



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS  
ASOCIADOS A UNA VARIEDAD COMERCIAL DE  
*Carica papaya* L. EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN**

**Tesis que presenta**

LUCÍA DEL CARMEN CHI CHI

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

AÑO 2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



#### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Lucía Del Carmen Chi Chi, titulado "Diversidad de hongos endófitos asociados a una variedad comercial de Carica papaya L. en la Península de Yucatán", fue realizado en la Unidad De Bioquímica y Biología Molecular De Plantas, en la línea de investigación interacción planta ambiente, del laboratorio USF10 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 27 de enero de 2019

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_



LUCÍA DEL CARMEN CHI CHI

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., particularmente al laboratorio USF10 por permitir desarrollar este proyecto en sus instalaciones.

Al CONACYT, por la beca otorgada N° 861148.

A las empacadoras PAMASUR® y FRUTICAM®. Por permitir realizar los muestreos de los diferentes órganos de papaya de la variedad Tainung N°01.

Al Dr. Joel Lara Reyna, por su apoyo en los muestreos y por permitir el acceso al laboratorio del Colegio de Postgraduados, Campus Campeche, para la primera parte del trabajo.

A la Dra. Luisa Alhucema, por su activa participación, por su excelente dirección y su paciencia para el desarrollo de este trabajo de tesis. Por su constante orientación, y por sus aportes en los análisis de biología molecular.

para la parte molecular y para mi formación profesional.

A Dra. Aída Martínez Hernández, por su excelente sugerencia de realizar estudios de diversidad en hongos benéficos y por sus acertadas sugerencias en cada tutorial.

A la Dra. Daisy Pérez Brito, por su apoyo en la purificación de los aislamientos de los hongos endófitos, por su apoyo con el protocolo para la extracción de ADN de hongos endófitos. Por tomarse tiempo para las correcciones y por su apoyo a la estructura de la parte final de los resultados obtenidos.

Al Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado, por permitirme trabajar en su laboratorio, los diferentes morfotipos. Por su constante apoyo y de material para la realización de trabajo.

A la M.C. Mildred Rubí Carrillo Pech, por su apoyo en la parte de identificación microscópica de los hongos mucorales y de morfotipos levaduriformes. También por sus sugerencias para en los experimentos de biología molecular.

Al M.C. Luis Carlos Gutiérrez Pacheco, por su apoyo en los muestreos de ambas

---

poblaciones de estudio.

Al M.C. Felipe A. Barredo Pool, por su ayuda a la identificación de los diferentes aislamientos y por el método de separación de los mismos.

Al comité tutorial integrado por Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, Dra. Daisy Pérez Brito, Dra. Aída Martínez Hernández y el Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado. Por sus sugerencias en cada tutorial y en proceso de elaboración de la tesis.

Al comité revisor integrado por Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, Dra. Daisy Pérez Brito, Dra. Aída Martínez Hernández, el Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado y el Dr. Joel Lara Reina por sus observaciones y correcciones para el trabajo de tesis.

A la MC. Ángela Francisca Kú González, por el apoyo técnico en la parte de identificación microscópica de morfotipos de levaduras y de hongos levaduriformes.

A Stephany Burgos y Luivitz Chi, por su importante apoyo en la parte técnica del trabajo.

A mis compañeros de laboratorio USF-10, en especial a Nidia Hau, Adriana Chacón, Erick Arroyo y Daniel Bravo.

---

## **DEDICATORIAS**

A Dios: Por darme la fortaleza de vivir cada día, y por estar en los momentos buenos y malos.

### **A mi familia:**

#### **En especial a mi madre Lucía Candelaria**

Por ser mi fortaleza, por tu apoyo en todas las decisiones que te tomado y por tu espera. Gracias por haberme enseñado valores, y más por impulsarme a luchar por mis sueños.

#### **A mis hermanas**

Por ser mis mejores compañeras de vida y darme los ánimos que necesito, por su cariño incondicional.

#### **A mis sobrinos**

Karol, princesa gracias por llegar a nuestras vidas y hacernos muy felices.

Daniel, por ser el primero varón de la familia y por hacernos felices.

#### **Ángel Kú**

Gracias por estar ahí en tiempos de prueba, valoro mucho tu cariño, muchas gracias por tu gran apoyo.

#### **A mis amigas del CICY**

En especial a Zurisadai Escobar, Andrea Bayona, Mari Toña Juárez

---

---

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	xviii
ÍNDICE DE CUADROS .....	ixi
ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1.1 INTRODUCCIÓN .....	1
1.2. ANTECEDENTES.....	4
1.2.1. Generalidades de los hongos.....	4
1.3. Los hongos endófitos y sus asociaciones con plantas .....	4
1.3.1 Microorganismos endófitos .....	4
1.3.2. Los hongos endófitos (HE).....	4
1.3.3. Papel ecológico de los hongos endófitos .....	5
1.3.4 Clasificación de los hongos endófitos.....	5
1.4. Tipos de interacciones de los hongos endófitos .....	7
1.4.1. Relación hongo endófito-planta hospedera. ....	7
1.5. Respuesta en la resistencia adquirida por endófitos .....	8
1.5.1. Vía de señalización del Ácido salicílico (SA) .....	8
1.5.2. Vía de señalización del ácido jasmónico (JA) y del etileno (ET). ....	10

---

---

1.6. Estudios de la diversidad de hongos endófitos (todo tipo de estudio) .....	10
1.6.1 diversidad de hongos endófitos en el mundo .....	10
1.6.2. Estudios de la diversidad de hongos endófitos en México.....	12
1.6.3. Hongos mucorales encontrados en papaya .....	13
1.6.3.1. Características microscópicas de los hongos mucorales.....	13
1.7. Asociaciones no endófitas de hongos con plantas: las micorrizas.....	14
1.7.1. Estudios relacionados con micorrizas .....	14
1.8. El cultivo de papaya .....	15
1.8.1 Clasificación taxonómica de <i>Carica papaya</i> L. ....	16
1.8.2. Variedades de papaya cultivadas en México.....	17
1.8.3. Características agronómicas de la Papaya variedad Tainung N°01. ....	18
1.8.4. Hongos patógenos que afectan al cultivo de papaya .....	18
1.8.5. La antracnosis en papaya .....	19
1.9. Métodos moleculares para la identificación de hongos .....	20
JUSTIFICACIÓN.....	22
PREGUNTA BIOLÓGICA .....	23
HIPÓTESIS .....	23
OBJETIVO GENERAL .....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25

---

---

---

CAPÍTULO II.....	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
2.1.1. Sitios de colecta .....	26
2.1.2. Material biológico .....	26
2.3. Desinfección del material biológico .....	27
2.4. Aislamiento de hongos endófitos.....	27
2.5. Caracterización macroscópica de hongos endófitos.....	28
2.5.1. Aislamiento de cepas “puras”por estrías .....	28
2.5.2. Aislamiento de cepas “puras” por punta de hifa.....	28
2.6. Caracterización morfológica de hongos endófitos en papaya.....	29
2.7. Criopreservación de hongos endófitos .....	29
2.8. Microcultivo de morfotipos de hongos .....	29
2.8.1. Microscopia confocal de hongos endófitos y de hongos levaduriformes.....	30
2.9. Identificación molecular de los morfotipos aislados mediante ITS1-ITS4. ....	30
2.9.1 Obtención de biomasa para extracción de DNA .....	30
2.9.2. Extracción de ADN genómico.....	31
2.9.3. Amplificación de secuencias ITS .....	32
2.9.4. Reacciones de secuenciación.....	32
2.9.5. Análisis de secuencias .....	32
2.9.6. Análisis de la diversidad de especies de hongos.....	33

---

---

CAPÍTULO III.....	34
RESULTADOS .....	34
3.1 Sitios de muestreo .....	34
3.3. Purificación de hongos endófitos y selección de morfotipos.....	36
3.4. Caracterización macroscópica de hongos endófitos.....	36
3.5 Morfotipos identificados en ambas sitios de colecta .....	43
3.6. Hongos endófitos en los diferentes órganos de papaya. ....	44
3.6.1 Hongos endófitos en hojas.....	44
3.6.2. Hongos endófitos en flores.....	44
3.6.3 Hongos endófitos en fruto inmaduro.....	45
3.6.4. Hongos endófitos en fruto maduro .....	45
3.6.5. Hongos endófitos en raíces.....	45
3.6 Identificación de hongos mucorales .....	46
3.7. Identificación de levaduras endófitas y hongos levaduriformes .....	51
3.8. Caracterización molecular de hongos endófitos .....	53
3.8.1 Extracción de ADN de hongos endófitos método SDS .....	53
3.8.2. Amplificación por PCR de ADN de hongos endófitos .....	54
3.8.3 Análisis de las secuencias de los hongos endófitos .....	56
3.8.4. Identificación de especies de hongos endófitos .....	72
3.9 Estudios de la biodiversidad de hongos endófitos.....	82

---

---

---

3.9.1 Riqueza de especies .....	82
3.9.2. Índice Simpson y su complemento .....	83
3.9.3 Biodiversidad de especies Shannon-Wiener .....	84
3.9.4. Dominancia de especies .....	85
3.9.5 Estudio de la diversidad de morfotipos por órganos .....	89
CAPITULO IV. ....	94
DISCUSIÓN .....	94
CONCLUSIONES .....	100
PERSPECTIVAS .....	101
BIBLIOGRAFÍA .....	102

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG.
<b>Figura 1.</b> Esquema de la interacción planta-endófito, planta-patógeno y endófito-patógeno (modificado de Kusari <i>et al.</i> , 2012).	7
<b>Figura 2.</b> Representación del mecanismo de la resistencia sistémica adquirida (SAR).	9
<b>Figura 4.</b> Principales estados productores de papaya en México (SAGARPA 2017).	17
<b>Figura 5 .</b> Representación de las regiones del ADNr. Modificado de (White <i>et al.</i> , 1990).	20
<b>Figura 6.</b> Esquema de la estrategia experimental.	25
<b>Figura 7.</b> Órganos de plantas de papaya muestreados en la localidad de Temozón, Yucatán.	27
<b>Figura 8.</b> Explantes de órganos de papaya variedad Tainung N° 01 en medio PDA.	28
<b>Figura 9.</b> Microcultivo del M-23-A después de tres días de la inoculación en medio PDA.	30
<b>Figura 10.</b> Mapa de los poblados muestreados.	34
<b>Figura 11.</b> Sistema de arvenses que crecen cercanos al cultivo de papaya, candelaria Campeche.	35
<b>Figura 12.</b> Plantas repelentes de insectos A-B, plantas captadoras de insectos benéficos C-D. Candelaria, Campeche.	35
<b>Figura 13.</b> Morfotipo <b>15-C</b> purificado por punta de hifa y el <b>M-43</b> por estrías.	36
<b>Figura 14.</b> Características macroscópicas de hongos mucorales.	46
<b>Figura 15.</b> Micrografías del morfotipo M-23-A, microcultivo de dos días de inoculación.	47

---

<b>Figura 16.</b> Microcultivo del morfotipo 23-A. Micrografías de 5 días	47
<b>Figura 17.</b> Microcultivo del morfotipo 23-B. micrografías de 2 días de inoculación.	48
<b>Figura 18.</b> Microcultivo del morfotipo 23-C, micrografías de 2 días de inoculación	49
<b>Figura 19.</b> Microcultivo del morfotipo M-23-D. Micrografías de 2 días de inoculación	49
<b>Figura 20.</b> Microcultivo del morfotipo 23-E. micrografías de 2 días de inoculación.	50
<b>Figura 21.</b> Microcultivo del morfotipo 23-F. micrografías de 2 días de inoculación	51
<b>Figura 22.</b> Ejemplo de ADN genómico de hongos endófitos de papaya (Kit Qiagen DNeasy).	53
<b>Figura 23.</b> Ejemplo de ADN genómico de hongos endófitos de papaya obtenidos con el método de SDS.	54
<b>Figura 24.</b> Gel de agarosa de productos de PCR con 35 ciclos y 60ng de templado	55
<b>Figura 25.</b> Gel de agarosa de productos de PCR con 40 ciclos y 120 µg de templado	55
<b>Figura 26.</b> Productos de PCR purificados	55
<b>Figura 27.</b> Promedio de la riqueza de especies de ambos sitios de muestreo.	83
<b>Figura 28.</b> Especies dominantes del sitio 1: candelaria Campeche	87
<b>Figura 29.</b> Porcentaje de dominancia de especies de Candelaria, Campeche.	87
<b>Figura 30.</b> Especies dominantes del sitio 2: Temozón, Yucatán.	88
<b>Figura 31.</b> Gráfico del porcentaje de dominancia de los morfotipos de Temozón, Yucatán.	89
<b>Figura 32.</b> Promedio de la diversidad de ambos sitios de muestreo sitio 1	90
<b>Figura 33.</b> Diversidad de Shannon-Wiener en órganos del sitio 1: Candelaria Campeche.	91

---

---

**Figura 34.** Diversidad de Shannon-Wiener en órganos del sitio 2: Temozón, Yucatán. 92

**Figura 35.** Promedio de dominancia de ambos sitios de muestreo sitio 1: Candelaria Campeche y sitio 2: Temozón, Yucatán. 93

---

---

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>PÁG</b>
Cuadro 1. Criterios utilizados para la caracterización de los hongos endófitos (Rodríguez <i>et al.</i> , 2009).....	6
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de la papaya.....	16
Cuadro 3. Total de morfotipos y aislamientos obtenidos en ambos sitios de muestreo. ....	37
Cuadro 4. Morfotipos identificados en ambos sitios de muestreo.....	42
Cuadro 5. Morfotipos de endófitos identificados en Campeche (sin agroquímicos).....	43
Cuadro 6. Morfotipos de endófitos identificados en Yucatán (uso de agroquímicos).....	43
Cuadro 7. Morfotipos identificados como levaduras y de aspecto levaduriforme.....	52
Cuadro 8. Morfotipos identificados como levaduras y de aspecto levaduriforme.....	57
Cuadro 9. Lista de especies identificadas, base de datos de ITS para hongos de NCBI..	58
Cuadro 10. Especies de hongos endófitos identificados en ambas poblaciones. ....	59
Cuadro 11. Comparación de las especies identificadas con morfotipos no caracterizados molecularmente. ....	74
Cuadro 12. Lista de morfotipos no identificados mediante técnicas moleculares. ....	75
Cuadro 13. Resultados de la métrica del índice de Simpson y su complemento Sitio 1...	84
Cuadro 14. Índice de Shannon-Wiener del sitio 1: Candelaria Campeche. ....	85
Cuadro 15. Índice de Shannon-Wiener del sitio 2: Temozón Yucatán.....	85
Cuadro 16. Morfotipos dominantes de Candelaria Campeche. ....	86
Cuadro 17. Especies dominantes de Temozón Yucatán.....	88

---

---

Cuadro 18. Promedio de la diversidad de Shannon-Wiener en ambos sitios de estudio. .	89
Cuadro 19. Diversidad de Shannon-Wiener en órganos del sitio 2. ....	91
Cuadro 20. Promedio de la dominancia en ambos sitios de estudio. ....	92

---

## ABREVIATURAS

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>PDA</b>	Medio Papa Dextrosa Agar
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrógeno líquido
<b>ITS</b>	Espaciadores internos transcritos
<b>Dnpt</b>	Deoxinucleótidos trifosfato
<b>Tal polimerasa</b>	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
<b>DNAr</b>	ADN ribosomal
<b>HOJ</b>	Hoja
<b>FLR</b>	Flor
<b>FRI</b>	Fruto inmaduro
<b>FRM</b>	Fruto maduro
<b>HMA</b>	Micorriza de tipo arbuscular
<b>M</b>	Morfotipo
<b>H'</b>	Diversidad de Shannon
<b>ES</b>	Estolón
<b>ESP</b>	Esporangiospora
<b>EtBr</b>	Bromuro de etidio
<b>H'</b>	Índice de Shannon
<b>Dom</b>	Dominancia
<b>S</b>	Riqueza

---

**JH**

Equidad

**PH'**

Promedio de la diversidad de Shannon

---

## RESUMEN

Las plantas albergan una gran diversidad de microorganismos endófitos, bacterias y hongos, son productores de metabolitos secundarios y activadores del mecanismo de defensa. Sus principales aplicaciones en la industria farmacéutica hacen atractivo el uso de hongos endófitos como blancos para la extracción de compuestos bioactivos. La diversidad de hongos endófitos en cultivos comerciales ha comenzado a ser estudiada con la llegada de técnicas biotecnológicas; la metabolómica, la metagenómica y las tecnologías de secuenciación. El presente estudio se centró en caracterizar la diversidad de hongos endófitos aislados a partir de órganos de papaya variedad Tainung N°01, manejado con control biológico (Sitio 1) y con tratamiento con agroquímicos (sitio 2). Se obtuvieron 474 aislamientos, agrupados en 101 morfotipos. Se generaron amplicones utilizando iniciadores ITS1 e ITS4, los cuales fueron secuenciados. De 78 morfotipos secuenciados, se identificaron 64 a nivel especie y 56 OTUs distintas. Las especies identificadas se agruparon en 24 géneros. En el sitio1, las especies más dominantes pertenecen a los géneros: *Colletotrichum*, *Talaromyces* y *Shizophyllum*, mientras el sitio 2 a los géneros: *Fusarium*, *Meyerozyma*, *Aspergillus*, y *Sporidiobolus*. La diversidad, en el sitio 1 ( $H' = 3.43$ ) fue mayor, que en el sitio 2 ( $H' = 2.45$ ). La diversidad en órganos en el sitio 1, fue mayor en hojas ( $H' = 2.58$ ), seguido de flores, mientras en el sitio 2 se observó en raíces ( $H' = 1.71$ ), seguida de frutos maduros. Los resultados demuestran que el uso de fungicidas puede causar reducción de las comunidades endófitas.

---

## ABSTRACT

The plants harbor a great diversity of endophytic microorganisms, bacteria and fungi, they are producers of secondary metabolites and activators of the defense mechanism. Its main applications in the pharmaceutical industry make attractive the use of endophytic fungi as targets for the extraction of bioactive compounds. The diversity of endophytic fungi in commercial crops has been studied with the advent of biotechnological techniques; Metabolomics, metagenomics and sequencing technologies. The present study focused on characterizing the diversity of endophytic fungi isolated from papaya organs, Tainung variety No. 01, managed with biological control (site 1) and with agrochemical treatment (site 2). 474 isolates were obtained, grouped into 101 morphotypes. Amplicons were generated using ITS1 and ITS4 primers, which were sequenced. Of 78 sequenced morphotypes, 64 were identified at the species level and 56 different OTUs. The identified species are grouped into 22 genera. At site1, the most dominant species belonging to the genera: *Colletotrichum*, *Talaromyces* and *Shizophyllum*, while site 2 to the genera: *Fusarium*, *Meyerozyma*, *Aspergillus* and *Sporidiobolus*. The diversity, at site 1 ( $H' = 3.43$ ) was greater, than at site 2 ( $H' = 2.45$ ). The diversity in organs at site 1 was higher in leaves ( $H' = 2.58$ ), followed by flowers, while at site 2 they were identified in roots ( $H' = 1.71$ ), followed by ripe fruits. The results that affect the use of fungicides can cause the reduction of endophytic communities.

---

## 1.1 INTRODUCCIÓN

México ocupa el tercer lugar a nivel internacional en producción de papaya después de la India y Brasil (SIAP, 2017) y es uno de los principales exportadores. La papaya es un producto con alto valor nutricional, que se consume en su mayoría fresco y en la industria para la fabricación de mermeladas. Del látex se extrae “la papaína” que es un compuesto utilizado como ablandador de carnes, como clarificador de bebidas y encurtido de pieles (Sañudo Barajas *et al.*, 2017). Una de las problemáticas que enfrenta el cultivo es la susceptibilidad a virus y a nematodos (Sañudo Barajas *et al.*, 2017), pero principalmente a enfermedades transmitidas por hongos patógenos, como la antracnosis, que es una enfermedad precosecha y postcosecha causada por hongos del género *Colletotrichum* (Bailey and Jeger 1992; Torres Calzada *et al.*, 2018).

Los hongos endófitos, residen por completo en espacios inter e intracelulares de la mayoría de las plantas, manteniendo una fuerte asociación simbiótica sin causar daño aparente, esta simbiosis es continua y equilibrada, las interacciones son de varios tipos como el mutualismo, el comensalismo y el parasitismo (Aly *et al.*, 2011). Los hongos endófitos cumplen funciones clave en las plantas, como promover el crecimiento vegetal, activar el mecanismo de defensa sistémica contra el ataque de patógenos (Campanile *et al.*, 2011) y producir metabolitos secundarios (Samuels *et al.*, 2000, Vu *et al.*, 2006). Se sabe muy poco acerca de la diversidad y la función de estos hongos, particularmente en especies de importancia económica (Ruso-Pelizza *et al.*, 2015). Los estudios de diversidad de hongos miden la cantidad de especies presentes en una comunidad, las asociaciones entre ellos, permiten saber la dominancia de una especie en un sitio de muestreo, el grado de amenaza o el grado de conservación. Para ello se usan estimadores como el índice de Shannon-Wiener miden la diversidad presente en una comunidad o mediante la comparación de dos o más comunidades El índice de Simpson y su complemento que mide la diversidad de comunidades muestrales (González-Oreja and Lou 2012).

El estudio de los hongos endófitos esta en auge con el uso de las técnicas modernas

---

como son la mategenómica y la secuenciación, ya que permiten el estudio de los microorganismos. Además, el empleo de técnicas tradicionales basadas en cultivos de aislamientos microbiológicos, en conjunto con las técnicas moleculares, basadas en la secuenciación de las regiones espaciadoras del ADNr (ITS1-ITS4) permiten la identificación exitosa de especies presentes en las comunidades fúngicas, sea a nivel de especie o género (Orlandelli *et al.*, 2012; Jayawardena *et al.*, 2018).

México es un país megadiverso, ocupa el quinto lugar en diversidad a nivel global de hongos, (Mittermeier y Goettsch, 1992; Conabio 1998; Aguirre-Acosta *et al.*, 2014). En estudios de diversidad de hongos endófitos en México, los principales géneros que predominan son *Fusarium*, *Phomopsis*, *Alternaria* y *Colletotrichum*, encontrados en plantas asintomáticas de plantas de interés agronómico o científico (López-Gonzalez *et al.*, 2017; Ramos-Garza *et al.*, 2016).

Diversos estudios han sido realizados para estimar la diversidad de hongos endófitos, por ejemplo Abdelfattah *et al.* 2016, en fresa, evaluaron las comunidades de hongos mediante condiciones con uso de fungicidas y mediante la suspensión. Ellos encontraron que en las hojas de plantas sin fungicidas existió mayor diversidad, y que la suspensión de agroquímicos promueve la diversidad en órganos aéreos. Las especies abundantes fueron *Cladosporium sp* y *Botrytis cinerea*.

Por su parte Kim Chang-Kyun *et al.*, 2013, estudiaron la comunidad asociada de hongos endófitos en coníferas, en diferentes estaciones del año, el resultado especies más abundantes *Nemania diffusa* y *Phyllosticta papayae*, en el mes de noviembre.

Orlandelli *et al.*, 2012, estudiaron la diversidad de las comunidades de hongos endófitos asociados a hojas de *Piper hispidum* y los géneros más representados fueron: *Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Lasiodiplodia*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Glomerella*, *Marasmius*, *Phlebia* y *Schizophyllum*

Gomes-Fernades *et al.*, 2015 en plantas de *Glycine max* estudiaron de la diversidad de hongos endófitos asociados a hojas y raíces. Los principales géneros encontrados fueron: *Alternaria*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Colletotricum*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Leptosphaeria*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis* y

---

*Stagonosporopsis*.

Ramos-Garza *et al.*, (2016), estudiaron la diversidad de hongos endófitos en la planta medicinal *Dendropanax arboreus*. Los géneros más predominantes fueron *Fusarium*, *Phomopsis*, *Alternaria* y *Colletotrichum*, también obtuvieron hongos de los géneros *Corynespora*, *Endomelanconiopsis* y *Thozetella*, que son potenciales para la generación de compuestos antimicrobianos.

En México, se ha estudiado la diversidad de hongos mucorales, como saprófitos (Cruz-Lachica *et al.*, 2018). Lograron la identificación de hongos mucorales como saprofitos de suelo y frutos en papaya, y de hongos mucorales de importancia agrícola, biotecnológica y médica, especies: *Choanephora cucurbitarum*, *Mucor ellipsoideus*, *Rhizopus homothallicus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus schipperae*, *Lichteimia ramosa*, *Gongronella butleri*, *Cunninghamella bertholletiae* y *Cunninghamella blakesleeana*

Este, es uno de los pocos estudios en plantaciones de papaya, sobre el uso de técnicas moleculares y microbiológicas para la identificación de hongos benéficos en plantas en papaya, estudiar a los hongos endófitos presentaría bases para tratar de manera eficiente el cultivo, además permitiría saber que tipos de microorganismos están presentes en papaya variedad Tainung N°01 y compararlos con los hongos endófitos presentes en la variedad Maradol.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar la microbiota endógena asociada a diferentes órganos de papaya de la variedad Tainung N°01, en la Península de Yucatán mediante dos condiciones de cultivo: control biológico natural y con aplicación de agroquímicos y fungicidas.

---

---

## 1.2. ANTECEDENTES

### 1.2.1. Generalidades de los hongos

Los hongos pertenecen a uno de los ecosistemas más importantes y abundantes de la biosfera, su origen tiene millones de años, al igual que las plantas y los animales. Sus interacciones con plantas cambiaron la ecología terrestre, la geología y la modificación de la atmósfera en la tierra (Berbee *et al.*, 2017). Son un grupo muy diverso de organismos eucariotas que incluyen desde hongos microscópicos unicelulares y hongos macroscópicos multicelulares (Kendrich 1985; Schoch *et al.*, 2014).

Los hongos generalmente adquieren sus nutrientes a través de la degradación de restos de animales y vegetales, por tanto contribuyen al mantenimiento y el funcionamiento de los ecosistemas, desempeñan un importante papel en las cadenas tróficas. También tienen aplicaciones en la industria biotecnológica para la producción de enzimas, bebidas alcohólicas, medicamentos, como agentes de control biológico, fertilizantes, pigmentos naturales, cosméticos y en alimentos (Lange 2010; Muzzarelli *et al.*, 2012; Bandara *et al.*, 2015).

### 1.3. Los hongos endófitos y sus asociaciones con plantas

#### 1.3.1 Microorganismos endófitos

El término “endófito” se refiere a cualquier organismo, sea bacteria u hongo, que se encuentre asociado internamente a tejidos vegetales sin causar daño aparente (Petrini, 1991). La relación que existe entre los hongos endófitos y el huésped se describe como una simbiosis continua y equilibrada, que va desde el comensalismo, mutualismo al parasitismo (Aly *et al.*, 2011).

#### 1.3.2. Los hongos endófitos (HE)

A diferencia de los hongos de tipo micorrizas, que colonizan raíces y que crecen en la rizósfera, los HE, por lo general residen y crecen por completo dentro de los tejidos de las plantas (Aly *et al.*, 2011). Diversos estudios han demostrado que los HE, abarcan todos los grupos taxonómicos de las plantas, ya que viven en diferentes ambientes (Aly *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2009; Schulz y Boyle, 2005; Arnold, 2007). Por tanto, los hongos

---

---

endófitos constituyen una parte importante de la hiperdiversidad de los hongos en la tierra (Rodríguez *et al.*, 2009).

### 1.3.3. Papel ecológico de los hongos endófitos

Los HE, participan en la inducción de la resistencia a patógenos y a metales pesados, incrementando la tolerancia a factores de estrés biótico y abiótico (Rodríguez *et al.*, 2009), mejoran la toma de nutrientes y participan en la producción de fitohormonas y en la síntesis de compuestos con actividad biológica como, antibióticos, y otros metabolitos secundarios (Aly *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2009 Tan *et al.*, 2001). Por ello, se dice que ejercen efectos profundos en la ecología de los ambientes donde encuentran, además de jugar un papel importante en la evolución de las plantas (Brundett 2006). Diferentes estudios han demostrado que los hongos endófitos producen un amplio número de metabolitos secundarios, entre los que destacan los anticancerígenos, antidiabéticos y compuestos inmunosupresores. La producción de compuestos novedosos es una alternativa natural e importante para la producción de compuestos bioactivos y metabolitos secundarios (Priti *et al.*, 2009; Chamkhi *et al.*, 2018). Algunos metabolitos secundarios utilizados como productos terapéuticos son: paclitaxel, podofiloxina, hiperocina, vinblastina, campotecina y diosgenina (Huang *et al.*, 2008; Chamkhi *et al.*, 2018).

### 1.3.4 Clasificación de los hongos endófitos

La clasificación actual de los HE, se resume en el **cuadro 1**, estos se dividen en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, con base en su filogenia e historia de vida (Rodríguez *et al.*, 2009). Los de tipo Clavicipitáceos son mutualistas que defienden a su hospedero del ataque de herbívoros y colonizan los pastos (Clay, 1988). Mientras que los no Clavicipitáceos, colonizan las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (Rodríguez *et al.*, 2009; Arnold, 2007).

Los Clavicipitáceos de “clase I”, son un grupo pequeño de especies filogenéticamente relacionadas, son selectivos con sus hospederos (Rodríguez *et al.*, 2009). Los no clavicipitáceos abarcan HE de las clases II, III y IV (**cuadro 1**). Los de clase II, comprenden una amplia diversidad de hongos pertenecientes, a la clase de *Ascomycota*, seguido de la clase de *Basidiomycota*. La mayoría de estos endófitos pueden aumentar la

morfogénesis de su hospedero, biomasa de raíces, síntesis de hormonas, reguladores del crecimiento vegetal. Además, protegen a su hospedero del ataque de patógenos (Campanile *et al.*, 2007). Utilizan el sistema de resistencia sistémica adquirida (Samuels *et al.*, 2000; Vu *et al.*, 2006). Los endófitos de clase III, se distinguen por crecer en tejidos por encima del suelo, con transmisión horizontal en flores, frutos y tallos asintomáticos (Kumar e Hyde 2004; Tejesvi *et al.*, 2005). Y los de tipo IV se distinguen como hongos con presencia de septos oscuros melanizados, son principalmente hongos ascomicetos que son conidiales y que forman estructuras melanizadas como las hifas intercelulares e intracelulares y en las raíces de las plantas.

**Cuadro 1.** Criterios utilizados para la caracterización de los hongos endófitos (Rodríguez *et al.*, 2009).

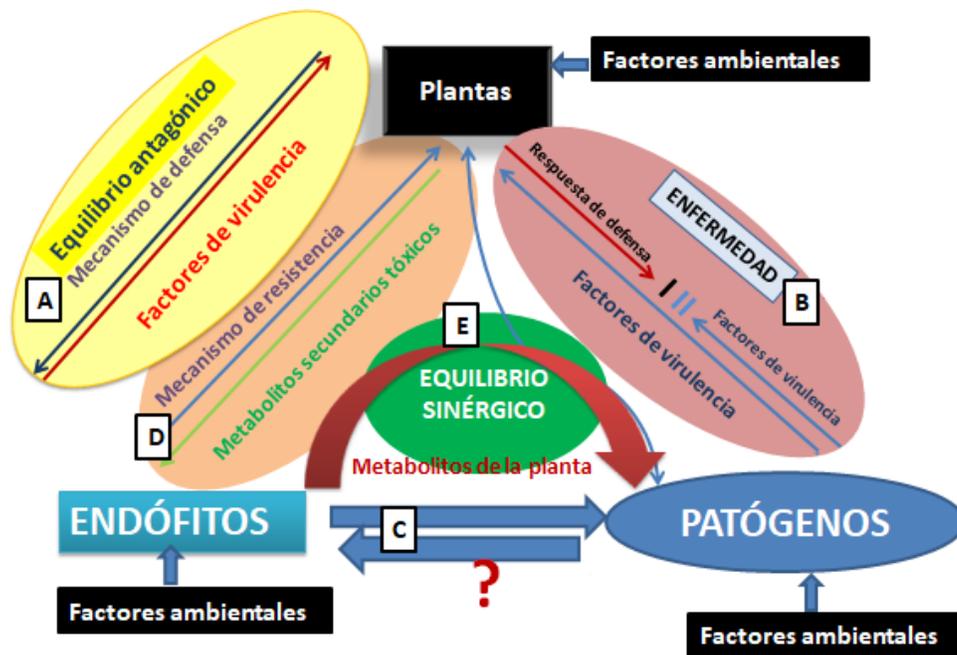
CLAVICIPITÁCEOS		NO CLAVICIPITÁCEOS		
CRITERIO	CLASE I	CLASE II	CLASE III	CLASE IV
rango de hospedero	reducido	general	general	general
tejidos que coloniza	brotos y rizoma	brotos, raíces y rizoma	brote	raíces
grado de colonización en la planta	amplio	amplio	limitado	amplio
diversidad en la planta	Bajo	bajo	alto	desconocido
Transmisión	vertical y horizontal	vertical y horizontal	horizontal	horizontal
Función ecológica	Incrementan la biomasa de las plantas, confieren tolerancia a la sequía y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros.	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia al estrés biótico y abiótico y protegen contra los hongos patógenos por acción de los metabolitos secundarios.	Inducen resistencia a las enfermedades protección contra herbívoros y modifican la sensibilidad al estrés abiótico mediante la producción de metabolitos secundario.	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros.

---

## 1.4. Tipos de interacciones de los hongos endófitos

### 1.4.1. Relación hongo endófito-planta hospedera.

Las asociaciones simbióticas de los hongos endófitos con sus hospederos son variables desde mutualismo, parasitismo o saprofismo (Zuccaro *et al.*, 2011; Millet *et al.*, 2010). Durante el mutualismo y el parasitismo, existe una relación simbiótica entre grupos de endófitos y su hospedero, durante el parasitismo puede ocasionar daños en cualquier momento de la simbiosis. Durante el saprofismo, ninguno de los socios que interactúan salen afectados y los beneficios dependen de ambos, de esta manera se da un equilibrio antagónico. (Zuccaro *et al.*, 2011; Millet *et al.*, 2010). El endofitismo se manifiesta de manera discreta, transitoria, asintomática dentro de la planta, con el establecimiento completo de los endófitos al interior de los órganos y tejidos (Kusari y Spiteller, 2012b).



**Figura 1.** Esquema de la interacción planta-endófito, planta-patógeno y endófito-patógeno (modificado de Kusari *et al.*, 2012).

