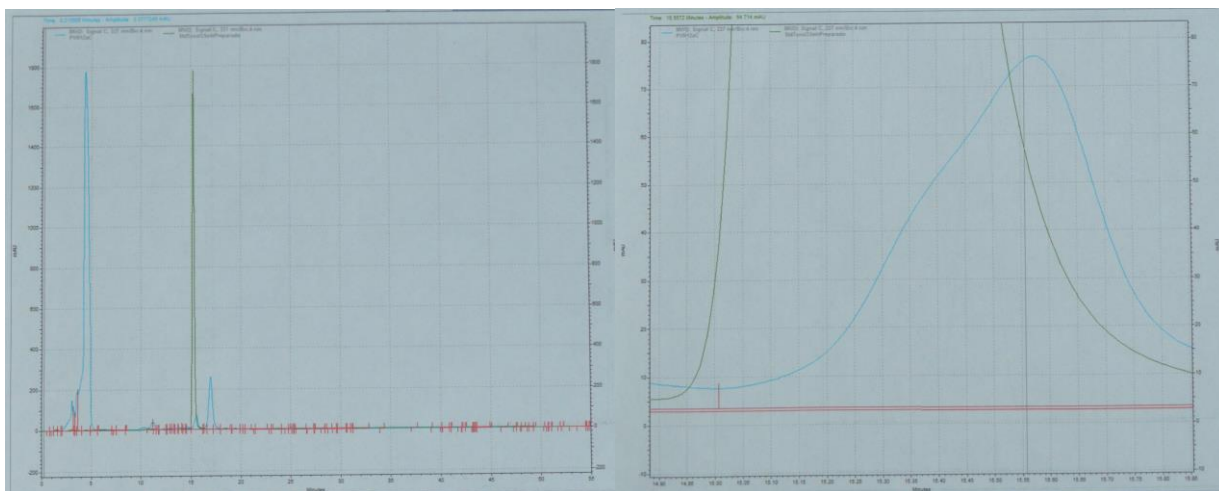


Imagen 6. Inyección de extracto del endófito MR10. Columna C18, μ Bondapak C18, 10 μ m, 3.9 x 300 mm. Waters. Gradiente de elución: 0-10 min, 20-50% de acetonitrilo; 10-40 min, 50-80 % de acetonitrilo y 40-50 min, 80-20 % de acetonitrilo.

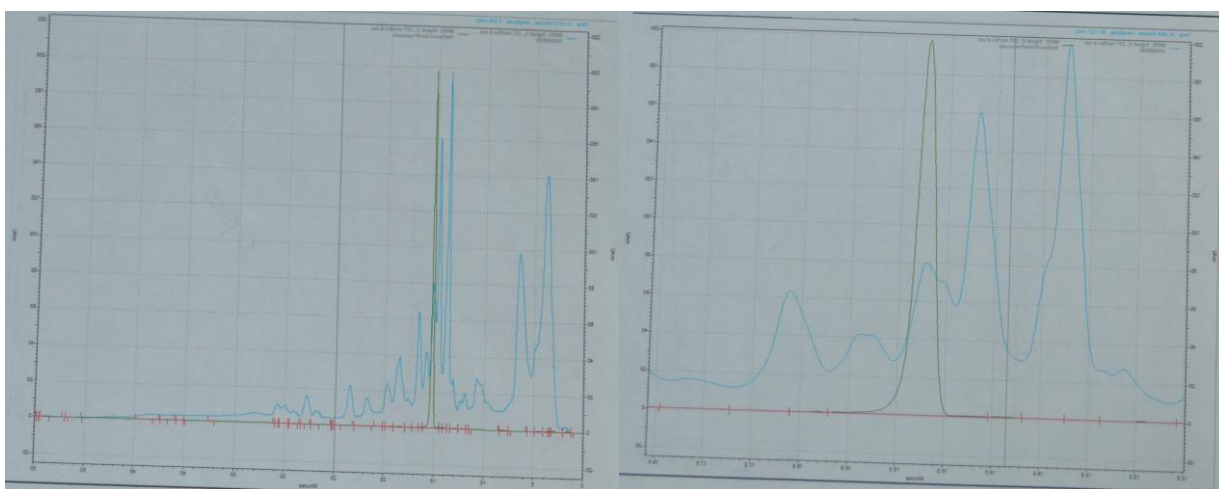


Imagen 7. Inyección de extracto del endófito ER01. Columna C18, μ Bondapak C18, 10 μ m, 3.9 x 300 mm. Waters. Gradiente de elución: 0-10 min, 20-50% de acetonitrilo; 10-40 min, 50-80 % de acetonitrilo y 40-50 min, 80-20 % de acetonitrilo

Tabla 16. Medio MID para la producción de taxol fúngico

Componente	Cantidad
Sacarosa	30 g/l
Tartrato de amonio	5 g/l
Extracto de levadura	0.5 g/l
Soytone, Bacto™	1 g/l
Ca(NO ₃) ₂	280 mg/l
KCl	60 mg/l
KNO ₃	80 mg/l
MgSO ₄	360 mg/l
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	20 mg/l
FeCl ₃	2 mg/l
MnSO ₄	5 mg/l
ZnSO ₄	2.5 mg/l
H ₃ BO ₃	1.4 mg/l
KI	0.7 mg/l

Tabla 17. Medio M2D para la producción de taxol fúngico

Componente	Cantidad
Sacarosa	30 g/l
Tartrato de amonio	5 g/l
Extracto de levadura	0.5 g/l
Soytone, Bacto™	1 g/l
Ca(NO ₃) ₂	280 mg/l
KCl	60 mg/l
KNO ₃	80 mg/l
MgSO ₄	10 mg/l
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1 mg/l
FeCl ₃	2 mg/l
MnSO ₄	100 mg/l
ZnSO ₄	1000 mg/l
H ₃ BO ₃	1.4 mg/l
KI	0.7 mg/l

Tabla 18. Medio S7 para la producción de taxol fúngico

Componente	Cantidad
Glucosa	1 g/l
Fructosa	3 g/l
Sacarosa	6 g/l
Soytone, Bacto™	1 g/l
Extracto de levadura	0.5 g/l
Tiamina	1 mg/l
Biotina	1 mg/l
Piridoxal	1 mg/l
Pantotenato de sodio	1 mg/l

MgSO ₄	36 mg/l
CaNO ₃	6.5 mg/l
Cu(NO ₃) ₂	1 mg/l
MnCl ₂	5 mg/l
FeCl ₂	2 mg/l
KH ₂ PO ₄ 1 M	1ml/l (136 mg/l)
Acetato de sodio	1000 mg/l
Fenilalanina	5 mg/l
Bezoato de sodio	100 mg/l

Tabla 19. Medio GF para producción de taxol fúngico

Componente	Cantidad
Glucosa	29.9 g/l
Fructosa	29.9 g/l
NaNO ₃	3.6 g/l
Extracto de levadura	4.52 g/l
Ca(NO ₃) ₂	280 mg/l
KCl	60 mg/l
KNO ₃	80 mg/l
MgSO ₄	360 mg/l
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	20 mg/l
FeCl ₃	2 mg/l
MnSO ₄	5 mg/l
ZnSO ₄	2.5 mg/l
H ₃ BO ₃	1.4 mg/l
KI	0.7 mg/l

Tabla 20. Medio RMPI para mantenimiento de las líneas celulares

Componente	Cantidad
Medio RMPI 1640 10X (in vitro s.a.)	50 ml
Suero de ternera neonato (in vitro s.a.)	50 ml
L-glutamina (in vitro s.a.)	5 ml
Penicilina-estreptomicina (in vitro s.a.)	0.5 ml
Bicarbonato de sodio (in vitro s.a.)	25 ml
Agua desionizada estéril	369

Tabla 21. *Escherichia coli* ATCC®25922. Diámetros de zona de inhibición de la prueba de susceptibilidad a antibióticos por difusión en disco

Antibiótico	Réplicas de los diámetros de zona de inhibición (mm)						Rangos de control de calidad para <i>E. coli</i> ATCC®25922		
	1	2	3	4	5	6		P ± DE	Resultado
Amoxicilina (AML)	16	14	15	14	15	12	15-22	14.3 ± 1.4	DR
Ampicilina (AMP)	14	14	15	14	15	14	15-22	14.3 ± 0.5	DR
Ciprofloxacino (CIP)	31	20	30	21	35	23	30-40	26.7 ± 6.2	DR
Tetraciclina (TE)	22	17	22	18	21	21	18-25	20.2 ±	DR
Ácido nalidíxico (NA)	22	23	22	24	21	24	22-28	22.7 ± 2.1	DR
Gentamina (CN)	19	20	20	23	22	22	19-26	21.0 ± 1.2	DR
Ceftriaxona (CRO)	31	22	27	22	33	31	29-35	27.7 ± 1.5	DR
Sulfametoxazol/ Trimetroprima (SXT)	26	19	26	19	28	34	23-29	25.3 ± 4.8	DR
Oxitetraciclina (OT)	21	19	20	19	20	12	18-25	18.5 ± 5.7	DR
Kanamicina (K)	20	19	21	23	20	17	17-25	20.0 ± 3.3	DR
Enrofloxacin (ENR)	22	22	23	23	23	24	32-40	22.8 ± 2	DR
Estreptomycin (S)	13	13	12	12	13	12	12-20	12.5 ± 0.8	DR
Ceftiofur (EFT)	25	27	27	27	26	28	26-31	26.7 ± 0.5	DR
Colistina (CT)	12	11	11	12	12	11	11-17	11.5 ± 0.5	DR