La estrategia de colonización utilizada por los endófitos con sus hospederos y los 4 tipos de interacciones que utilizan se ilustra en la (Figura 1). En el antagonismo equilibrado, se establece un equilibrio entre la virulencia del hongo y la defensa de la planta, de este

---

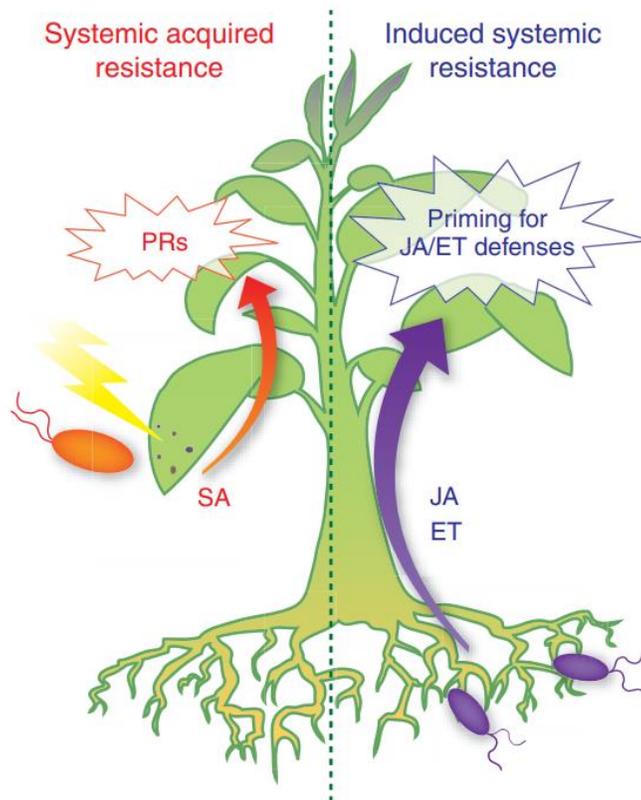
---

modo la relación es asintomática (**Figura 1A**). Cuando ocurre la infección la planta activa su mecanismo de defensa y el hongo no se desarrolla, en este sentido, los factores ambientales juegan un papel muy importante, si no son favorables para la planta, se establece una relación planta-patógeno y se produce una enfermedad (**Figura 1B**). Aunque existen mecanismos de interacción no elucidados, por ejemplo, algunos endófitos se comportan como patógenos, o que los patógenos tomen papeles de endófitos (**Figura 1C**). Los hongos endófitos tienen estrategias que les permiten proliferar dentro del hospedero sin daño visible, pero asegurando la resistencia antes de ser incapacitados por los metabolitos de la planta (**Figura 1D**). Por último, los endófitos establecen un equilibrio sinérgico endófito-patógeno (**figura 1E**). La sinergia equilibrada de ayuda mutua entre uno o más endófitos confiere éxito dentro el hospedero (Kusari *et al.*, 2012).

## **1.5. Respuesta en la resistencia adquirida por endófitos**

### **1.5.1. Vía de señalización del Ácido salicílico (SA)**

Las plantas producen metabolitos secundarios que les sirven como barreras para prevenir o atenuar la invasión de los posibles atacantes conocidos (Glazebrook *et al.*, 2005). El resultado del ataque dependerá del equilibrio entre la capacidad de la planta para contrarrestar al patógeno y viceversa (Jones *et al.*, 2006; Göhre *et al.*, 2009). Los biótropos son reconocidos por la vía de señalización del Ácido salicílico (SA), mientras que los necrótrofos inducen la muerte celular programada que facilita la vida del patógeno en el hospedero (Thomma *et al.*, 1998).



**Figura 2.** Representación del mecanismo de la resistencia sistémica adquirida (SAR). La SAR se activa en tejidos sanos, una vez dado el reconocimiento del patógeno se produce una señal (SA) que se moviliza y viaja a través del sistema vascular de la planta, de este modo se activa el mecanismo de defensa a larga distancia (Pieterse *et al.*, 2009).

El ácido salicílico (SA), es conocido como una molécula señal esencial para activar el inicio la resistencia sistémica adquirida (SAR), y activar la expresión de un conjunto de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), como respuesta al ataque de un patógeno (Pieterse *et al.*, 2009). Las mutantes y plantas transgénicas a las cuales se ha modificado la vía de señalización de SA, muestran incapacidad de desarrollar SAR, y no muestran la activación de genes PR, ante la infección de patógenos (Durrant *et al.*, 2004). Esto indica que el SA, es un intermediario en la vía de señalización de SAR, donde la proteína reguladora NPR1 (NONEXPRESSOR OF PR GENES1) es un importante transductor de la vía de señalización del SA (Dong, 2006).

---

---

### **1.5.2. Vía de señalización del ácido jasmónico (JA) y del etileno (ET).**

Por otro lado, cuando las plantas interactúan con organismos benéficos, reconocen diferentes patrones moleculares asociados con microorganismos benéficos, esto resulta de una activación leve, pero efectiva de la respuesta inmune a nivel sistémico. A esta respuesta se le conoce como resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés). Al igual que en la SAR, en la ISR hay una señal que viaja a larga distancia a través del sistema vascular de la planta para activar el sistema inmune. La ISR es comúnmente regulada por vías dependientes del ácido jasmónico (JA) y del etileno (ET) y a diferencia de la SAR, normalmente no está asociado a la activación directa de los genes PR (Van- Loon *et al.*, 1998; Pozo *et al.*, 2007).

Muchos microorganismos benéficos del suelo, como las rizobacterias y las micorrizas son llamados promotoras del crecimiento vegetal, se sabe que pueden activar su mecanismo de inmunidad mediante la resistencia sistémica inducida (Van- Loon *et al.*, 1998)

## **1.6. Estudios de la diversidad de hongos endófitos (todo tipo de estudio)**

### **1.61 diversidad de hongos endófitos en el mundo**

El reino Fungi representa una de los más grandes acervos de la biodiversidad en el planeta, con actividades ecológicas importantes en todos los ecosistemas, así como gran variabilidad en su morfología y ciclos de vida (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014).

Hawksworth and Lucking (2017), mencionan que se han identificado entre 2.2 y 3.8 millones de especies de hongos en el mundo. De esta cifra, sólo 120,000 especies han sido aceptadas por micólogos, del total de estas especies se conoce del 3 millones a 8 millones. Con el advenimiento de las técnicas de metagenómica el estudio de la diversidad de los hongos endófitos en diversas especies vegetales se encuentra en auge. A continuación, se describen algunos ejemplos:

Abdelfattah *et al.* en 2016, realizaron un estudio de metagenómica de la diversidad fúngica en plantas de fresa, y evaluaron el efecto en las prácticas de manejo de cultivo en las comunidades fúngicas. Se evaluó la diversidad en los diferentes órganos (hoja, flor, fruto inmaduro y fruto maduro), en tratamientos con y sin uso de fungicidas. Se encontró que en las hojas de plantas sin fungicidas tuvo una mayor diversidad, mediante el índice

---

de Shannon con el  $H' = 2.83$ , respecto a las tratadas con fungicidas del  $H = 1.94$ , seguido de las flores no tratadas con  $H' = 2.1$  y  $H' = 1.53$  de las tratadas. En frutos maduros e inmaduros de las plantas tratadas con agroquímicos se vio menos diversidad. Las especies más abundantes en fresa fueron *Cladosporium* sp., *Botrytis cinerea*. Interesantemente, el uso de agroquímicos causó una reducción en *B. cinerea* del 50% y aumento del 60% de *Cladosporium* sp. esto sugiere que el uso de agroquímicos causa reducción de las comunidades de hongos.

Kim Chang-Kyun *et al.*, 2013, estudiaron la diversidad y la variación estacional de los hongos endófitos aislados de tres especies de coníferas en el monte de Taehwa Korea. Colectaron hojas de tres especies, en diferentes estaciones del año. Utilizando técnicas microbiológicas y moleculares, lograron la identificación de 59 morfotipos. Las especies más abundantes fueron *Nemania diffusa* con 66.7 de abundancia relativa (ab) en plantas de *Junninper*, seguido de *Phyllosticta papayae* en planta de *Larix Kaempferi* con (ab) de 50. La mayor diversidad con  $H' = 1.58$  se vio en árboles de *Pinus* en el mes de noviembre.

Orlandelli *et al.*, 2012, estudiaron la diversidad de las comunidades de hongos endófitos asociados a hojas de *Piper hispidum*, ésta es una planta de regiones tropicales, ampliamente usada como planta medicinal y como insecticida. Se colectaron hojas sin síntomas de enfermedad en el sureste de Brasil, posteriormente se aislaron los hongos endófitos, mediante cultivo en placa y mediante técnicas moleculares. Se realizó la identificación de especies y se obtuvieron 66 morfotipos de hongos endófitos, con base a las características macroscópicas de 98 aislamientos. Los géneros más representados fueron: *Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Lasiodiplodia*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Glomerella*, *Marasmius*, *Phlebia* y *Schizophyllum*. El género más abundante fue *Bipolaris* con 23.81 % de los endófitos identificados, seguido de *Colletotrichum* con el 19.05%, *Alternaria* y *Phomopsis* cada uno representando 9.53% del total. Otros géneros estuvieron representados por un sólo aislamiento.

Gomes-Fernades *et al.*, 2015, realizaron un estudio de la diversidad de hongos endófitos en hojas y raíces de *Glycine max*, en una plantación en Brasil para ello, se seleccionaron muestras de 50 hojas y raíces, posteriormente se aislaron los hongos endófitos mediante el uso de la subunidad pequeña del ANDr, (18S), se realizaron cálculos para la estimación de la diversidad encontrada. Se obtuvieron un total de 229 aislamientos, 187 en hojas y

---

42 aislamientos en raíces. Los principales géneros encontrados fueron: *Alternaria*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Colletotricum*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Leptosphaeria*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis* y *Stagonosporopsis*. Los análisis de riqueza mostraron ser mayores en hojas que en raíces, (S=187 respecto a 42 individuos y S=40 respecto a 13 individuos), el índice de Simpson, Shannon-Wiener (2.77 y 1.741), la equitabilidad (0.752 y 0.678) y la dominancia de hongos endófitos mostró ser mayor en raíces respecto a las hojas (0.297 y 2.123).

Ruso *et al.*, 2015, estudiaron la diversidad de hongos endófitos en las raíces, tallos y hojas de dos variedades de maíz y en cuatro variedades de soja, para ello realizaron colectas en seis áreas diferentes en Argentina. También realizaron la caracterización morfológica y molecular de los aislamientos. En sus análisis molecular obtuvieron 11 especies de hongos endófitos en soja y en maíz obtuvieron siete especies. En soja, la especie más frecuente fue *Fusarium graminearum* y la menos frecuente *Scopulariopsis brevecaulis* y en maíz las más frecuentes fueron *Aspergillus terreus* y *Aspergillus flavus* menos frecuente. En los índices de diversidad, en soja el cultivar DM3810 tuvo ( $H' = 3.09$ ) mientras que NAS009 tuvo ( $H' = 1.93$ ), la mayor diversidad se dio en tallos y hojas y menos diversidad en raíces. El cultivar DM4670, tuvo mayor diversidad en raíces. En maíz la mayor diversidad fue observada en el cultivar DK747 ( $H' = 1.84$ ) y en NK900 fue ( $H' = 1.67$ ). La mayor diversidad en órganos fue en tallos y hojas, mientras que, en raíces se vio menos diversidad.

### **1.6.2. Estudios de la diversidad de hongos endófitos en México**

México se considera un país megadiverso en grupos de organismos, ocupa el quinto lugar a nivel global por el número de especies y endemismos, cuenta con el 10% de la diversidad terrestre del planeta. Esta elevada diversidad se debe a su situación geográfica y a su topografía, con una variedad de altitudes y tipos de clima, situación que ha contribuido a la formación de un mosaico de condiciones ambientales y microambientales que promueven una variedad de hábitats (Mittermeier y Goettsch, 1992; Conabio 1998; Aguirre-Acosta *et al.*, 2014).

---

En *Vicia faba*, (López-Gonzalez *et al.*, 2017).identificaron y caracterizaron hongos endófitos asociados a habas donde recuperaron 758 aislamientos en secciones de hoja, que se clasificaron en 129 familias y en 66 géneros, los más representados fueron: *Fusarium*, *Curvularia*, *Phomopsis*, *Alternaria* y *Colletotrichum* (López-Gonzalez *et al.*, 2017).

Ramos-Garza *et al.*, (2016), estudiaron la diversidad de hongos endófitos en la planta medicinal *Dendropanax arboreus*, asociada a diferentes órganos como hojas, corteza y raíz. Los resultados fueron 45 aislamientos, que se agruparon en 28 genotipos, y 14 géneros de endófitos, los predominantes fueron *Fusarium*, *Phomopsis*, *Alternaria* y *Colletotrichum*. La diversidad de endófitos fue alta de  $H' = 3.19$ . También se obtuvieron aislados de hongos de los géneros *Corynespora*, *Endomelanconiopsis* y *Thozetella*, que son potenciales para la generación de compuestos antimicrobianos.

### **1.6.3. Hongos mucorales encontrados en papaya**

#### **1.6.3.1. Características microscópicas de los hongos mucorales**

Estos hongos se caracterizan por tener estructuras microscópicas, como desarrollo de estolones largos o cortos, dependiendo de la especie que se describa. Su morfología microscópica desarrolla esporangióforos (hifas), estas estructuras se conectan con uno o más esporangióforos (ápice de soporte y se conectan con los estolones) adicionalmente se compone de la columella y el apófisis, éstas últimas estructuras globosas a su vez, pueden o no tenerlas. Algunas pueden desarrollar rizoides (estructuras similares a raíces) y las esporangiosporas, que son estructuras contenidas en sacos o en las estructuras globosas (Hartanti *et al.*, 2015).

Se ha estudiado la diversidad de hongos mucorales, como saprófitos. En una colecta realizada en suelos de parcelas de tres estados (Colima, Oaxaca y Veracruz), se logró el aislamiento, caracterización morfológica y molecular, usando la región ribosómica 28S. De 72 hongos mucorales, 34 se encontraron en Colima, 11 en Veracruz y 27 en Oaxaca. Las especies más abundantes fueron *Gilbertella persicaria*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis* y *Mucor irregularis*, que son causantes pudrición blanda en frutos de papaya. Se logró la identificación de especies que no causan pudrición blanda en frutos y que son de importancia agrícola, biotecnológica y

---

---

médica como: *Choanephora cucurbitarum*, *Mucor ellipsoideus*, *Rhizopus homothallicus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus schipperae*, *Lichteimia ramosa*, *Gongronella butleri*, *Cunninghamella bertholletiae* y *Cunninghamella blakesleeana* ( Cruz-Lachica *et al.*, 2018).

### **1.7. Asociaciones no endófitas de hongos con plantas: las micorrizas**

Una micorriza es un hongo que se encuentra asociado a las raíces de las plantas, se sabe que tienen una estrecha relación con aproximadamente 160 especies de plantas, la mayoría pertenecen al Phylum *Glomeromycota* (Trindade-Vilar *et al.*, 2006). Los hongos de tipo micorriza, ejercen funciones claves en la rizósfera de más del 90 % de las plantas como: mejorar el enraizamiento (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999), aumentar la absorción de nutrientes minerales, especialmente iones como P, Cu y Zn (Bethlenfalvay *et al.*, 1988, Marschner y Dell, 1994). Los hongos micorrízicos de tipo arbuscular (HMA), promueven la tolerancia a estrés biótico y abiótico (Barea y Jeffries, 1995), activan el mecanismo de defensa de las plantas contra el ataque de patógenos, como bacterias, hongos, nematodos (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007, Borowicz, 2001). Además, las micorrizas mejoran la estructura del suelo (Azcón-Aguilar y Barea, 1997), producen una mayor diversidad vegetal (Leake *et al.*, 2004) y son fuentes de hormonas como el ácido abscísico, las giberelinas, las auxinas y las citocininas (Strack *et al.*, 2003).

Los hongos (HMA) funcionan como biofertilizantes, contribuyen al rendimiento de cultivos como: granada (Aseri *et al.*, 2008), tomate (Makus, 2004), sandía (Kaya *et al.*, 2003) fresa (Jaen *et al.*, 1997) y en papaya (Vazquez-Hernandez *et al.*, 2011).

#### **1.7.1. Estudios relacionados con micorrizas**

En el norte y sur de Brasil, se realizó un estudio para la identificación de micorrizas estrechamente relacionadas con la rizósfera de plantaciones de papaya. En total se obtuvieron 24 especies de micorrizas de tipo arbuscular (HMA), representadas en cinco familias y siete géneros. *Glomus etunicatum* y *Acaulospora scrobiculata* fueron las especies más abundantes, con una frecuencia de más del 50%. Otras especies fueron encontradas exclusivamente en ciertas regiones del país como *Glomerella intraradices* y *Paraglomus brasilianum*, en el norte de Espírito Santo, *Acaulosporace dilatata*, *Acaulosporace longula*, *Scutellospora persica* encontradas en el sur de Bahia (Trindade-Vilar *et al.*, 2006).

---

---

En México, se evaluó el efecto de un complejo de cuatro hongos micorrízicos de tipo arbuscular (HMA) formado por *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*, *Glomus etunicatum* y *Gigaspora albida*, como antagonistas de *Fusarium oxysporum* en plántulas de papaya, tanto en forma individual como en combinación con la rizobacteria *Pseudomonas* sp. (PPV3). Los resultados indicaron que el complejo de HMA (MTZ01) y la rizobacteria proporcionaron mayor protección hasta un 85%. Esto sugiere que esta relación mutualista mejora el control de la enfermedad provocada por *F. oxysporum*, además de estimular el crecimiento de plántulas de papaya (Hernández Montiel *et al.*, 2013).

### **1.8. El cultivo de papaya**

**La papaya (*Carica papaya* L.)** es una especie nativa de Centroamérica y Sudamérica (Teixeira da Silva *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010 Ávila-Reséndiz *et al.*, 2017). Son plantas dicotiledóneas, de tipo herbáceas, de tronco hueco y no ramificado, sus hojas son prominentes y palmeadas, peciolo dispuestos en la parte apical de la planta y las inflorescencias son de tres tipos: masculinas, femeninas y hermafroditas, de coloración blanca- crema. Los frutos son de forma ovalada a casi redonda y pueden llegar a pesar hasta 9 kg. Del fruto inmaduro se genera un látex de color blanco del cual se extrae la papaína. La papaya pertenece al género *Carica*, que se encuentra dentro de la familia *Caricaceae* (**cuadro 3**), que incluyen 35 especies, distribuidas en 6 géneros (Fisher 1980, Ming *et al.*, 2008). La papaya es la única especie del género que se cultiva como árbol frutal, mientras que las demás especies son cultivadas como plantas ornamentales (Burkill, 1966).



**Figura 3.** *Carica papaya* L. Ilustración de Stephanie Cabinas (2016). Tallo largo, especie de corona formada por hojas con pedúnculo largo. Inflorescencias, botones florales y semillas de color negro-gris, frutos inmaduros y maduros colgados en la base del tronco.

### 1.8.1 Clasificación taxonómica de *Carica papaya* L.

**Cuadro 2.** Clasificación taxonómica de la papaya.

Taxonomía: <i>Carica papaya</i> L. (papaya)	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden	Violales
Familia:	Caricaceae
Género:	<i>Carica</i> L.
Especie:	papaya L.

---

### 1.8.2. Variedades de papaya cultivadas en México

México ocupa el tercer lugar en exportación de papaya a nivel mundial seguido de la India y Brasil (SIAP, 2017). Los principales estados productores de papaya en el país son: Oaxaca, seguido de Colima, Chiapas, Veracruz, Michoacán, Guerrero, Jalisco, Campeche, Yucatán y Tabasco (SIAP, 2017). La variedad Maradol es más comercializada en el país y representa el 90% de la papaya sembrada (López-Ochoa *et al.*, 2017; Sañudo-Barajas *et al.*, 2017). Otras variedades cultivadas en México, son la roja en los estados de Guerrero, Nayarit, Tabasco y Veracruz; la Hawaiana, se cultiva en Guerrero, Nayarit; la Criolla, cultivada en Baja California, Guerrero, Jalisco y la Amarilla sembrada mayormente en los estados de México, Puebla, Sinaloa y Tamaulipas (López-Ochoa *et al.*, 2017; SAGARPA, 2017). En los estados de Campeche y Yucatán, se cultivan otras variedades de papaya destinadas al mercado de exportación, como son el híbrido Tainung N° 01.



- Michoacán
- Colima
- Guerrero
- Jalisco
- Oaxaca
- Chiapas
- Veracruz
- Campeche
- Yucatán

**Figura 4.** Principales estados productores de papaya en México (SAGARPA 2017).

---

### **1.8.3. Características agronómicas de la Papaya variedad Tainung N°01.**

El híbrido Tainung N°01, fue importado desde Kaohsiung, Taiwán pertenece al grupo Formosa. Los frutos de las plantas hermafroditas (de interés comercial) son de tipo oblongo, con pulpa de color naranja-rojiza, y aroma suave (Maruchi *et al.*, 2009; Sañudo-Barajas *et al.*, 2017). Con peso promedio de 1.6 kg. El costo por Kg de semilla de \$3,500 a \$4000 pesos (Maruchi *et al.*, 2009; Sañudo-Barajas *et al.*, 2017; Ventura-Aires *et al.*, 2017).

Esta variedad es altamente productiva, con un promedio del 98.5 kg por planta, presenta características que la hacen atractiva para programas de mejoramiento genético, por ser tolerante a enfermedades fúngicas y víricas. Las plantas de esta variedad son muy vigorosas, pueden alcanzar hasta 2 metros de altura. El período de floración inicia a los tres meses de la transferencia a campo y el proceso de producción del fruto a los 8 meses (Sañudo-Barajas *et al.*, 2017; Maruchi *et al.*, 2009).

### **1.8.4. Hongos patógenos que afectan al cultivo de papaya**

Los hongos patógenos tienen un amplio rango de hospederos, afectan cultivos de importancia agrícola. Por ejemplo, hongos de la clase Ascomicota y Deuteromicota provocan enfermedades durante la precosecha y postcosecha (Sañudo-Barajas *et al.*, 2017). A nivel mundial, se han reportado especies patógenas en cultivos de papaya, principalmente, los del género *Colletotrichum* que causan antracnosis, los del género *Alternaria*, que causan la mancha café en fruto; los del género *Fusarium*, causantes de pudrición blanda; los del género *Ascochyta*, que causan pudrición del fruto, los del género *Rhizopus* son causantes de la pudrición blanda en frutos. Algunas especies de los géneros *Mycosphaerella*, *Phomopsis* y *Lasiodiplodia* causan pudrición del pedúnculo del fruto, mientras que otra especie del género *Guignardia*, genera mancha oscuras en el fruto, y especies de los géneros *Cladosporium* y *Penicillium* afectan el interior del fruto (Sañudo-Barajas *et al.*, 2017). En México se han descrito 36 especies de hongos causantes de diferentes enfermedades en plantaciones de papaya, las especies más comunes son *Colletotrichum*, *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Ascochyta caricae* (Sañudo-Barajas *et al.*, 2017). Es común que en algún momento del ciclo de vida de los patógenos puedan ser encontrados como endófitos, dentro de los tejidos sin ningún daño aparente y cambiar esta condición si los factores ambientales lo permiten, pero este

---

mecanismo no ha sido del todo estudiado. (Kusari *et al.*, 2012).

### **1.8.5. La antracnosis en papaya**

La principal enfermedad provocada por la incidencia de hongos patógenos es la antracnosis, que afecta los frutos tanto en campo como en la etapa de post-cosecha, es causada por especies del género *Colletotrichum* se encuentran comúnmente en regiones con climas tropicales (Bailey and Jeger 1992; Torres Calzada *et al.*, 2018).

En México se han identificado 4 especies de este género que afectan a la papaya: *C. gloeosporioides* produce lesiones hundidas redondas, empapadas de agua, de color rosado-naranja, *C. truncatum* (Syn. *C. capsicii*) cuyas lesiones están cubiertas de masas de conidios de coloración marrón-negro; *C. magnum*, que causa lesiones atípicas, parcialmente hundidas de coloración salmón y lesiones de coloración parda en la superficie de los frutos (Torres Calzada *et al.*, 2013; Tapia Tussell *et al.*, 2008) y recientemente se describió *C. plurivorum*, afectando plantaciones del estado de Veracruz, que produce lesiones hundidas de color negro intenso con márgenes claros (García-Estrada *et al.*, 2019).

En un estudio realizado en la Península de Yucatán, se obtuvieron 37 aislamientos de hongos que causaban antracnosis en frutos de papaya de los cuales, 22 correspondían a *C. gloeosporioides* y 15 a *C. capsicii*, con 6 morfotipos de *C. gloeosporioides* y tres de *C. capsicii*, que presentaron distintos grados de virulencia. Estos fueron identificados utilizando los cebadores específicos CgInt/ITS4 para *C. gloeosporioides*, y CcapF/CcapR para *C. capsicii*. Posteriormente se encontró a *C. magnum*, en plantaciones comerciales de Chiapas y Campeche (Tapia-Tussell *et al.*, 2016). *C. gloeosporioides* no sólo causa antracnosis en papaya, también ha sido encontrado en otros cultivos de importancia económica como el mango, aguacate y otros cultivos (Silva-Rojas y Avila-Quezada, 2011; Tapia-Tussell *et al.*, 2008). Mientras que *C. capsicii* se ha encontrado afectando también cultivos de chile y *Jatropha curcas* (Tapia-Tussell *et al.*, 2008; Torres Calzada *et al.*, 2011).

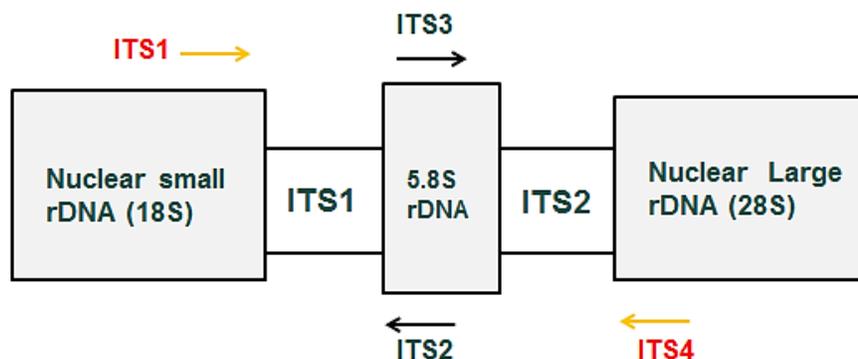
---

## 1.9. Métodos moleculares para la identificación de hongos

Los ADN ribosomales son secuencias del ADN de longitud variable que codifican para el ARN ribosómico (ARNr). El cistrón de ARNr eucariótico está formado por los genes ARNr 18S, 5.8S y 28S transcritos como una unidad por la ARN polimerasa I (Stackebrandt and Goebel 1994). Los genes del ADN ribosomal son ampliamente conservados y son utilizados para realizar la identificación y clasificación de especies de hongos y de otros organismos. Utiliza secuencias estándar es decir el tamaño de banda esperada es de 500 a 800 pb, para la identificación de especies en todos los reinos eucariotes, pero los ITS son ampliamente usados como códigos de barras para identificación de hongos para hongos varía de 400 pb a 800 pb (Schoch *et al.*, 2012).

Los ITS corresponden a fragmentos de ADN no codificantes, situados entre los ADNr, se les llama ITS, por su abreviatura en Inglés de “internal transcribed sequences”, es decir, secuencias espaciadoras transcritas. La región ITS comprende dos secciones (ITS1 e ITS2) que flanquean la región 5.8S conservada (Cuadros-Orellana *et al.*, 2013) **Figura 5**.

Durante la maduración del ARNr, los fragmentos ITS son eliminados y degradados, de esta manera se obtienen los los RNAr 18S, 5.8S y 28S. Entre las regiones del cistrón ribosómico, las regiones (ITS) tienen la probabilidad más alta para realizar la identificación exitosa de las distintas especies de hongos, por ser altamente variables, pudiendo ser específicas dentro de un mismo género (Scorzetti *et al.*, 2002).



**Figura 5** . Representación de las regiones del ADNr. Modificado de (White *et al.*, 1990).

---

Para la identificación exitosa de hongos Schoch *et al.*, (2012), probó seis regiones del ADN como posibles códigos de barras para hongos, y tres subunidades del cistrón ribosómico nuclear (ARN), los genes representativos como: la subunidad grande de la ARN polimerasa II, la segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II, la proteína de mantenimiento de minicromosomas. Genes del ADNr como: La subunidad nuclear grande 28S, la subunidad pequeña 18S, los ITS y la región del gen mitocondrial que codifica para la citocromo oxidasa (COI). De todas estas regiones, los ITS mostraron una mayor probabilidad de identificación exitosa para hongos, y fue propuesto como el código de barras para hongos.

En general los marcadores ITS, tienen un amplio rango de identificación de especies aunque no funcionan para todos los casos, por esta razón se han adoptado otros marcadores. Por ejemplo, en linajes tempranos como *Penicillium* se utiliza la región mitocondrial del gen de la citocromo c oxidasa (COI) para la confirmación de más del 67% de las especies (Seifert KA, *et al.*, 2007). Para la identificación de hongos del género *Fusarium* se utilizan genes de rRNA y el factor de elongación 1- $\alpha$  (Donnell *et al.*, 2010). Para *Penicillium* se ha utilizado la  $\beta$ -tubulina (Frisvad *et al.*, 2004) y genes codificantes de diversas proteínas. La subunidad grande de la ARN polimerasa II (RPB1) puede tener potencial como código de barras fúngico para estudios de hongos de las clases *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Microsporidia* (Cheney *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2004).

---

## JUSTIFICACIÓN

La papaya es un cultivo de importancia económica en México y en el mundo, la variedad más cultivada en México es la Maradol a pesar de ser muy susceptible a enfermedades. La variedad Tainung N°01, es cultivada por presentar tolerancia al virus de la mancha anular. Para contrarrestar los problemas fitosanitarios del cultivo se requieren alternativas para su manejo. Para ello se han usado microorganismos endófitos como promotores del crecimiento en plantas y de respuesta de defensa contra patógenos (los hongos endófitos). En plantaciones de papaya variedad Tainung N° 01 se desconoce la diversidad de la micobiota existente, aunque se han realizado estudios acerca de la diversidad de hongos endófitos en cultivos agrícolas, no existen estudios en *Carica papaya*. Estudiarla permitiría conocer los distintos hongos endófitos en papaya para determinar su abundancia, la dominancia y la riqueza depende de las condiciones al que sea sometido el cultivo, además de contar con una colección de hongos que pueda ser la base de futuros esfuerzos de biospropección y aportar conocimiento para el cultivo de manera sustentable. Considerando que la población de hongos endófitos en las variedades de papayas puede ser diferente, podrían utilizarse como blancos para el mejoramiento del cultivo de la papaya Maradol.

---

## **PREGUNTA BIOLÓGICA**

¿Cómo se encuentran asociadas las comunidades de hongos endófitos en papaya variedad Tainung N°01 en la Península de Yucatán?

## **HIPÓTESIS**

La diversidad de la micobiota endógena existente en plantaciones de papaya variedad Tainung N°01, depende del tipo de suelo y de las condiciones de manejo al que sea sometido el cultivo.

---

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar la diversidad de hongos endófitos asociados a la papaya variedad Tainung N° 01 en dos condiciones de cultivo diferentes.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener aislados de hongos a partir de diferentes órganos de papayas cultivadas bajo diferentes condiciones de manejo agronomico.
- Realizar la caracterización morfológica macroscópica de los aislados fúngicos
- Identificar morfotipos distintos y caracterizarlos molecularmente.
- Analizar la diversidad de especies de hongos endófitos identificados en dos sitios de muestreo de papaya Tainung N° 01 en condiciones contrastantes

---

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

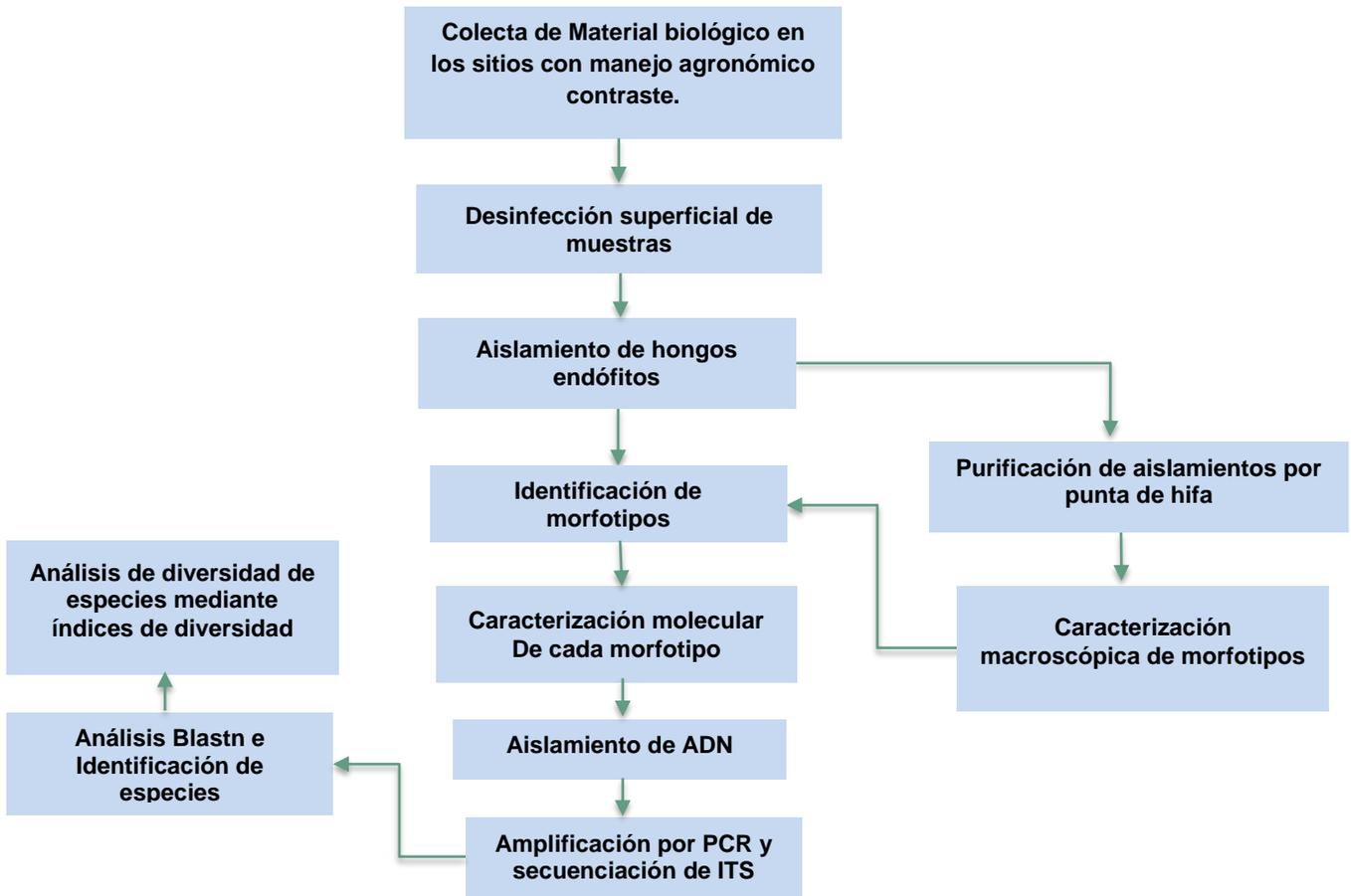


Figura 6. Esquema de la estrategia experimental.

---

## CAPÍTULO II

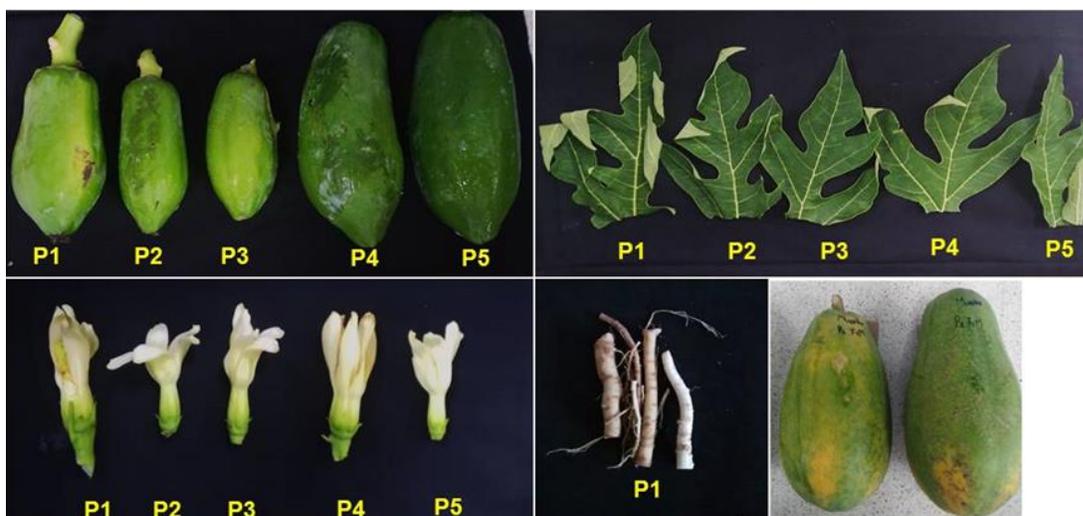
### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1.1. Sitios de colecta

Se realizaron dos muestreos en localidades con condiciones diferentes de cultivo: la primera se realizó en el municipio de Candelaria Campeche en la plantación comercial FRUTICAM<sup>®</sup> que consistía de control biológico natural, es decir se dejaban operar a los controladores biológicos de posibles plagas y el segundo muestreo se realizó en el poblado de Temozón, Yucatán en la Empacadora PAMASUR<sup>®</sup>. Donde aplicaban control con fungicidas.

#### 2.1.2. Material biológico

En Candelaria, Campeche, se seleccionaron plantas asintomáticas de papaya de la variedad Tainung N°01, de seis meses de edad de las cuales se colectaron los siguientes órganos: hojas intermedias, flores post-antesis y frutos inmaduros (**figura 8**). De un segundo lote, de plantas de dos años de edad, se colectaron los frutos maduros y las raíces fueron tomadas de plantas de dos años de edad de un tercer lote. Las muestras fueron colocadas en bolsas de papel encerado, separándolas entre órganos y luego en neveras, fueron trasladadas para su procesamiento inicial en el laboratorio del COLPOS y posteriormente al laboratorio del CICY (**anexo 2**). En la segunda colecta, en Temozón, Yucatán, todos los órganos fueron tomados de dos lotes donde se muestrearon cinco plantas asintomáticas. Las características del primer lote, fueron tomadas de plantas sembradas sin elevaciones, de color negro sin piedras, mientras que las plantas del segundo lote estaban en un suelo cuya topografía presentaba colinas y tenían abundantes piedras (**Anexo 3**).



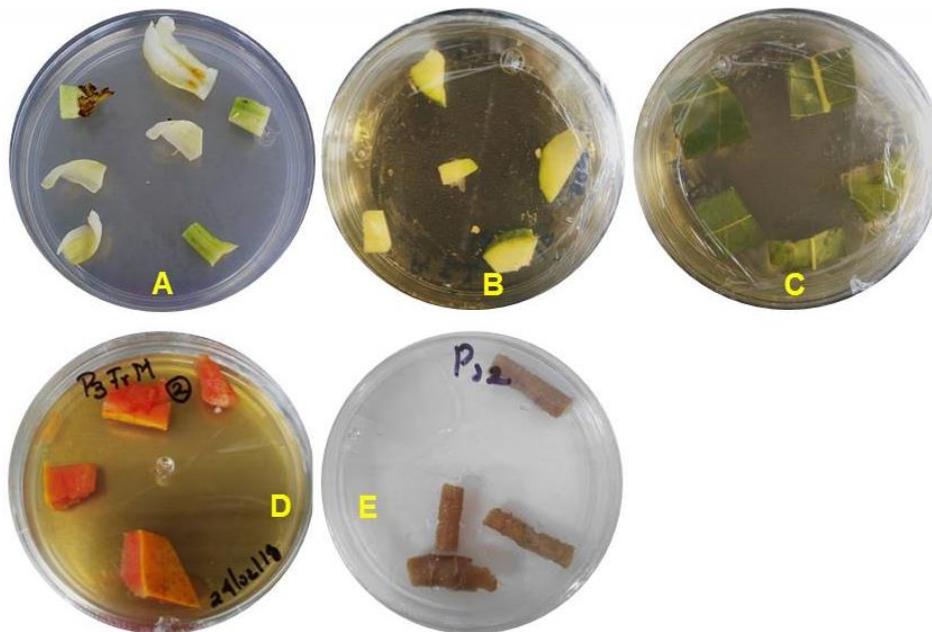
**Figura 7.** Órganos de plantas de papaya muestreados en la localidad de Temozón, Yucatán.

### 2.3. Desinfección del material biológico

Para seleccionar únicamente hongos endófitos de papaya se procedió a la desinfección, de los órganos seleccionados, para ello se colocaron las muestras en una solución comercial de hipoclorito de sodio (NaOCl) diluida al 1% por 3 minutos, seguida de tres lavados sucesivos con agua destilada estéril. Posteriormente las muestras se lavaron con una solución de etanol al 70% por 2 minutos, y se realizaron tres lavados sucesivos con agua destilada estéril, para la eliminación del etanol (Kim *et al.*, 2013).

### 2.4. Aislamiento de hongos endófitos

Las hojas fueron cortadas con ayuda de una tijera estéril en cuadros de 1cm<sup>2</sup>. Las flores en etapa post-antesis fueron cortadas longitudinalmente en dos partes (**Figura 8-A**), los frutos tanto inmaduros como maduros, se cortaron conservando tanto la parte externa (epicarpio) como la pulpa (mesocarpio) (**Figuras 8-B, 8-C y 8-D**). Las raíces se cortaron longitudinalmente en secciones de 3 cm de largo. Todos los explantes fueron sembrados en cajas Petri® con 25 mL de PDA marca (SIGMA-ALDRICH®) y el medio PDB se usó la marca (DIFCO®), para cultivar hongos filamentosos, y se incubaron por 10 días a 28° ±2° C. En todos los casos se hicieron tres réplicas (tres placas) por órgano de cada planta.



**Figura 8.** Explantes de órganos de papaya variedad Tainung N° 01 en medio PDA. Secciones de flores post-antesis A), frutos inmaduros B), hojas intermedias sembradas C), secciones de fruto maduro D), secciones de raíces E).

## 2.5. Caracterización macroscópica de hongos endófitos

### 2.5.1. Aislamiento de cepas “puras” por estrías

Una vez transcurridos 10 días de la incubación de los explantes en medio PDA, se procedió al aislamiento de los hongos endófitos. Para ello, se seleccionó con base en las distintas morfologías de las colonias, una fracción de micelio independiente empleando un asa bacteriológica, y se realizó la siembra de las cepas haciendo estrías en una placa con medio PDA fresco. Este procedimiento fue repetido cada tres o cinco días, hasta la obtención de colonias independientes (morfología en colonia única y consistente). Cuando las colonias de hongos crecían muy cercanas se purificaron mediante cultivo de punta de hifa, para la obtención de aislamientos puros.

### 2.5.2. Aislamiento de cepas “puras” por punta de hifa

Este método de purificación se realizó conforme al método utilizado recomendación del Laboratorio de GeMBio del CICY (Tapia-Tusell *et al.*, 2006). Se utilizaron placas Petri® con medio agar-agua al 2%, pH a 5.6. Se sembró una fracción de micelio y se incubó por

---

una semana o 15 días a  $28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , o hasta el crecimiento del micelio e hifas independientes. Una vez que las hifas pudieron ser observadas al microscopio estereoscópico (ZEISS, Stemi 200-C), se seleccionó una sola punta de hifa y se sembró en una nueva placa Petri®.

## **2.6. Caracterización morfológica de hongos endófitos en papaya.**

Se llevaron registros fotográficos y periódicos de la morfología en placa de los cultivos de hongos, su velocidad y tiempo de crecimiento. Se evaluó el aspecto general de la colonia como: tamaño, pigmentación, forma, borde, elevación, y superficie. La forma de la colonia se visualizó mediante los criterios: puntiforme, circular, irregular, filamentoso, rizoide, (entero, ondulado, lobulado; que tiene formas redondas grandes y pequeñas, ramificado y rizado). En los bordes, de aspecto plano, elevado, convexo, pulvinada (con elevación esférica), umbilicada (elevaciones pequeñas, pero redondas) (Pedrique-Gutierrez *et al.*, 2008). Para la identificación de texturas se registraron, si eran de tipo algodonoso, aterciopelado, polvoroso, apetalada, friable, compacta, mate, seco, liso, brillante, corrugado. También se registró si el aislado producía algún pigmento (Ornadelli *et al.*, 2012; Pedrique-Gutierrez *et al.*, 2008; Guevara *et al.*, 2007).

## **2.7. Criopreservación de hongos endófitos**

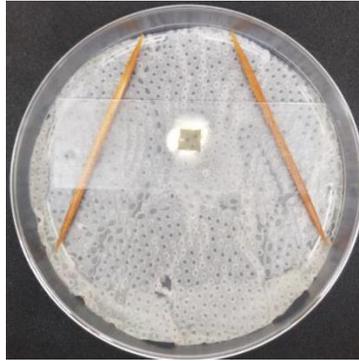
Los diferentes morfotipos identificados macroscópicamente fueron colocados en un medio de criopreservación, caldo Papa Dextrosa (PDB) al 50% y glicerol al 50%). En tubos de criopreservación de plásticos de 2.5 mL, y con una espátula se colectó el micelio y se colocó en los tubos que contenían 2 mL de medio de criopreservación. Los tubos se agitaron suavemente y se etiquetaron con el número de morfotipo, se sellaron con parafilm, por último se resguardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el ultracongelador.

## **2.8. Microcultivo de morfotipos de hongos**

Para la observación y diferenciación microscópica de algunos hongos con morfología similar, se realizó un microcultivo. En campana de flujo laminar, se prepararon las cajas Petri® con una base de papel secante y con palillos en forma de "A" que sirvieron de base a un portaobjetos, en la parte central del mismo, se colocó un cuadro de  $1\text{cm}^2$  de medio PDA. Con la punta de una pinza se tomó una fracción de micelio del hongo de interés crecido en medio PDA y se inoculó en los cuatro lados del cuadro (**figura 9**). Finalmente

---

se colocó el cubreobjetos sobre la preparación, se sellaron, se rotularon y se incubaron dos, tres y cinco días  $28^{\circ} \pm 2$  °C. Hasta la observación al microscopio (ZEISS-Primo Star, objetivo P95 M37/52X 0.75).



**Figura 9.** Microcultivo del M-23-A después de tres días de la inoculación en medio PDA.

### **2.8.1. Microscopia confocal de hongos endófitos y de hongos levaduriformes.**

Se realizaron tinciones de levaduras con blanco de Calcoflúor al 0.2% (18909), este un fluorocromo no específico, con afinidad por la celulosa y la quitina, ésta es una técnica rápida para la identificación de estructuras de hongos por microscopia. Las levaduras fueron cultivadas en medio 30 mL PDB, dos días después, se tomó una fracción de la levadura con un asa bacteriológica y se montó en un cubreobjetos, posteriormente se adicionaron 300  $\mu$ L de una solución de blanco de Calcoflúor al 0.2%, con glicerol al 100%. Se incubó por 3 minutos, se selló la preparación y se visualizó en un microscopio confocal marca OLIMPUS IX 81, MICROSCOPIA F100VIEW FV 1000, 12 horas o 18 horas después de la tinción.

## **2.9. Identificación molecular de los morfotipos aislados mediante ITS1-ITS4.**

### **2.9.1 Obtención de biomasa para extracción de DNA**

Después de obtener los aislados puros, se caracterizaron y se seleccionaron 89 morfotipos con características diferenciales. La biomasa de los hongos algodonosos se obtuvo mediante el cultivo en medio líquido, para ello, se tomó una fracción de micelio y se sembró en un matraz con 75 mL de medio (PDB). Los matraces fueron incubados en un orbitador a 100 rpm y a  $28 \pm 2$  °C, con un fotoperiodo 18 horas de luz / 6 horas de

---

---

oscuridad durante 15-18 días. Transcurridos los días, el micelio se filtró, con ayuda de una bomba de vacío y de tres lavados con agua destilada estéril, se congelaron en paquetes con nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>) y se guardaron en el ultracongelador.

Para las levaduras y morfotipos levaduriformes, se cultivaron en 15 mL de medio PDB por dos días, después se colectaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugaron a 13 rpm por 2 minutos, se desechó el sobrenadante y se repitió este paso hasta la obtención de una pastilla de 180 mg. Para el resto de los morfotipos la biomasa se obtuvo de micelio fresco y crecidos en placas en placas Petri® a 28 ± 2 °C, transcurridos 10 días el micelio fue colectado para su extracción de ADN como describe a continuación.

### **2.9.2. Extracción de ADN genómico**

Para la extracción de ADN se pesaron 180 mg de micelio y se añadieron en un mortero que contenía N<sub>2</sub>. El micelio se maceró en congelación hasta la obtención de polvo fino, después con ayuda de una espátula se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se procedió a la extracción de ADN, o bien, se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para extracción de DNA genómico se utilizó el kit de extracción, DNAeasy® Plant mini kit de la Marca QIAGEN. Se siguió el protocolo descrito por el fabricante. Se eluyó el ADN de las columnas empleando 30 µL de amortiguador Tris-EDTA (TE). La calidad del ADN se verificó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8% misma que fueron teñidos con 2.5 µL de bromuro de etidio (EtBr). Se desarrolló a 90V por 45 minutos y se reveló en el transiluminador (KODAK EDAS 290). También se utilizó el protocolo para la extracción de ADN descrito por Tapia-Tussell *et al.*, 2006 con ligeras modificaciones. La extracción del ADN de hongos se realizó pesando 300 mg de micelio y se maceró con N<sub>2</sub> hasta la obtención de polvo fino, se pasó en tubos de microcentrífuga de 2 mL y se extrajo el ADN con 800 µL de solución de lisis (SDS al 0.3 %), seguidamente se añadieron 500 µL cloroformo mezclando por inmersión, después el sobrenadante se trató con 700 µL de isopropanol, la pastilla se lavó con 500 µL de etanol grado molecular al 70% y se recuperó con 50 µL amortiguador de Tris-EDTA (TE).

---

### 2.9.3. Amplificación de secuencias ITS

Para la amplificación a nivel especie de los morfotipos obtenidos, se empleó la técnica de amplificación en cadena de la DNA polimerasa (PCR), con los iniciadores ITS1 e ITS4, contra las regiones ITS conservadas de los ADNr (White *et al.*, 1990). La mezcla de reacción se hizo con 10X Dream Taq Buffer 5  $\mu$ L, dNTP Mix, 10 mM (NEBs) 1  $\mu$ L, iniciador ITS1- 20 pmol/ $\mu$ L (Forward) 1  $\mu$ L, iniciador ITS4 20 pmol/ $\mu$ L (Reverse) 1  $\mu$ L, Dream Taq DNA Polymerase 0.25  $\mu$ L. El volumen final de la reacción fue de 50  $\mu$ L; el programa de amplificación por PCR consistió de los siguientes pasos: Desnaturalización inicial 95 °C durante 3 min, y 35 ciclos en las condiciones, 95 °C durante 30 s. 55 °C durante 60 s, 72 °C durante 45 s, finalmente se realizó una última extensión 72 °C durante 5 min, en el termociclador (BIO-RAD T100 <sup>TM</sup>). Los amplicones obtenidos se verificaron en geles de agarosa al 0.8%, como se describió previamente. Se empleó como referencia de masa molecular la escalera 100 pb de New England Biolabs (**Cuadro anexo 6**).

### 2.9.4. Reacciones de secuenciación.

Los amplicones, se purificaron con el kit comercial PureLink PCR Purification Kit, siguiendo el protocolo del fabricante (QIAGEN). Se verificó la calidad e integridad de los amplicones purificados en geles de agarosa al 0.1%, como se describió anteriormente. Se tomaron 250 ng de los productos de PCR purificados y se mezclaron con 2.5 picomoles del cebador ITS1 y se ajustó a un volumen final de 10  $\mu$ L. Las secuencias se obtuvieron por servicio de la empresa Macrogen, Corea, que emplea el método de Sanger automatizado con dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos como terminadores de la reacción.

### 2.9.5. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se analizaron con programas como Sequencher y BLASTn del NCBI. Primero, se verificó la calidad de las secuencias por revisión de los cromatogramas en Sequencher. Aquellas de buena calidad se depuraron eliminando los extremos, alineándolas en Sequencher *in silico* con el iniciador ITS1 empleado en la secuenciación. Para la confirmación de la identidad de cada especie, con las secuencias depuradas se realizaron alineamientos de nucleótidos (BLASTn), contra las secuencias reportadas en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en Inglés). Se

---

---

registró el porcentaje de identidad y de cobertura de cada secuencia. También se realizaron alineamientos múltiples de los cromatogramas de cada una de las secuencias y alineamientos múltiples de todas las secuencias depuradas y obtenidas en Sequencher, aquellas que dieron la formación de un contig fue considerada como una misma especie.

#### **2.9.6. Análisis de la diversidad de especies de hongos**

En el análisis de diversidad, se estudió la riqueza especies de las secuenciaron en ambas poblaciones, en Campeche se tomaron 37 especies únicas y en Yucatán 14 especies. La dominancia de los diferentes órganos (hojas, flores, fruto maduro e inmaduro y de raíces). Se calculó el índice Simpson (D) y su complemento (1-D), y la comparación de ambas condiciones muestreadas. También se calculó el índice de Shannon-Wiener para el análisis de diversidad alfa con base al logaritmo natural y logaritmo en base 10, la abundancia relativa de ambos sitios de muestreo (Kim *et al.*, 2013 y Abdelfattah *et al.*, 2016). Tanto el índice de Shannon como la diversidad de Simpson, se calcularon utilizando el programa de cómputo Estimate S.9.1 (Colwell 2005; Ramos-Garza *et al.*, 2016). Para realizar este cálculo y la corrida del programa, se utilizaron las matrices de abundancia, matrices de presencia y ausencia de los diferentes morfotipos de ambas poblaciones.

---

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 Sitios de muestreo

En este trabajo se comparó la biodiversidad de hongos endófitos presentes en plantas de papaya de la variedad Tainung N°01, sujetas a distintas condiciones de cultivo. Para ello se colectó material biológico de dos plantaciones comerciales. La primera colecta se efectuó en la empacadora FRUTICAM® ubicada en Candelaria Campeche (N-18.182778°, O-91.04583), en el mes de febrero (al que se le denominó Sitio 1). El segundo muestreo se realizó en el poblado de Temozón, Yucatán en la Empacadora PAMASUR® (N-20.800200°, O-88.20110°), en el mes de abril, (Sitio 2). Para consulta de datos (**anexo 1**).

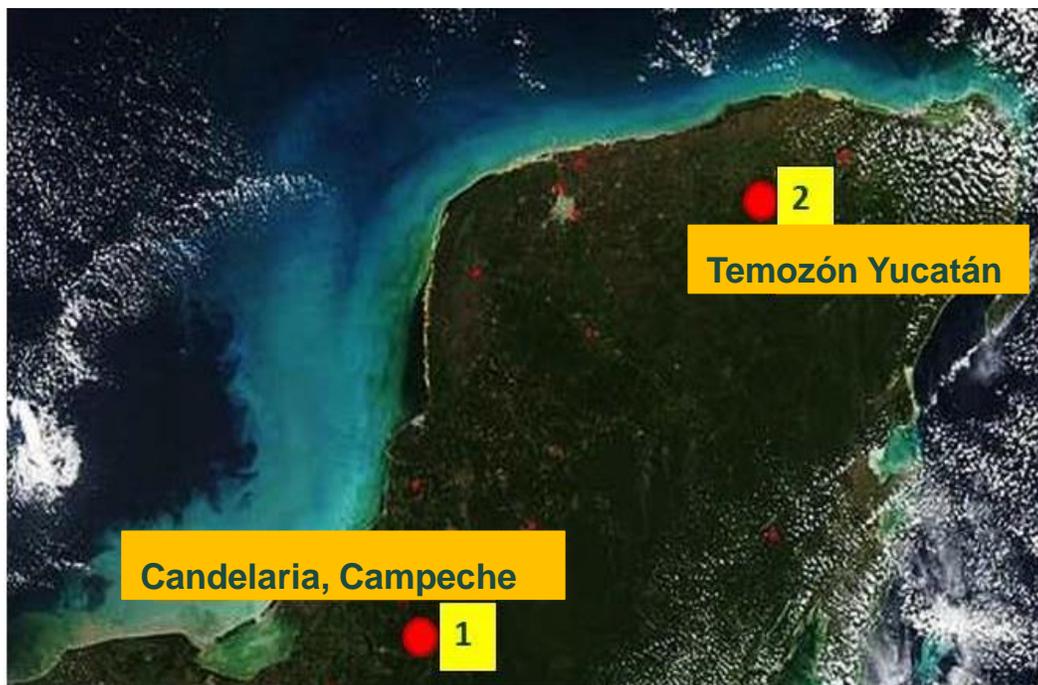


Figura 10. Mapa de los poblados muestreados.

---

### 3.2. Condiciones de cultivo de las poblaciones muestreadas

En el muestreo realizado en Candelaria, Campeche la plantación estaba sujeta a un control biológico natural, que consistió en el uso de plantas arvenses para atraer insectos, vectores de enfermedades (**figura 11**) y de arvenses atrayentes de polinizadores e insectos benéficos (**figura 12**), con aplicación mínima de fungicidas. El segundo muestreo se realizó en Temozón, Yucatán, las condiciones de cultivo, incluían uso frecuente de agroquímicos (fungicidas-plaguicidas).



**Figura 11.** Sistema de arvenses que crecen cercanos al cultivo de papaya, candelaria Campeche.

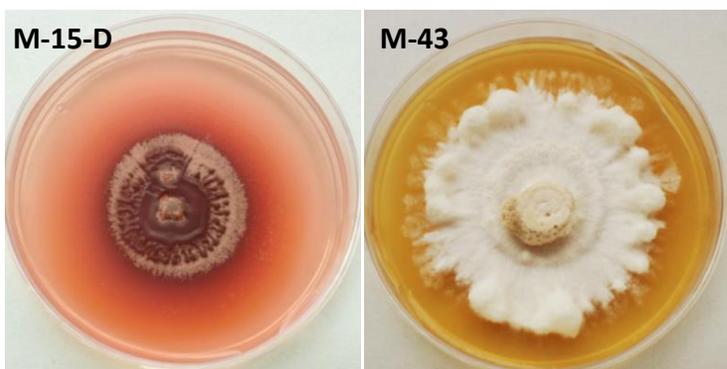


**Figura 12.** Plantas repelentes de insectos A-B, plantas captadoras de insectos benéficos C-D. Candelaria, Campeche.

---

### 3.3. Purificación de hongos endófitos y selección de morfotipos

La purificación y selección de los diferentes morfotipos de hongos endófitos se realizó con base a lo reportado por (Cruz-Lachica *et al.*, 2018; Ramos-Garza *et al.*, 2016; Orlandelli *et al.*, 2012; Pedrique-Gutierrez *et al.*, 2008). Para la obtención de aislamientos puros fue muy importante el método de separación, a continuación, se muestra dos ejemplos de la purificación una por estrías y por punta de hifa (**figura 13**).



**Figura 13.** Morfotipo 15-C purificado por punta de hifa y el M-43 por estrías.

### 3.4. Caracterización macroscópica de hongos endófitos

Posteriormente se hizo la caracterización macroscópica de los aislamientos en placa, y se tomaron datos: color de micelio, textura, forma del crecimiento micelial, forma de márgenes, registros de la velocidad de crecimiento, así como la producción de pigmentos por Orlandelli *et al.*, 2012; Pedrique-Gutierrez *et al.*, 2008). Con base en las características macroscópicas se fueron seleccionando los distintos morfotipos, aquellos morfotipos que se registraron en más de un órgano se consideraron como distintos aislamientos. Para ello se elaboraron cuadros para registrar el número de aislamiento, tanto por órgano y lugar de colecta. El (**cuadro 3**), muestra el número de aislamientos encontrados para cada morfotipo, su frecuencia por órgano y por lugar de colecta. En total se logró la identificación de 101 morfotipos y 474 aislamientos en ambos sitios de muestreo. El morfotipo más frecuente es el sitio 1 (Candelaria, Campeche), fue el M-15 con 18 aislamientos, distribuidos principalmente en hojas (9 aislamientos), frutos maduros con (7 aislamientos) y frutos inmaduros (con 2 aislamientos). Le siguió el morfotipo 42 con

17 aislamientos, 7 en fruto inmaduros, 4 en frutos maduros y 3 en raíces. El tercer lugar el morfotipo **60-TRI** con 12 aislamientos encontrados todos en raíces. Mientras que en Yucatán los morfotipos más abundantes fueron el M-73 con 9 aislamientos; el segundo lugar fue el **M-74** y **M-82**, con 8 aislamientos cada uno y en tercer lugar el M-71 y M-68 ambos con 7 aislamientos. **El M-73** se encontró exclusivamente en hojas y el M-82 exclusivamente en raíces. **El M-74**, se encontró principalmente en hojas seguido de frutos inmaduros, mientras que el **M-68** se encontró también exclusivamente en raíces. El M-71 se encontró igualmente distribuido en hojas, flores y frutos maduros (cuadro 3).

**Cuadro 3.** Total de morfotipos y aislamientos obtenidos en ambos sitios de muestreo.

N°	MORFOTIPO	ÓRGANO COLECTADO					AISLAMIENTOS POR MORFOTIPO	SITIO DE COLECTA
		HOJ	FLR	FRI	FRM	RA		
		NÚMERO DE AISLAMIENTOS						
1	2	8					8	CAMP
2	3	4					4	CAMP
3	4	8					8	CAMP
4	5	7		3			10	CAMP
5	6	9			3		12	CAMP
6	7	11					11	CAMP
7	8	9					9	CAMP
8	9	11					11	CAMP
9	10	2					2	CAMP
10	10-A	2					2	CAMP
11	10-B	1					1	CAMP
12	10-C	10					10	CAMP
13	10-D	2					2	CAMP
14	10-E	4					4	CAMP
15	10-F	3					3	CAMP

16	12	3					3	CAMP
17	15	9		2	7		18	CAMP/YUC
18	16	2					2	CAMP
19	18	12					12	CAMP
20	19	3					3	CAMP
21	20	3					3	CAMP
22	22	3					3	CAMP
23	23	3					3	CAMP
24	24	3					3	CAMP
25	25	5		2			7	CAMP
26	31		1				1	CAMP
27	32		2				2	CAMP
28	33		3				3	CAMP
29	34		3				3	CAMP
30	35		5				5	CAMP
31	36		3				3	CAMP
32	37		5				5	CAMP
33	37-C		6				6	CAMP
34	38		5				5	CAMP
35	39		6				6	CAMP
36	41		1	1	1		3	CAMP
37	40		4				4	CAMP
38	40-A		3				3	CAMP
39	40-B		2				2	CAMP
40	40-C		2				2	CAMP
41	40-D		2				2	CAMP
42	41-A		3				3	CAMP

43	41-C		3				3	CAMP
44	42		7	4	3		14	CAMP
45	43		3	3	2		8	CAMP
46	44		3	2			5	CAMP
47	45		4	8			12	CAMP
48	23-B		3				3	CAMP
49	23-C		2				2	CAMP
50	46			6			6	CAMP
51	47			1			1	CAMP
52	48			1			1	CAMP
53	49			2			2	CAMP
54	50			9			9	CAMP
55	51			6			6	CAMP
56	52			5			5	CAMP
57	23-A			3	2		5	CAMP
58	23-D			2			2	CAMP
59	23-E			2			2	CAMP
60	23-F			7			7	CAMP
61	53				3		3	CAMP
62	49-A				3		3	CAMP
63	54				6		6	CAMP
64	55				2	2	6	CAMP

65	56				1		1	CAMP
66	15-A				2		2	CAMP
67	15-B				2		2	CAMP
68	15-C				2		2	CAMP
	23-A				2			CAMP
	42				3			CAMP
	15			2				CAMP
69	57					2	2	CAMP
70	60-TRI					12	12	CAMP
	55	2			2	2	6	CAMP/YUC
71	61					4	4	CAMP
72	15-E				1		1	CAMP
73	78				6		6	CAMP
74	63					4	2	CAMP
75	68					7	7	CAMP
76	66					2	2	CAMP
77	59					6	6	CAMP
78	79					4	4	CAMP/YUC
77	69	2					2	YUC
79	70	2		2			4	YUC
80	71	2	2	3			7	YUC
81	73	7			2		9	YUC

82	74	6		2			8	YUC
83	75	5					5	YUC
84	76		4				4	YUC
85	55	2	2			2	6	CAMP/YUC
86	72	2		2			4	YUC
	71		2					YUC
87	77		4				4	YUC
88	58	2	2	2			6	YUC
89	15			2			2	YUC
90	63			4			4	YUC
	72		2	2			4	YUC
	58	2	2	2				YUC
	70	2		2				YUC
	74	6		2				YUC
	78			3		3	6	YUC/CAMP
	15-C				3			YUC
	15			2				YUC
91	15-D				3			YUC
	59/59-A				3			YUC
	79				4			YUC/CAMP
	53				4			YUC
92	80-TRI					6		YUC
	73					2		YUC
93	82					8	8	YUC
94	83					2	2	YUC
95	82-A					1	1	YUC
96	90					6	6	YUC

97	90-A					5	5	YUC
98	92					4	4	YUC
99	95					3	3	YUC
100	80-LEV					5	5	YUC
101	81					4	4	YUC
Total de morfotipos =101		Total de aislamientos=474						

El **cuadro 3**, representa la lista de los 101 morfotipos y los 474 aislamientos identificados en ambos sitios de colecta. **YUC= Yucatán, CAMP=Campeche, HOJ=hojas, FLR=flores, FRI= fruto inmaduro, FRM= fruto maduro y RA=raíces. El 80-Lev=** morfotipo registrado como levadura, **60-TRI**, morfotipo registrado como posible *Trichoderma*, al igual que el **80-TRI**. Los espacios en blanco dentro del **cuadro 3**, indican que el morfotipo ya había sido identificado en otro órgano por eso se dejó ese espacio vacío.

El **cuadro 4**, corresponde a los morfotipos que se hallaron en ambos sitios de muestro, por órgano, n° de aislamientos y sitio de colecta. En Campeche y en Yucatán, pareciera que estos morfotipos son los más frecuentes en papaya, ya que se obtuvo en ambos sitios pero en el mismo órgano. Por ejemplo el morfotipo 15, fue muy abundante en hojas de Campeche y en frutos maduros de Yucatán.

**Cuadro 4.** Morfotipos identificados en ambos sitios de muestreo.

SITIO DE COLECTA	MORFOTIPO	ÓRGANO					N. DE AISLAMIENTOS
		HOJ	FRL	FRI	FRM	RA	
		AISLAMIENTOS					
CAMP	M-15	9			2		18
YUC	M-15				7		
CAMP	M-55				4	2	12
YUC	M-55	2			2	2	
CAMP	M-78				3		6

YUC	M78					3	
CAMP	M-79					4	
YUC	M-79				4		8

### 3.5 Morfotipos identificados en ambas sitios de colecta

En los (cuadros 5 y 6) se resumen, las características de los endófitos encontrados en Campeche y Yucatán clasificados por el tipo de órgano, el número de morfotipos y el número de endófitos identificados.

**Cuadro 5.** Morfotipos de endófitos identificados en Campeche (sin agroquímicos).

		CAMPECHE	
ÓRGANO	N° DE MORFOTIPOS	AISLAMIENTOS	
Hoja	25	140	
Flor	24	83	
Fruto inmaduro	12	44	
Fruto maduro	12	34	
Raíz	12	52	
<b>TOTAL</b>	<b>85</b>	<b>353</b>	

**Cuadro 6.** Morfotipos de endófitos identificados en Yucatán (uso de agroquímicos).

		YUCATÁN	
ÓRGANO	N° DE MORFOTIPOS	AISLAMIENTOS	
Hoja	6	29	
Flor	6	16	
Fruto Inmaduro	7	17	
Fruto maduro	5	17	
Raíz	10	42	
<b>TOTAL</b>	<b>34</b>	<b>121</b>	

---

### **3.6. Hongos endófitos en los diferentes órganos de papaya.**

Se registró una gran diversidad morfotipos en ambas poblaciones, algunos estuvieron ampliamente representados y otros fueron poco abundantes. Algunos presentaron características particulares como la producción de pigmentos o de olores característicos, otros resultaron ser inhibidores del crecimiento de otros hongos endófitos, también se identificaron 4 especies de levaduras y uno con crecimiento levaduriforme (**cuadro 7**).

#### **3.6.1 Hongos endófitos en hojas**

En hojas se encontraron 25 morfotipos en Candelaria Campeche y 6 en Yucatán. (**Cuadro 4**), con morfotipos de hoja en ambos sitios de colecta y número de aislamientos). La mayoría de los morfotipos de Campeche presentaron crecimiento rápido, y micelio algodonoso en tonalidades grisáceas y blancas. Los morfotipos más representados fueron el **M-15** y el **M-18**, con 16 y 12 aislamientos respectivamente. En hojas de la colecta de Candelaria se registraron 6 morfotipos, de tonalidades blancas-rosas y algodonosas, de anillos concéntricos, los más representados fueron el **M-71** y **M-73**, ambos con 7 aislamientos.

#### **3.6.2. Hongos endófitos en flores**

En flores de la colecta de Campeche, se obtuvieron 24 morfotipos y 6 en Yucatán. En Campeche los morfotipos fueron en su mayoría de micelio blanco algodonoso con elevaciones y conglomerados, unos de micelio apetalado, con producción de pigmentos y otros con micelio pardo negro con café claro. Los más representativos fueron los **M-42**, **M-43**, **M-45** y otros los **M-23-B** y **M-23-C**. En Yucatán se registraron 6 morfotipos en flores **M-76**, **M-55** y **M-77** de micelio algodonoso en tonalidades blancas-rosas y de anillos concéntricos.

---

### 3.6.3 Hongos endófitos en fruto inmaduro.

En fruto inmaduro de Campeche, se identificó 12 morfotipos y 7 en Yucatán. Los morfotipos fueron de crecimiento lento, en su mayoría, su morfología fue muy variada, en tonalidades rosa-blanca de tipo algodonoso, además de morfotipos productores de pigmentos. Los más representativos fueron el **M-50**, unos de los más abundantes con 9 aislamientos, los **M-23-A**, **M-23-E**, **M-23-D** y **M-23-F**, que presentaron morfología similar pero no igual, estos se identificaron por microcultivo y microscopia (**Sección: 3.7 Hongos mucorales**). Los de Yucatán representaron a morfotipos de lento crecimiento, fueron de morfología variada y se obtuvo los algunos morfotipos productores de pigmentos y de otros que ya habían identificado en hojas y flores de la misma colecta como el **M-55**, **M-78** y los **M-15-A**, **M-15-E**, **M-15-C**.

### 3.6.4. Hongos endófitos en fruto maduro.

En frutos maduros se obtuvieron 12 morfotipos en la colecta de Campeche y 5 en Yucatán. Los morfotipos de Campeche fueron el **M-53**, de los más abundantes y los **el morfotipos M-15-C**, **15-B**, **M-15-E**, productores de pigmento rojo. En ambos sitios de muestreo, en fruto maduro fue donde menos número de morfotipos se identificó. En Yucatán se identificaron morfotipos, productores de pigmentos y de otros identificados en hojas y flores de la misma colecta como el **M-55**, **M-78** y los **M-15-A**, **M-15-E**, **M-15-C**.