DR: Dentro del rango del control de calidad según CLSI-M100. FR: Fuera del rango del control de calidad según CLSI-M100
P ± DE: Promedio más menos una desviación estándar

Tabla 22. *Staphylococcus aureus* ATCC®25923. Diámetros de zona de inhibición de la prueba de susceptibilidad a antibióticos por difusión en disco

Antibiótico	Réplicas de los diámetros de zona de inhibición (mm)						Rangos de control de calidad para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25923		
	1	2	3	4	5	6		P ± DE	Resultado
Ciprofloxacino (CIP)	28	24	28	27	26	29	27-35	23.3 ± 2.9	FR
Tetraciclina (TE)	25	23	30	19	25	27	27-35	24.8 ± 3.7	DR
Gentamicina (CN)	20	24	29	25	22	22	19-27	23.7 ± 3.1	DR
Sulfametoxazol/ Trimetroprima (SXT)	29	28	31	18	30	27	24-32	27.2 ± 4.7	DR
Oxitetraciclina (OT)	25	20	28	25	24	23	24-30	24.2 ± 2.6	DR
Kanamicina (K)	20	21	25	22	21	21	19-26	21.7 ± 1.8	DR
Lincomicina (MY)	24	26	24	26	26	19	24-30	21.3 ± 1.8	FR
Ceftiofur (EFT)	32	20	36	26	31	25	27-31	28.3 ± 5.8	DR
Enrofloxacin (ENR)	26	24	30	20	26	24	27-31	25.0 ± 3.3	DR

DR: Dentro del rango del control de calidad según CLSI-M100. FR: Fuera del rango del control de calidad según CLSI-M100

P ± DE: Promedio más menos una desviación

Tabla 23. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®9027. Diámetros de zona de inhibición de la prueba de susceptibilidad a antibióticos por difusión en disco

Antibiótico	Réplicas de los diámetros de zona de inhibición (mm)	
-------------	--	--

	1	2	3	4	5	6	Rangos de control de calidad para <i>P. aeruginosa</i> ATCC®9027		
								P ± DE	Resultado
Ciprofloxacino (CIP)	25	26	24	25	29	27	25-33	25 ± 1.8	DR
Gentamicina (CN)	21	21	22	19	18	19	17-23	17 ± 1.5	DR
Enrofloxacin (ENR)	19	18	22	19	23	18	15-19	15 ± 2.1	DR

DR: Dentro del rango del control de calidad según CLSI-M100. FR: Fuera del rango del control de calidad según CLSI-M100

P ± DE: Promedio más menos una desviación

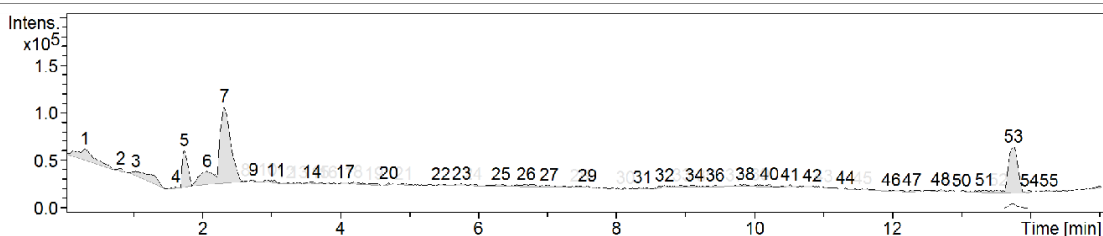
Compound Spectrum List Report

Analysis Info

Acquisition Date 4/10/2014 1:41:36 PM
 Analysis Name D:\Data\Entrenamiento\Data\MoisesGalindo\Taxol_LCMSPositivo10ABR14_4_RA1_01_208.d
 Method tune_low_LC_modificado.m Operator CBS_UAM_I
 Sample Name Taxol_LCMSPositivo10ABR14_4 Instrument micrOTOF 213750.00410
 Comment

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	190 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	2000 m/z	Set Charging Voltage	0 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



#	RT [min]	Area	Int. Type	I	S/N	Chromatogram	Max. m/z	FWHM [min]
1	0.3	221230.3	Chromatogram	62105	10.8	BPC +	216.9489	0.3
2	0.8	18793.4	Chromatogram	41647	2.9	BPC +	216.9516	0.1
3	1.0	156935.5	Chromatogram	38475	4.0	BPC +	216.9477	0.2
4	1.6	6515.9	Chromatogram	22282	1.1	BPC +	216.9470	0.1
5	1.7	216823.1	Chromatogram	60610	34.6	BPC +	145.0235	0.1
6	2.1	209891.0	Chromatogram	38532	12.3	BPC +	216.9470	0.3
7	2.3	849701.1	Chromatogram	106261	71.9	BPC +	98.9800	0.2
8	2.6	3015.9	Chromatogram	29148	1.2	BPC +	216.9497	0.0
9	2.7	8181.6	Chromatogram	29704	1.6	BPC +	216.9530	0.1
10	2.9	12934.4	Chromatogram	29513	2.2	BPC +	216.9482	0.1
11	3.1	13017.2	Chromatogram	29267	2.6	BPC +	216.9508	0.1
12	3.2	6284.1	Chromatogram	27101	1.2	BPC +	216.9524	0.1
13	3.4	5984.3	Chromatogram	26849	1.2	BPC +	216.9556	0.1
14	3.6	14001.2	Chromatogram	27522	1.8	BPC +	216.9486	0.1
15	3.7	5256.9	Chromatogram	26786	1.1	BPC +	216.9474	0.1
16	3.8	8008.6	Chromatogram	27084	1.5	BPC +	216.9432	0.0
17	4.1	15299.8	Chromatogram	27482	2.1	BPC +	216.9489	0.1
18	4.2	19338.2	Chromatogram	27425	2.1	BPC +	216.9540	0.1
19	4.5	14203.5	Chromatogram	25983	1.5	BPC +	216.9526	0.2
20	4.7	5213.2	Chromatogram	26064	1.4	BPC +	216.9487	0.0
21	4.9	9302.7	Chromatogram	25959	1.3	BPC +	216.9378	0.1
22	5.5	8137.2	Chromatogram	25176	1.3	BPC +	216.9544	0.1
23	5.8	20021.3	Chromatogram	25922	2.1	BPC +	216.9507	0.1
24	5.9	14115.7	Chromatogram	25340	1.9	BPC +	216.9534	0.1
25	6.3	30505.5	Chromatogram	25322	2.2	BPC +	216.9494	0.1
26	6.7	40161.9	Chromatogram	25215	2.2	BPC +	216.9479	0.2
27	7.0	26547.8	Chromatogram	24445	1.8	BPC +	216.9502	0.1
28	7.5	4642.7	Chromatogram	23576	1.3	BPC +	116.9343	0.0
29	7.6	6990.0	Chromatogram	23295	1.3	BPC +	116.9355	0.1
30	8.1	3242.2	Chromatogram	21057	0.9	BPC +	194.9092	0.0
31	8.4	13851.5	Chromatogram	22048	1.5	BPC +	194.9121	0.1
32	8.7	13958.1	Chromatogram	24353	2.1	BPC +	194.9141	0.1
33	8.9	12323.3	Chromatogram	24251	1.5	BPC +	194.9172	0.1
34	9.1	15074.6	Chromatogram	24356	1.6	BPC +	194.9166	0.1
35	9.3	5530.0	Chromatogram	23686	1.1	BPC +	194.9154	0.1
36	9.4	14817.0	Chromatogram	24166	1.5	BPC +	194.9158	0.1
37	9.7	3818.4	Chromatogram	24179	1.1	BPC +	194.9157	0.0
38	9.8	1488.2	Chromatogram	24963	1.9	BPC +	194.9116	0.1

Taxol_LCMSPositivo10ABR14_4_RA1_01_208.d

Broker Compass DataAnalysis 4.1

printed: 12/21/2018 6:55:52 PM

by: CBS_UAM_I

Page 1 of 31

Imagen 8. Cromatograma y lista de masas del estándar de taxol

REFERENCIAS

1. (2021). M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical and Laboratory Standards Institute.
2. Aguilar-Trigueros, C. A. and M. C. Rillig (2016). "Effect of different root endophytic fungi on plant community structure in experimental microcosms." Ecology and Evolution **6**(22): 8149-8158.
3. Arnold, A. E. (2007). "Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers." Fungal Biology Reviews **21**(2): 51-66.
4. Arnold, A. E. and F. Lutzoni (2007). "Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?" Ecology **88**(3): 541-549.
5. Arnold, A. E., L. C. Mejía, D. Kyllo, E. I. Rojas, Z. Maynard, N. Robbins and E. A. Herre (2003). "Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(26): 15649-15654.
6. Arora, P., Z. A. Wani, T. Ahmad, P. Sultan, S. Gupta and S. Riyaz-Ul-Hassan (2019). "Community structure, spatial distribution, diversity and functional characterization of culturable endophytic fungi associated with *Glycyrrhiza glabra* L." Fungal Biol **123**(5): 373-383.
7. Aswini, A. and C. Soundhari (2018). "Production of camptothecin from endophytic fungi and characterization by high-performance liquid chromatography and anticancer activity against colon cancer cell line." Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research **11**: 166-170.
8. Azhar, A., F. Mu, H. Huang, J. Cheng, Y. Fu, M. R. Hamid, D. Jiang and J. Xie (2019). "A novel RNA virus related to Sobemoviruses confers hypovirulence on the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*." Viruses **11**(8): 759.
9. Baldrian, P., T. Větrovský, C. Lepinay and P. Kohout (2022). "High-throughput sequencing view on the magnitude of global fungal diversity." Fungal Diversity **114**(1): 539-547.
10. Bandara, C. J., A. Siriwardhana, D. N. Karunaratne, B. M. Ratnayake Bandara, A. Wickramasinghe, S. A. Krishnarajah and V. Karunaratne (2021). "Production of Vincristine and Vinblastine by the Endophytic Fungus *Botryosphaeria laricina* Strain (CRS1) is Dependent on Stimulating Factors Present in *Catharanthus roseus*." The Natural Products Journal **11**(2): 221-230.
11. Bastías, D. A., L. J. Johnson and S. D. Card (2020). "Symbiotic bacteria of plant-associated fungi: friends or foes?" Current Opinion in Plant Biology **56**: 1-8.
12. Biswas, D., P. Biswas, S. Nandy, A. Mukherjee, D. K. Pandey and A. Dey (2020). "Endophytes producing podophyllotoxin from *Podophyllum* sp. and other plants: A review on isolation, extraction and bottlenecks." South African Journal of Botany **134**: 303-313.
13. Bitas, V., N. McCartney, N. Li, J. Demers, J.-E. Kim, H.-S. Kim, K. M. Brown and S. Kang (2015). "*Fusarium Oxysporum* Volatiles Enhance Plant Growth Via Affecting Auxin Transport and Signaling." Frontiers in Microbiology **6**(1248).
14. Brader, G., S. Compant, K. Vescio, B. Mitter, F. Trognitz, L.-J. Ma and A. Sessitsch (2017). "Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes." Annual Review of Phytopathology **55**(1): 61-83.