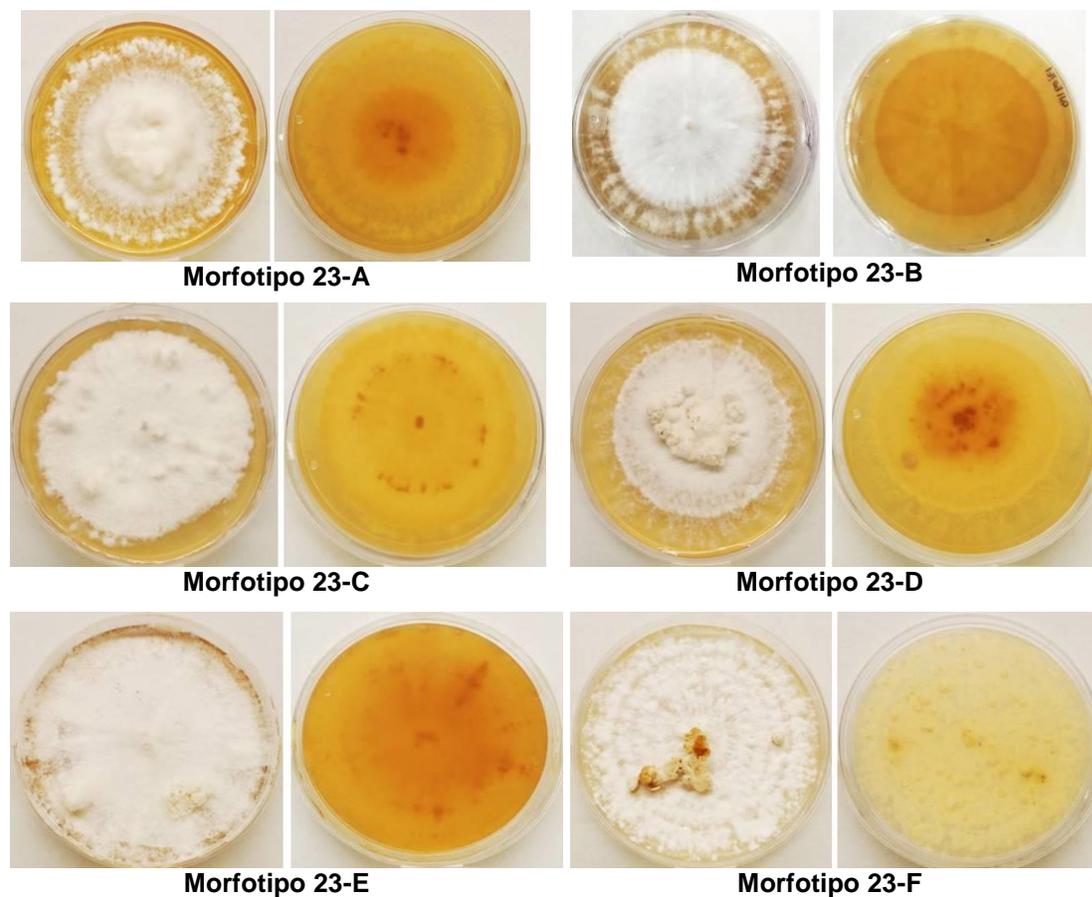
### 3.6.5. Hongos endófitos en raíces.

En raíces de la colecta de Campeche se obtuvieron 12 morfotipos y 10 en Yucatán. Los más representativos fueron el **M-60-TRI**, con 12 aislamientos resultaron ser más abundantes, el **M-68** y el **M-79**, que son levaduras endófitas que ejercían efectos inhibitorios de otros hongos endófitos. En las raíces de la colecta de Yucatán se registró el **M-80-TRI** y **M-90**, ambos morfotipos más abundantes con 6 aislamientos. El **M-60-TRI** y el **M-80-TRI**, presentaron características macroscópicas similares a especies de *Trichoderma*. En de ambas poblaciones se identificaron levaduras asociadas a las raíces de papaya.

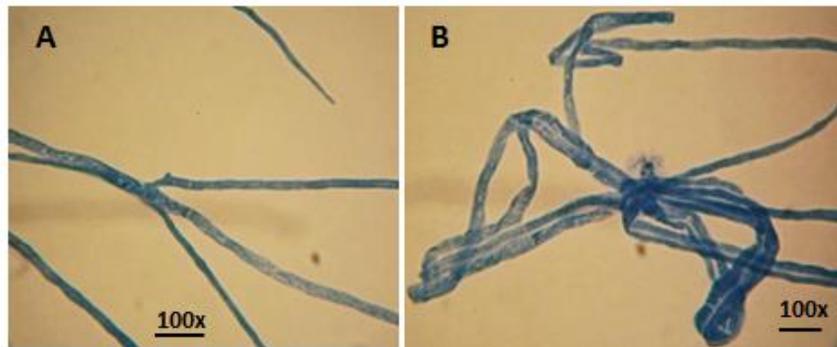
---

### 3.6 Identificación de hongos mucorales

Se identificaron hongos mucorales (Cruz-Lachica *et al.*, 2017; Cruz-Lachica *et al.*, 2018). Respecto a la morfología microscópica, estos hongos, desarrollan esporangióforos (hifas), estructuras que se conectan con uno o más esporangióforos, se componen de la columela y las esporangiosporas, que se encuentran contenidas en sacos o en las estructuras globosas, también las hay sin saco (Hartanti *et al.*, 2015). En la colecta de Campeche, se identificaron seis morfotipos con características microscópicas y macroscópicas de hongos mucorales. Los morfotipos fueron nombrados como **M-23 (A-F)**, figura (14). La mayoría fueron de crecimiento rápido 1.2 cm a 1.5 cm por día, micelio blanco y algodonoso, algunos presentaron elevación del micelio. En las micrografías se describe el resultado de los microcultivos de dos y cinco días, teñidos con azul de lactofenol.

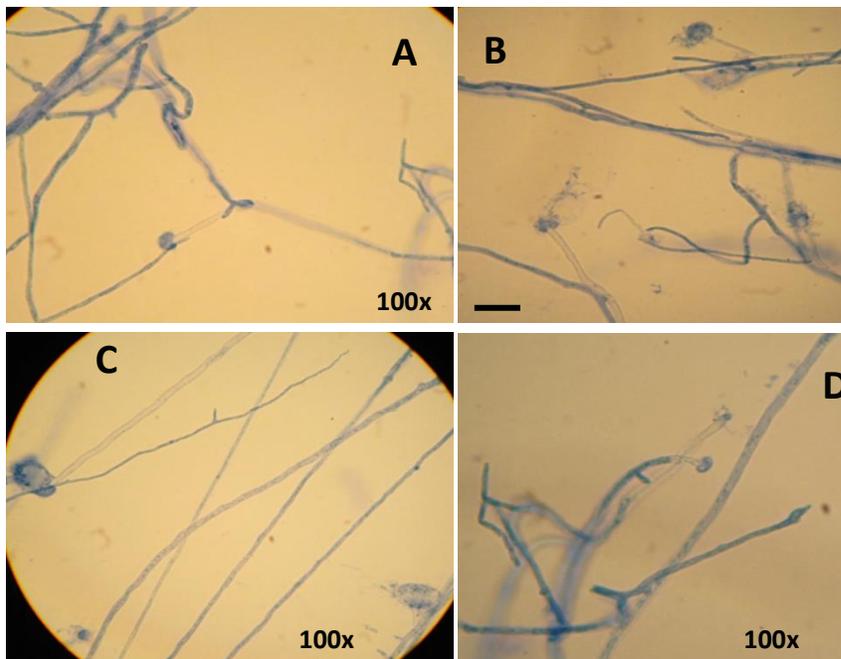


**Figura 14.** Características macroscópicas de hongos mucorales.



**Figura 15.** Micrografías del morfotipo M-23-A, microcultivo de dos días de inoculación. Tinción con azul de lactofenol.

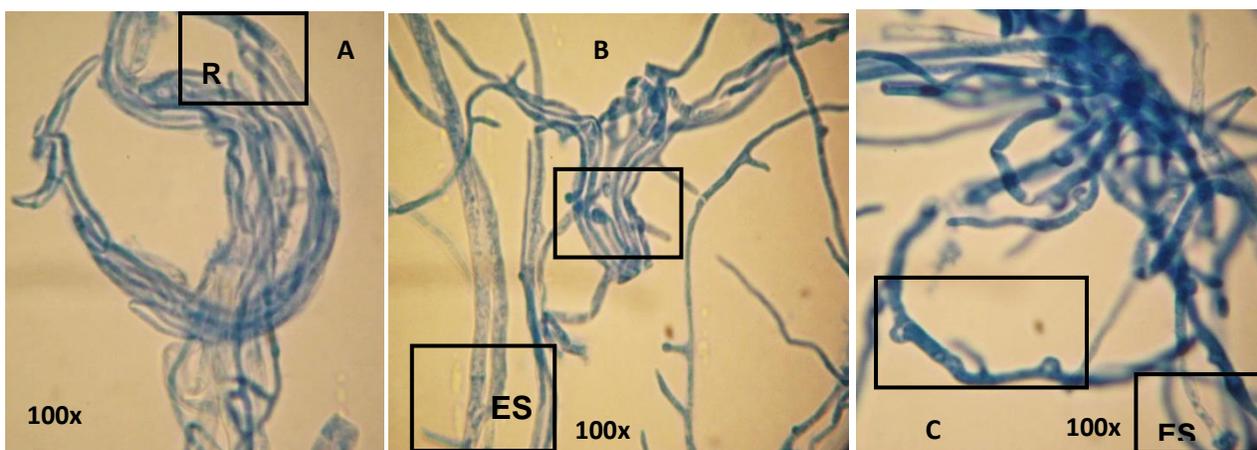
En las micrografías morfotipo **M-23-A**, presentó micelios alargados y de hifas entrecruzadas (estructuras en forma de lazo). Se logró identificar un esporangio liberando esporangióforas. A los cinco días se pudieron visualizar las estructuras globosas, grandes y reventadas, también se observó la formación de rizoides (hifas en grupos e hinchadas), sus esporangióforos fueron largos e hinchados y de ellos emergieron los esporangios globosos. **Figura 15 (A, B, C y D).**



**Figura 16.** Microcultivo del morfotipo 23-A. Micrografías de 5 días, tinción con azul de lactofenol, se visualizaron a 100X.

---

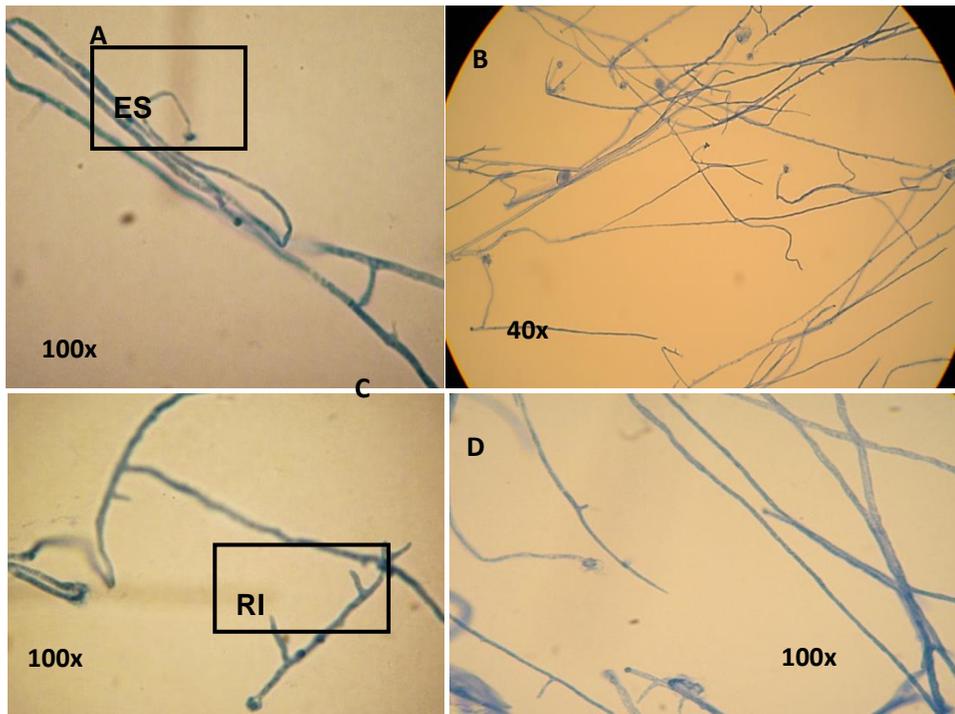
El morfotipo **M-23-B**, mostro características microscópicas, como la unión de hasta ocho hifas unidas, que emergían de un estolón hinchado (**figuras 16-A**). Se aprecia la forma circular y la estructura de las hifas. Se vio el desarrollo de esporangios globosos y pequeños (**figura 16-B**), se observó la formación de estolones hinchados, desarrollo de esporangióforos cortos y de un esporangio globoso pequeño, en el (**16-C**).se identifican estructuras redondas que emergen de las hifas, pudiendo ser la formación temprana de los esporangios globosos, en la misma figura, se observa un esporangióforo y su esporangio globoso y grande.



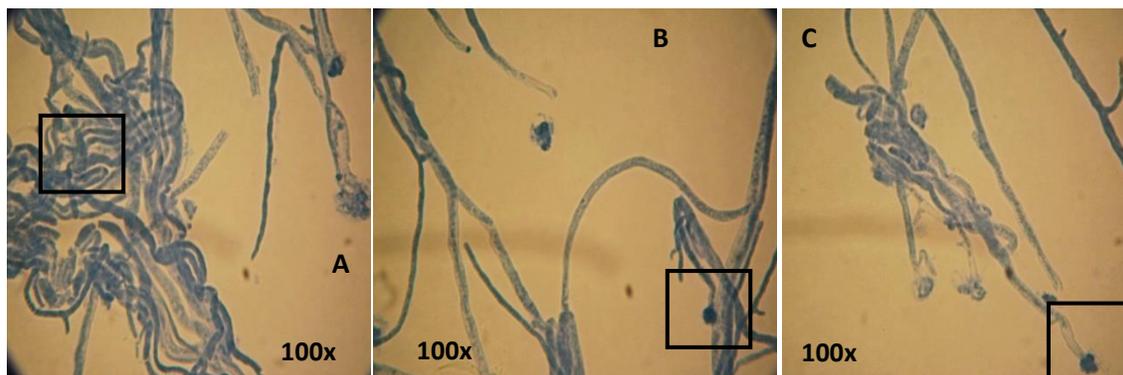
**Figura 17.** Microcultivo del morfotipo 23-B. micrografías de 2 días de inoculación. Tinción con azul de lactofenol). R=rizoide, E=estolón, ES = esporangio. Visualizados a 100x.

El morfotipo **M-23-C**, también desarrollo estructuras de hongos mucorales. En la **figura (18-A)** se visualizó la formación de un esporangióforo largo con un esporangio globoso. A los cinco días de la fijación, se pudo visualizar en diferentes planos de la muestra la formación de esporangios de forma asincrónica, unos pequeños y grandes, pero con esporangióforos hinchados (**18-B, 18-D**), algunos forman rizoide figura (**18-C**).

El morfotipo **M-23-D** desarrolló estructura de micelio parecido al **M-23-B**, la diferencia fueron las hifas que se entrecruzaban (**figura 19-A**), los esporangióforos fueron más gruesos, largos y el colarete que se une a la columela se encontraba inclinado, la columela era más pequeña y redonda (**figura 19-B**), también se observó esporangiosporas libres pero unidas a los esporangióforos (**figura 19-C**).



**Figura 18.** Microcultivo del morfotipo 23-C, micrografías de 2 días de inoculación. Tinción con azul de lactofenol). R= rizoide, E=estolón, ES = esporangio. B) se visualizó a 40X. A, C, D, se visualizaron a 100X.

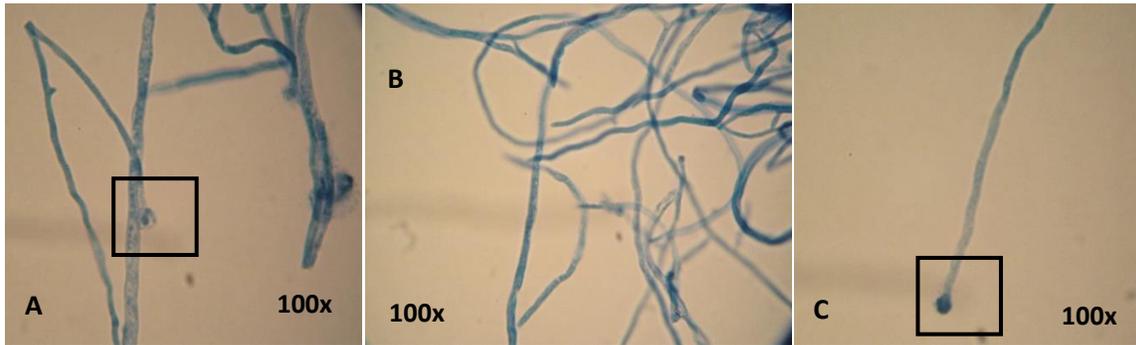


**Figura 19.** Microcultivo del morfotipo M-23-D. Micrografías de 2 días de inoculación. Tinción con azul de lactofenol). E=estolón, ES = esporangio, CO= columela. Se visualizó a 100X.

En las micrografías del **M-23-E (figura 20)**, se observó el desarrollo de esporangios globosos de menor tamaño. No se logró ver muchos, pero pudo deberse a las condiciones de incubación del microcultivo, no fue adecuado para el desarrollo de los esporangios,

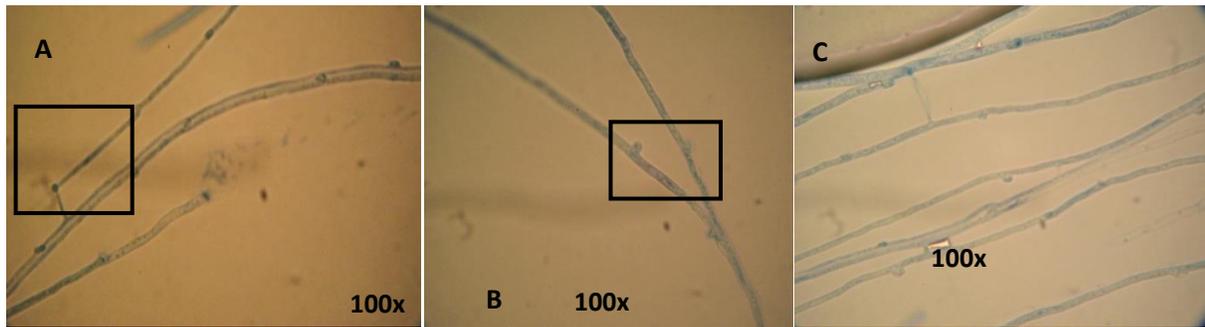
---

debido a que este morfotipo es de rápido crecimiento. Y debió evaluarse al tercer y cuarto día. **(20-A, B, C)**. La estructura microscópica fue similar a los demás morfotipos evaluados, es decir, se vio agrupamiento de hifas, de esporangióforos largos y al final se veían los esporangios globosos pero muy pequeños.



**Figura 20.** Microcultivo del morfotipo 23-E. micrografías de 2 días de inoculación. Tinción con azul de lactofenol). E=estolón, ES = esporangio. Se visualizó a 100X.

Respecto al morfotipo **M-23-F**, se vio, una distribución de las hifas muy diferentes a los demás morfotipos analizados. En las micrografías se mostró la formación de estructuras redondas que se distribuyen a lo largo de las hifas que a su vez están de forma paralela y no se cruzan entre ellas, en la **figura (21-B)**, se muestran las estructuras redondas, que posiblemente sean los esporangios en etapas tempranas. En la **figura (21-A)**, se vio un esporangio globoso pequeño y corto. Este morfotipo pudiera no pertenecer a los hongos mucorales, aunque la literatura menciona que hay especies de hongos mucorales que no desarrollan esporangiosporas y esporangios (Hartanti *et al.*, 2015).

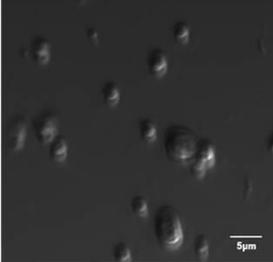
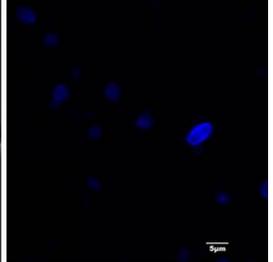
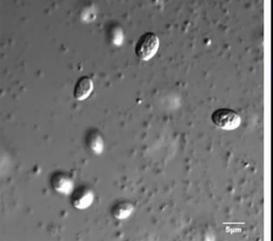
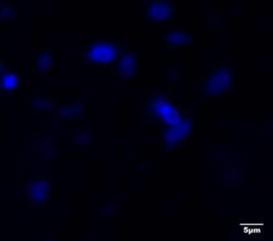
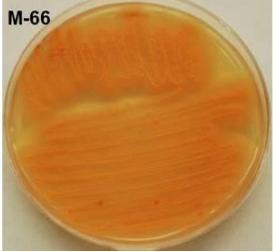
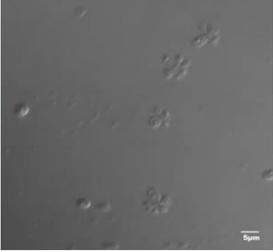
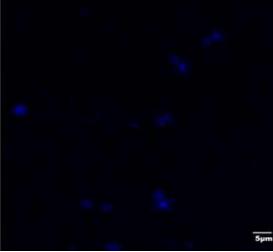
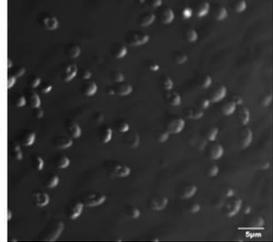
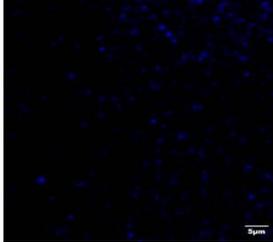
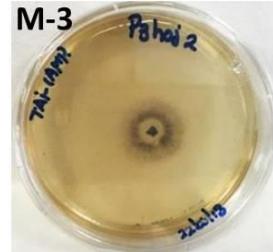
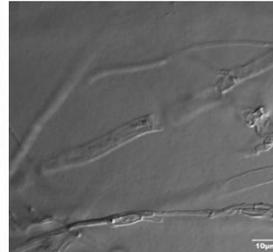
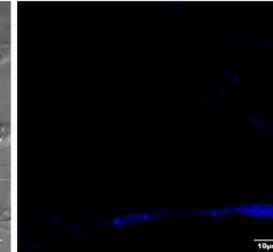


**Figura 21.** Microcultivo del morfotipo 23-F. micrografías de 2 días de inoculación. Tinción con azul de lactofenol). ES = esporangióforos. Se visualizó a 100X.

### 3.7. Identificación de levaduras endófitas y hongos levaduriformes

Se seleccionaron cinco morfotipos **M-68**, **M-66**, **M-79**, **M-80-LEV**, **M-3**. Que fueron visualizados mediante microscopia confocal y teñidos con blanco de calcoflúor al 2%. El **(cuadro 7)**, muestra las características microscópicas de las levaduras, tanto en campo claro como en campo fluorescente, se evaluaron cinco morfotipos de hongos de los cuales 4 mostraron características microscópicas como estructuras circulares y oblongas y de tamaño entre cinco y siete micras, el **M-3** mostró desarrollo de hifas pero su crecimiento en placa es similar al de una levadura, es considerado de crecimiento levaduriforme.

**Cuadro 7.** Morfotipos identificados como levaduras y de aspecto levaduriforme.

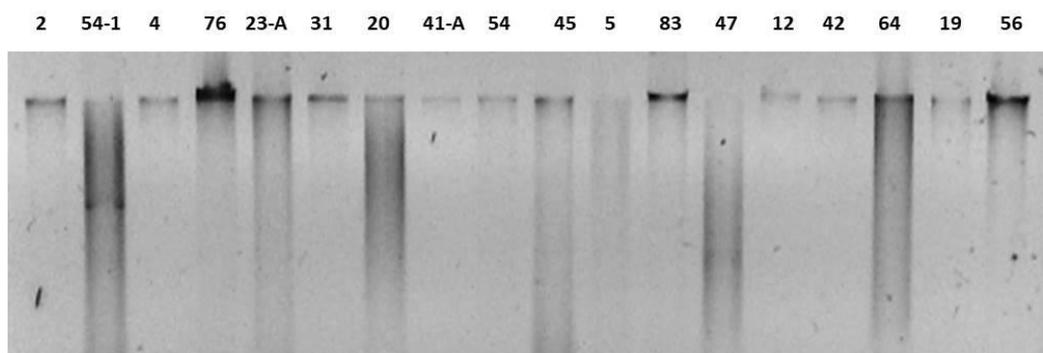
MORFOTIPO	CAMPO CLARO	CAMPO FLUORESCENTE	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
 <p>M-68</p>			<p>El <b>M-68</b>, con características macroscópicas blanco marfil con aspecto mate y cremoso. Campo claro: estructuras redondas y oblongas. Así como en campo fluorescente. Se tiñen perfectamente las de 5 micras.</p>
 <p>M-79</p>			<p>El <b>M-79</b>: colonia, de color beige y de aspecto brillante, su crecimiento es de 3 horas después de la inoculación. En las micrografías campo claro: estructuras de forma oval, de dos tipos, grande ovals y pequeñas y redondas. De 2 micras y 7 micras. las de 5 micras emiten fluorescencia.</p>
 <p>M-66</p>			<p>El <b>M-66</b>: colonia compacta de coloración salmón claro, aspecto mate y seco. En Campo claro, mostró la forma de conglomerados de 5 o 6 estructuras redondas, en forma de flor. En Campo fluorescente sólo las estructuras de mayor tamaño se visualizaron.</p>
 <p>80-LEV</p>			<p>En <b>M-80-LEV</b>, un morfotipo muy similar al <b>M-68</b>, de tonalidad blanco marfil, de aspecto mate. Las micrografías mostraron estructuras ovals, tanto en campo claro, y en campo fluorescente, se vio la tinción de todas las estructuras.</p>
 <p>M-3</p>			<p>El <b>M-3</b>, se aisló en órganos de hoja y no mostro crecimiento levaduriforme oval o redonda. En las micrografías se observan hifas y en campo fluorescente se visualizó la tinción de los septos. Y de algunas estructuras redondas dentro de los septos.</p>

---

### 3.8. Caracterización molecular de hongos endófitos

Se realizó extracción de ADN genómico de cada morfotipo diferente, y fue directo de cultivo en placa, y se visualizaron en geles de agarosa. En la (figura 22), se muestran algunos ejemplos del resultado de la extracción. Las letras **M**, se refieren al número asignado a cada morfotipo. Por ejemplo **M-76**, es el morfotipo 76.

No todos los morfotipos se lograron extraer mediante el uso del (Kit Qiagen Dneasy), en el gel se visualizan que el **M-5** y el **M-19**, no se logró una buena extracción del ADN genómico de estos. En algunos casos se ve poca cantidad de ADN, **M-54-1**, **M-41-A**, **M-54**, **M-45** y el **M-12**. Los **M-76**, **M-83**, **M-56**, son ejemplos de ADN limpio e íntegro.



**Figura 22.** Ejemplo de ADN genómico de hongos endófitos de papaya (Kit Qiagen DNeasy). Carril 1: M-2, 2: M-54-1, 3: M-4, 4: M-76, 5: M-23-A, 6: M-31, 7: M-20, 8: M-41-A, 9: M-54, 10: M-45, 11: M-5, 12: M-83, 13: M-47, 14: M-12, 15: M-42, 16: M-64, 17: M-19, 18: M-56. Gel de agarosa al 0.8%, EtBr. 2.25  $\mu$ L, amortiguador de carga 6X + 10 $\mu$ L de muestra. Se desarrolló a 90V durante 40 min.

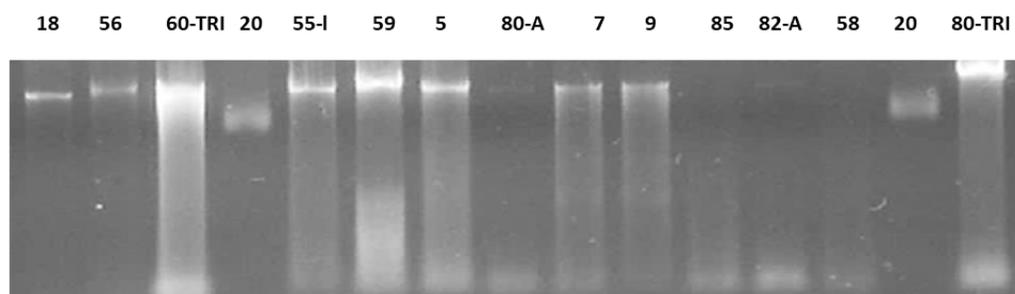
Se realizó un total 89 extracciones de ADN mediante el Kit (Qiagen Dneasy), pero no fue eficiente para todas las muestras de hongos endófitos, por ejemplo los morfotipos **M-47**, **M-5**, y el **M-19**, **M-7**, **M-9** se extrajeron con otro protocolo de extracción de ADN (Tapia-Tussell *et al.*, 2006).

#### 3.8.1 Extracción de ADN de hongos endófitos método SDS

Se probó otro protocolo que utiliza SDS al 0.3% (Tapia-Tussell *et al.*, 2006). Se realizó con más cantidad de micelio 300 mg y con otras condiciones como esta descrito en materiales y métodos. En la figura 23 se muestra el ADN de los hongos endófitos, en algunos casos con exceso de carbohidratos como: **M-60-TRI**, **M-59**, **M-80-TRI** pero con

---

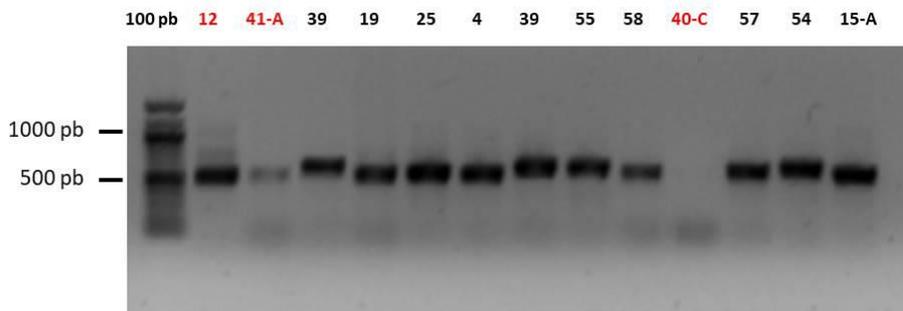
ADN de buena calidad. Una de las particularidades de usando este protocolo es tener micelio fresco de 5 a 8 días del cultivo en placa. Por ejemplo los **M-85**, **M-58** son hongos que tardaron en crecer y esto pudo ser la razón de que no se logre la extracción del ADN. Pero este método fue más eficiente que el kit de extracción. En total se extrajeron con este método 38 muestras de hongos endófitos que no se logró usando kit de extracción de ADN (kit Qiagen Dneasy) y faltaron por extraer 19 morfotipos.



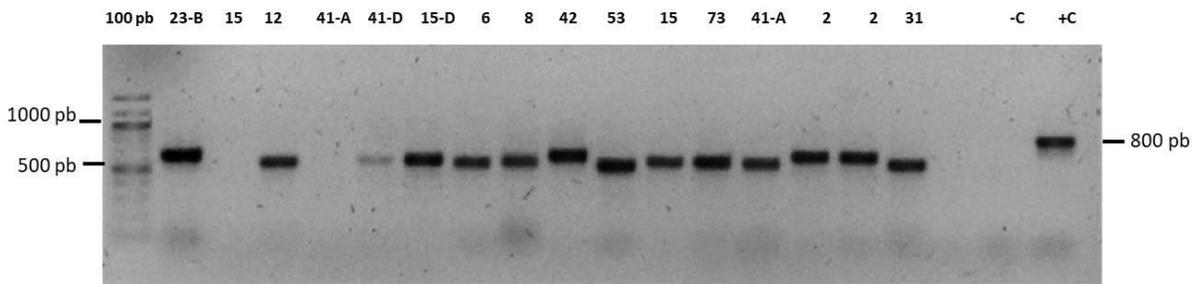
**Figura 23.** Ejemplo de ADN genómico de hongos endófitos de papaya obtenidos con el método de SDS. Carril 1: M-18, 2: M-55, 3: M-60-TRI, 4: M-20, 5: M-55-I, 6: M-59, 7: M-5, 8: M-7, 9: M-9, 10: M-85, 11: M-82-A, 12: M-58, 13: M-20, 15: M-80-TRI.

### 3.8.2. Amplificación por PCR de ADN de hongos endófitos

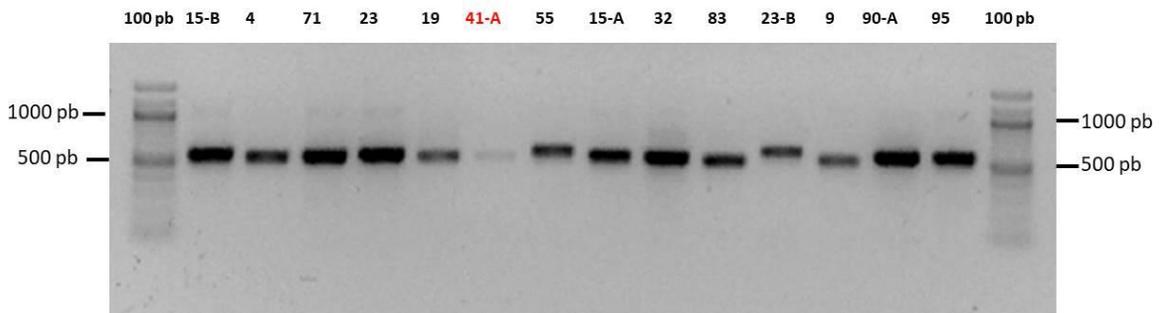
Para la identificación molecular de los diferentes morfotipos de hongos endófitos se utilizó los cebadores ITS1 e TS4. En la **(figura 24)** observan los amplicones obtenidos de 13 hongos endófitos, los fragmentos variaron de tamaño de entre 480 a 800pb (bandas únicas). Los productos de PCR con bandas tenues por ejemplo el **M-41-A** y **M-40-C**, fueron repetidos con una mayor cantidad de templado 120 µg y con 40 ciclos **(Figura 25)**. En total se logró amplificar las regiones ITS de 78 morfotipos de hongos endófitos. Posteriormente los amplicones fueron purificados y cuantificados para ser secuenciados usando el cebador ITS1. En la **figura 26** se muestran 17 amplicones purificados.



**Figura 24.** Gel de agarosa de productos de PCR con 35 ciclos y 60ng de templado. Carril 1: M-12, 2: M-41-A, 3: M-39, 4: M-19, 5: M-25, 6: M-4, 7: 39, 8: M-55, 9: M-58, 10: M-40-C, 11: M-57, 12: M-54, 13: M-15-A.



**Figura 25.** Gel de agarosa de productos de PCR con 40 ciclos y 120 µg de templado. Carril 1: M-18, 2: M-23-b, 3: M-15, 4: M-12, 5: M-41-A, 6: M-41-D, 7: M-6, 8: M-8, 9: M-42, 10: M-53, 11: M-15, 12: M-41-A, 13: M-73, 14: M-41-A 15: M-2, 16: M-2, 17: M-31: 19: -C, 20: +C: *S. cerevisiae*.



**Figura 26.** Productos de PCR purificados. Carril 1: MPM, 2: M-15-B, 3: M-4, 4: M-71, 5: M-23, 6: M-19, 7: M-41-A, 8: M-55, 9: 15-A, 10: M-32, 11: M-83, 12: M-23-B, 13: M-9, 14: M-90-A, 15: MPM: marcador de 100 pb de NEBs.

---

---

### 3.8.3 Análisis de las secuencias de los hongos endófitos

Las secuencias se depuraron usando el programa Sequencher y posteriormente se realizó un análisis BLASTn, tanto en la base de datos general de hongos (FGDB) del NCBI, como en la de ITS. De los 101 morfotipos identificados en este trabajo se secuenciaron 81, de los cuales se obtuvieron 64 secuencias de buena calidad, que a su vez representaron 44 especies distintas y se agruparon en 24 géneros: *Fusarium*, *Talaromyces*, *Colletotrichum*, *Phyllosticta*, *Meyerozyma*, *Alternaria*, *Stagonosporopsis*, *Phomopsis*, *Diaporthe*, *Schizophyllum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Sporidiobolus*, *Nigrospora*, *Trichoderma*, *Papiliotrema*, *Macrophomina*, *Leptosphaeria*, *Psilocybe*, *Corynespora* y *Moesziomyces*.

En los **(cuadros 7 y 8)**, se muestran las especies con el porcentaje de identidad, longitud de banda, los morfotipos y la base de datos donde se comparó.

La especie *Corynespora torulosa* estuvo representada en más de un morfotipo, es común encontrar hongos de una misma especie y que presenten características morfológicas distintas. Dos morfotipos de levaduras **80-LEV** Y **68-LEV** pertenecen a la especie *Candida raliensis* **(cuadro 7)**, mientras las secuencias de los morfotipos **23-F**, **23-A**, **23-B** y **M-43** se alienaron con mayor identidad con la secuencia del hongo no cultivado 1 (número de accesión 175245). Los morfotipos **M-40** y **M-36** corresponden a *Diaporthe yunnanensis* **(cuadro 8)**, el **M-83** y **M-45** *Stagonosporopsis lupini*, los **M-2** y **M-82** a *Phyllosticta fallopiae*. Los morfotipos **M-15-A** y **M-15-B**, comparten características morfológicas similares, la **15-B** produce pigmento rojos y la **M-15-A** no produce pigmento. Pero ambas pertenecen al *Talaromyces amestolkiae*, igualmente los morfotipos **M-23-C** y **M-23-D**, presentaron secuencias idénticas a *Schizophyllum commune*. Los morfotipos **M-9** y **M-4** presentaron un 96% de identidad a *Corynespora torulosa*, debido a que ambas secuencias son idénticas entre si pertenece a la misma especie, sin embargo, dada la baja identidad es posible que se trate de una especie distinta (Raja *et al.*, 2017). Del mismo modo, los morfotipos **M-36** y **M-40**, presentaron un porcentaje de identidad del 95% con la secuencia ITS a la especie *Diaporthe yunnanensis*, ambos morfotipos pertenecen a la misma especie, aunque posiblemente sea una especie distinta. Para los casos en que no se puede resolver la identidad de la especie usando a los ITS, se puede secuenciar usando otros genes (Schoch *et al.*, 2012).

**Cuadro 8.** Morfotipos identificados como levaduras y de aspecto levaduriforme.

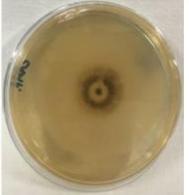
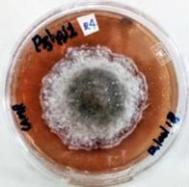
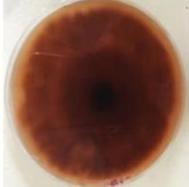
<b>Base de datos general para hongos (NCBI)</b>			
<b>Nombre científico</b>	<b>porcentaje de identidad</b>	<b>longitud de alineamiento</b>	<b>Morfotipos</b>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99.398	498	<b>M-10-F</b>
[ <i>Candida railenensis</i>	99.324	592	<b>M-80-LEV,M-68-LEV</b>
<i>Corynespora cassiicola</i>	99.244	529	<b>M-6</b>
<i>Colletotrichum sichuanense</i>	99.083	545	<b>M-25</b>
<i>Corynespora cassiicola</i>	99.244	529	<b>M-6</b>
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	99.035	518	<b>M-50</b>
<i>Schizophyllum commune</i>	99.002	601	<b>M-23-C, 23-D</b>
<i>Fusarium incarnatum</i>	99.027	514	<b>M-53</b>
<i>Talaromyces purpureogenus</i>	99.091	550	<b>M-15-C</b>
<i>Phomopsis</i> sp.	99.071	538	<b>M-37-C</b>
<i>Leptosphaeria</i> sp.	99.637	551	<b>M-23</b>
<i>Nigrospora</i> sp.	99.415	513	<b>M-18</b>
<i>Moesziomyces</i> sp.	99.592	736	<b>M-42</b>
<i>Penicillium</i> sp.	98.909	550	<b>M-15-D</b>
<i>Colletotrichum</i> sp.	98.134	536	<b>M-40-C</b>
<i>Penicillium</i> sp.	98.692	535	<b>M-15</b>
<i>Phomopsis</i> sp.	98.874	533	<b>M-41-A</b>
<i>Fusarium solani</i>	98.521	541	<b>M-19</b>
<i>Alternaria</i> sp.	98.459	519	<b>M-31</b>
<i>Trichoderma</i> sp.	98.464	586	<b>M-60-TRI</b>
<i>Colletotrichum</i> sp.	97.967	541	<b>M-16</b>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	97.124	591	<b>M-10-C</b>
uncultured fungus 2	95.267	824	<b>M-39</b>
<i>Cladosporium uredinicola</i>	95.591	567	<b>M-59-A</b>
<i>Schizophyllum</i> sp	94.534	622	<b>M-54</b>
uncultured fungus 2	92.604	649	<b>M-32</b>

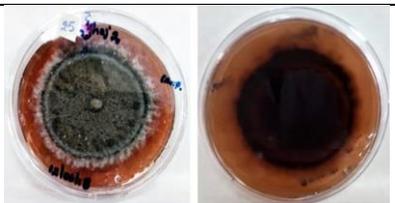
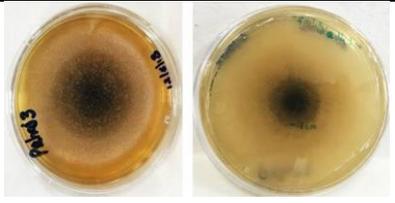
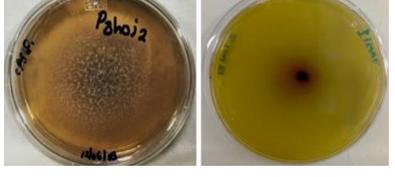
uncultured fungus 1	92.508	307	M-23-F,23-A, 23-B, M-43
---------------------	--------	-----	----------------------------

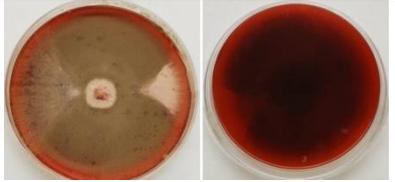
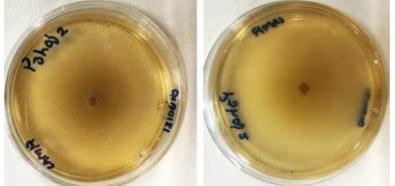
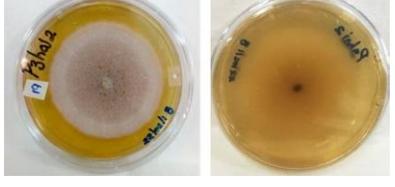
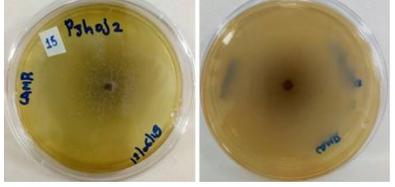
**Cuadro 9.** Lista de especies identificadas, base de datos de ITS para hongos de NCBI.

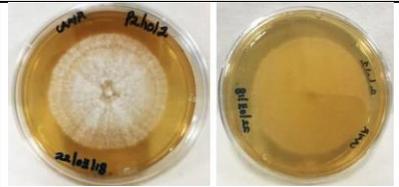
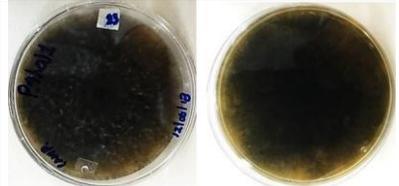
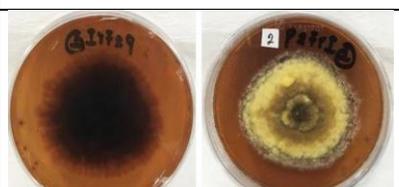
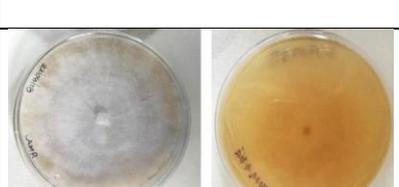
<b>Base de datos para hongos del NCBI ITS</b>			
<b>nombre científico</b>	<b>porcentaje de identidad</b>	<b>longitud de alineamiento</b>	<b>Morfotipos</b>
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	99.048	525	<b>M-73</b>
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	99.24	526	<b>M-71</b>
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	99.238	525	<b>M-33</b>
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	99.046	524	<b>M-35</b>
<i>Aspergillus neoglaber</i>	99.088	548	<b>M-76</b>
<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	99.445	541	<b>M-24</b>
<i>Aspergillus foetidus</i>	99.456	551	<b>M-57</b>
<i>Sporidiobolus</i> sp. DT2	99.093	551	<b>M-90-A</b>
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99.457	552	<b>M-95</b>
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	98.919	555	<b>M-3</b>
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	98.901	546	<b>M-15-A, M-15-B</b>
<i>Papiliotrema terrestris</i>	98.361	488	<b>M-79</b>
<i>fungal endophyte Phyllosticta fallopiae</i>	98.697	614	<b>M-2</b>
<i>Fusarium falciforme</i>	98.606	502	<b>M-20</b>
<i>Stagonosporopsis lupini</i>	98.384	495	<b>M-83, M-45</b>
<i>Phyllosticta fallopiae</i>	98.689	610	<b>M-2, M-82</b>
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	98.401	563	<b>M-90</b>
<i>Penicillium coffeae</i>	97.417	542	<b>M-58</b>
<i>Corynespora torulosa</i>	96.117	515	<b>M-9,M-4</b>
<i>Diaporthe yunnanensis</i>	95.669	531	<b>M-36,M-40</b>
<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	91.696	566	<b>M-78</b>
<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	91.71	579	<b>M-55</b>
<i>Colletotrichum eremochloae</i>	75.676	74	<b>M-8</b>

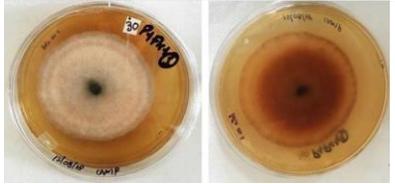
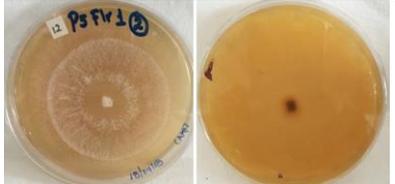
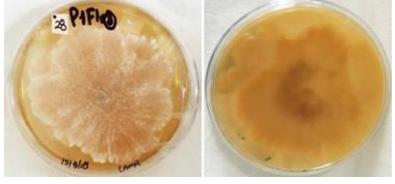
**Cuadro 10.** Especies de hongos endófitos identificados en ambas poblaciones.

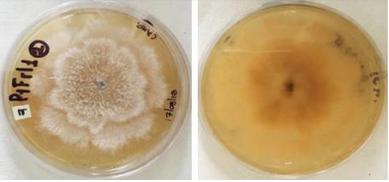
MORFOTIPO		CARACTERÍSTICAS	ÓRGANO	ESPECIE	SITIO DE COLECTA
ANVERSO	REVERSO				
		<b>M-2:</b> Micelio negro plano, granulado, con anillos concéntricos en la parte reversa. Crecimiento lento 1 cm cada 2 días.	HOJ	<i>Phyllosticta fallopieae</i>	CAMP
		<b>M-3:</b> Micelio blanco-crema transparente brillante, con anillo en centro de color negro. Crecimiento rápido 1 cm por día.	HOJ	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CAMP
		<b>M-4:</b> Micelio blanco-crema transparente brillante, con anillo en centro de color negro. Crecimiento rápido 1 cm por día.	HOJ	<i>Corynespora torulosa</i>	CAMP
		<b>M-6:</b> Micelio grisáceo, con borde blanco, elevado y algodonoso, con producción de pigmento en el medio (color marrón oscuro). Crecimiento rápido 1.2 por día.	HOJ	<i>Corynespora cassiicola</i>	CAMP

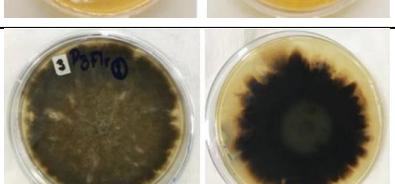
	<p><b>M-8:</b> Micelio gris con blanco, algodonoso, anillo concéntrico en el borde de color gris. Crecimiento rápido 2.3 cm por día.</p>	<p>HOJ</p>	<p><i>Colletotrichum eremochloae</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-9:</b> Micelio gris, algodonoso, anillo concéntrico en el borde de color gris. Crecimiento rápido 2.5 cm. Produce pigmento en el medio de color marrón oscuro.</p>	<p>HOJ</p>	<p><i>Corynespora torulosa</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-10-C:</b> Micelio gris oscuro en centro, con borde blanco, algodonoso. Crecimiento rápido 1.4 por día.</p>	<p>HOJ</p>	<p><i>Colletotrichum gloeosporioides</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-10-F:</b> Micelio blanco, algodonoso, con elevación umbilicada en el centro, crecimiento rápido 2 cm por día. Genera exudado viscoso de color marrón.</p>	<p>HOJ</p>	<p><i>Cladosporium cladosporioides</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-12:</b> Micelio blanco-crema, algodonoso, de borde entero y plano, crecimiento rápido 2.5 cm por día.</p>	<p>HOJ</p>	<p><i>Corynespora cassiicola</i></p>	<p>CAMP</p>

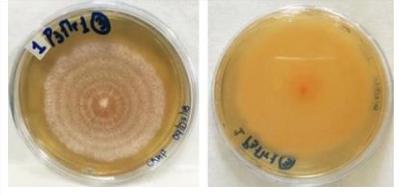
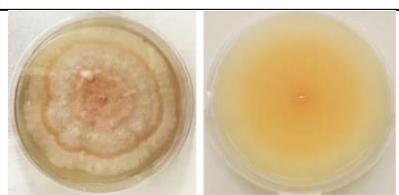
	<p><b>M-15:</b> Micelio de color verde olivo, polvoroso. Reverso: generó pigmento de color rojo en el medio. Es un hongo inhibidor de otros endófitos como el M-54. Crecimiento lento 1 cm cada 4 días.</p>	<p>HOJ FRM</p>	<p><i>Penicillium sp.</i></p>	<p>CAMP/ YUC</p>
	<p><b>M-16:</b> Micelio amarillo brillante, de borde plano. Crecimiento rápido 1.2 cm cada 2 días.</p>	<p>HOJ</p>	<p><i>Colletotrichum sp.</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-18:</b> Micelio blanco, de tipo puntiforme, con anillos concéntricos, crecimiento rápido 1.5 cm por día. Reverso: micelio blanco de filamentoso.</p>	<p>HOJ</p>	<p><i>Nigrospora sp.</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-19:</b> Micelio blanco filamentoso, plano con anillos concéntricos, borde blanco. Anverso: blanco crema, con anillos concéntricos. Crecimiento rápido 1.2 cm por día.</p>	<p>HOJ</p>	<p><i>Fusarium solani</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-20:</b> Micelio blanco-crema, filamentoso y circular, con anillos concéntricos, borde color blanco. Crecimiento rápido 1.5 cm por día.</p>	<p>HOJ</p>	<p><i>Fusarium falciforme</i></p>	<p>CAMP</p>

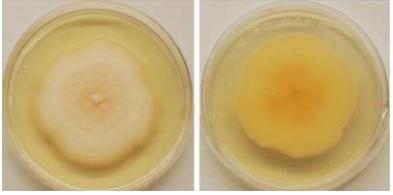
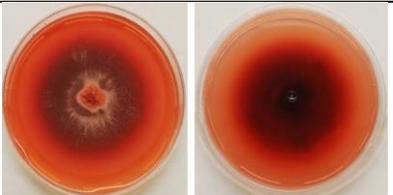
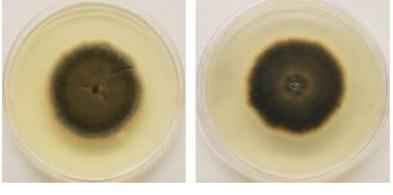
	<p><b>M-23:</b> Micelio blanco algodónoso, forma de la colonia es ramificada y presenta elevación de tipo umbilicada, crecimiento 1.7 cm por día.</p>	<p>HOJ</p>	<p><i>Leptosphaeria sp.</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-24:</b> Micelio color negro algodónoso de tipo filamentososo, con borde de tipo entero, presenta elevación en la caja de manera uniforme, crecimiento rápido de 1.7 cm por día</p>	<p>HOJ</p>	<p><i>Macrophomina pseudophaseolina</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-25:</b> Micelio color mostaza con elevación irregular en el centro, forma de colonia ondulado con borde blanco, es algodónoso. Generó pigmento marrón en el medio. Reverso crecimiento de micelio lobulado. Crecimiento 1 cm por día.</p>	<p>HOJ FRI</p>	<p><i>Colletotrichum sichuanense</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-31:</b> Micelio color beige-blanco, de forma de colonia entero, de borde plano su crecimiento rápido 1.3 cm por día.</p>	<p>FRL</p>	<p><i>Alternaria sp.</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-32:</b> Micelio gris claro con anillos concéntricos irregulares reverso negro. Crecimiento rápido 1.3 cm por día.</p>	<p>FLR</p>	<p><i>uncultured fungus 2</i></p>	<p>CAMP</p>

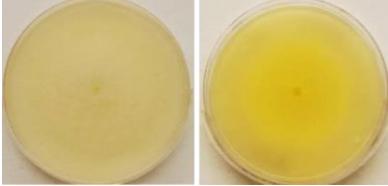
	<p><b>M-33:</b> Micelio color rosa, con centro gris claro, de tipo algodonoso, desarrollo de anillos concéntricos, su crecimiento fue rápido 1.1 cm por día</p>	FRL	<p><i>Alternaria alstroemeriae</i></p>	CAMP
	<p><b>M-35:</b> Micelio blanco de crecimiento filamentosos, forma anillos concéntricos irregulares. Crecimiento rápido 1.7 cm por día.</p>	FRL	<p><i>Alternaria sp.</i></p>	CAMP
	<p><b>M-36:</b> Micelio blanco-beige, forma de colonia es de tipo rizoide, con borde ondulado es algodonoso. Su Crecimiento 1.2 cm por día.</p>	FRL	<p><i>Diaporthe yunnanensis</i></p>	CAMP
	<p><b>37-C:</b> Micelio color mostaza de forma de colonia de tipo rizoide, con borde ramificado es algodonoso y forma dos anillos concéntricos. Crecimiento rápido 1.2 cm por día. Despide olor a papaya fermentada.</p>	FRL	<p><i>Phomopsis sp.</i></p>	CAMP
	<p><b>M-39:</b> Micelio blanco, apetalado, forma de colonia rizoide. Presento elevación plana, crecimiento 1.3 cm por día. Despide olor a papaya fermentada.</p>	FRL	<p>uncultured fungus 1</p>	CAMP

	<b>M-40:</b> Micelio blanco-crema, apetalado, de crecimiento filamentoso no produce pigmento en el medio. Crecimiento 1.3 cm por día. Despide olor a papaya fermentada.	<b>FRL</b>	<i>Diaporthe yunnanensis</i>	<b>CAMP</b>
	<b>M-40-c:</b> Micelio blanco de tipo apetalado, de crecimiento filamentoso. Produce pigmento en el medio de color amarillo claro.	<b>FRLr</b>	<i>Colletotrichum sp.</i>	<b>CAMP</b>
	<b>M-41:</b> Micelio blanco algodonoso de crecimiento vertical. En la parte reversa de color blanco con un halo amarillo. Crecimiento 1.4. cm por día.	<b>FLR</b> <b>FRI</b>	<i>Phomopsis sp.</i>	<b>CAMP</b>
	<b>41-A:</b> Micelio blanco, apetalado, rizoide. Produce pigmento en centro de color café oscuro. Crecimiento 1.4 cm por día	<b>FLR</b>	<i>Phomopsis sp.</i>	<b>CAMP</b>
	<b>M-42:</b> Micelio blanco algodonoso con conglomerados esféricos de micelio, de forma irregular, crecimiento rápido 2 cm por día.	<b>FRL.FRI, FRM</b>	<i>Moesziomyces sp.</i>	<b>CAMP</b>

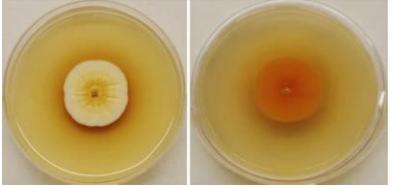
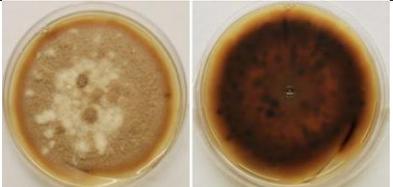
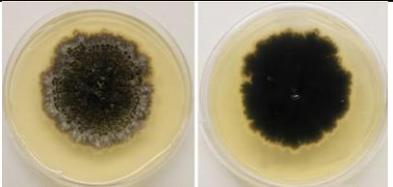
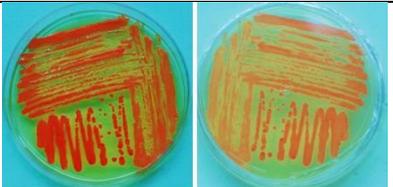
	<p><b>M-43:</b> Micelio blanco algodonoso en forma lobulado, presenta elevación del micelio, reversa crecimiento color crema con blanco, crecimiento rápido 2 cm por día.</p>	<p>FRL.FRI, FRM</p>	<p>uncultured fungus 1</p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-23-A:</b> Micelio blanco algodonoso, con elevación de tipo sinuado reverso: centro crema con la periferia blanca. Crecimiento 1 cm por día.</p>	<p>FRL</p>	<p><i>Psilocybe quebecensis</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-23-B:</b> Micelio blanco filamentoso con forma ramificado, presenta elevación de micelio. Crecimiento rápido 1.6 cm por día.</p>	<p>FRL</p>	<p>uncultured fungus 1</p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-23-C:</b> Micelio blanco filamentoso, de tipo entero presenta elevación de micelio. Crecimiento rápido 1.3 cm por día.</p>	<p>FRL</p>	<p><i>Schizophyllum commune</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-45:</b> Micelio pardo en tonalidades (café claro, mostaza, blanco, grisácea), presenta elevación. Crecimiento lento 0.5 mm por día.</p>	<p>FRI</p>	<p><i>Stagonosporopsis lupini</i></p>	<p>CAMP</p>

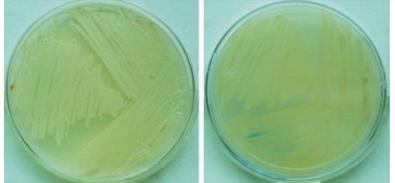
	<p><b>M-50:</b> Micelio salmón claro, plano, con anillos concéntricos, algodonoso. Crecimiento 1.1 cm cada tres días.</p>	<p>FRI</p>	<p><i>Fusarium chlamydosporum</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-23-D:</b> Micelio blanco algodonoso, entero, centro crema con la periferia blanca. Crecimiento 1.2 cm por día.</p>	<p>FRI</p>	<p><i>Schizophyllum commune</i></p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-23-F:</b> Micelio blanco algodonoso, puntiforme, con conglomerados de micelio, filamentoso. Crecimiento 1.6 cm por día.</p>	<p>FRI</p>	<p>uncultured fungus 2</p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-53:</b> Micelio naranja claro, algodonoso y formación de capas onduladas. Reverso crema-blanco en bordes. Crecimiento rápido de 1.2 cm por día</p>	<p>FRM</p>	<p><i>Fusarium incarnatum</i></p>	<p>CAMP/YUC</p>
	<p><b>M-54:</b> Micelio blanco filamentoso, con elevación ondulado. Reverso: generó pigmento azul en el medio. Crecimiento 1.6 cm por día.</p>	<p>FRM</p>	<p><i>Schizophyllum sp.</i></p>	<p>CAMP</p>

	<b>M-55:</b> Micelio salmón-claro, algodonoso y formación de ondulaciones amorfas Reverso: de coloración blanco, su crecimiento rápido de 1.1 cm por día.	FRM	<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	CAMP/YUC
	<b>M-15-A:</b> Micelio beige-verde seco, polvoroso, forma de colonia entero y de borde plano. Reverso: generó pigmento en centro, pero no el medio, su crecimiento 1.2 cm por día.	FRM	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	CAMP
	<b>M-15-B:</b> Micelio blanco-rosa, filamentoso, de borde plano centro polvoroso, la periferia de color rojo y filamentoso y crecimiento vertical. Reverso: generó pigmento en el medio. Crecimiento 1.2 cm por día.	FRM	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	CAMP
	<b>M-15-C:</b> Micelio rosa-verde seco, dé tipo polvoroso, forma de colonia filamentosa, con elevación del micelio de rizado, con borde plano de color rosa. Generó pigmento rojo en el medio, 1.2 cm por día. Es inhibidor del <b>M-54</b>	FRM	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	CAMP/YUC
	<b>M-59:</b> Micelio verde seco aterciopelado, corrugación en el centro con bordes blanco, es crecimiento lento 0.8 mm cada 2 días. Reverso, verde seco con puntos negros.	FRM RA	<i>Cladosporium uredinicola</i>	CAMP/YUC

	<b>M-57:</b> Micelio blanco, plano con líneas verticales de centro hacia los bordes y un anillo amarillo concéntrico de esporas en tono verde seco con negro. Crecimiento rápido 1.2 cm por día. Es un endófito inhibidor del <b>M-53</b> y <b>M-55</b>	RA	<i>Aspergillus foetidus</i>	CAMP
	<b>M-60-TRI:</b> Micelio verde-amarillo y con conglomerados de micelio verdes. Crecimiento rápido 1.4 cm por día. Es un endófito inhibidor de otros endófitos de levaduras como el <b>M-68</b> y <b>M-79</b> . Reverso de color amarillo.	RA	<i>Trichoderma sp.</i>	CAMP
	<b>M-78:</b> Micelio amarillo circular algodonoso, presenta elevación de tipo pulvinada con un borde morado, crecimientos 1.3 cm por día.	RA	<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	CAMP
	<b>M-68-LEV:</b> Levadura de tono mate de color blanco-marfil, crecimiento en 3 horas después del cultivo. Es un endófito inhibidor de otros endófitos pero es inhibido por el <b>M-60-TRI</b> .	RA	<i>Candida railenensis</i>	CAMP
	<b>M-79:</b> Levadura de tono beige brillante, crecimiento en 1 hora después del cultivo, es un endófito inhibidor de otros endófitos.	RA	<i>Papiliotrema terrestris</i>	CAMP/YUC

	<p><b>M-15-E:</b> Micelio rosa claro seco, polvoroso, forma de colonia entero y de borde plano y transparente. Reverso: generó pigmento en centro, pero no en el medio, su crecimiento 1 cm por día.</p>	FRM	<i>Talaromyces sp2</i>	CAMP/ YUC
	<p><b>M-71:</b> Micelio blanco circular, con elevación del micelio, con formación de anillos concéntricos. Crecimiento 1.1 cm por día.</p>	HOJ FLR FRM	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	YUC
	<p><b>M-73:</b> Micelio beige-gris compacto, presenta elevación convexa, crecimiento lento 0.6 mm cada 2 días.</p>	HOJ	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	YUC
	<p><b>M-75:</b> Micelio blanco de algodonoso irregular, con elevación en centro y con borde ondulado y elevado. Crecimiento 1.2 cm por día.</p>	HOJ	<i>Cladosporium pini-ponderosae</i>	YUC
	<p><b>M-76:</b> Micelio blanco aterciopelado y plano, con líneas verticales, y bordes ondulados. Crecimiento 1.3 cada 2 días</p>	FRL	<i>Aspergillus aureolus</i>	YUC

	<p><b>M-58:</b> Micelio beige plano, y entero presenta ligeras ondas en los bordes. Es un hongo inhibidor. De crecimiento lento 1 cm cada 8 días.</p>	<p>FLR/ RAÍZ</p>	<p><i>Penicillium coffeae</i></p>	<p>YUC</p>
	<p><b>M-80-LEV:</b> Levadura de color marfil mate, crecimiento en 1 hora después del cultivo, es un endófito inhibidor de otros endófitos.</p>	<p>RA</p>	<p><i>[Candida] railenensis</i></p>	<p>YUC</p>
	<p><b>M-83:</b> micelio café calor con conglomerados de tono pardo con blanco. Reverso de color café oscuro con puntos negros. Crecimiento 1.2 cm por día.</p>	<p>RA</p>	<p><i>Stagonosporopsis lupini</i></p>	<p>YUC</p>
	<p><b>M-82:</b> Micelio negro, granulado, puntiforme, forma ondulada, presenta elevación en el centro. Crecimiento lento 0.3 mm cada día. Reverso negro con borde blanco compacto.</p>	<p>RA</p>	<p><i>Phyllosticta sp.</i></p>	<p>YUC</p>
	<p><b>M-90:</b> Levadura de tono salmón brillante, crecimiento en 1 hora después del cultivo, es un endófito inhibidor de otros endófitos.</p>	<p>RA</p>	<p><i>Sporidiobolus pararoseus</i></p>	<p>YUC</p>

	<p><b>M-90-A:</b> Levadura de tono salmón-claro brillante, crecimiento en 2 horas después del cultivo, es un endófito inhibidor de otros endófitos.</p>	<p>RA</p>	<p><i>Sporidiobolus sp.</i></p>	<p>YUC</p>
	<p><b>M-95:</b> Levadura de tono beige mate, crecimiento en 1 hora después del cultivo. Es un endófito inhibidor de otros endófitos.</p>	<p>RA</p>	<p><i>Meyerozyma guilliermondii</i></p>	<p>YUC</p>

---

---

### 3.8.4. Identificación de especies de hongos endófitos

Con los alineamientos realizados logró identificar 33 a nivel especie y 13 a nivel género. Varios de los morfotipos pertenecieron al mismo género y en algunos casos a la misma especie como, *Alternaria alstroemeria*, que su secuencia resulto ser la misma para 4 morfotipos, con un porcentaje de identidad por arriba del 99%. Respecto a sus características macroscópicas no fueron tan diferentes, ya que mostraron características morfológicas de: micelio algodonoso en tonalidades blancas y con anillos concéntricos, se identificaron en flores de la colecta de Campeche (**M-33**, **M-35**) y en raíces de la colecta de Yucatán (**M-71** y **M-73**). También fue de las especies que más abundan en los órganos de papaya.

El género *Colletotrichum*, se obtuvo cinco morfotipos, de los cuales, en tres se logró identificar a nivel especie, como *Colletotrichum gloeosporioides* con el 97 % de identidad y *Colletotrichum sichuanense* con el 99% de identidad. Dos se lograron solo a nivel género con el 98 % y 99 % de identidad, el quinto morfotipo presento una identidad del 75 % con *Colletotrichum eremochloae*, que sugiere ser otra especie de este género. Estas especies fueron encontradas en hojas y en flores de papaya de la colecta de Campeche.

Se identificaron cuatro especies de *Fusarium*; *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium incarnatum* con el 99% de identidad y *Fusarium falciforme* y *Fusarium solani* con el 98% de identidad, estas especies se identificaron en flores de la colecta de Campeche.

La especie *Phyllosticta Fallopieae* con el 98% de identidad, se identificó en dos morfotipos y con características macroscópicas similares de micelio polvoroso y oscuro, y en Yucatán se aisló en raíces y en hojas de la colecta de Campeche.

El género *Talaromyces* sp. registro dos morfotipos que no producen pigmentos, fueron encontrados en hojas de la colecta de Campeche y la especie *Talaromyces purpureogenus* *Talaromyces amestolkiae* producían pigmento rojo, se encontraron en colectas de Yucatán.

Las especies que se identificaron en ambos sitios de muestreo fueron: *Alternaria alstroemeriae*, *Candida railenensis*, *Cladosporium uredinicola*, *Papiliotrema terrestris*,

---

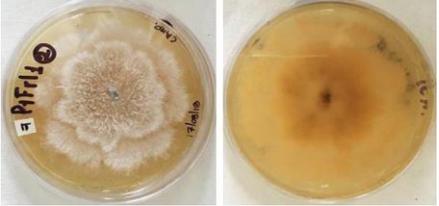
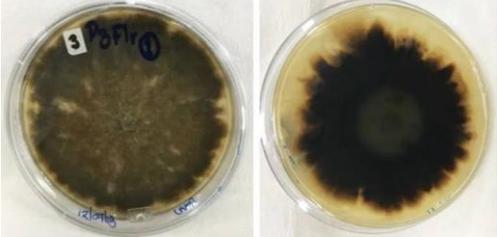
---

*Fusarium incarnatum*, *Meyerozyma guilliermondi*, *Stagonosporopsis* sp. *Phyllosticta* sp. NsE+24, *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* y especies del género: *Phyllosticta*, *Talaromyces*, y *Penicillium*. en Yucatán. En Campeche las especies más abundantes en órganos de papaya fueron: *Schizophyllum comune*, *Talaromyces* sp, y *Schizophyllum* sp. La morfología de todos morfotipos fue micelio blanco algodonoso, con elevaciones y conglomerados.

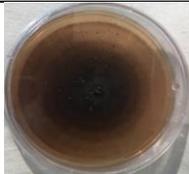
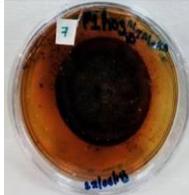
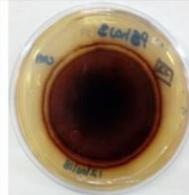
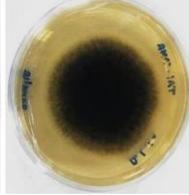
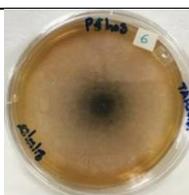
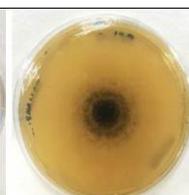
Se registraron 37 morfotipos que no fueron identificados molecularmente, algunos presentaron características muy similares a las especies identificadas. En el **(cuadro 12)** muestra morfotipos con sus características macroscópicas, el órgano, el número de aislamientos y el sitio de colecta. Por sus características macroscópicas algunas de estos morfotipos muestran parecido a algunos de los identificados molecularmente, que pudieran pertenecer a géneros cercanos **(Cuadro 11)**.

En el **(cuadro 11)**, se comparan a los morfotipos no identificados y de algunos que se lograron identificar a nivel especie. Los morfotipos **M-69**, **M-70** y el **M-77**, presentaron características macroscópicas similares a la especie identificada como *Alternaria alstroemeriae*, que se caracteriza por tener micelio algodonoso en tonalidades blancas y claras, además de la formación de anillos concéntricos. Los morfotipos **M-48** y **M-49**, **M-49-A** mostraron características similares a la especie *Penicillium coffeae*, micelio claro y plano con anillos concéntricos de crecimiento lento de 0.8 cm a la semana. El morfotipo **M-82-A**, fue identificado como el morfotipo del 82 y posiblemente pertenezca a la especie *Phyllosticta fallopiae*. Otro morfotipo es el **M-64**, de micelio blanco filamentoso y esponjoso, de crecimiento rápido, genera pigmento amarillo, muy parecido a la especie *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*.