15. Bromann, K., M. Toivari, K. Viljanen, A. Vuoristo, L. Ruohonen and T. Nakari-Setälä (2012). "Identification and Characterization of a Novel Diterpene Gene Cluster in *Aspergillus nidulans*." PLOS ONE **7**(4): e35450.
16. Bérdy, J. (2005). "Bioactive Microbial Metabolites." The Journal of Antibiotics **58**(1): 1-26.
17. Chagas, F. O., R. d. C. Pessotti, A. M. Caraballo-Rodríguez and M. T. Pupo (2018). "Chemical signaling involved in plant–microbe interactions." Chemical Society Reviews **47**(5): 1652-1704.
18. Chen, H., Y. Qi, X. He, L. Xu, W. Zhang, X. Lv, H. Zhang, D. Yang, Y. Zhu and Z. Liang (2021). "Endophytic fungus *Mucor circinelloides* DF20 promote tanshinone biosynthesis and accumulation in *Salvia miltiorrhiza* root." Plant Science **307**: 110898.
19. Christianson, D. W. (2017). "Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases." Chemical Reviews **117**(17): 11570-11648.
20. Chu, Y.-M., J.-J. Jeon, S.-J. Yea, Y.-H. Kim, S.-H. Yun, Y.-W. Lee and K.-H. Kim (2020). "Double-Stranded RNA Mycovirus from *Fusarium graminearum*." Applied and Environmental Microbiology **68**(5): 2529-2534.
21. Chávez, F. Z. (2001). "Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. I: Población de adultos y algunas características del hábitat." CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva **8**(2).
22. Chávez, F. Z. (2002). "Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México." CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva **9**(2).
23. Cobian, G. M., C. P. Egan and A. S. Amend (2019). "Plant–microbe specificity varies as a function of elevation." The ISME Journal **13**(11): 2778-2788.
24. Cseke, L. J., A. Kirakosyan, P. B. Kaufman, S. Warber, J. A. Duke and H. L. Briellmann (2016). Natural Products from Plants, CRC Press.
25. Cui, Y., R. Mao, J. Chen and Z. Guo (2019). "Regulation Mechanism of MYC Family Transcription Factors in Jasmonic Acid Signalling Pathway on Taxol Biosynthesis." International Journal of Molecular Sciences **20**(8).
26. Dang, H., T. Zhang, Z. Wang, G. Li, W. Zhao, X. Lv and L. Zhuang (2021). "Differences in the endophytic fungal community and effective ingredients in root of three *Glycyrrhiza* species in Xinjiang, China." PeerJ **9**: e11047.
27. Darcy, J. L., S. O. I. Swift, G. M. Cobian, G. L. Zahn, B. A. Perry and A. S. Amend (2020). "Fungal communities living within leaves of native Hawaiian dicots are structured by landscape-scale variables as well as by host plants." Molecular Ecology **29**(16): 3102-3115.
28. de la Porte, A., R. Schmidt, É. Yergeau and P. Constant (2020). "A Gaseous Milieu: Extending the Boundaries of the Rhizosphere." Trends in Microbiology **28**(7): 536-542.
29. Demain, A. L. (1999). "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms." Applied Microbiology and Biotechnology **52**(4): 455-463.
30. Demain, A. L. and A. Fang (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. History of Modern Biotechnology I. A. Fiechter. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 1-39.

31. Demers, J. E., B. K. Gugino and M. d. M. Jiménez-Gasco (2015). "Highly diverse endophytic and soil *Fusarium oxysporum* populations associated with field-grown tomato plants." Applied and environmental microbiology **81**(1): 81-90.
32. Dewick, P. M. (2009). Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. Medicinal Natural Products: 7-38.
33. Dewick, P. M. (2009). The Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. Medicinal Natural Products: 187-310.
34. Ditengou, F. A., A. Müller, M. Rosenkranz, J. Felten, H. Lasok, M. M. van Doorn, V. Legué, K. Palme, J.-P. Schnitzler and A. Polle (2015). "Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture." Nature Communications **6**(1): 6279.
35. Drew, B. T., J. G. González-Gallegos, C.-L. Xiang, R. Kriebel, C. P. Drummond, J. B. Walked and K. J. Sytsma (2017). "*Salvia* united: The greatest good for the greatest number." TAXON **66**(1): 133-145.
36. Eid, A. M., S. S. Salim, S. E.-D. Hassan, M. A. Ismail and A. Fouda (2019). Role of Endophytes in Plant Health and Abiotic Stress Management. Microbiome in Plant Health and Disease: Challenges and Opportunities. V. Kumar, R. Prasad, M. Kumar and D. K. Choudhary. Singapore, Springer Singapore: 119-144.
37. El-Sayed, A. S. A., D. M. I. Ali, M. A. Yassin, R. A. Zayed and G. S. Ali (2019). "Sterol inhibitor "Fluconazole" enhance the Taxol yield and molecular expression of its encoding genes cluster from *Aspergillus flavipes*." Process Biochemistry **76**: 55-67.
38. El-Sayed, A. S. A., A. A. Shindia, A. AbouZeid, A. Koura, S. E. Hassanein and R. M. Ahmed (2021). "Triggering the biosynthetic machinery of Taxol by *Aspergillus flavipes* via cocultivation with *Bacillus subtilis*: proteomic analyses emphasize the chromatin remodeling upon fungal-bacterial interaction." Environmental Science and Pollution Research **28**(29): 39866-39881.
39. El-Sayed, E. R. "Discovery of the anticancer drug vinblastine from the endophytic *Alternaria alternata* and yield improvement by gamma irradiation mutagenesis." Journal of Applied Microbiology **n/a**(n/a).
40. Espino-Vázquez, A. N., J. R. Bermúdez-Barrientos, J. F. Cabrera-Rangel, G. Córdova-López, F. Cardoso-Martínez, A. Martínez-Vázquez, D. A. Camarena-Pozos, S. J. Mondo, T. E. Pawłowska, C. Abreu-Goodger and L. P. Partida-Martínez (2020). "Narnaviruses: novel players in fungal–bacterial symbioses." The ISME Journal **14**(7): 1743-1754.
41. Eyberger, A. L., R. Dondapati and J. R. Porter (2006). "Endophyte Fungal Isolates from *Podophyllum peltatum* Produce Podophyllotoxin." Journal of Natural Products **69**(8): 1121-1124.
42. Farh, M. E.-A. and J. Jeon (2020). "Roles of Fungal Volatiles from Perspective of Distinct Lifestyles in Filamentous Fungi." The plant pathology journal **36**(3): 193-203.
43. Fett-Neto, A. G., S. J. Melanson, S. A. Nicholson, J. J. Pennington and F. DiCosmo (1994). "Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *taxus cuspidata*." Biotechnology and Bioengineering **44**(8): 967-971.