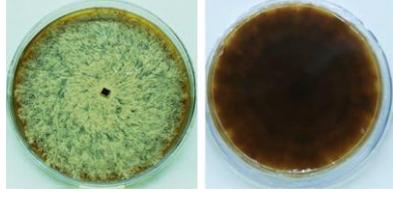
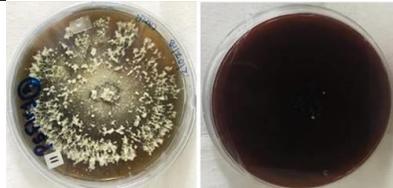
**Cuadro 11.** Comparación de las especies identificadas con morfotipos no caracterizados molecularmente.

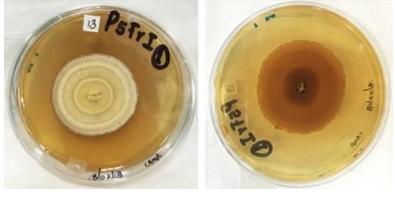
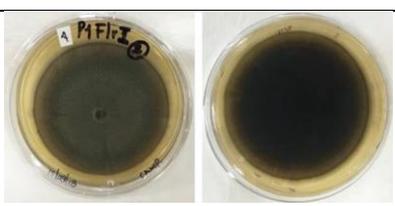
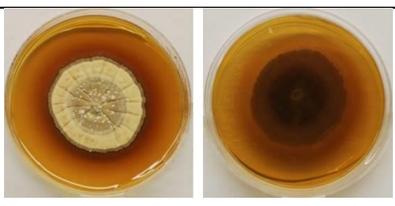
Especie	Características morfológicas
 <p data-bbox="310 667 639 703"><b><i>Diaporthe yunnanensis</i></b></p>	<p data-bbox="748 432 1255 594">Micelio blanco-crema, apetalado, de crecimiento filamentoso no produce pigmento en el medio. Crecimiento 1.3 cm por día. Despide olor a papaya fermentada.</p>
Morfotipos	Características morfológicas
 <p data-bbox="337 1045 613 1081"><b>40-A, M-40-B y 40-D</b></p>	<p data-bbox="748 840 1227 1001">Micelio blanco apetalado, de crecimiento filamentoso. Produce pigmento de color café oscuro. Crecimiento 1.3 cm por día. Despide olor a papaya fermentada.</p>
Especie	Características morfológicas
 <p data-bbox="302 1451 651 1486"><b><i>Stagonosporopsis lupini</i></b></p>	<p data-bbox="748 1178 1243 1308">Micelio pardo en tonalidades (café claro, mostaza, blanco, grisácea), presenta elevación. Crecimiento lento 0.5 mm por día.</p>
Morfotipo	Características morfológicas
	<p data-bbox="748 1556 1263 1686"><b>M-63:</b> Micelio plano de tipo rizoide de coloración café claro en el centro y en borde de coloración café con negro. De crecimiento lento 0.8 mm por día.</p>

**Cuadro 12.** Lista de morfotipos no identificados mediante técnicas moleculares.

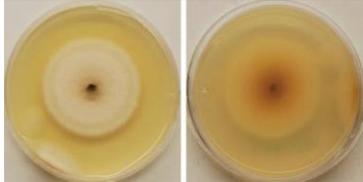
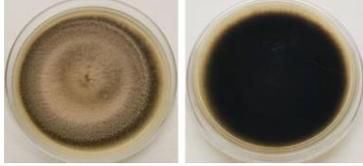
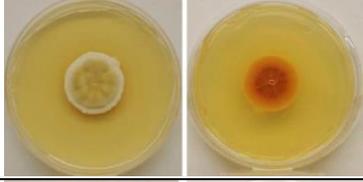
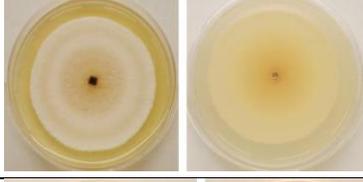
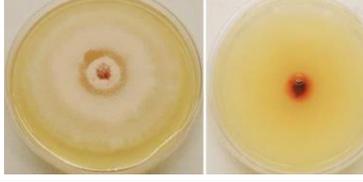
MORFOTIPO		CARACTERÍSTICAS	ÓRGANO	N. AISLAMIENTO	SITIO DE COLECTA
Anverso	Reverso				
		<b>M-5:</b> Micelio de color negro claro liso, crecimiento rápido 1.2 cm por día. Reverso micelio negro claro con anillos concéntricos.	HOJ	10	CAMP
		<b>M-7:</b> Micelio rojo vino, de tipo algodonoso plano y anillos concéntricos en la periferia. Reverso anillos concéntricos en la periferia. Crecimiento 1.4 cm cada 2 días.	HOJ	11	CAMP
		<b>M-22:</b> Micelio negro ramificado, plano crecimiento 1.1 cm por día.	HOJ	3	CAMP
		<b>10-A:</b> Micelio blanco-crema de tipo algodonoso, centro gris oscuro, crecimiento rápido 2.6 cm por día.	HOJ	2	CAMP

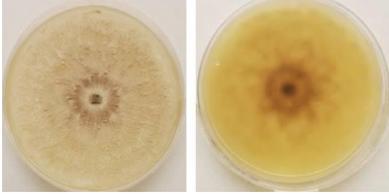
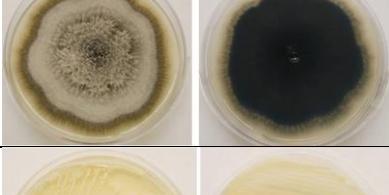
	<p><b>10-B:</b> Micelio blanco algodonoso elevado, centro gris oscuro, crecimiento rápido 2 cm por día.</p>	<p><b>HOJ</b></p>	<p><b>1</b></p>	<p><b>CAMP</b></p>
	<p><b>M-10-D:</b> Micelio gris oscuro, algodonoso, borde gris claro crecimiento rápido 1.7 por día.</p>	<p><b>HOJ</b></p>	<p><b>2</b></p>	<p><b>CAMP</b></p>
	<p><b>M-34:</b> Micelio color café plano, filamentoso, forma dos anillos concéntricos. 1 cm por día.</p>	<p><b>FRL</b></p>	<p><b>3</b></p>	<p><b>CAMP</b></p>
	<p><b>M-40-A:</b> Micelio blanco apetalado, de crecimiento filamentoso. Produce pigmento en el medio de color café oscuro. Crecimiento 1.3 cm por día. Despide olor a papaya fermentada.</p>	<p><b>FRL</b></p>	<p><b>3</b></p>	<p><b>CAMP</b></p>
	<p><b>M-40-B:</b> Micelio blanco de tipo apetalado, de crecimiento rizoides. Produce pigmento en el medio de color beige claro, 1.1 cm por día.</p>	<p><b>FRL</b></p>	<p><b>2</b></p>	<p><b>CAMP/ YUC</b></p>

	<p><b>M-40-D:</b> Micelio blanco, apetalado, de forma rizoide. Produce pigmento en el medio de color mostaza. Crecimiento 1.2 cm por día.</p>	<p>FRL</p>	<p>2</p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-41-C:</b> Micelio blanco, apetalado, de crecimiento rizoide. Produce pigmento en el medio de color mostaza. Crecimiento 1.3 por día.</p>	<p>FRL</p>	<p>3</p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-46:</b> Micelio amorfo, centro rosa con beige, borde (irregular). Reverso: micelio amorfo de color naranja, crecimiento lento 0.6 mm cada día.</p>	<p>FRI</p>	<p>6</p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-47:</b> Micelio beige-blanco, forma anillos concéntricos irregulares. Crecimiento 1 cm cada 5 días.</p>	<p>FRI</p>	<p>1</p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-44:</b> Micelio blanco algodonoso en forma lobulado, presenta elevación del micelio. Reversa: micelio color crema con blanco, crecimiento rápido 2 cm por día.</p>	<p>FRI</p>	<p>5</p>	<p>CAMP</p>

	<p><b>M-48:</b> Micelio beige, forma anillos concéntricos, plano. Crecimiento rápido lento, (crecimiento máximo 2.2 cm en 4 meses).</p>	<p>FRI</p>	<p>1</p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-49:</b> Micelio plano, beige-salmón y verde olivo, de tipo granuloso. Con anillos concéntricos, crecimiento lento 2.7 cm al tercer mes.</p>	<p>FRI</p>	<p>2</p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-51:</b> Micelio rosa claro amorfo, centro rosa, borde (irregular). Reverso de color naranja, crecimiento lento 1 cm cada 3 días.</p>	<p>FRI</p>	<p>6</p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-52:</b> Micelio verde seco, de tipo filamentoso, de crecimiento rápido 1cm por día.</p>	<p>FRI</p>	<p>5</p>	<p>CAMP</p>
	<p><b>M-49-A:</b> Micelio plano en tono café claro, generó pigmento de color ámbar, tiene líneas verticales hacia los bordes. Crecimiento 2.7 cm al tercer mes.</p>	<p>FRM</p>	<p>3</p>	<p>CAMP</p>

	<p><b>M-56:</b> Micelio blanco de tipo filamentoso con conglomerados de micelio. Reverso: blanco con crema de crecimiento rápido 1.3 cm por día.</p>	FRM	1	CAMP
	<p><b>M-63:</b> Micelio plano de tipo rizoide de coloración café claro en el centro y en borde de coloración café con negro. De crecimiento rápido 1.3 cm por día.</p>	RA	2	CAMP
	<p><b>M-61:</b> Micelio café claro con periferia rojo oxido y de textura porosa, crecimiento rápido 1.2 cm por día. Reverso genero un pigmento ámbar en el medio de cultivo.</p>	RA	4	CAMP
	<p><b>M-66:</b> Levadura salmón-mate y seco crecimiento en 2 horas después del cultivo, es un endófito que está asociado a otros endófitos como M-20 y el M-19.</p>	RA	2	CAMP
	<p><b>M-64:</b> Micelio blanco filamentoso y esponjoso de crecimiento muy rápido 1.3 cm después del segundo día. Reverso: generó un pigmento en el medio de color amarillo</p>	RA	3	CAMP

	<b>M-69:</b> Micelio blanco circular, centro gris con formación de anillos concéntricos. Crecimiento 1 cm por día.	<b>HOJ</b>	<b>2</b>	<b>YUC</b>
	<b>M-70:</b> Micelio rosa palo, con café con formación de anillos concéntricos en tonos café y rosa. Reverso: color café oscuro, crecimiento 1.1 cm por día.	<b>HOJ/FRI</b>	<b>4</b>	<b>YUC</b>
	<b>M-74:</b> Micelio mostaza-beige compacto, presenta elevación, y líneas verticales. Crecimiento lento 0.5 mm cada 3 días.	<b>HOJ/FRI</b>	<b>8</b>	<b>YUC</b>
	<b>M-77:</b> Micelio blanco circular, centro gris con formación de anillos concéntricos. Crecimiento 1.3 cm por día.	<b>FLR</b>	<b>4</b>	<b>YUC</b>
	<b>M-55-A:</b> Micelio salmón claro, filamentoso, presenta borde ondulado de color blanco. Crecimiento 1 cm por	<b>FRI</b>	<b>2</b>	<b>YUC</b>
	<b>M-15-D:</b> Micelio rojo brillante circular, forma entera presenta elevación de tipo umbilicada. Crecimiento lento 1.4 cm por día.	<b>FRM</b>	<b>3</b>	<b>YUC</b>

	<b>M-80-TRI:</b> Micelio amarillo filamentoso, de crecimiento rápido 1.4 cm por día.	RA	6	YUC
	<b>M-81:</b> Micelio beige claro, filamentoso, amorfo. Crecimiento 1.4 cm por día.	RA	4	YUC
	<b>M-84:</b> Micelio café claro, filamentoso, amorfo presenta elevación en borde. Reverso pigmento café oscuro. 1.4 cm por día	RA	1	YUC
	<b>M-82-A:</b> Micelio negro-blanco en forma de roseta, granuloso, puntiforme y ondulado, presenta elevación en el centro. Crecimiento lento 0.6 mm cada día.	RA	1	YUC
	<b>M-92:</b> levadura de beige mate. Crecimiento a la hora del cultivo.	RA	4	YUC

---

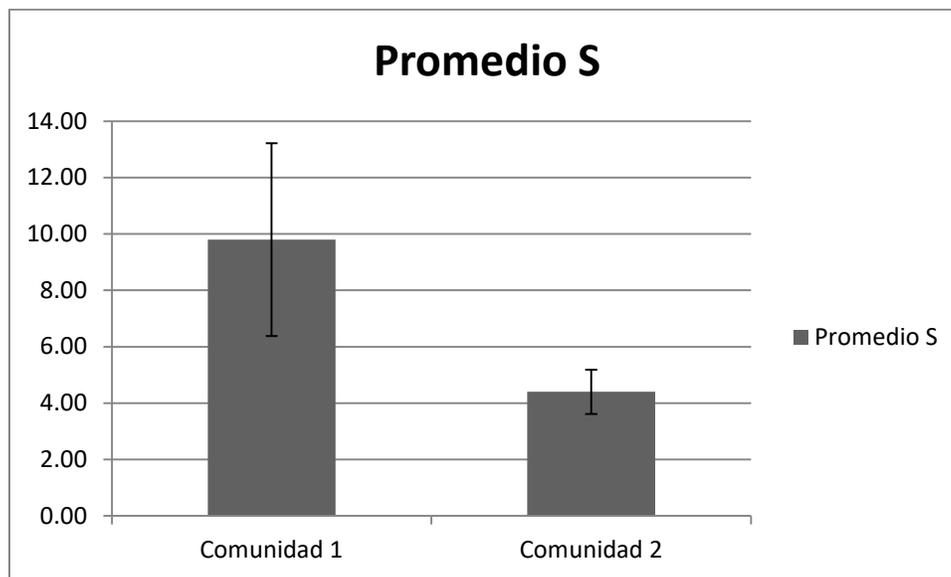
### 3.9 Estudios de la biodiversidad de hongos endófitos

Para los estudios de la diversidad de hongos endófitos presentes en ambos sitios de muestreo, se procedió primero a la identificación de las diferentes especies. Se utilizaron las matrices de presencia-ausencia y matrices de abundancias de ambos sitios. Cabe mencionar que las matrices que más se usaron fueron las de abundancia porque son más prácticas de manejar y menos complejas a la hora de interpretar los datos. Para estos estudios de diversidad utilizaron 38 especies para Campeche y 15 en Yucatán, cabe mencionar que una especie fue identificada en más de un órgano.

#### 3.9.1 Riqueza de especies

Una de las formas de estimación de la diversidad de manera simple, es la riqueza esta representa el número total de individuos presente en las muestras de una comunidad o más (Mayo de 1988; González-Oreja and Lou 2012). Respecto al estudio de la diversidad se obtuvo una riqueza (que indica el cálculo del número de individuos presentes en el sitio o comunidad de muestreo). De un total de **265** individuos únicos se obtuvo una riqueza en Candelaria, Campeche de **S=37** y en Temozón Yucatán de un total de **76** individuos únicos se registró una **S=14**, esto quiere decir que hay más riqueza en el sitio 1 en comparación del sitio 2.

En la gráfica (**figura 27**) indica el promedio de la riqueza (**PS**) en la comunidad 1 es de **PS= 9.8** y su intervalo de confianza (**IC**) del 95% es el **3.9**, para el sitio 2 tenemos que **PS=4.4** y su (**IC**) del 95% es el **0.78**, esto demuestra que el sitio 1 es más rico en especies respecto al sitio 2, lo que también indica que no hay diferencias significativas en la riqueza de especies, aunque el promedio de la comunidad sea diferente en ambos sitios, esto se debe la abertura del intervalo de confianza es significativamente similar al sitio 1.



**Figura 27.** Promedio de la riqueza de especies de ambos sitios de muestreo. La comunidad 1 representa a Candelaria Campeche y el Comunidad 2 a Temozón Yucatán. Las barras de error, son intervalos de confianza al 95%.

### 3.9.2. Índice Simpson y su complemento

Una de las métricas para el análisis de la entropía dentro de las comunidades son índice de Simpson y su complemento. Esta métrica indica que tan frecuente es encontrar una especie en cada muestra dentro de un sitio de muestreo. En nuestras poblaciones se mostró que el grado de incertidumbre que una especie sea encontrada en el sitio 1 fue de **0.03** mientras que su complemento fue **0.97** y **0.91** respectivamente para el sitio 2.

El índice de Simpson mostró que en Candelaria hay una alta probabilidad de encontrar un mismo morfotipo **0.91**, estos resultados concuerdan a las especies que se registraron en más de un órgano. Adicionalmente el índice de Simpson indica que Campeche, es más diverso que el sitio 2. Pero la diferencia no es estadísticamente significativa en cuanto al sitio 1 (**Cuadro 13**).

---

---

**Cuadro 13. Resultados de la métrica del índice de Simpson y su complemento Sitio**

1.

	<b>Índice de Simpson</b>	<b>Complemento 1-D</b>
<b>Sitio 1. Candelaria</b>	<b>0.03</b>	<b>0.97</b>
<b>Sitio 2. Temozón</b>	<b>0.09</b>	<b>0.91</b>

### **3.9.3 Biodiversidad de especies Shannon-Wiener**

Otra métrica que mide la biodiversidad de especies en una o más comunidades es Shannon-Wiener. Esta métrica pondera valores en logaritmo natural y en base 10 para la estimación de la diversidad (González-Oreja and Lou 2012). Para este análisis se empleó el programa Stimate 0.91 para computar la información de ambas poblaciones, y se analizan en formatos de Excel.

En Candelaria Campeche de 38 especies con características únicas, la diversidad total del sitio fue  $H' = 3.43$  y la diversidad máxima alcanzada fue de  $H' \text{ Max} = 3.61$ , en comparación con el sitio 2 de Temozón Yucatán con 14 especies tuvo un  $H' = 2.45$ , y la diversidad máxima alcanzada fue de  $H' \text{ Max} = 2.64$ . Los resultados de la comparación de la diversidad de Shannon, de ambas poblaciones indican que, en Campeche se obtuvo la diversidad más alta de especies. El **cuadro (14 y 15)** muestra la diversidad utilizando ambos logaritmos (logaritmo natural y el de base 10). El cálculo del índice de Shannon-Wiener nos permite medir la equidad de especies. Podemos ver (**cuadro 14 y cuadro 15**) que el valor máximo de la diversidad de Shannon-Wiener, es la equidad. Este tipo de análisis indica que la comunidad 1 es más equitativa que la comunidad 2 por presentar un valor de  $JH = 0.95$  en comparación del valor  $JH = 0.93$ , cabe mencionar que una comunidad es equitativa cuando las especies encontradas son más comunes. (González-Oreja and Lou 2012).

Cuadro 14. Índice de Shannon-Wiener del sitio 1: Candelaria Campeche.

	Sitio 1: Candelaria Campeche	
Índice Shannon-Wiener	diversidad LOG natural	diversidad base 10
H'	3.43	1.49
H' Max	3.61	1.57
Equidad (JH')	0.95	0.95

Cuadro 15. Índice de Shannon-Wiener del sitio 2: Temozón Yucatán.

	Sitio 2:Temozón Yucatán	
Índice Shannon-Wiener	diversidad LOG natural	diversidad base 10
H'	2.45	1.07
H' Max	2.64	1.15
Equidad (JH')	0.93	0.93

#### 3.9.4. Dominancia de especies

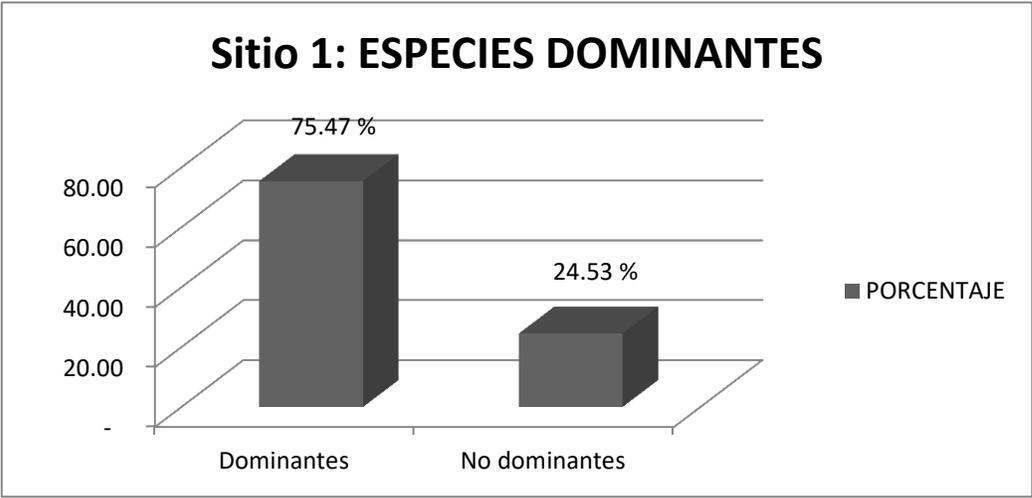
La dominancia se refiere al índice de frecuencia de especies dentro de una comunidad. Se identificó a la especie que mayor dominancia presentó en el muestreo (**cuadro 16**). El **75.47%** fueron morfotipos dominantes en el sitio 1, la especie *Corynespora torulosa*, fue la más dominante con el **6.79%** (**figura 28**). Las especies no dominantes representaron el **24.53%** (**Figura 29**).

**Cuadro 16.** Morfotipos dominantes de Candelaria Campeche.

Especies dominantes	MAX ni/ N	porcentaje de Dominancia
1. <i>Corynespora torulosa</i>	0.067924528	6.79
2. <i>Penicillium</i> sp.	0.060377358	6.04
3. <i>Psilocybe quebecensis</i>	0.056603774	5.66
4. <i>Moesziomyces</i> sp.	0.052830189	5.28
5. <i>Trichoderma</i> sp	0.045283019	4.53
6. <i>Stagonosporopsis lupini</i>	0.045283019	4.53
7. <i>Corynespora cassicola</i>	0.045283019	4.53
8. uncultured fungus 2	0.041509434	4.15
9. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0.037735849	3.77
10. <i>Fusarium chlamydosporum</i>	0.033962264	3.40
11. <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i>	0.033962264	3.40
12. <i>Colletotrichum eremochloae</i>	0.033962264	3.40
13. <i>Phyllosticta</i> sp1	0.030188679	3.02
14. <i>Alternaria alstroemeriae</i>	0.030188679	3.02
15. <i>Colletotrichum sichuanense</i>	0.026415094	2.64
16. [ <i>Candida</i> ] <i>railenensis</i>	0.026415094	2.64
17. <i>Phomopsis</i> sp.	0.022641509	2.26
18. <i>Schizophyllum</i> sp.	0.022641509	2.26
19. <i>Cladosporium uredinicola</i>	0.022641509	2.26
20. uncultured fungus 1	0.018867925	1.89
	<b>Dominantes</b>	<b>75.47</b>
	<b>No dominantes</b>	<b>24.53</b>



**Figura 28.** Especies dominantes del sitio 1: candelaria Campeche. *Corynespora torulosa* está representado por el **(6.79%)** como la más dominante.



**Figura 29.** Porcentaje de dominancia de especies de Candelaria, Campeche.

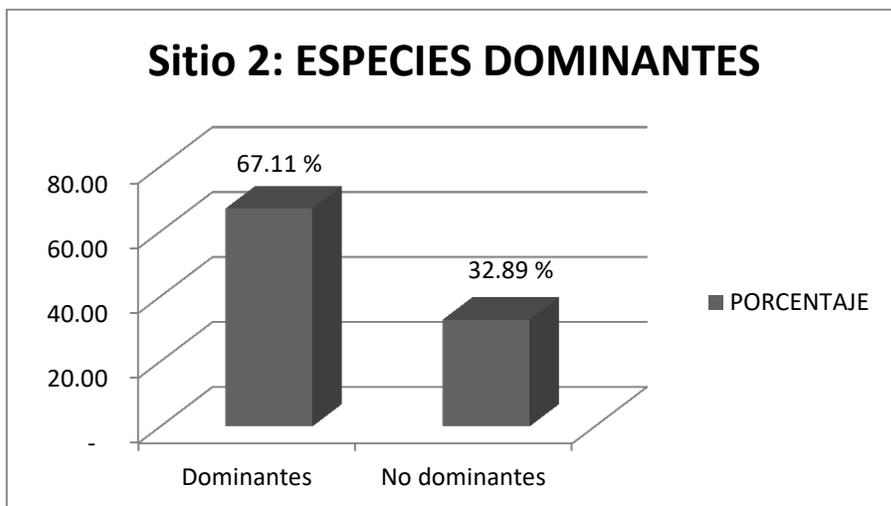
El sitio 2, tuvo menos especies dominantes (**cuadro 17**), están representados por el **67.11%**, y la especie con mayor dominancia *Alternaria alstroemeriae* con el **18.42%**. Respecto a los morfotipos menos dominantes representaron el **32.89 % (Figura 30y 31)**.

**Cuadro 17. Especies dominantes de Temozón Yucatán.**

Especies dominantes	MAX ni/ N	porcentaje de Dominancia
1. <i>Alternaria alstroemeriae</i>	0.184210526	18.42
2. <i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	0.157894737	15.79
3. <i>Stagonosporopsis lupini</i>	0.118421053	11.84
4. <i>Penicillium coffeae</i>	0.078947368	7.89
5. <i>Sporidiobolus sp. DT2</i>	0.065789474	6.58
6. <i>Candida railenensis</i>	0.065789474	6.58
<b>Dominantes</b>		<b>67.11</b>
<b>No dominantes</b>		<b>32.89</b>



**Figura 30.** Especies dominantes del sitio 2: Temozón, Yucatán. *Alternaria alstroemeriae* está representado por el **(18.82%)**, como la especie más dominante.



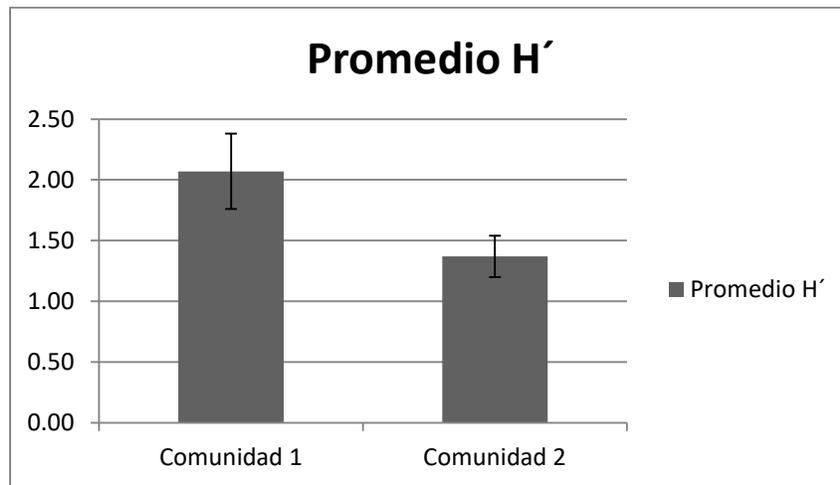
**Figura 31.** Gráfico del porcentaje de dominancia de los morfotipos de Temozón, Yucatán.

### 3.9.5 Estudio de la diversidad de morfotipos por órganos

Para saber que sitio fue más diverso, se hicieron las mismas métricas de diversidad pero por especies y por órganos. Para identificar la dominancia, la equidad y la diversidad de Shannon-Wiener. Para ello se realizaron los cálculos, se computaron en Stimate 9.1, finalmente se graficaron en Excel. En Candelaria Campeche tenemos que el promedio de la diversidad de Shannon-Wiener indica que el sitio 1 es más diverso en los diferentes órganos con un valor de  $H' = 2.58$ , su  $PH' = 2.07$  y con un intervalo de confianza del 95% ( $IC$ ) =  $0.31$ , respecto al sitio 2, su diversidad alcanzada por órganos fue  $H' = 1.19$ , un  $PH' = 1.33$  y su ( $IC$ )  $0.17$  (**cuadro 18**). Los valores de diversidad de Shannon-Wiener para los órganos indican, que no hay diferencias significativas, aunque el promedio sea mayor en el sitio 1 en comparación con el sitio 2. Ya que traslapamiento de los valores del IC del 95% del sitio 2 con IC del 95% del sitio 1. (**Figura 32**).

**Cuadro 18.** Promedio de la diversidad de Shannon-Wiener en ambos sitios de estudio.

	Promedio H'	95%IC
SITIO 1	2.07	0.30
SITIO 2	1.37	0.17

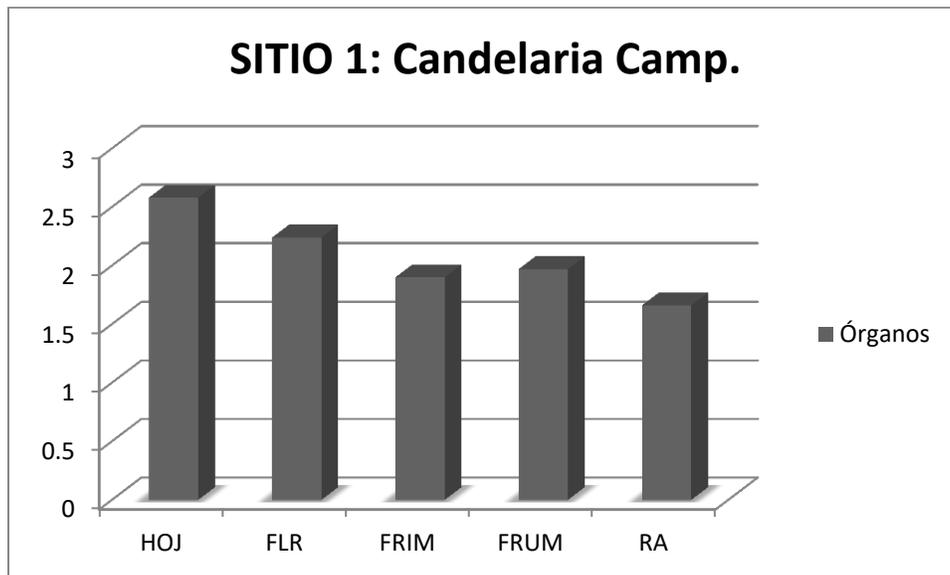


**Figura 32.** Promedio de la diversidad de ambos sitios de muestreo sitio 1: Candelaria Campeche y sitio 2: Temozón, Yucatán.

Para la estimación de la diversidad por órganos de ambos sitio, vemos que, en Campeche se vio más diversidad en órganos de hojas, con  $H' = 2.58$ , seguido de flores con  $H' = 2.24$ , fruto maduro con  $H' = 1.97$ , fruto maduro con  $H' = 1.9$  y raíces con  $H' = 1.66$  de diversidad encontrada (**cuadro 18 y figura 33**).

**Cuadro 1.** Diversidad de Shannon-Wiener en órganos del sitio 1.

SITIO 1:Candelaria Campeche	H' Órganos
HOJ	2.58
FLR	2.24
FRM	1.97
FRUM	1.9
RA	1.66

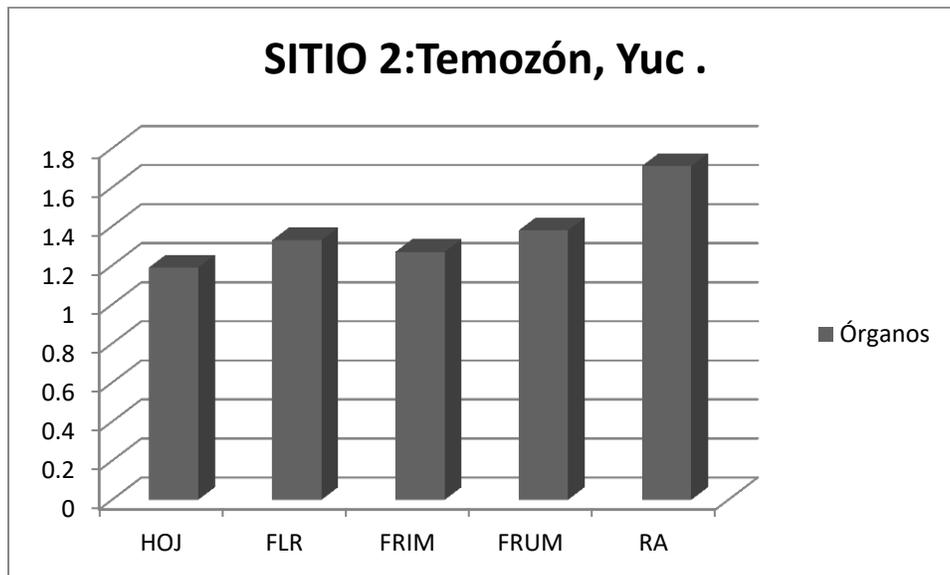


**Figura 33.** Diversidad de Shannon-Wiener en órganos del sitio 1: Candelaria Campeche.

Respecto a la diversidad de órganos en el sitio 2: Temozón Yucatán, tenemos que la mayor diversidad se vio en raíces  $H' = 1.71$ , seguido de fruto maduro con  $H' = 1.38$ , flores con  $H' = 1.33$ , y el órgano que presentó menos diversidad fueron hojas con  $H' = 1.19$  (cuadro 19 y figura 34). Estos resultados pudieran estar relacionados con el uso intensivo de fungicidas en el cultivo, exclusivamente de fungicidas foliares y por eso se vio menor diversidad en hojas y en frutos inmaduros.

**Cuadro 19.** Diversidad de Shannon-Wiener en órganos del sitio 2.

SITIO 2: Temozón Yucatán	H' Órganos
HOJ	1.19
FLR	1.33
FRIM	1.27
FRUM	1.38
RA	1.71

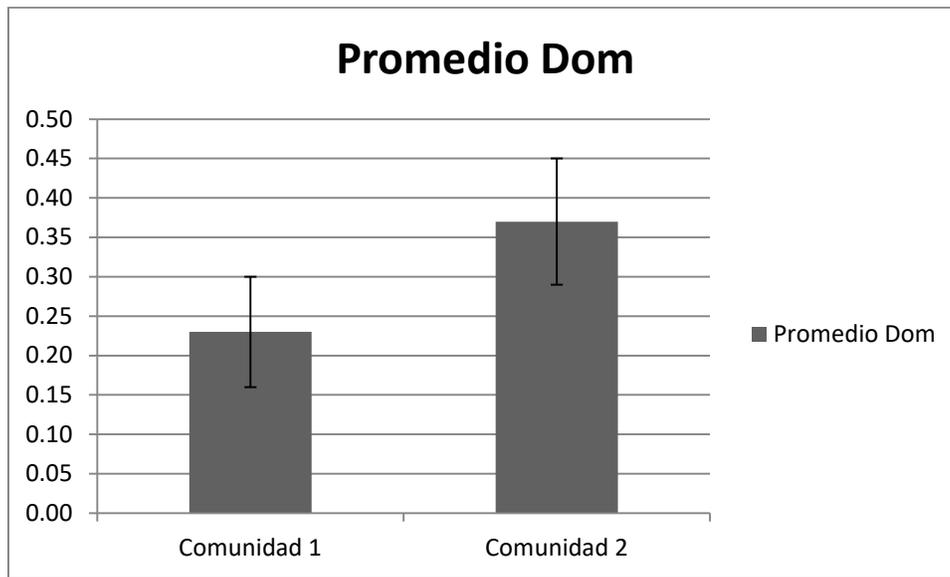


**Figura 34.** Diversidad de Shannon-Wiener en órganos del sitio 2: Temozón, Yucatán.

Por último se tiene que el promedio de la dominancia fue mayor en Temozón con  $pD= 0.37$ , a diferencia Candelaria con  $pD= 0.23$ . Este valor engloba a todos los morfotipos dominantes pero en relación a su promedio y al intervalo de confianza para las muestras. Esto indica que la dominancia del sitio 1 fue inferior a la dominancia del sitio 2, y los intervalos de confianza se solapan, por tanto no existe diferencias significativas entre los valores de dominancia para ambos sitios (**Cuadro 20 y figura 36**).

**Cuadro 20.** Promedio de la dominancia en ambos sitios de estudio.

	Promedio Dom	95%IC
<b>Sitio 1:Candelaria, Camp</b>	0.23	0.07
<b>Sitio 2: Temozón,Yuc</b>	0.37	0.08



**Figura 35.** Promedio de dominancia de ambos sitios de muestreo sitio 1: Candelaria Campeche y sitio 2: Temozón, Yucatán.

---

---

## CAPITULO IV.

### DISCUSIÓN

La biodiversidad se refiere a todas las formas de vida en la tierra y depende de variabilidad genética dentro una especie o de la diversidad de especies, tanto como en plantas, animales y microorganismos, y de la diversidad de ecosistemas (Sandhu and Gupta, 2015). Los hongos endófitos son organismos que tienen una estrecha simbiosis con los tejidos de las plantas y pueden vivir en ellas si presentar síntomas de enfermedad Kusari y Spiteller, 2012b). También desempeñan un papel clave en la adaptación del hábitat de las plantas, mejorando el rendimiento de la plantas brindándoles protección contra el estrés biótico y abiótico (Bend *et al.*, 2016). Los hongos endófitos, producen una gran variedad de metabolitos secundarios novedosos, además son herramientas para mejoramiento de cultivos.

El objetivo principal del trabajo fue estudiar la diversidad de la micobiota endófitas asociada a distintos órganos de la variedad Tainung N°01 en la Península de Yucatán, bajo condiciones de cultivo contrastantes la primera sitio 1: bajo control biológico natural y el sitio 2: bajo control con fungicidas. De los 474 aislamientos obtenidos en este trabajo 353 pertenecen a *Candelaria*, Campeche (sitio1) donde las plantas se mantuvieron bajo control biológico natural. Mientras que 121 aislamientos se identificaron en Temozón, Yucatán (sitio 2), de plantaciones que estaban bajo control con agroquímicos.

El uso de técnicas microbiológicas para la identificación de hongos (Jayawardena *et al.*, 2018) en combinación de técnicas moleculares, como de las regiones ITS (White *et al.*, 1990). Ha permitido la identificación exitosa de hongos a nivel especie, incluso a nivel genotipo (Scorzetti *et al.*, 2002; Schoch *et al.*, 2012). En este trabajo se conjuntaron ambos métodos para la caracterización e identificación de los diferentes hongos endófitos. De los 101 morfotipos se agruparon por sus características morfológicas macroscópicas, sin llegar a la caracterización microscópica de la mayoría de los morfotipos, debido a tienen sus desventajas de ser exhaustivamente tardado trabajar con estos métodos tradicionales (Jayawardena *et al.*, 2018), razón por la que se utilizan las técnicas moleculares para la identificación de especies.

---

Un trabajo similar fue el realizado por (Saucedo-García *et al.*, 2014), donde agrupó por morfotipos a los diferentes aislamientos de hongos endófitos foliares obtenidos en *Coffea arabica* L. Para después realizar estudios de diversidad en los órganos foliares. En este estudio, mediante la caracterización macroscópica se obtuvieron 474 aislamientos agrupados en 101 morfotipos de hongos endófitos, en Campeche el cultivo se encontraba bajo control biológico natural se identificó 353 aislamientos, siendo los órganos con más morfotipos hojas y flores. En Yucatán para el mantenimiento del cultivo se usaban fungicidas y agroquímicos, en este sitio se logró la identificación de 121 aislamientos siendo las raíces y hojas donde más morfotipos se registró Un trabajo similar fue el realizado por Varanda *et al.*, (2016). Donde estudió la diversidad de hongos endófitos en plantas sintomáticas de *Vitis vinifera* L. que al igual que en nuestro caso utilizaron control biológico natural y control con agroquímicos.

En este trabajo se logró la identificación exitosa de hongos endófitos en plantas asintomáticas de papaya variedad Tainung N°01, a nivel molecular de 78 de los 101 morfotipos utilizando la región ITS del ADNr con los cebadores ITS1 e ITS4. Se obtuvieron, 64 secuencias únicas (OTUs), de las cuales, se identificaron 44 a nivel especie, con las 20 secuencias restantes no fue posible asignarlas a una especie por varias razones, 1) no estar disponibles en la base de datos, lo que sugiere que las secuencias identificadas posiblemente corresponden a nuevas especies. 2) Aunque algunas secuencias se encuentren disponibles en las bases de datos, aún no se ha hecho una caracterización macroscópica que respalde la anotación de la especie, tal es el caso de cinco morfotipos que se reportan como hongos no cultivables en este trabajo, pertenecientes a dos OTUS distintos. Esto es común en los trabajos de metagenómica. Por último, 3) Las secuencias con las que se encontró hits presentaron baja identidad (del 75 al 95%) y por ende, corresponden a especies distintas. Para denotar el porcentaje de identidad para una especie, los micólogos han utilizado un valor de corte arbitrario que varía de  $\leq 3\%$  a 5% de divergencia en la secuencia de la región ITS. Para delimitar a una especie de los hongos, la identidad debe ser mayor a 97%. Por otro lado, cuando hay una variación hasta del 80% de identidad se considera como otra unidad taxonómica (Raja *et al.*, 2017). Para los casos en los que no es posible identificar las secuencias a nivel de

---

especie, se emplea el término “Unidad Taxonómica Operacional” u OTUS, por sus siglas en inglés (Nguyen *et al.*, 2016), que es un valor que se asigna a grupos taxonómicos que no se logran identificar a nivel especie o que tiene un porcentaje de identidad menor al 97%.

En total se identificaron OTUs pertenecientes a 24 géneros, los más representativos fueron: *Fusarium*, *Talaromyces*, *Colletotrichum*, *Phyllosticta*, *Meyerozyma*, *Alternaria*, *Stagonosporopsis*, *Phomopsis*, *Diaporthe*, *Schizophyllum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Sporidiobolus*, *Nigrospora*, *Trichoderma*, *Moesziomices*, *Corynespora*, *Papilotrema*, *Macrophomina*, *Leptosphaeria* y de hongos no cultivables. En trabajos similares se han logrado la identificación macroscópica junto con la caracterización molecular (Orlandelli *et al.*, 2012), estudió la diversidad de hongos endófitos asociados a la hojas de *Piper hispidum*, de un total de 474 aislamientos de hongos endófitos, lograron secuenciar 98 aislamientos y los agruparon en 11 géneros: *Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Glomerella*, *Guidnardia*, *Lasiodiplodia*, *Marasmius*, *Phlebia*, *Phoma*, *Phomopsis* y *Schizophyllum* fueron los más representativos. Varanda *et al.*, (2016), también identificó a los hongos endófitos mediante el uso de los ITS, donde sólo 16 OTUs logró identificar. Los géneros más representativos fueron *Alternaria*, *Cladosporium*, y *Nigrospora* en condiciones con control biológico mientras que *Botrytis cinerea*, *Epicoccum nigrum* y *Epicoccum.sp.* en condiciones de manejo con agroquímicos.

En Campeche los géneros que estaban presentes bajo condiciones de control biológico fueron *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Schizophyllum*, *Nigrospora*, *Phomopsis*, *Moesziomyce*, *Leptosphaeria* *Diaporthe*, *Talaromyces*, *Stagonosporopsis* y *Fusarium*. Mientras que en Yucatán *Alternaria*, *Aspergillus*, *Papilotrema*, *Mucor*, *Penicillium* *Stagonosporopsis*, *Talaromyces*, y *Phyllosticta*. En ambos sólo compartieron a *Talaromyces*, *Mucor*, *Alternaria*, *Stagonosporopsis* y *Phyllosticta*.

En hojas de *Vicia faba* (Lopez-Gonzalez *et al.*, 2017), de 758 aislamientos se logró la identificación de 66 géneros, donde los más representados fueron: *Fusarium*, *Curvularia*, *Phomopsis*, *Alternaria* y *Colletotrichum*. En otro estudio con la planta medicinal *Dendopranax arboreus*, se obtuvieron 45 aislamientos y lograron la identificación de hongos endofitos de 14 géneros los más representativos fueron *Alternaria*, *Corynespora*, *Diaporthe*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Glomerella* y *Thozetella* (Ramos Garza

---

*et al.*, 2016). En este sentido nuestros resultados coinciden ya que en papaya se logró la identificación de los géneros *Phomopsis*, *Fusarium*, *Colletotrichum* *Alternaria*, *Corynespora* y *Diaporthe*.

En este estudio se vio que la especie *Alternaria alstroemeriae*, fue predominante en el cultivo de papaya variedad Tainung N°01, y se encontró mayormente en Yucatán. Los resultados de la secuenciación arrojaron que cuatro morfotipos pertenecen a la misma secuencia. Mientras que *Mucor hiemalis* y *Stagonosporopsis lupini* fueron muy abundantes en hojas y flores en Yucatán. Mientras que en Campeche las especies dominantes fueron, *Corynespora torulosa*, *Psilocybe quebecensis*.

Interesantemente los hongos pertenecientes al género *Colletotrichum*, han sido encontrados en México como agentes causales de antracnosis, en fruto y órganos de papaya siendo los más comunes *Colletotrichum gloeosporioides*, *C.truncatum* (Syn. *C. capsicii*), *C. magnum* y (Torres Calzada *et al.*, 2013; Tapia Tussell *et al.*, 2008) y recientemente se describió *C. plurivorum*, afectando plantaciones del estado de Veracruz (García-Estrada *et al.*, 2019). Fue interesante la obtención de nuevas especies del género *Colletotrichum* en plantas de papaya asintomáticas, como *Colletotrichum gloeosporioides* con el 97 % de identidad y *Colletotrichum sichuanense* con el 99% de identidad. El género *Colletotrichum*, se encontró representado por cinco OTUS distintas, y se ha encontrado en otros estudios de hongos endófitos en hojas de plantas asintomáticas (Ramos Garza *et al.*, 2016; Kyun *et al.*, 2013, Orlandelli *et al.*, 2012). Lo que es acorde con la propuesta de ser un parásito oportunista, por lo que no es sorprendente encontrarlo asociado a plantas asintomáticas, pero una vez dadas las condiciones ambientales necesarias, puede causar infección (Kusary *et al.*, 2012).

En papaya existen dos reportes relacionados con hongos mucorales (Cruz-Lachica 2017; Cruz-Lachica 2018), donde se reportaron especies causantes de pudrición blanda en frutos de papaya, y especies con aplicaciones biotecnológicas agrícolas y médicas. En este trabajo se aislaron y caracterizaron 6 morfotipos de hongos endófitos que pertenecen a la especie de *Schizophyllum commune*, *Schizophyllum* sp. y *Psilocybe quebecensis*, aunque estos morfotipos desarrollaron características de los hongos mucorales, la literatura menciona que son hongos del suelo, comúnmente alucinógenos, y pueden colonizar plantas y árboles caídos, es causante de la podredumbre blanca (Ohm *et*

---

---

al.,2010). En los estudios de microcultivos realizados, estos morfotipos mostraron características microscópicas como desarrollo de estolones hinchados y largos y de esporangios globosos con esporangiosporas, propios de especies de hongos mucorales (Hartanti, 2015; Cruz-Lachica 2018). Por ello es importante se continúe haciendo trabajos de cultivo en conjunto con la secuenciación con otros genes, cuando no coincidan los datos morfológicos y de secuencia. Con lo anterior, existe la posibilidad de tener cinco especies nuevas de la colección de hongos endófitos en papaya variedad Tainung N°01.

En este trabajo los estudios se realizaron considerando el número de especies OTUs obtenida por sitio de muestreo, por órgano y por planta. Respecto al número de especies obtenidas por sitio de muestreo, y por órgano. En el presente análisis de diversidad se observó una mayor diversidad en Candelaria, Campeche con ( $H' = 3.43$ ) en el Sitio 1 donde se utiliza control biológico natural, comparado con el segundo sitio, Temozón, Yucatán con  $H' = 2.45$ . Aunque en Campeche la diversidad fue alta, el promedio indica que no hubo diferencias significativas, por su parte Varanda *et al.*, (2016). En su trabajo evaluaron las mismas condiciones y mencionan que tampoco obtuvieron diferencias significativas. En nuestro caso esto indica que aunque ambas comunidades fueron estadísticas similares esto se debe a la apertura del intervalo de confianza, siendo que para el sitio 1 el intervalo de confianza fue 0.31 y para el sitio 2 fue 0.17. No es tan drástica la diferencia en el margen de error.

Respecto a la dominancia, el sitio 1, la dominancia total fue del 75.47%, mientras que en el sitio 2 fue 67.11%. Las especies más dominantes en sitio 1, fueron *Corynespora torulosa*, *Penicillium* sp., *Moesziomyces* sp. y *Psilocybe quebecensis*, en el sitio 2 fueron *Alternaria alstroemeriae*, *Mucor hiemalis f. hiemalis*, y *Stagonosporopsis lupini*. En trabajo similar, en una plantación de Brasil, se estudió que la diversidad de hongos endófitos en hojas y raíces de *Glycine max*, obtuvieron mayor dominancia en raíces respecto a las hojas 0.297 y 2.123, (respectivamente). En nuestro caso, el promedio de la dominancia arrojó que el sitio 2 es más dominante respecto al sitio 1.

En este trabajo en ambos sitios de muestreo se identificó la diversidad de hongos endófitos en diferentes órganos de la planta, encontrándose una mayor diversidad en hojas seguida de flores en el sitio 1 (control biológico natural). Estos resultados confirman que la suspensión de agroquímicos promueve una mayor diversidad. De manera

---

---

interesante, se observó una mayor diversidad de hongos endófitos en las raíces del sitio 2, esto sugiere que la diversidad en raíces no se vio afectada por la aplicación de fungicidas. Resultados similares se encontraron en cultivos de fresa sujetos a la suspensión de fungicidas y aplicación de las mismas (Abdelfatt *et al.*, 2016), donde la mayor diversidad se vio en hojas, seguido de flores y mientras que con tratamiento con fungicidas se encontró una reducción de la diversidad en órganos aéreos pero no en las raíces. Por tanto se puede asumir que la diversidad de hongos endófitos en órganos aéreos está relacionada con el tipo de control utilizado en el cultivo (Abdelfatt *et al.*, 2016), así, la diversidad de hongos endófitos en órganos aéreos en Candelaria Campeche no está perturbada; mientras que en Temozón, Yucatán, donde emplea con regularidad control químico, la diversidad de los órganos aéreos se vio afectada por el constante uso de fungicidas, pero aparentemente no se afectan a las comunidades de hongos endófitos del suelo. También en su trabajo, Varanda *et al.*, 2016, menciona que la composición de las comunidades endófitas fúngicas, no mostraron diferencias significativas entre los cultivares, aunque si se observaron diferencias entre las comunidades fúngicas aisladas de plantas de *Vitis vinifera* L. cuando son tratadas con control biológico y con métodos convencionales de cultivo.

---

---

## CONCLUSIONES

De 474 aislamientos se logró la caracterización macroscópica de 101 morfotipos en ambos sitios de muestreo. Donde en Candelaria Campeche se obtuvo 353 aislamientos y 84 morfotipos (sitio con control biológico natural), mientras que en Temozón, Yucatán se identificó 121 aislamientos y 34 morfotipos (sitio con control con agroquímicos).

Mediante la caracterización molecular se logró de 87 secuencias de buena calidad, se logró la identificación a nivel especie de 64 morfotipos, clasificados en 56 OTUs diferentes, de estas se logró la identificación de 44 a nivel especie y 13 a nivel género. También de 5 nuevas especies.

Los géneros más predominantes fueron: en Campeche, *Colletotrichum*, *Talaromyces* y *Shizophyllum*, en Yucatán, los más comunes, *Fusarium*, *Meyerozyma*, *Aspergillus*, *Sporidiobolus* y *Stagonosporopsis*.

Los estudios de diversidad mostraron que Candelaria, Campeche, tuvo una mayor diversidad de especies, y mayor dominancia en órganos, siendo en hojas seguida de flores donde se vio mayor diversidad. Mientras que, en Temozón Yucatán la diversidad de especies fue menor y pero la mayor diversidad en órganos fueron en las raíces, seguidas de flores

El control biológico natural pareciera no tener efectos en la diversidad observada, mientras que, control con agroquímicos, afecta la diversidad de la comunidad de hongos endófitos en órganos aéreos, pero no pareciera afectar a las comunidades de hongos endófitos del suelo.

---

---

## PERSPECTIVAS

De la colección de hongos endófitos identificados en los diferentes órganos de papaya variedad Tainung N°01.

- Se pueden realizar la identificación de pigmentos de aquellas que producen pigmentos rojos, negros y verdes como las especies: *Talaromyces amestolkiae*, *Phyllosticta fallopiae* y *Trichoderma*, respectivamente.
- Se pueden realizar estudios de interacción de los hongos endófitos, y su capacidad antagonista contra hongos patógenos para mejoramiento del cultivo de papaya como las especies: *Candida railenensis*, *Aspergillus foetidus*, *Talaromyces purpleogenus* y dos hongos de tipo micorrizas *Trichoderma sp.*
- Evaluación de la actividad antimicrobiana de los endófitos, contra otros microorganismos bacterias, hongos, incluso vectores de enfermedades en plantas.
- Extracción de compuestos novedosos antibióticos, metabolitos secundarios de las especies *Schizophyllum commune*, *Phomopsis sp.*, *Diaporthe yunnanensis*.
- Se pueden utilizar como herramientas para dilucidar mecanismos en la interacción virus-hongo-planta (los micovirus).
- Se pueden hacer bibliotecas del genoma de los hongos endófitos que todavía no han sido secuenciados.
- Una biblioteca de la micobiota de los endófitos en papaya variedad Tainung N°01 comparándola con los hongos endófitos presentes en papaya Maradol.
- Se pueden hacer estudios con las micorrizas para solucionar problemas en el cultivo de papaya.
- De los hongos que no se lograron identificar a nivel especie, volver a secuenciar utilizando otros genes.
- Volver a realizar los microcultivos para estudiar a las especies que desarrollaron a especies de hongos mucorales

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdelfttah A., Wisniewski M., Li Destri Nicosia, M. G., Cacciola SO., Schena L. (2016) Metagenomic Analysis of Fungal Diversity on Strawberry Plants and the Effect of Management Practices on the Fungal Community Structure of Aerial Organs. PLoS ONE. 11(8) pp. 1-17.
- Aguirre-Acosta E., Ulloa M., Aguilar S., Cifuentes J.(2014) Biodiversidad de hongos en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. Supl. 85: s76-s81.
- Alarcón A., Ferrera-Cerrato R. (1999). Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. TerraLatinoam., 17. pp. 1979-1991
- Aly A. H., Debbab A., Proksch P. (2011) Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. Appl Microbiol Biotechnol 90: 1829-1845.
- Álvarez E. C., Claroz L., Loke, J.B., y Echeverry, C. (2001) Diversidad genética y patogénica de *Shaerotheca pannosa* var. *Rosae*, del hongo causante de Miledo Polvoso en la rosa en Colombia. Revista Asocolflores (Bogotá) N°.58 ,pp 36-44.
- Álvarez M., Ane and Nishijima T., Wayne (1987) Postharvest Diseases of papaya. The American Phytopathological society. Plant Disease. Vol. 71 N° 8. Pp.682-866.
- Ancona-Méndez, L., G. Cetz-Zapata y P. Garma-Baéz. 2010. Hongos. In La biodiversidad en Campeche. Estudio de estado, G. J. Villalobos-Zapata y J. Mendoza-Vega (coord.). Conabio, Gobierno del estado de Campeche, Universidad de Campeche, El Colegio de la Frontera Sur, México. p. 186-189.
- Arnold, A.E., (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. Fungal Biology. Rev. vol. 21, pp. 51-66.
- Aseri G.K., Jain N., Panwar J., Rao A.V., Meghwal P.R. (2008) Biofertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of *Pomegranate (Punicagranatum L.)* in Indian Thar Desert. Sci. Hortic., 117 pp. 130-135.
- Ávila Reséndiz C., Santamaría Fernández J, M., Alcaraz Meléndez I., Castro Hernández E., Luna Esquivel G., Soto Estrada A., Ramírez Galindo J. (2017). Capítulo 2.3

- 
- Red Papaya: Recolecta Caracterización y cultivo *in vitro* de diferentes accesiones de papayo (*Carica papaya* L.) en México. Situación Actual de la Industria papayera Santamaría Fernández J. M., López Ochoa L. A., Herrera Martínez G., impreso en Mérida Yucatán. Pag. 54-55.
- Azcón-Aguilar C., Barea J.M. (2000), Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials *Sci. Hortic.*, 68 (1997), pp. 1-24.
- Bacon C.W., White JF. Microbial endophytes. Dekker, New York, pp 341-388.
- Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98:426-438.
- Badotti, F., de Oliveira, F.S., Garcia, C.F., Martins Vaz A.B., Camargos Fonseca P.L., Alves Nahum L., Oliveira G., Góes-Neto A. (2017). Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of *Basidiomycota* (Fungi). *BMC Microbiology* 17:42.
- Bialek J.A., Jeger MJ. (1992). *Colletotrichum*: Biology, Pathology and control. Wallingford, UK: CAB international.
- Blackwell, M (2011), The fungi: 1, 2, 3, 5.1 million Species? *Am. Journal Botanical*. 98, pp 426-438.
- Bandara AR., Rapior S., Bhat DJ., Kakumyan P., Chamyuang S., Xu J., Hyde KD. (2015) *Polyporus umbellatus*, an edible-medicinal cultivated mushroom with multiple developed health-care products as food, medicine and cosmetics: A review. *Cryptogamie Mycologie* 36 (1): 3-42.
- Barve M.P., Haware M.P., Sainani M.N, Ranjekar P.K, Gupta V.S. (2001). Potential of microsatellites to distinguish four races of *Fusarium oxysporum* f.sp.ciceri prevalent in India. *Theoretical and Applied Genetics* 102:1 pp. 38-47.
- Barea J.M., Jeffries P. (1995), Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems A. Varma, B. Hock (Eds.), *Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 521-560.

- 
- Ben J.J. Lugtenberg, John R. Caradus, Linda J. Johnson, 2016. Fungal endophytes for sustainable crop production, FEMS Microbiology Ecology, Volume 92, Issue 12, 194, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw194>
- Berbe M.L., James T.Y., and Strullu Derrien C. (2017) Early Diverging Fungi: Diversity and impact at the Dawn of Terrestrial Life. Annual Review Microbiol Vol. 71 pp. 41-60.
- Bethlenfalvay G.J., Brown M.S., Ames R.N., Thomas R.S. (1988) Effects of drought on host and endophyte development in mycorrhizal soybeans in relation to water use and phosphate uptake. Physiol. Plant., 72 pp. 565-571.
- Bock C.H., Thrall P.H., Brubaker C.L., Burdon J.J. (2002). Detection of genetic variation in *Alternaria brassicicola* using AFLP fingerprinting. Mycol Research; 106: pp.428-34.
- Borowicz V.A. (2001), Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations?. Ecology, 82 pp. 3057-3068.
- Burkill IH (1966). A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula (2nd Edn), Malay Ministry of Agriculture and Co-operatives, Kuala Lumpur.
- Bradreddine I., Laitte C., Heux L., Skandalis N., Spanou Z., Martinez Y., Esquerré-Tugayé-M.T., Bulone V., Dumas B., Bottin A. (2008). Cell Wall Chitosaccharides are Essential Components and exposed Patterns of the Phytopathogenic Oomycete *Aphanomyces euteiches*. Eukaryotic cell. Pp.1980-1993.
- Brundett M. (2006) Comprender los roles de hongos multiformato micorrizales y endofíticos. En: Schulz B, Boyle C, Sieber TN (eds) Biología del suelo, vol 9: endófitos de raíz microbiana. Springer, Berlín, pp 281-298.
- Cardona C., Armendariz Hemes Y Barrera C. (2009) Estimación del área foliar de papaya (*Carica papaya*). Basada en muestreo no destructivo. Revista U.D.C. A. A, actualidad y divulgación científica 12 (1). pp 131-139.
- Campanile G., Ruscelli A., Luisi N. (2007). Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. European Journal of Plant Pathology 117: 237-246.

- 
- Camarinha-Silva A., Wos-Oxley M.L., Jáuregui R., Becker K., Pieper D.H (2012). Validating T-RFLP as a sensitive and high-throughput approach to assess bacterial diversity patterns in human anterior nares. *FEMS Microbiol Ecology*. 79(1): 98-108
- Cañejo Veronica y Ames Teresa. Manual de Laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos, Edición Cañejo V., Ames. (2004).
- Chamkhi I., Sabou L., Aurag J. (2018). Endophytic fungi isolated from *Crocus sativus* L. (Saffron). As a source of bioactive secondary metabolites. *Pharmacog J*. 10: (6). Pp. 1143-1148.
- Cheney SA, Lafranchi-Tristem NJ, Bourges D, Canning EU.(2001) Relationships of microsporidian genera, with emphasis on the polysporous genera, revealed by sequences of the largest subunit of RNA polymerase II (RPB1). *J Eukaryot Microbiol* 48: 111-117
- Cervone F., De Lorenzo G., Caprari C., Clark AJ., Desiderio A. (1993). The interaction between fungal endopolygalacturonase and plant cell wall PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). In *Mechanisms of Plant Defense Responses*, ed. B Fritig, M Legrand. Dordrecht: Kluwer pp. 64-7.
- Clay, K. Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69, 10-16 (1988)
- Crautlein M.V., Korpelainen H., Helander M., Ohberg A., Saikkonen K.( 2014). Development and characterization of nuclear microsatellite markers in the endophytic fungus *Epichloe festucae* (clavicipitaceae). *Applied Plant Science*.; 2 (12).
- Cruz-Lachica I., Marquez-Zequera I., Garcia-Estrada R. S., Carrillo –Fasio J. A., Leon-Felix, Allende- Malar R. (2017). Identification of mucoralean fungi causing soft rot in papaya (*Carica papaya* L.), fruit in Mexico. *Mexican Journal Phytopathology* 33 (3): 397-417.
- Cruz-Lachica, I., Marquez-Zequera, I., Allende-Molar, R., Sañudo-Barajas, J. A., Leon-Felix, J., Ley-Lopez, N., & Garcia-Estrada, R. S. (2018). Diversity of mucoralean

- 
- fungi in soils of papaya (*Carica papaya* L.) producing regions in Mexico. *Fungal biology*, 122(8), 810-816.
- Colwell RK. (2005) EstimateS: Estadistical stimation of species richness and Shared species from samples <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>.
- Conabio, 1998. La diversidad biológica de México: estudio de país, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. 341 p.
- Corand S., Schoch, Keith A.S., Sabine H., Vicent. R., John. L.S., C. Andre L., Wen Ch. and fungal. Barconding consortium (2012). Nuclear Ribosomal internal transcribed spacer (ITS), region as as universal DNA marker for fungi. *PNAS*. Volúmen 109. N°16 6241-6246.
- Cruz-Lachica I., Marquez-Zequera I., Garcia-Estrada R. S., Carrillo –Fasio J. A., Leon-Felix, Allende- Malar R. (2017). Identification of mucoralean fungi causing soft rot in papaya (*Carica papaya* L.), fruit in Mexico. *Mexican Journal Phytopathology* 33 (3): 397-417.
- Cuadros-Orellana S, Leite LR, Smith A, Medeiros JD, Badotti F, Fonseca PL, Vaz ABM, Oliveira G, Góes-Neto A.( 2013). Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review. *Fungal Genome Biology*. 2013;3:110.
- Da Silva, LL, Veloso, TGR, Manhaes, JHC (2020). The plant organs and rhizosphere determine the common bean mycobiome. *Braz Journal of Microbiology*.
- Dickie I.A., Bolstridge N., Cooper J.A., Peltzer D.A. (2010) Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi. *New Phytologist Journal* 187(2) pp.475-84.
- Diba K., Kordbacheh P., Mirhendi SH., Rezaie S., Mahmoudi M. (2007) Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. *Pakistan Journal of Medical Sciences* 23:867-872.
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*. 7, 547-552.

- 
- Durrant, W.E. & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *The Annual Review of Phytopathology*. 42, 185-209 .
- Esqueda, M., M. Coronado, A. Gutiérrez, R. Valenzuela, S. Chacón, R. L. Gilbertson. T. Herrera, M. Lizárraga, G. Moreno, E. Pérez-Silva y T. R. Van Devender. (2010). Hongos. In *Diversidad biológica de Sonora*, F. E. Molina-Freaner y T. R. Van Devender (eds.). UNAM, Conabio, México, D. F. p. 189-205
- Fauth, J. E., Bernardo, J., Camara, M., Resetarits, W.J. y Van Buskirk, J. (1996). Simplifying the jargon of community ecology: a conceptual approach. *The American Naturalist*, Vol. 147. pp. 282-286.
- Favaro LC, DL, Sebastianes FLDS, Araujo WL. (2012). A sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PLoS One* . *Epicoccum nigrum* P16, 7 (6): 36826.
- Feinsinger, P. (2004). El diseño de estudios de campo para la conservación de la biodiversidad. FAN , Santa Cruz de la Sierra.
- Fernandes, E. G., Pereira, O. L., da Silva, C. C., Bento, C. B. P., Queiroz, M. V. (2015). Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. *Microbiological research*, 181, 84-92.
- Fiore-Donno AM., Nikolaev SI., Nelson M., Pawlowski J., Cavalier-Smith T., Baldauf SL. (2010) Deep phylogeny and evolution of slime moulds (Mycetozoa). *Protist* 161:55-70.
- Fisher, J.B. (1980). The vegetative and reproductive structure of papaya ( *Carica papaya* ) *Lyonia*. 1:191-208.
- Font Quer, P. 1965. *Diccionario de botánica*. Editorial Labor S.A., Barcelona. pp. 182-183.
- Frisvad JC, Samson RA (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*- a guide to identification of food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins. *Stud Mycol* 49:1-173.

- 
- Frutis-Molina, I. y R. Valenzuela. (2009) Macromicetos. In La diversidad biológica del Estado de México. Estudio de estado, G. Ceballos, R. List, G. Garduño, R. López-Cano, M. J. Muñozcano-Quintanar, E. Collado y J. E. San Román (comps.). Gobierno del Estado de México, Biblioteca Mexiquense del Bicentenario, Toluca. pp. 243-249.
- Galagan J., Henn MR., Ma L.J., Cuomo C.A., Birren B. (2005). Genomics of the Fungal Kingdom: Insights into Eukaryotic Biology *Genome Res.*15:1620-631.
- García-Jiménez, J. y G. Guevara-Guerrero (2005). Macromicetos (Hongos Superiores) de Tamaulipas. In Biodiversidad Tamaulipeca, Vol. 1, L. Barrientos-Lozano, A. CorreaSandoval, J. V. Horta-Vega y J. García-Jiménez (eds.). Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria. Cd. Victoria. p. 67-79.
- Garrido, C., M. Carbú FJ. Fernandez-Acero, N. Boonham A. Colver J.M. Cantoral G. Budge (2009) Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutacum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathology*, 58 43-51.
- Geistlinger J., Zwanzig J., Heckendorff S., Schellenberg I. (2015). SSR Markers for *Trichoderma virens*: their evaluation and application to identify and quantify root-endophytic strains. *Diversity*.7: pp. 360-84.
- Gil, A. I., Miranda, D. (2005) Morfología de la flor y de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.): variedad Maradol e híbrido Tainung-1. *Agronomía Colombiana*, vol. 23, pp. 217-222.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Reviews. Phytopathol.* 43, pp. 205-227
- Gómez-Peralta, M. y V. M. Gómez-Reyes. (2005) Hongos y líquenes. In La biodiversidad en Michoacán. Estudio de estado, G. L. E. Villaseñor (ed.). Gobierno del Estado de Michoacán, Secretaría Urbanismo y Medio Ambiente, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia. p. 64-67.
- Guevara M., Urcia F., Casquero J. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio

- 
- para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2007. Serie de Normas Técnicas N.º 44.
- Guo L.D. (2010). Molecular diversity and identification of endophytic fungi. In: Gherbawy Y, Voigt K, editors. Molecular identification of fungi. Berlin: Springer. Pp. 277-96.
- Göhre, V. & Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. Annual Reviews. Phytopathol. 46, 189-215
- Guzmán, G., F. Ramírez-Guillén y P. Munguía. 2003. Introducción a la microbiota del estado de Veracruz (México). Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid 27:223-229.
- Haggag WM., Abdall AM. (2011). Foliar application of *Streptomyces aureofaciens* improve protection in Mango against post-harvest anthracnose and enhances fruit yield. Eur Journal Sciences. Research, 63:139-49.
- Hammer O, DAT Harper, PD Ryan (2001) Past: paquete de software de estadísticas paleontológicas para educación y análisis de datos Palaeontol de electrones, 4, pp. 1-9
- Harman, G. E. (2000). Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes in Perceptions Research on *Trichoderma harzianum* t-22, Plant Disease, 84:377- 393.
- Hartanti, A. T., Rahayu, G., and Hidayat, I. (2015). *Rhizopus* species from fresh tempeh collected from several regions in Indonesia. HAYATI Journal of Biosciences, 22(3), 136-142.
- Hartley S E., Gange A.C. (2009) Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. Annual Review of Entomology 54:323-342.
- Hawksworth D., Lücking R., (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species, pp. 79-95. In Heitman J, Howlett B, Crous P, Stukenbrock E, James T, Gow N (ed), The Fungal Kingdom. ASM Press, Washington, DC.