44. Fisher, P. J. and O. Petrini (1987). "Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticosa*: A preliminary study." Transactions of the British Mycological Society **89**(2): 246-249.
45. Gangadevi, V., M. Murugan and J. Muthumary (2008). "Taxol Determination from *Pestalotiopsis pauciseta*, a Fungal Endophyte of a Medicinal Plant." Chinese Journal of Biotechnology **24**(8): 1433-1438.
46. Gangadevi, V. and J. Muthumary (2009). "A Novel Endophytic Taxol-Producing Fungus *Chaetomella raphigera* Isolated From a Medicinal Plant, *Terminalia arjuna*." Applied Biochemistry and Biotechnology **158**(3): 675-684.
47. Gangadevi, V. and J. Muthumary (2009). "Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree)." Biotechnology and Applied Biochemistry **52**(1): 9-15.
48. Garyali, S., A. Kumar and M. S. Reddy (2013). "Taxol production by an endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from Himalayan yew." Journal of microbiology and biotechnology **23**(10): 1372-1380.
49. Garyali, S., A. Kumar and M. S. Reddy (2014). "Diversity and antimitotic activity of taxol-producing endophytic fungi isolated from Himalayan yew." Annals of Microbiology **64**(3): 1413-1422.
50. Gauchan, D. P., P. Kandel, A. Tuladhar, A. Acharya, U. Kadel, A. Baral, A. B. Shahi and M. R. García-Gil (2020). "Evaluation of antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of bioactive compounds produced from endophytic fungi of Himalayan yew (*Taxus wallichiana*) in Nepal." F1000Res **9**: 379.
51. Gershenzon, J. and N. Dudareva (2007). "The function of terpene natural products in the natural world." Nature Chemical Biology **3**(7): 408-414.
52. Godtfredsen, W. O., S. Jahnsen, H. Lorck, K. Roholt and L. Tybring (1962). "Fusidic Acid: a New Antibiotic." Nature **193**(4819): 987-987.
53. Gokul Raj, K., R. Manikandan, C. Arulvasu and M. Pandi (2015). "Anti-proliferative effect of fungal taxol extracted from *Cladosporium oxysporum* against human pathogenic bacteria and human colon cancer cell line HCT 15." Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **138**: 667-674.
54. Gouda, S., G. Das, S. K. Sen, H.-S. Shin and J. K. Patra (2016). "Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance." Frontiers in Microbiology **7**(1538).
55. Hacquard, S., B. Kracher, K. Hiruma, P. C. Münch, R. Garrido-Oter, M. R. Thon, A. Weimann, U. Damm, J.-F. Dallery, M. Hainaut, B. Henrissat, O. Lespinet, S. Sacristán, E. Ver Loren van Themaat, E. Kemen, A. C. McHardy, P. Schulze-Lefert and R. J. O'Connell (2016). "Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi." Nature Communications **7**(1): 11362.
56. Hao, F., T. Ding, M. Wu, J. Zhang, L. Yang, W. Chen and G. Li (2018). "Two Novel Hypovirulence-Associated Mycoviruses in the Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*: Molecular Characterization and Suppression of Infection Cushion Formation." Viruses **10**(5): 254.
57. Havlíková, L., L. Matysová, R. Hájková, D. Šatínský and P. Solich (2008). "Advantages of pentafluorophenylpropyl stationary phase over conventional C18

- stationary phase—Application to analysis of triamcinolone acetonide." Talanta **76**(3): 597-601.
58. Hersch-Martínez, P. (1997). "Medicinal plants and regional traders in Mexico: physiographic differences and conservational challenge." Economic Botany **51**(2): 107-120.
 59. Hide, K. D., Soyong, K. (2008). "The fungal endophyte dilemma." Fungal Diversity **33**: 163-173.
 60. Hoffman, M. T. and A. E. Arnold (2010). "Diverse Bacteria Inhabit Living Hyphae of Phylogenetically Diverse Fungal Endophytes." Applied and Environmental Microbiology **76**(12): 4063-4075.
 61. Hoffman, M. T., M. K. Gunatilaka, K. Wijeratne, L. Gunatilaka and A. E. Arnold (2013). "Endohyphal Bacterium Enhances Production of Indole-3-Acetic Acid by a Foliar Fungal Endophyte." PLOS ONE **8**(9): e73132.
 62. Hsiao, T. C. and L. K. Xu (2000). "Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport." Journal of Experimental Botany **51**(350): 1595-1616.
 63. Huang, J.-X., J. Zhang, X.-R. Zhang, K. Zhang, X. Zhang and X.-R. He (2014). "*Mucor fragilis* as a novel source of the key pharmaceutical agents podophyllotoxin and kaempferol." Pharmaceutical Biology **52**(10): 1237-1243.
 64. Huang, M., A. M. Sanchez-Moreiras, C. Abel, R. Sohrabi, S. Lee, J. Gershenzon and D. Tholl (2012). "The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen." New Phytologist **193**(4): 997-1008.
 65. Hung, R., S. Lee and J. W. Bennett (2013). "*Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds." Fungal Ecology **6**(1): 19-26.
 66. Jam Ashkezari, S. and K.-B. Fotouhifar (2017). "Diversity of endophytic fungi of common yew (*Taxus baccata* L.) in Iran." Mycological Progress **16**(3): 247-256.
 67. Jassbi, A. R., S. Zare, O. Firuzi and J. Xiao (2016). "Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species." Phytochemistry Reviews **15**(5): 829-867.
 68. Jingfeng, L., F. Linyun, L. Ruiya, W. Xiaohan, L. Haiyu and Z. Ligang (2013). "Endophytic fungi from medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their antimicrobial activity." African journal of microbiology research **7**(47): 5343-5349.
 69. Junker, C., S. Draeger and B. Schulz (2012). "A fine line – endophytes or pathogens in *Arabidopsis thaliana*." Fungal Ecology **5**(6): 657-662.
 70. Kaddes, A., M.-L. Fauconnier, K. Sassi, B. Nasraoui and M.-H. Jijakli (2019). "Endophytic Fungal Volatile Compounds as Solution for Sustainable Agriculture." Molecules **24**(6): 1065.
 71. Kai, G., C. Wu, L. Gen, L. Zhang, L. Cui and X. Ni (2015). "Biosynthesis and biotechnological production of anti-cancer drug Camptothecin." Phytochemistry Reviews **14**(3): 525-539.
 72. Kai, M. and B. Piechulla (2018). "Interspecies interaction of *Serratia plymuthica* 4Rx13 and *Bacillus subtilis* B2g alters the emission of isoprenoids." FEMS Microbiology Letters **365**(22).

73. Kamaruzzaman, M., G. He, M. Wu, J. Zhang, L. Yang, W. Chen and G. Li (2019). "A Novel Partitivirus in the Hypovirulent Isolate QT5-19 of the Plant Pathogenic Fungus *Botrytis cinerea*." Viruses **11**(1): 24.
74. Kang, Z., M. A. Babar, N. Khan, J. Guo, J. Khan, S. Islam, S. Shrestha and D. Shahi (2019). "Comparative metabolomic profiling in the roots and leaves in contrasting genotypes reveals complex mechanisms involved in post-anthesis drought tolerance in wheat." PLOS ONE **14**(3): e0213502.
75. Keller, B. O., J. Sui, A. B. Young and R. M. Whittall (2008). "Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry." Analytica Chimica Acta **627**(1): 71-81.
76. Ketchum, R. E. B., C. D. Rithner, D. Qiu, Y. S. Kim, R. M. Williams and R. B. Croteau (2003). "Taxus metabolomics: methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus x media* cell cultures." Phytochemistry **62**(6): 901-909.
77. Ko, K. S., S. G. Hong and H. S. Jung (1997). "Phylogenetic Analysis of *Trichaptum* Based on Nuclear 18S, 5.8S and ITS Ribosomal DNA Sequences." Mycologia **89**(5): 727-734.
78. Kogel, K.-H., P. Franken and R. Hückelhoven (2006). "Endophyte or parasite – what decides?" Current Opinion in Plant Biology **9**(4): 358-363.
79. Kong, H. G., G. C. Song, H.-J. Sim and C.-M. Ryu (2021). "Achieving similar root microbiota composition in neighbouring plants through airborne signalling." The ISME Journal **15**(2): 397-408.
80. Kramer, R. and W.-R. Abraham (2012). "Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for?" Phytochemistry Reviews **11**(1): 15-37.
81. Kuang, X., S. Sun, J. Wei, Y. Li and C. Sun (2019). "Iso-Seq analysis of the *Taxus cuspidata* transcriptome reveals the complexity of Taxol biosynthesis." BMC Plant Biology **19**(1): 210.
82. Kuldau, G. and C. Bacon (2008). "Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses." Biological Control **46**(1): 57-71.
83. Kumar, A., D. Patil, P. R. Rajamohanan and A. Ahmad (2013). "Isolation, Purification and Characterization of Vinblastine and Vincristine from Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Catharanthus roseus*." PLOS ONE **8**(9): e71805.
84. Kumar, P., B. Singh, V. Thakur, A. Thakur, N. Thakur, D. Pandey and D. Chand (2019). "Hyper-production of taxol from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus isolated from *Taxus* sp. of the Northern Himalayan region." Biotechnology Reports **24**: e00395.
85. Kumaran, R. S., Y. K. Choi, S. Lee, H. J. Jeon, H. Jung and H. J. Kim (2012). "Isolation of taxol, an anticancer drug produced by the endophytic fungus, *Phoma betae*." Afr J Biotechnol **11**(4): 950-960.
86. Kumaran, R. S. and B.-K. Hur (2009). "Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol." Biotechnology and Applied Biochemistry **54**(1): 21-30.
87. Kumaran, R. S., H. J. Kim and B.-K. Hur (2010). "Taxol promising fungal endophyte, *Pestalotiopsis* species isolated from *Taxus cuspidata*." Journal of Bioscience and Bioengineering **110**(5): 541-546.

88. Kumaran, R. S., J. Muthumary and B.-K. Hur (2008). "Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a leaf spot fungus of the angiosperm *Citrus medica*." Journal of Bioscience and Bioengineering **106**(1): 103-106.
89. Kumaran, R. S., J. Muthumary and B. K. Hur (2008). "Isolation and identification of taxol, an anticancer drug from *Phyllosticta melochiae* yates, an endophytic fungus of *Melochia corchorifolia* L." Food Science and Biotechnology **17**(6): 1246-1253.
90. Kumari, A., D. Singh and S. Kumar (2017). "Biotechnological interventions for harnessing podophyllotoxin from plant and fungal species: current status, challenges, and opportunities for its commercialization." Critical Reviews in Biotechnology **37**(6): 739-753.
91. Kusari, S., S. Zühlke and M. Spiteller (2009). "An Endophytic Fungus from *Camptotheca acuminata* That Produces Camptothecin and Analogues." Journal of Natural Products **72**(1): 2-7.
92. Lackner, G., N. Moebius and C. Hertweck (2011). "Endofungal bacterium controls its host by an hrp type III secretion system." The ISME Journal **5**(2): 252-261.
93. Lai, D., J. Li, S. Zhao, G. Gu, X. Gong, P. Proksch and L. Zhou (2021). "Chromone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Xylomelasma* sp. Samif07, and their antibacterial and antioxidant activities." Natural Product Research **35**(22): 4616-4620.
94. Lakehal, A., A. Ranjan and C. Bellini (2020). Multiple Roles of Jasmonates in Shaping Rhizotaxis: Emerging Integrators. Jasmonate in Plant Biology: Methods and Protocols. A. Champion and L. Laplaze. New York, NY, Springer US: 3-22.
95. Lee, J. C., G. A. Strobel, E. Lobkovsky and J. Clardy (1996). "Torreyanic Acid: A Selectively Cytotoxic Quinone Dimer from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis microspora*." The Journal of Organic Chemistry **61**(10): 3232-3233.
96. Lee, S., M. Yap, G. Behringer, R. Hung and J. W. Bennett (2016). "Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth." Fungal Biology and Biotechnology **3**(1): 7.
97. Lenka, S. K., N. E. Nims, K. Vongpaseuth, R. A. Boshar, S. C. Roberts and E. L. Walker (2015). "Jasmonate-responsive expression of paclitaxel biosynthesis genes in *Taxus cuspidata* cultured cells is negatively regulated by the bHLH transcription factors TcJAMYC1, TcJAMYC2, and TcJAMYC4." Frontiers in Plant Science **6**.
98. Li, J., J. Xie, Y.-H. Yang, X.-L. Li, Y. Zeng and P.-J. Zhao (2015). "Pestalpolyols A–D, Cytotoxic Polyketides from *Pestalotiopsis* sp. cr013." Planta Med **81**(14): 1285-1289.
99. Li, J.-Y., R. S. Sidhu, A. R. T. Bollon and G. A. Strobel (1998). "Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*." Mycological Research **102**(4): 461-464.
100. Li, J. Y., R. S. Sidhu, E. J. Ford, D. M. Long, W. M. Hess and G. A. Strobel (1998). "The induction of taxol production in the endophytic fungus—*Periconia* sp from *Torreya grandifolia*." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **20**(5): 259-264.

101. Li, S.-t., P. Zhang, M. Zhang, C.-h. Fu, C.-f. Zhao, Y.-s. Dong, A.-y. Guo and L.-j. Yu (2012). "Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate." BMC Genomics **13**(1): 295.
102. Li, X., X. Zhai, Z. Shu, R. Dong, Q. Ming, L. Qin and C. Zheng (2016). "*Phoma glomerata* D14: An Endophytic Fungus from *Salvia miltiorrhiza* That Produces Salvianolic Acid C." Current Microbiology **73**(1): 31-37.
103. Li, Y.-L., X.-M. Xin, Z.-Y. Chang, R.-J. Shi, Z.-M. Miao, J. Ding and G.-P. Hao (2015). "The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* Bge.f. alba are a potential source of natural antioxidants." Botanical Studies **56**(1): 5.
104. Liang, Z., J. Zhang, X. Zhang, J. Li, X. Zhang and C. Zhao (2015). "Endophytic Fungus from *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying that Produces Podophyllotoxin." Journal of Chromatographic Science **54**(2): 175-178.
105. Lin, C., S. M. Owen and J. Peñuelas (2007). "Volatile organic compounds in the roots and rhizosphere of *Pinus* spp." Soil Biology and Biochemistry **39**(4): 951-960.
106. Lin, L.-Z., H.-L. Shieh, C. K. Angerhofer, J. M. Pezzuto, G. A. Cordell, L. Xue, M. E. Johnson and N. Ruangrungsi (1993). "Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cyclea barbata*." Journal of Natural Products **56**(1): 22-29.
107. Liu, K., X. Ding, B. Deng and W. Chen (2009). "Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **36**(9): 1171-1171.
108. Liu, K., X. Ding, B. Deng and W. Chen (2010). "10-Hydroxycamptothecin produced by a new endophytic *Xylaria* sp., M20, from *Camptotheca acuminata*." Biotechnology Letters **32**(5): 689-693.
109. Liu, S., H. Dai, G. Makhloufi, C. Heering, C. Janiak, R. Hartmann, A. Mándi, T. Kurtán, W. E. G. Müller, M. U. Kassack, W. Lin, Z. Liu and P. Proksch (2016). "Cytotoxic 14-membered macrolides from a mangrove-derived endophytic fungus, *Pestalotiopsis microspora*." Journal of Natural Products **79**(9): 2332-2340.
110. Lovetruer, B. (2020). "The AI-discovered aetiology of COVID-19 and rationale of the irinotecan+ etoposide combination therapy for critically ill COVID-19 patients." Medical Hypotheses **144**: 110180.
111. M, M.-B., B. L, A. I, D. P, I. E, C. F, L.-V. M, M. J, F.-R. M, U. M and H. G (2020). "Etoposide treatment adjunctive to immunosuppressants for critically ill COVID-19 patients." The Journal of infection **81**(3): 452-482.
112. Mandyam, K. G., J. Roe and A. Jumpponen (2013). "*Arabidopsis thaliana* model system reveals a continuum of responses to root endophyte colonization." Fungal Biology **117**(4): 250-260.
113. Martino, E., G. Casamassima, S. Castiglione, E. Cellupica, S. Pantalone, F. Papagni, M. Rui, A. M. Siciliano and S. Collina (2018). "Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **28**(17): 2816-2826.
114. Matsuda, Y. and I. Abe (2020). 1.14 - Fungal Meroterpenoids. Comprehensive Natural Products III. H.-W. Liu and T. P. Begley. Oxford, Elsevier: 445-478.

115. Mattoo, A. J. and S. Nonzom (2021). "Endophytic fungi: understanding complex cross-talks." Symbiosis **83**(3): 237-264.
116. Mohinudeen, I. A. H. K., R. Kanumuri, K. N. Soujanya, R. U. Shaanker, S. K. Rayala and S. Srivastava (2021). "Sustainable production of camptothecin from an *Alternaria* sp. isolated from *Nothapodytes nimmoniana*." Scientific Reports **11**(1): 1478.
117. Mohinudeen, I. A. H. K., S. Pandey, H. Kanniyappan, V. Muthuvijayan and S. Srivastava (2021). "Screening and selection of camptothecin producing endophytes from *Nothapodytes nimmoniana*." Scientific Reports **11**(1): 11205.
118. Musavi, S. F., A. Dhavale and R. M. Balakrishnan (2015). "Optimization and Kinetic Modeling of Cell-associated camptothecin production from an endophytic *Fusarium oxysporum* NFX06." Preparative Biochemistry & Biotechnology **45**(2): 158-172.
119. Muñoz-Adalia, E. J., M. M. Fernández and J. J. Diez (2016). "The use of mycoviruses in the control of forest diseases." Biocontrol Science and Technology **26**(5): 577-604.
120. Márquez, L. M., R. S. Redman, R. J. Rodriguez and M. J. Roossinck (2007). "A Virus in a Fungus in a Plant: Three-Way Symbiosis Required for Thermal Tolerance." Science **315**(5811): 513-515.
121. Müller, A., P. Faubert, M. Hagen, W. zu Castell, A. Polle, J.-P. Schnitzler and M. Rosenkranz (2013). "Volatile profiles of fungi – Chemotyping of species and ecological functions." Fungal Genetics and Biology **54**: 25-33.
122. Nadeem, M., M. Ram, P. Alam, M. M. Ahmad, A. Mohammad, F. Al-Qurainy, S. Khan and M. Z. Abdin (2012). "*Fusarium solani*, P1, a new endophytic podophyllotoxin-producing fungus from roots of *Podophyllum hexandrum*." African Journal of Microbiology Research **6**(10): 2493-2499.
123. Naik, B. S. (2019). "Developments in taxol production through endophytic fungal biotechnology: a review." Oriental Pharmacy and Experimental Medicine **19**(1): 1-13.
124. Nelson, J. M., D. A. Hauser, R. Hinson and A. J. Shaw (2018). "A novel experimental system using the liverwort *Marchantia polymorpha* and its fungal endophytes reveals diverse and context-dependent effects." New Phytologist **218**(3): 1217-1232.
125. Netala, V. R., M. S. Bethu, B. Pushpalatha, V. B. Baki, S. Aishwarya, J. V. Rao and V. Tarte (2016). "Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities." International journal of nanomedicine **11**: 5683.
126. Oita, S., J. Carey, I. Kline, A. Ibáñez, N. Yang, E. F. Y. Hom, I. Carbone, J. M. U'Ren and A. E. Arnold (2021). "Methodological Approaches Frame Insights into Endophyte Richness and Community Composition." Microbial Ecology **82**(1): 21-34.
127. Oita, S., A. Ibáñez, F. Lutzoni, J. Miadlikowska, J. Geml, L. A. Lewis, E. F. Hom, I. Carbone, J. M. U'Ren and A. E. Arnold (2021). "Climate and seasonality drive the richness and composition of tropical fungal endophytes at a landscape scale." Communications biology **4**(1): 1-11.
128. Padmanabha, B. V., M. Chandrashekar, B. T. Ramesha, H. C. H. Gowda, R. P. Gunaga, S. Suhas, R. Vasudeva, K. N. Ganeshaiah and R. U. Shaanker