- 
- Heydari A., Pessaraki M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*. Vol.10 No.4 pp.273-290.
- Hernández-Montiel L. G., Rueda-Puente E. O., Córdoba-Matson M. V., Holguín-Peña J.R. Zulueta-Rodríguez R. (2013) Mutualistic interaction of rhizobacteria with arbuscular mycorrhizal fungi and its antagonistic effect on *Fusarium oxysporum* in *Carica papaya* seedlings. *Crop Protection*: 47 61-66
- Hibbet D.S., Binder M., Bischoff, J.F. Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson D.E, Huhndorf S., James T., Kirt P.M, Luking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzon F., Matheny P.B., McIlwghlin D.J. Vilgalys R., Aime C., Aptroot A., Bauver R., Begerow D., Benny G.L., Castlebury L.A Crous P.W., Dai Y.C., Garo W., Geiser D.M., Griffith G.W., Gueidan C., Hawksworth D.L., Hest Mark., G., Hosaka K., Humber R.A., Hyde K.D., Ironside J.E., Kuilalg U., Kartzman C.P., Larsson K.H., Lichtwardt R., Longcore. J., Mia J., Dlikowska., Miller A., Moncalvo JM., Muzley-Stagrigde S., Oberwinkler F., Parmato E., Reeb V., Roger J.D., Roox C., Ryvardeen L., Samparo J.P., Schubler A., Sugiyama V., Thor R.G., Tibell L., Unteriner W.A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M.M., Winka K., Yao Y.J., Zhan N. (2007). A Higher-level Phylogenetic Classification of the fungi Mycological research pp. 509-547.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts, *Plant Disease*, 87:pp 4-10.
- Hyde K.D., Nilsson R. H., Alias S.A., Ariyawansa H. A., Blair J. E. (2014) One Shop: Backbones trees form important Phytopathogenic genera: L., (2014). *Fungal Diversity* 67: pp. 121-125.
- Huang W., Cai Y., Hyde K., Corke H, Sun M. (2008) Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. 2008 [cited 2018 Feb 15]; Available from: <http://hub.hku.hk/handle/10722/60713>
- Jaen C.D., Becerril R.A.E., Colinas L.M.T., Santizo R.J.A. (1993), Crecimiento y producción de fresa inoculada con *Glomus mosseae*, asperjada con AG3 y fertilizada con NPK, *Agrociencia*, 31 pp. 165-169

- 
- Jimenez- Díaz J. A. Manual práctico de la papaya Hawaiana 1° edición-Guácimo, CR. EARTH. (2002). Pap. 108:il.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329
- Kaya C., Higgs D., Kirnak H., Tas I. (2003). Mycorrhizal colonization improves fruit yield and water use efficiency in watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) grown under well-watered and water-stressed conditions *Plant Soil*, 254, pp. 287-292.
- Kim Chang-Kyun., Eo Ju-Kyeong and Eom Ahn-Heum. (2013) Diversity and Seasonal Variation of Endophytic fungi Isolated from three Conifers in Mt. Taehwa, Korea. *Mycobiology*, the Korean Society of Mycology. 41(2): 82-85.
- Kirk, P. M., P. F. Canon, D. W. Minter y J. A. Stalpers (eds.). 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10 ed. International Mycological Institute, CAB International, Wallingford. 784 p.
- Kumar DSS, Hyde KD. (2004) Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity* 17:69-90.
- Kusari and Spiteller, 2012(a)., Kusari S., Spiteller M. Camptothecin: recent advances in plant endophyte research., L.R. Patro (Ed.), *Natural Resources Conservation and Management*, Manglam Publications, New Delhi, India (2012), pp. 1-32.
- Kusari and Spiteller, 2012 (b), Kusari S., Spiteller M. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities U. Roessner (Ed.), *Metabolomics*, InTech, Rijeka, Croatia (2012), pp. 241-266.
- Kusari S., Hertwerck C., Spiteller M. (2012), *Chemical Ecology of endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites*. *Chemistry & Biology* Vol. 19 pp. 792-798.
- Lane CR, Beales PA, Hughes KJD. *Fungal plant pathogens*. Wallingford: CAB International; 2012. p. 2012.
- Leake J., Johnson D., Donnelly D., Muckle G., Boddy L., Read D. (2004). Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant

- 
- communities and agroecosystem functioning, *Can. Journal of the Botanical.*, 82, pp. 1016-1030.
- Lange, L. (2010). The importance of fungi for a more sustainable future on our planet. *Fungal Biology Review.* 24:90-92.
- Liang Y., Guo LD., Ma., K.P., (2005) Population genetic structure of an ectomycorrhizal fungus *Amanita manginiana* in a subtropical forest over 2 year. *Micorriza.* 15 pp. 37-42
- Libkind, D. (2007). Evaluación de la técnica de MSP-PCR para caracterización molecular de aislamientos *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia Nororiental. *Revista Argentina de Microbiología* 39 133-137.
- Liesack W., Dunfield P.F, Spencer J, F.T., Ragout de Spencer A.L. (2004). T-RFLP analysis: a rapid fingerprinting method for studying diversity, structure, and dynamics of microbial communities. In: *Environmental microbiology: methods and protocols.* Methods in biotechnol. Totowa: Humana Press; pp. 23-37.
- Locey K.J., Lennon J.T. (2016), Scaling laws predict global microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: pp. 5970-5975.
- Lou J., and González-Oreja J. A., (2012) Midiendo la diversidad biológica: más allá del Índice de Shannon. *Acta zoológica lilloana.* Vol. 56 (1-2). Pp. 3-14.
- López L., Fuentes G., Santamaría M. J. (2017) Tema 1. Situación mundial de la industria papayera. Situación Actual de la Industria papayera Santamaría Fernández J. M., López Ochoa L. A., Herrera Martínez G., impreso en Mérida Yucatán. Centro de investigación científica de Yucatán A.C. pp 14-17.
- López-González R., Gomez-Cornelio S., De la Rosa-García S., Garrido E., Oropeza-Mariano O. Heil M., Partida-Martínez L.P.(2017) The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecology.* ELSEVIER vol. 26. pp 1-10

- 
- Marschner H., Dell B. (1994), Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil*, 159 pp. 89-102.
- Makus D.J. (2004). Mycorrhizal inoculation of tomato and onion transplants improves earliness. *Acta Hortic.*, 631 pp. 275-28
- Majer D., Mithen R., Lewis B.G, Vos P., Oliver R.P. (1996). The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol Research*, 100: 1107-1111.
- McLaughlin DJ., Frieders EM., Haisheng L. (1995) A microscopist's view of heterobasidiomycete phylogeny. *Studies in Mycology*. 38:91-109
- Maruchi A., Tornet Yoel., Ramos R., Farrés E., Rodríguez D. (2009). Evaluación de dos híbridos de papaya introducidos en Cuba. *Agronomía Costarricense* 33(2): 267-274.
- Millet Y.A., Danna C.H., N.K., Clay W., Songnuan M.D., Simon, D. Werck-Reichhart, Ausubel F.M. (2010). Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns *Plant Cell*, 22, pp. 973-990.
- Mittermeier, R. y C. Goettsch. (1992), La importancia de la diversidad biológica de México. In México ante los retos de la biodiversidad, Sarukhán J. y Dirzo R. (comps.) Conabio, México, D. F. pp. 63-73.
- Mishra V.K., Pasasari, A.K., Vinecth V.L., Sing B. P. (2017) Fungal Biology. Molecular markers in Mycology. Diagnostic and Marker Developments Springer. Chapper 1. Pp. 18-25.
- Ming R., Yu Q., Blas A., Chen C., Na JK., Moore P.H. (2008) Genomics of papaya, a common source of vitamins in the tropics. In: Moore PH, Ming R (eds) Genomics of tropical crop plants, vol 1. Springer Science+Business Media, New York, pp. 405-42.
- Morton J. (1987) Papaya (*Carica papaya* L.) Pp 336-346: Morton J.F(ed). Fruits of Warm climates creative Resorse systems Inc. Winterville USA pp:505

- 
- Muzzarelli RAA., Boudrant J., Meyer D. (2012) Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydr Polym* 87:995-1012.
- Nguyen, N. P., Warnow, T., Pop, M., & White, B. (2016). A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ biofilms and microbiomes*, 2, 16004
- O'Donnell K, et al. (2010) Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J. Clin Microbiol* 48:3708-3718.
- Orlandelli, R. C., Alberto, R. N., Rubin Filho, C. J., & Pamphile, J. A. (2012). Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. *Genet Mol Res*, 11(2), 1575-1585.
- Ohm, R. A., De Jong, J. F., Lugones, L. G., Aerts, A., Kothe, E., Stajich, J. E., ... & Bartholomew, K. A. (2010). Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nature biotechnology*, 28(9), 957.
- Pardavé-Díaz, L. M., L. Flores-Pardavé, V. Franco-Ruiz Esparza y M. Robledo-Cortés. 2007. Contribución al conocimiento de los hongos (macromicetos) de la Sierra Fría, Aguascalientes. *Investigación y Ciencias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 37:4-12.
- Petrini O. (1991) Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews JH, Hirano SS. (Eds) *Microbial ecology of leaves*. Springer, Verlag New York, pp 179-197.
- Petrini LE., Petrini O. (2013) Identifying moulds a practical guide. J. Cramer: VII (191):37.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5(5), pp. 308.
- Pozo M.J., C. Azcón-Aguilar, C. (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance *Current Opinion in Plant Biology*., 10 pp. 393-398

- 
- Ponton J., 2008. Revisión: La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Iberoam Micol.* 25 pp. 78-82
- Priti V, Ramesha B., Singh S, Ravikanth G., Ganeshiah K., Suryanarayanan T., Suryanarayanan and R. Uma S.(2009) How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites. *Curr Sci.* 2009; 97(4):477-478.
- Ramos-Garza J., Rodríguez-Tovar A.V., Flores-Cotera L.B., Rivera-Orduña F.N., Vásquez-Murrieta M.S., Ponce-Mendoza A. and Wang Tao (2016). Diversity of fungal endophytes from the medicinal plant *Dendropanax arboreus* in a protected area of Mexico *Annals of Microbiology.* Vol. 66(3), pp. 991-1002.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 80(3), 756-770.
- Rodríguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., and Redman, A. R. A. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, vol. 182(2), 314-330.
- Rodríguez R., Redman R., (2008) More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany.* 59:1109-1114.
- SAGARPA (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Papaya Mexicana. Ciudad de México, CP. 03310. pp. 1-16 [www.gob.mx/sagarpa](http://www.gob.mx/sagarpa).
- Samuels G.J., Pardo-Schultheiss R., Hebbard K.P., Lumsden R.D., Bastos C.N., Costa J.C., Bezerra J.L. (2000) *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research* 104: 760-764.
- Sangabriel-Conde, W., Trejo-Aguilar, D., Soto-Estrada, A., Alvarado-Castillo G. (2017). Diversity and functionality of arbuscular mycorrhizal fungi in carica papaya l., plantations with different agronomic management. *Agroproductividad.* Vol. 10, Núm. 9 pp: 90-94.
- Sañudo-Barajas J.A., Allende-Molar R., García- Estrada S.R., Osuna-Encino T. Carrillo-Fasio J.A., Báez Sañudo M. A. (2017). Situación Actual de la Industria papayera

- 
- Santamaría Fernández J. M., López Ochoa L. A., Herrera Martínez G., impreso en Mérida Yucatán. Centro de investigación científica de Yucatán A.C. Pag. 40-41.
- Sánchez-Fernández R. E., Sánchez Ortiz B. L., Sandoval Espinosa Y. K., Ulloa-Benítez., A., Armendáriz Guillen B., García Méndez C. M., Macías-Rubalcava M. L., (2013). Artículo Revisión. Hongos endófitos: puente potencial de metabolitos secundarios bioactivos en la agricultura y la medicina. 16 (2): pp132-146.
- Sánchez-Jácome, M. R. y L., Guzmán-Dávalos (2011). Hongos citados para Jalisco, II. Ibugana 16:25-6.
- Saucedo-García, A., Anaya, AL, Espinosa-García, FJ y González, MC (2014). Diversity and communities of endophytic leaf fungi of different agroecosystems of *Coffea arabica* L. in two regions of Veracruz, Mexico. *PloS one*,9 (6), e98454.
- Schulz, B., Boyle, C., (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research*. Vol. 109, pp. 661-686.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Fungal Barcoding Consortium. (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.
- Schoch CL, Robbertse B, Robert V, Vu D, Cardinali G, Irinyi L, Meyer W, Nilsson RH, Hughes K, Miller AN, Kirk PM, Abarenkov K, Aime MC, Ariyawansa HA, Bidartondo M, Boekhout T, Buyck B, Cai Q, Chen J, Crespo A, Crous PW, Damm U, De Beer ZW, Dentinger BT, Divakar PK, Dueñas M, Feau N, Fliegerova K, García MA, Ge ZW, Griffith GW, Groenewald JZ, Groenewald M, Grube M, Gryzenhout M, Gueidan C, Guo L, Hambleton S, Hamelin R, Hansen K, Hofstetter V, Hong SB, Houbraken J, Hyde KD, Inderbitzin P, Johnston PR., Karunarathna SC., Kõljalg U., Kovács GM, Kraichak E, Krizsan K., Kurtzman CP., Larsson KH, Leavitt S., Letcher PM, Liimatainen K, Liu JK, Lodge DJ, Luangsaard JJ., Lumbsch HT, Maharachchikumbura SS, Manamgoda D, Martín MP, Minnis AM, Moncalvo JM, Mulè G, Nakasone KK, Niskanen T, Olariaga I, Papp T., Petkovits T, Pino-Bodas R, Powell MJ, Raja HA, Redecker D, Sarmiento-Ramirez JM, Seifert KA, Shrestha

- 
- B, Stenroos S, Stielow B, Suh SO, Tanaka K, Tedersoo L, Telleria MT, Udayanga D., Untereiner WA., Diéguez Uribeondo J, Subbarao KV, Vágvölgyi C, Visagie C, Voigt K, Walker DM, Weir BS, Weib M., Wijayawardene NN., Wingfield MJ., Xu JP., Yang ZL., Zhang N., Zhuang WY., Federhen S. (2014) Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. Database.
- Scorzetti, G., J.W., Fell, A., Fonseca y A., Statezell-Talman (2002) Systematic of Basidiomycetous yeast: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. FEMS Yeast Research, 2, 495-517.
- Seifert KA, et al. (2007) Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. Proc Natl Acad Sci USA 104:3901- 3906.
- Shenoy BD., Jeewon R, Hyde KD (2007) Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. Fungal Divers 26:1-54
- Shubin L., Juan H., RenChao Z., ShiRu X., YuanXiao J. (2014). Fungal endophytes of alpinia officinarum rhizomes: insights on diversity and variation across growth years, growth sites, and the inner active chemical concentration. PLoS One. 9 (12):e115289.
- SIAP, 2017. SAGARPA, México. Consulta 15/11/2017
- <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257083/Potencial-Papaya.pdf>
- Sieber T.N., (2007) Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? Fungal Biological Reviews 21:75-89.
- Singh A.K., Bajpai A., Singh A. (2010). Classification of morphoagronomic variability in papaya for developing elite cultivar. Acta Horticulturae, 851: 137-144
- Singh, BP. (2015). Molecular markers used in fungal diversity analysis .On overview. In: Choudhury H, editor. Biology, biotechnology and sustainable development. Delhi: Research India Publication. Pp. 167-82.
- Subashini C., Jayasiri and D. Hyde K., Hiran A., Ariyawansa, Jayarama Bhat, BartBuyck., Lei Cai., Yu-Cheng D., Kamel A., Abd-Elsalam1., Damien E., Iman H., Rajesh

- 
- Jeewon., E. B. Gareth Jones., Ali H. Bahkali., Samantha C. Karunarathna., JianKui L., Luangsa-ard.,H. Thorsten Lumbsch., Sajeewa S. N. M., Eric H. C. McKenzie., Moncalvom Jean-Marc., Ghobad-Nejhad M. Nilsson H., Pang., Olinto L., Pereira A., Phillips J.L., Raspe O., Adam W. R., Romero A.I., Eyato ., Selcuk Faruk ., Stephenson S.L., Suetrong S., E.Taylor J., Clement K.M., Vizzini A., A. Abdel-Wahab M., Thing-Chi W., Boonmee S., Dong Qin Dai., Dinushani A. D., Asha J. Dissanayake A. H., Ekanayaka S.C Fryar, Ruvishika, S. Jayawardena, Perera R., Phookamsak R., De Silva N., Kasum M. T., Qing Tian., Nalin N. W., Rui-Lin Zhao., Qi Zhao., Ji-Chuan Kang., Itthayakorn P. ( 2015) The Faces of Fungi database: fungal names linked with morphology, phylogeny and human impacts. *Fungal Diversity*. Springer. Volume (74):3-18.
- Suarez-Quiroz M. L., Mendoza B.I., Monroy R. A., De la Cruz-Medina J., Angulo-Guerrero O., Gonzalez-Rios O. (2013) Aislamiento Indentificación y sensibilidad de antifúngicos de hongos fitopatógenos en papaya Cv. Maradol (*Carica Papaya* L.) *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha* 14: Pp. 115. 124
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 44:846-849
- Stephenson, SL. (2011) From morphological to molecular: studies of myxomycetes since the publication of the Martin and Alexopoulos monograph. *Fungal Divers* 50:21-34.
- Stirling Gray, and Brian Wilsey (2001). Empirical Relationships between Species Richness, Evenness, and Proportional Diversity. vol. 158: 3 the american naturalist. Pp. 1-14.
- Smith S.E., Read, D.J. (1997), *Mycorrhizal Symbiosis* (second ed.), Academic Press, London.
- Strack D., Fester T., Hause B., Schliemann W., Walter M.H. (2003), arbuscular micorrhiza:biologica,chemical, and molecular aspects biological, chemical, and molecular aspects *Journal of Chemical Ecology.*, 29 pp. 1955-1979.

- 
- Tanabe Y, Saikawa M, Watanabe MM, Sugiyama J. (2004) Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1alpha and RPB1 sequences: Limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Mol Phylogenet Evol* 30:438-449.
- Tapia-Tussell R., Quijano-Ramayo A., Cortes-Velazquez A., Lappe P., Larque-Saavedra A., Perez-Brito D. (2008) PCR-Based Detection and Characterization of the fungal Pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing Anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. *Molecular Biotechnology*. 40: 293-298.
- Tapia-Tussell R., Lappe P., Ulloa M., Quijano-Ramayo A., Cáceres- Farfan M., Larque-Saavedra A., Perez Brito D. (2006) A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology* 33, (1). pp. 67-70.
- Tejes vi.,MV, Kini KR., Prakash, HS., Subbiah V., Shetty HS.( 2007). Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Divers* 24: pp. 37-54.
- Teixeira da Silva J. A., Rashid Z., Tan-Nhut D., Silvakumar D., Gera A., Teixeira-Souza M., Tennant F. P., (2007). Papaya (*Carica papaya* L.) Biology and Biotechnology. Global science Book. Tree and Forestry science and Biotechnology 1(1). Pp 47-43
- Tiwari K and Chittora M. (2013). Assessment of genetic diversity and distribution of endophytic fungal communities of *Alternaria solani* isolates associated with the dominant Karanja plants in Sanganer Region of Rajasthan. *Springer Plus*. 2:313.
- Torres Calzada C., Tapia-Tussell R., Higuera-Ciapara, I., Huchin-Pot E., Martin-Mex R., Nexticapan-Garcez and Perez Brito D., (2018) Characterization of *Colletotrichum truncatum* from papaya,pepper and Physic nut based on phylogeny, morphology and pathogenicity. *Plant Pathology* (67) pp. 821-830.pp 821-830.
- Torres Calzada C., Tapia-Tussell R., Higuera-Ciapara, and Perez Brito D., (2013) Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica Papaya* L.) *Eur J. Plant Pathol* 135: pp. 67-79.

- 
- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Nexticapan-Garcez, A., Matin-Mex, R., Quijano-Ramayo, A., Cortés-Velázquez, A. and Perez-Brito, D. (2011). First report of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in *Jatropha curcas* in Yucatan, Mexico. *New Disease Reports*, 23(6), 2044-0588.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, et al. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:151 07-11.
- Trindade A.V., Siqueira J.O., Stürmer S.L. (2006) Arbuscular mycorrhizalfungi in papaya plantations of Espírito Santo and Bahia, Brazil *Braz. J. Microbiol.*, 37 pp. 283-289
- Valenzuela, R., J. García-Jiménez, T. Raymundo y C. I. SilvaBarrón. En prensa [a]. Los macromicetos de Querétaro. In *Historia natural del estado de Querétaro*, R. Jones y J. Malda (eds.). Conabio-UAQ.
- Valenzuela, R., T. Raymundo, M. Esqueda, J. García-Jiménez, F. Garza-Ocañas, R. Díaz-Moreno y M. Lizárraga. En prensa [b]. Los macrohongos de la Sierra Madre Occidental. Conabio-IPN.
- Van der Nest M.A., Steenkamp E.T., Wingfield B.D., Wingfield M.J. (2000) Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Eucalyptus* from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). *Plant Breed.* 119: 433-436.
- Van den Ackerveken GFJM., Dunn RM., Cozijnsen AJ., Vossen JPMJ., Van den Broek HWJ., De Wit PGM (1994). Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Gen. Genet.* 243: 277-278.
- Van Loon, L.C., Rep, M. & Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *The Annual Review of Phytopathology.* 44, 135–162.

- 
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *The Annual Review of Phytopathology*. 36, 453-483.
- Vazquez-Hernández M.V., Arévalo-Galarza L., Jaen-Contreras D., Escamilla-Garcia J.L., Mora-Aguilera A., Hernández-Castro E., Cibran-Tovar J., Teliz-Ortiz (2011). Effect of *Glomus mosseae* and *Entrophospora colombiana* on plant growth, production, and fruit quality of 'Maradol' papaya (*Carica papaya* L.) *Scientia Horticulturae* , 128 255-260.
- Vázquez-Mendoza, S. y R. Valenzuela-Garza. 2010. Macromicetos de la Sierra Norte del estado de Puebla, México. *Naturaleza y Desarrollo* 8:46-61
- Vega, F. E., Simpkins, A., Aime, M. C., Posada, F., Peterson, S. W., Rehner, S. A., and Arnold, A. E. (2010). Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology*, 3(3), 122-138.
- Veronico P., Gray LJ, Jones JT., Bazzclupo P., Arbucci S., Cortese MR., Di Vito M., De Giorgi C. (2001). Nematode Chitin synthases: gene structure, expression and function in *Caenorhabditis elegans* and the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *Molecular Genetics Genomics* 266 (1): 28-34.
- Ventura-Aires J., Do Santos Martins D., Fernandes R. A. A., Machado Fernandes P. M. (2017) Tema 1.2. La papaya de Brasil Producción y Mercado Santamaría Fernández J. M., López Ochoa L. A., Herrera Martínez G., impreso en Mérida Yucatán. Centro de investigación científica de Yucatán A.C. Pag. 24-26.
- Vilar Trindade A., Siqueira J.O., Sturmer L.S. (2006). Arbuscular Mycorrhizal fungi in papaya plantations of Espirito Santo and Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of microbiology* 37:283-289.
- Vu T., Hauschild R., Sikora RA. (2006). *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. *Nematology* 8: 847-852.

- 
- Whittaker, R. H. 1965. Dominance and diversity in land plant communities. *Science* (Washington, D.C.) 147:250-260.
- White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., and Taylor J. W.( 1990) Amplification and directsequencing of fungal ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18 (1). ResearchGate, pp. 315-322
- Yuridia-López, C., G. Guevara-Guerrero y J. I. Alonso Riverol. 2011. Hongos macromicetos. In *Riqueza biológica de Quintana Roo. Un análisis para su conservación*. Tomo 2, C. Pozo (ed.). El Colegio de la Frontera Sur, Conabio, Gobierno del estado de Quintana Roo y Programa de Pequeñas Donaciones (PFC), México, D. F. p. 24-29.
- Yogiraj, P., Goyal P.K., Chauhan C.S., Goyal A. Vyas B. (2014). *Carica papaya* Linn: An Overview. *International Journal of Herbal Medicine* 2 (5) pp. 01-08
- Zuccaro A., Lahrmann U., Güldener U., Langen G., Pfiffi S., Biedenkopf D., Wong P., Samans B., Grimm C., Basiewicz M. (2011). Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. *PLoS Pathog.*, (7), p. e100.

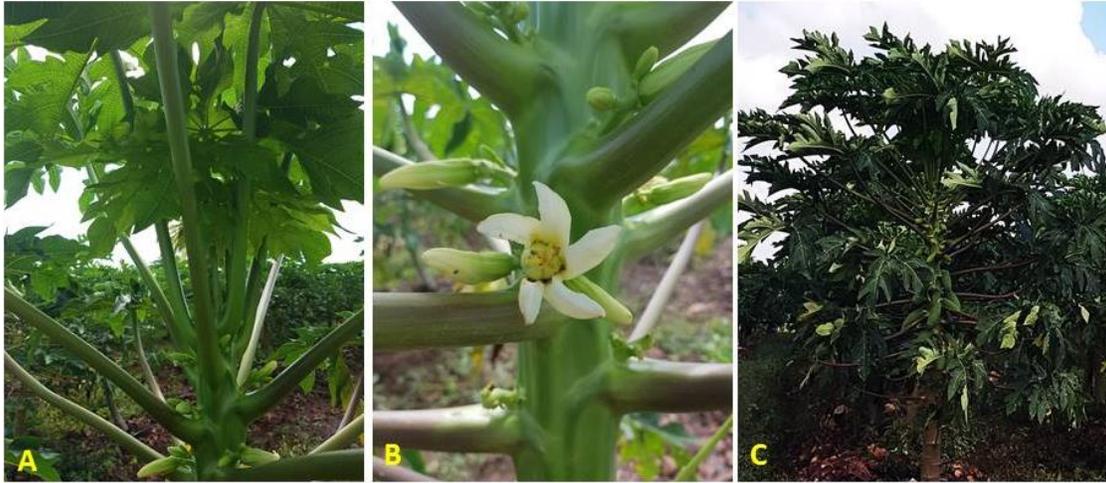
## ANEXOS

### Anexo 1. Materiales y métodos

**Cuadro.** Datos de georeferenciación de los dos sitios de muestreo

<b>Candelaria, Campeche</b>	<b>Temozón, Yucatán</b>
<b>Altitud:</b> 58 m	<b>Altitud:</b> 22 m
<b>Latitud:</b> 18.182778°	<b>Latitud:</b> 20.800200
<b>Longitud:</b> 91.04583°	<b>Longitud:</b> 88.20110°
<b>precipitación:</b> 90%	<b>precipitación:</b> 80%
<b>Uv:</b> 0	<b>Uv:</b> 11( Extremo)
<b>Temperatura :</b> 21°C-30°C	<b>Temperatura :</b> 21°C-34°C
<b>Presión:</b> 1014 mb	<b>Presión:</b> 1012 mb
<b>Humedad:</b> 85%	<b>Humedad:</b> 64%
<b>Tipo de suelo:</b> Vertisoles y Leptosoles	<b>Tipo de suelo:</b> Leptosoles y luvisoles
<b>Control biológico natural</b>	<b>Control químico</b>

## Anexo 2: Materiales y Métodos



**Figura 10.** Plantas jóvenes de papaya variedad Tainung N°1. **A)** Hojas intermedias, **B)** flores post-antesis, **C)** Planta con fruto inmaduro.



**Figura 11.** Plantación de papaya Tainung No. 1 (**A- B**) de un año, en Candelaria Campeche. Frutos maduros colectados de las 5 plantas seleccionadas (**C**).

### ANEXO 3: Características del muestreo de Yucatán



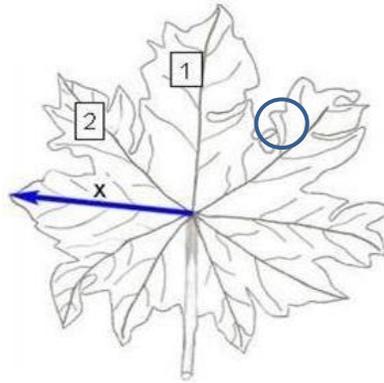
**Figura 35.** Plantas adultas muestreadas en Temozón, Yucatán. La **(A)** representa al lote 1 y el **(B)** al lote 2 muestreado.

### ANEXO 4: Estrategia de muestreo

#### Manipulación de las muestras colectadas

Para colecta se utilizaron bisturís número 3 y filos de bisturís número 23, guantes de látex y tijeras previamente desinfectadas, con etanol al 70% para asegurarnos de no tener contaminación cruzada, después las muestras se colocaron entre dos capas de papel secante previamente estériles, posteriormente los paquetes de cada muestra fueron colocados en bolsas de plástico, por último los paquetes se etiquetaron y se resguardaron en una nevera para su posterior procesamiento en el laboratorio del CICY

Para la colecta de las hojas, se seleccionó una hoja en posición media de cada planta (estado intermedio de madurez) y se tomaron secciones cuadradas de aproximadamente 8 cm<sup>2</sup> de los lóbulos superiores derecho e izquierdo. Así como fragmentos de nervaduras centrales en ambos lóbulos.



**Figura 36.** Esquema representativo de la zona del lóbulo de la hoja de papaya para la colecta 1). Lóbulo medio; 2) lóbulo izquierdo adyacente al lóbulo medio; x) nervadura central del lóbulo izquierdo Cardona *et al.*, (2009).

Se eligieron 3 flores post-antesis de cada planta de papaya, que fueron envueltas en una capa de papel secante para su resguardo en la nevera. También se seleccionaron tres frutos inmaduros, estas se colocaron en bolsas, se etiquetaron y se guardaron en neveras para su traslado en el laboratorio. Referente a los frutos inmaduros se seleccionaron todos en un mismo estadio de desarrollo de un mes aproximadamente. En el Lote **(1)** de plantas adultas se muestrearon 5 frutos maduros y fueron guardados en una caja para su traslado al laboratorio del CICY. También se colectaron muestras de raíces de plantas adultas de papaya en un lote distinto en una aproximación de 20 cm de la profundidad del suelo, con ayuda de un bisturí se tomaron 10 cm de las raíces cercanas a la rizósfera, estas muestras fueron tratadas con cuidado y se colocaron en papel secante.

En la segunda colecta se tomaron los mismos órganos referenciados en la primera colecta. Posteriormente estas muestras fueron etiquetadas y resguardadas por al menos una semana a 4° C. para su posterior procesamiento.

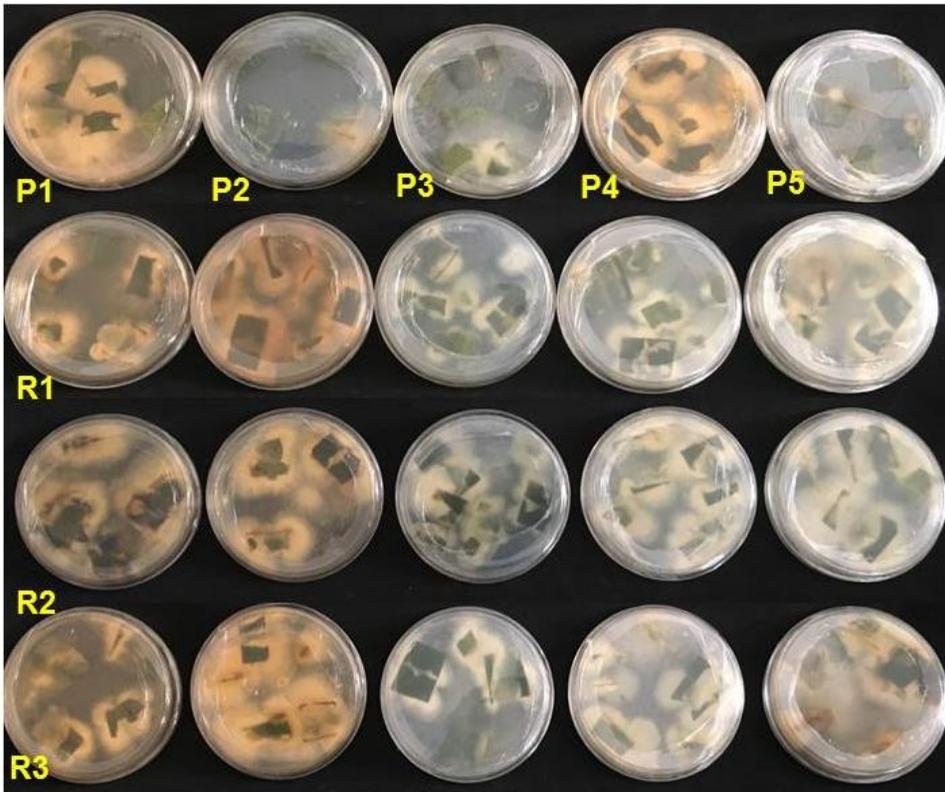
---

## **ANEXO 5: Materiales y métodos**

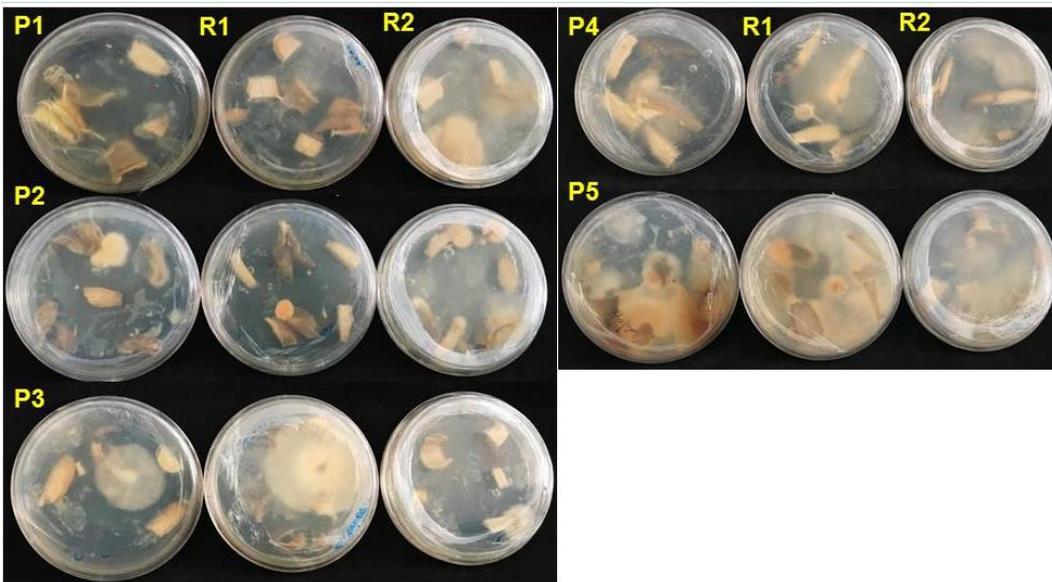
### **Proceso de aislamiento de hongos endófitos en papaya**

Los primeros acercamientos en el aislamiento de hongos endófitos de órganos de papaya. En las figuras **(37,38,39,40 y 41)**, se pueden visualizar los hongos endófitos a los 10 días después de la siembra en medio PDA a  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

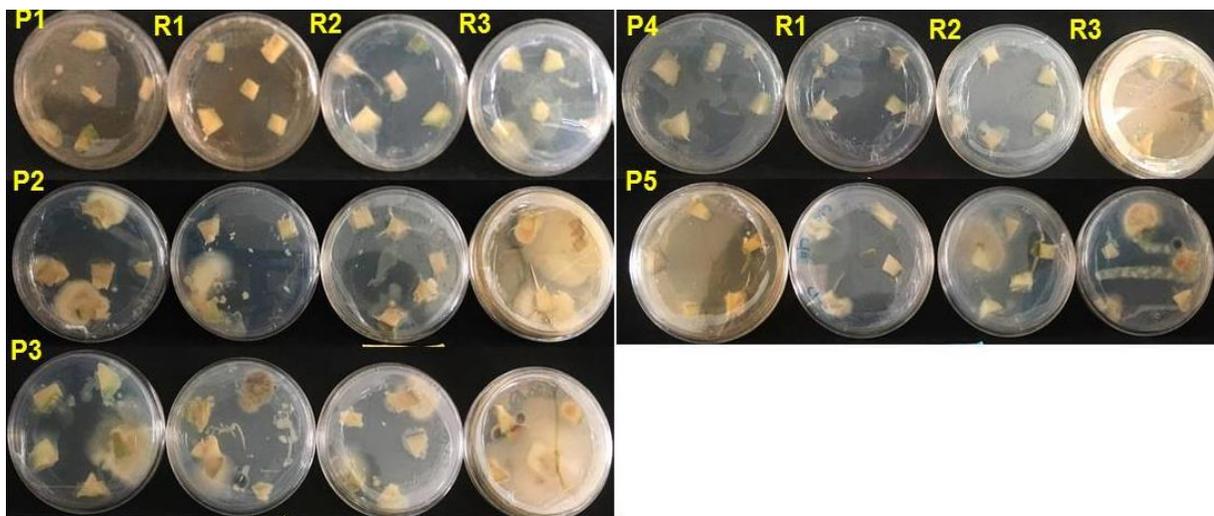
En secciones de hojas los hongos comenzaron a desarrollarse al tercer día de la siembra en el medio PDA, para el día 8 ya estaban desarrolladas las estructuras fungosas en la periferia de la hoja, en este órgano se vio más desarrollo de hongos a diferencia de los demás órganos. En fruto maduro se vio también que habían desarrollado más hongos endófitos, pero su crecimiento fue lento y fueron las mismas características en casi todas las placas, en flores se vio un crecimiento rápido alrededor de los órganos sembrados, de tipo algodonoso y en su mayoría de micelio blanco. En fruto inmaduro se observó lento crecimiento de las estructuras fungosas en los órganos sembrados, pero se observó una morfología en las distintas réplicas.