- (2006). "Patterns of accumulation of camptothecin, an anti-cancer alkaloid in *Nothapodytes nimmoniana* Graham., in the Western Ghats, India: Implications for identifying high-yielding sources of the alkaloid." Current Science **90**(1): 95-100.
129. Palem, P. P. C., G. C. Kuriakose and C. Jayabaskaran (2015). "An Endophytic Fungus, *Talaromyces radicus*, Isolated from *Catharanthus roseus*, Produces Vincristine and Vinblastine, Which Induce Apoptotic Cell Death." PLOS ONE **10**(12): e0144476.
 130. Pandey, S. S., S. Singh, C. V. Babu, K. Shanker, N. Srivastava, A. K. Shukla and A. Kalra (2016). "Fungal endophytes of *Catharanthus roseus* enhance vindoline content by modulating structural and regulatory genes related to terpenoid indole alkaloid biosynthesis." Scientific reports **6**(1): 1-14.
 131. Pandi, M., R. S. Kumaran, Y. K. Choi, H. J. Kim and J. Muthumary (2011). "Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*." African Journal of Biotechnology **10**(8): 1428-1435.
 132. Parthasarathy, R., R. Shanmuganathan and A. Pugazhendhi (2020). "Vinblastine production by the endophytic fungus *Curvularia verruculosa* from the leaves of *Catharanthus roseus* and its in vitro cytotoxicity against HeLa cell line." Analytical Biochemistry **593**: 113530.
 133. Partida-Martinez, L. P., C. F. d. Looß, K. Ishida, M. Ishida, M. Roth, K. Buder and C. Hertweck (2007). "Rhizonin, the First Mycotoxin Isolated from the Zygomycota, Is Not a Fungal Metabolite but Is Produced by Bacterial Endosymbionts." Applied and Environmental Microbiology **73**(3): 793-797.
 134. Petrini, O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves, New York, NY, Springer New York.
 135. Polashock, J. J. and B. I. Hillman (1994). "A small mitochondrial double-stranded (ds) RNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**(18): 8680-8684.
 136. Pu, X., X. Qu, F. Chen, J. Bao, G. Zhang and Y. Luo (2013). "Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production." Applied Microbiology and Biotechnology **97**(21): 9365-9375.
 137. Puri, S. C., A. Nazir, R. Chawla, R. Arora, S. Riyaz-ul-Hasan, T. Amna, B. Ahmed, V. Verma, S. Singh, R. Sagar, A. Sharma, R. Kumar, R. K. Sharma and G. N. Qazi (2006). "The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans." Journal of Biotechnology **122**(4): 494-510.
 138. Puri, S. C., V. Verma, T. Amna, G. N. Qazi and M. Spiteller (2005). "An Endophytic Fungus from *Nothapodytes foetida* that Produces Camptothecin." Journal of Natural Products **68**(12): 1717-1719.
 139. Pérez-Gutiérrez, S., E. Sánchez-Mendoza, D. Martínez-González, M. A. Zavala-Sánchez and C. Pérez-González (2012). "Kramecyne — A New Anti-inflammatory Compound Isolated from *Krameria cytisoides*." Molecules **17**(2): 2049-2057.

140. Rajagopal, K. (2017). "Cytotoxic evaluation of endophytic fungal extract obtained through static fermentation against Human Larynx Cancer Cell Line (HEp2)."
141. Ramadevi, D. and S. Ganapathy (2012). "Fusidic acid from *Corchorus aestuans* L." Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences **3**(1): 550-557.
142. Ran, X., G. Zhang, S. Li and J. Wang (2017). "Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminata*." African Health Sciences **17**(2): 566-574.
143. Rana, K. L., D. Kour, I. Sheikh, N. Yadav, A. N. Yadav, V. Kumar, B. P. Singh, H. S. Dhaliwal and A. K. Saxena (2019). Biodiversity of Endophytic Fungi from Diverse Niches and Their Biotechnological Applications. Advances in Endophytic Fungal Research: Present Status and Future Challenges. B. P. Singh. Cham, Springer International Publishing: 105-144.
144. Rashmi, M., J. Kushveer and V. Sarma (2019). "A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity." Mycosphere **10**(1): 798-1079.
145. Ratnaweera, P. B., D. E. Williams, E. D. de Silva, R. L. C. Wijesundera, D. S. Dalisay and R. J. Andersen (2014). "Helvolic acid, an antibacterial nortriterpenoid from a fungal endophyte, *Xylaria* sp. of orchid *Anoectochilus setaceus* endemic to Sri Lanka." Mycology **5**(1): 23-28.
146. Redman, R. S., K. B. Sheehan, R. G. Stout, R. J. Rodriguez and J. M. Henson (2002). "Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis." Science **298**(5598): 1581-1581.
147. Rehman, S., A. S. Shawl, A. Kour, R. Andrabi, P. Sudan, P. Sultan, V. Verma and G. N. Qazi (2008). "An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin." Applied Biochemistry and Microbiology **44**(2): 203-209.
148. Riga, R., N. Happyana and E. Holisotan Hakim (2020). "Sesquiterpenes produced by *Pestalotiopsis microspora* HF 12440 isolated from *Artocarpus heterophyllus*." Natural Product Research **34**(15): 2229-2231.
149. Riga Riga, N. H., Euis Holisotan Hakim (2019). Chemical constituents of *Pestalotiopsis microspora* HF 12440, Issue: 1.
150. Rivera-Orduña, F. N., R. A. Suarez-Sanchez, Z. R. Flores-Bustamante, J. N. Gracida-Rodriguez and L. B. Flores-Cotera (2011). "Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew)." Fungal Diversity **47**(1): 65-74.
151. Rodriguez, R. J., J. F. White Jr, A. E. Arnold and R. S. Redman (2009). "Fungal endophytes: diversity and functional roles." New Phytologist **182**(2): 314-330.
152. Rustamova, N., K. Bozorov, T. Efferth and A. Yili (2020). "Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties." Phytochemistry Reviews **19**(2): 425-448.
153. Scherlach, K., L. P. Partida-Martinez, H.-M. Dahse and C. Hertweck (2006). "Antimitotic Rhizoxin Derivatives from a Cultured Bacterial Endosymbiont of the Rice Pathogenic Fungus *Rhizopus microsporus*." Journal of the American Chemical Society **128**(35): 11529-11536.
154. Schmidt, R., D. W. Etalo, V. de Jager, S. Gerards, H. Zweers, W. de Boer and P. Garbeva (2016). "Microbial Small Talk: Volatiles in Fungal–Bacterial Interactions." Frontiers in Microbiology **6**(1495).

155. Schmidt, R., V. d. Jager, D. Zühlke, C. Wolff, J. Bernhardt, K. Cankar, J. Beekwilder, W. v. Ijcken, F. Sleutels, W. d. Boer, K. Riedel and P. Garbeva (2017). "Fungal volatile compounds induce production of the secondary metabolite Sodorifen in *Serratia plymuthica* PRI-2C." Scientific Reports **7**(1): 862.
156. Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen, n. null, E. Bolchacova, K. Voigt, P. W. Crous, A. N. Miller, M. J. Wingfield, M. C. Aime, K.-D. An, F.-Y. Bai, R. W. Barreto, D. Begerow, M.-J. Bergeron, M. Blackwell, T. Boekhout, M. Bogale, N. Boonyuen, A. R. Burgaz, B. Buyck, L. Cai, Q. Cai, G. Cardinali, P. Chaverri, B. J. Coppins, A. Crespo, P. Cubas, C. Cummings, U. Damm, Z. W. de Beer, G. S. de Hoog, R. Del-Prado, B. Dentinger, J. Diéguez-Urbeondo, P. K. Divakar, B. Douglas, M. Dueñas, T. A. Duong, U. Eberhardt, J. E. Edwards, M. S. Elshahed, K. Fliegerova, M. Furtado, M. A. García, Z.-W. Ge, G. W. Griffith, K. Griffiths, J. Z. Groenewald, M. Groenewald, M. Grube, M. Gryzenhout, L.-D. Guo, F. Hagen, S. Hambleton, R. C. Hamelin, K. Hansen, P. Harrold, G. Heller, C. Herrera, K. Hirayama, Y. Hirooka, H.-M. Ho, K. Hoffmann, V. Hofstetter, F. Högnabba, P. M. Hollingsworth, S.-B. Hong, K. Hosaka, J. Houbraken, K. Hughes, S. Huhtinen, K. D. Hyde, T. James, E. M. Johnson, J. E. Johnson, P. R. Johnston, E. B. G. Jones, L. J. Kelly, P. M. Kirk, D. G. Knapp, U. Kõljalg, G. M. Kovács, C. P. Kurtzman, S. Landvik, S. D. Leavitt, A. S. Liggenstoffer, K. Liimatainen, L. Lombard, J. J. Luangsa-ard, H. T. Lumbsch, H. Maganti, S. S. N. Maharachchikumbura, M. P. Martin, T. W. May, A. R. McTaggart, A. S. Methven, W. Meyer, J.-M. Moncalvo, S. Mongkolsamrit, L. G. Nagy, R. H. Nilsson, T. Niskanen, I. Nyilasi, G. Okada, I. Okane, I. Olariaga, J. Otte, T. Papp, D. Park, T. Petkovits, R. Pino-Bodas, W. Quaedvlieg, H. A. Raja, D. Redecker, T. L. Rintoul, C. Ruibal, J. M. Sarmiento-Ramírez, I. Schmitt, A. Schüßler, C. Shearer, K. Sotome, F. O. P. Stefani, S. Stenroos, B. Stielow, H. Stockinger, S. Suetrong, S.-O. Suh, G.-H. Sung, M. Suzuki, K. Tanaka, L. Tedersoo, M. T. Telleria, E. Tretter, W. A. Untereiner, H. Urbina, C. Vágvölgyi, A. Vialle, T. D. Vu, G. Walther, Q.-M. Wang, Y. Wang, B. S. Weir, M. Weiß, M. M. White, J. Xu, R. Yahr, Z. L. Yang, A. Yurkov, J.-C. Zamora, N. Zhang, W.-Y. Zhuang and D. Schindel (2012). "Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(16): 6241-6246.
157. Schouten, A. (2019). Endophytic fungi: Definitions, diversity, distribution and their significance in plant life. Endophyte biotechnology: Potential for agriculture and pharmacology. A. Schouten. Boston, MA 02111, USA, CAB International.
158. Schulz, B. and C. Boyle (2005). "The endophytic continuum." Mycological Research **109**(6): 661-686.
159. Schulz, B., S. Haas, C. Junker, Andr, xe, N. e and M. Schobert (2015). "Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms." Current Science **109**(1): 39-45.
160. Schulz, B. J., L. Rabsch and C. Junker (2019). Chemical Warfare in the Plant Microbiome Leads to a Balance of Antagonisms and a Healthy Plant. Seed Endophytes: Biology and Biotechnology. S. K. Verma and J. J. F. White. Cham, Springer International Publishing: 171-189.
161. Schulz-Bohm, K., S. Geisen, E. R. J. Wubs, C. Song, W. de Boer and P. Garbeva (2017). "The prey's scent – Volatile organic compound mediated

- interactions between soil bacteria and their protist predators." The ISME Journal **11**(3): 817-820.
162. Schulz-Bohm, K., S. Gerards, M. Hundscheid, J. Melenhorst, W. de Boer and P. Garbeva (2018). "Calling from distance: attraction of soil bacteria by plant root volatiles." The ISME Journal **12**(5): 1252-1262.
 163. Shah, U. A., I. Kotta-Loizou, B. D. L. Fitt and R. H. A. Coutts (2020). "Mycovirus-Induced Hypervirulence of *Leptosphaeria biglobosa* Enhances Systemic Acquired Resistance to *Leptosphaeria maculans* in Brassica napus." Molecular Plant-Microbe Interactions® **33**(1): 98-107.
 164. Shapira, R., G. H. Choi and D. L. Nuss (1991). "Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight." The EMBO Journal **10**(4): 731-739.
 165. Shweta, S., B. R. Gurumurthy, G. Ravikanth, U. S. Ramanan and M. B. Shivanna (2013). "Endophytic fungi from *Miquelia dentata* Bedd., produce the anti-cancer alkaloid, camptothecin." Phytomedicine **20**(3): 337-342.
 166. Shweta, S., S. Zuehlke, B. T. Ramesha, V. Priti, P. Mohana Kumar, G. Ravikanth, M. Spiteller, R. Vasudeva and R. Uma Shaanker (2010). "Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (*Icacinaeae*) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin." Phytochemistry **71**(1): 117-122.
 167. Simpson, B. B. (1991). "The Past and Present Uses of Rhatany (*Krameria*, *Krameriaceae*)." Economic Botany **45**(3): 397-409.
 168. Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M. R. Boyd (1990). "New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening." JNCI: Journal of the National Cancer Institute **82**(13): 1107-1112.
 169. Soliman, S. and M. Raizada (2013). "Interactions between co-habiting fungi elicit synthesis of taxol from an endophytic fungus in host taxus plants." Frontiers in Microbiology **4**.
 170. Soliman, Sameh S. M., John S. Greenwood, A. Bombarely, Lukas A. Mueller, R. Tsao, Dick D. Mosser and Manish N. Raizada (2015). "An Endophyte Constructs Fungicide-Containing Extracellular Barriers for Its Host Plant." Current Biology **25**(19): 2570-2576.
 171. Soliman, S. S. M. and M. N. Raizada (2018). "Darkness: A Crucial Factor in Fungal Taxol Production." Frontiers in Microbiology **9**.
 172. Steinert, M., U. Hentschel and J. Hacker (2000). "Symbiosis and pathogenesis: evolution of the microbe-host interaction." Naturwissenschaften **87**(1): 1-11.
 173. Stierle, A., G. Strobel and D. Stierle (1993). "Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew." Science **260**(5105): 214-216.
 174. Stone, J. K., Bacon, Charles W. , and White, Jr James F. (2000). An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. Microbial Endophytes. W. Bacon Charles W. , Jr James F. . 270 Madison Avenue, New York, NY 10016, Marcel Dekker, Inc.
 175. Stone, J. K., Bacon, Charles W. , and White, Jr James F. (2005). Endophytic fungi. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. G. M. Mueller,

- Bills, Gerald F. , Foster, Mercedes S., Elsevier Academic Press, Burlington, MA **55**: 282-283.
176. Strobel, G., X. Yang, J. Sears, R. Kramer, R. S. Sidhu and W. M. Hess (1996). "Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*." Microbiology **142**(2): 435-440.
 177. Stroble, G., A. Stierle and D. Stierle (1993). "*Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with pacific yew (*Taxus brevifolia*)." Mycotaxon **47**: 71-80.
 178. Subban, K., R. Subramani, V. P. M. Srinivasan, M. Johnpaul and J. Chelliah (2019). "Salicylic acid as an effective elicitor for improved taxol production in endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*." PLOS ONE **14**(2): e0212736.
 179. Sánchez-González, A., D. Granados-Sánchez and R. Simón-Nabor (2008). "Uso medicinal de las plantas por los otomíes del municipio de Nicolás Flores, Hidalgo, México." Revista Chapingo. Serie Horticultura **14**(3): 271-279.
 180. Tang, Z., L. Rao, G. Peng, M. Zhou, G. Shi and Y. Liang (2011). "Effects of endophytic fungus and its elicitors on cell status and alkaloid synthesis in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*." Journal of Medicinal Plants Research **5**(11): 2192-2200.
 181. Taofeeq, G., S. Saheed, L. Adebola Azeez, A. Alimat Taiwo and A. Maryam Kehinde (2018). "In Vitro Cytotoxicity and Antioxidant Activities of *Pestalotiopsis microspora* Culture Filtrate." Malaysian Journal of Applied Sciences **3**(1).
 182. Tayung, K., B. P. Barik, D. K. Jha and D. C. Deka (2011). "Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew." Mycosphere **2**(3): 203-213.
 183. Teimoori-Boghsani, Y., A. Ganjeali, T. Cernava, H. Müller, J. Asili and G. Berg (2020). "Endophytic Fungi of Native *Salvia abrotanoides* Plants Reveal High Taxonomic Diversity and Unique Profiles of Secondary Metabolites." Frontiers in Microbiology **10**.
 184. Terhonen, E., K. Blumenstein, A. Kovalchuk and F. O. Asiegbo (2019). "Forest Tree Microbiomes and Associated Fungal Endophytes: Functional Roles and Impact on Forest Health." Forests **10**(1): 42.
 185. Thomas. (2019). "Threatened Conifers of The World." from <https://threatenedconifers.rbge.org.uk/conifers/taxus-globosa>.
 186. Tian, C., H. Gao, X.-P. Peng, G. Li and H.-X. Lou (2021). "Fusidic acid derivatives from the endophytic fungus *Acremonium pilosum* F47." Journal of Asian Natural Products Research: 1-8.
 187. Tian, J., L. Fu, Z. Zhang, X. Dong, D. Xu, Z. Mao, Y. Liu, D. Lai and L. Zhou (2017). "Dibenzo- α -pyrones from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01: isolation, structure elucidation, and their antibacterial and antioxidant activities." Natural Product Research **31**(4): 387-396.
 188. Toju, H., A. S. Tanabe, S. Yamamoto and H. Sato (2012). "High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples." PLOS ONE **7**(7): e40863.
 189. Torres-Mendoza, D., H. E. Ortega and L. Cubilla-Rios (2020). "Patents on Endophytic Fungi Related to Secondary Metabolites and Biotransformation Applications." Journal of Fungi **6**(2): 58.

190. Tran, J. C. and A. A. Doucette (2006). "Cyclic polyamide oligomers extracted from nylon 66 membrane filter disks as a source of contamination in liquid chromatography/mass spectrometry." Journal of The American Society for Mass Spectrometry **17**(5): 652-656.
191. Ulubelen, A., S. Öksüz, U. Kolak, C. Bozok-Johansson, C. Çelik and W. Voelter (2000). "Antibacterial Diterpenes from the Roots of *Salvia viridis*." Planta Med **66**(05): 458-462.
192. Utsugi, T., J. Shibata, Y. Sugimoto, K. Aoyagi, K. Wierzba, T. Kobunai, T. Terada, T. Oh-hara, T. Tsuruo and Y. Yamada (1996). "Antitumor Activity of a Novel Podophyllotoxin Derivative (TOP-53) against Lung Cancer and Lung Metastatic Cancer." Cancer Research **56**(12): 2809-2814.
193. Venturini, G., G. Assante, S. L. Toffolatti and A. Vercesi (2013). "Pathogenicity variation in *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in northern Italy." Mycoscience **54**(4): 285-290.
194. Verbist, L. (1990). "The antimicrobial activity of fusidic acid." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **25**(suppl_B): 1-5.
195. Vichai, V. and K. Kirtikara (2006). "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening." Nature Protocols **1**: 1112.
196. Wall, M. E. and M. C. Wani (1995). "Camptothecin and Taxol: Discovery to Clinic—Thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture." Cancer Research **55**(4): 753-760.
197. Wall, M. E., M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail and G. A. Sim (1966). "Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata* 1,2." Journal of the American Chemical Society **88**(16): 3888-3890.
198. Wang, L., L. Ren, C. Li, C. Gao, X. Liu, M. Wang and Y. Luo (2019). "Effects of endophytic fungi diversity in different coniferous species on the colonization of *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae)." Scientific Reports **9**(1): 5077.
199. Wang, X.-Z., X.-H. Luo, J. Xiao, M.-M. Zhai, Y. Yuan, Y. Zhu, P. Crews, C.-S. Yuan and Q.-X. Wu (2014). "Pyrone derivatives from the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* SP-07 of Chinese herbal medicine *Salvia przewalskii*." Fitoterapia **99**: 184-190.
200. Wani, M. C., H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon and A. T. McPhail (1971). "Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*." Journal of the American Chemical Society **93**(9): 2325-2327.
201. Wennström, A. (1994). "Endophyte: The Misuse of an Old Term." Oikos **71**(3): 535-536.
202. Wilson, D. (1995). "Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition." Oikos **73**(2): 274-276.
203. Wilson, D. N. (2014). "Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance." Nature Reviews Microbiology **12**(1): 35-48.
204. Wu, L., T. Han, W. Li, M. Jia, L. Xue, K. Rahman and L. Qin (2013). "Geographic and Tissue Influences on Endophytic Fungal Communities of *Taxus chinensis* var. *mairei* in China." Current Microbiology **66**(1): 40-48.

205. Wu, Y.-H., Y.-R. Wu, B. Li and Z.-Y. Yan (2020). "Cryptotanshinone: A review of its pharmacology activities and molecular mechanisms." Fitoterapia **145**: 104633.
206. Xie, J. and D. Jiang (2014). "New Insights into Mycoviruses and Exploration for the Biological Control of Crop Fungal Diseases." Annual Review of Phytopathology **52**(1): 45-68.
207. Xiong, X., J. Gou, Q. Liao, Y. Li, Q. Zhou, G. Bi, C. Li, R. Du, X. Wang, T. Sun, L. Guo, H. Liang, P. Lu, Y. Wu, Z. Zhang, D.-K. Ro, Y. Shang, S. Huang and J. Yan (2021). "The *Taxus* genome provides insights into paclitaxel biosynthesis." Nature Plants **7**(8): 1026-1036.
208. Xiong, Z.-Q., Y.-Y. Yang, N. Zhao and Y. Wang (2013). "Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from *Angiojap yew*, *Taxus x media*." BMC Microbiology **13**(1): 71.
209. Xu, J. (2016). "Fungal DNA barcoding." The 6th International Barcode of Life Conference **01**(01): 913-932.
210. Yamagiwa, Y., Y. Inagaki, Y. Ichinose, K. Toyoda, M. Hyakumachi and T. Shiraishi (2011). "*Talaromyces wortmannii* FS2 emits β -caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistance." Journal of General Plant Pathology **77**(6): 336-341.
211. Yang, S.-X., W.-T. Zhao, H.-Y. Chen, L. Zhang, T.-K. Liu, H.-P. Chen, J. Yang and X.-L. Yang (2019). "Aureonitols A and B, Two New C13-Polyketides from *Chaetomium globosum*, an Endophytic Fungus in *Salvia miltiorrhiza*." Chemistry & Biodiversity **16**(9): e1900364.
212. Yang, X., S. Guo, L. Zhang and H. Shao (2003). "Select of producing podophyllotoxin endophytic fungi from podophyllin plant." Natural Product Research and Development **15**(5): 419-422.
213. Yang, Y., H. Zhao, R. A. Barrero, B. Zhang, G. Sun, I. W. Wilson, F. Xie, K. D. Walker, J. W. Parks, R. Bruce, G. Guo, L. Chen, Y. Zhang, X. Huang, Q. Tang, H. Liu, M. I. Bellgard, D. Qiu, J. Lai and A. Hoffman (2014). "Genome sequencing and analysis of the paclitaxel-producing endophytic fungus *Penicillium aurantiogriseum* NRRL 62431." BMC Genomics **15**(1): 69.
214. Yu, C., X. Luo, C. Zhang, X. Xu, J. Huang, Y. Chen, S. Feng, X. Zhan, L. Zhang, H. Yuan, B. Zheng, H. Wang and C. Shen (2020). "Tissue-specific study across the stem of *Taxus media* identifies a phloem-specific TmMYB3 involved in the transcriptional regulation of paclitaxel biosynthesis." The Plant Journal **103**(1): 95-110.
215. Yu, X., B. Li, Y. Fu, D. Jiang, S. A. Ghabrial, G. Li, Y. Peng, J. Xie, J. Cheng, J. Huang and X. Yi (2010). "A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(18): 8387-8392.
216. Yu, Z., H. Ding, K. Shen, F. Bu, G. Newcombe and H. Liu (2021). "Foliar endophytes in trees varying greatly in age." European Journal of Plant Pathology **160**(2): 375-384.
217. Yukimune, Y., H. Tabata, Y. Higashi and Y. Hara (1996). "Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures." Nature Biotechnology **14**(9): 1129-1132.

218. Zaiyou, J., M. Li and H. Xiqiao (2017). "An endophytic fungus efficiently producing paclitaxel isolated from *Taxus wallichiana* var. *mairei*." Medicine **96**(27).
219. Zavala-Chávez, F., M. Soto-Hernández and T. Rodríguez-González (2001). "El romerillo (*Taxus globosa* Schlecht.): biología, dificultades y perspectivas de su uso." Chapingo Serie Horticultura **7**(1): 77-94.
220. Zhang, H., J. Xie, Y. Fu, J. Cheng, Z. Qu, Z. Zhao, S. Cheng, T. Chen, B. Li, Q. Wang, X. Liu, B. Tian, D. B. Collinge and D. Jiang (2020). "A 2-kb Mycovirus Converts a Pathogenic Fungus into a Beneficial Endophyte for Brassica Protection and Yield Enhancement." Molecular Plant **13**(10): 1420-1433.
221. Zhang, M., X. Jin, Y. Chen, M. Wei, W. Liao, S. Zhao, C. Fu and L. Yu (2018). "TcMYC2a, a Basic Helix–Loop–Helix Transcription Factor, Transduces JA-Signals and Regulates Taxol Biosynthesis in *Taxus chinensis*." Frontiers in Plant Science **9**.
222. Zhang, P., P.-P. Zhou and L.-J. Yu (2009). "An Endophytic Taxol-Producing Fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2." Current Microbiology **59**(3): 227.
223. Zhang, P., P.-P. Zhou and L.-J. Yu (2009). "An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus x media*, *Aspergillus candidus* MD3." FEMS Microbiology Letters **293**(2): 155-159.
224. Zhang, Y., X.-M. Li, Z. Shang, C.-S. Li, N.-Y. Ji and B.-G. Wang (2012). "Meroterpenoid and Diphenyl Ether Derivatives from *Penicillium* sp. MA-37, a Fungus Isolated from Marine Mangrove Rhizospheric Soil." Journal of Natural Products **75**(11): 1888-1895.
225. Zhang, Z.-B., S.-Y. Du, B. Ji, C.-J. Ji, Y.-W. Xiao, R.-M. Yan and D. Zhu (2021). "New Helvolic Acid Derivatives with Antibacterial Activities from *Sarocladium oryzae* DX-THL3, an Endophytic Fungus from Dongxiang Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.)." Molecules **26**(7): 1828.
226. Zheng, Y.-K., X.-G. Qiao, C.-P. Miao, K. Liu, Y.-W. Chen, L.-H. Xu and L.-X. Zhao (2016). "Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi." Annals of Microbiology **66**(2): 529-542.
227. Zhou, J., X. Li, Y. Chen and C. Dai (2017). "De novo transcriptome assembly of *Phomopsis liquidambari* provides insights into genes associated with different lifestyles in rice (*Oryza sativa* L.)." Frontiers in Plant Science **8**(121).
228. Zhou, J., X. Li, P.-W. Huang and C.-C. Dai (2018). "Endophytism or saprophytism: Decoding the lifestyle transition of the generalist fungus *Phomopsis liquidambari*." Microbiological Research **206**: 99-112.
229. Zhou, L., X. Li, I. Kotta-Loizou, K. Dong, S. Li, D. Ni, N. Hong, G. Wang and W. Xu (2021). "A mycovirus modulates the endophytic and pathogenic traits of a plant associated fungus." The ISME Journal.
230. Zimmerman, N. B. and P. M. Vitousek (2012). "Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(32): 13022-13027.
231. Zimowska, B., M. Bielecka, B. Abramczyk and R. Nicoletti (2020). "Bioactive Products from Endophytic Fungi of Sages (*Salvia* spp.)." Agriculture **10**(11): 543.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00277

Matrícula: 2141800840

HONGOS ENDÓFITOS DE PLANTAS
MEDICINALES: BÚSQUEDA DE
TAXOL FÚNGICO Y COMPUESTOS
BIOACTIVOS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas
del día 10 del mes de marzo del año 2023 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO
DRA. MARIA SALUD PEREZ GUTIERREZ
DR. JOSE ALBERTO MENDOZA ESPINOZA
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL



JUAN MOISES GALINDO SOLIS
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de
Secretario el último, se reunieron a la presentación de la
Disertación Pública cuya denominación aparece al margen,
para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

DE: JUAN MOISES GALINDO SOLIS

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

APROBAR

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

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO

VOCAL

DRA. MARIA SALUD PEREZ GUTIERREZ

VOCAL

DR. JOSE ALBERTO MENDOZA ESPINOZA

SECRETARIO

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL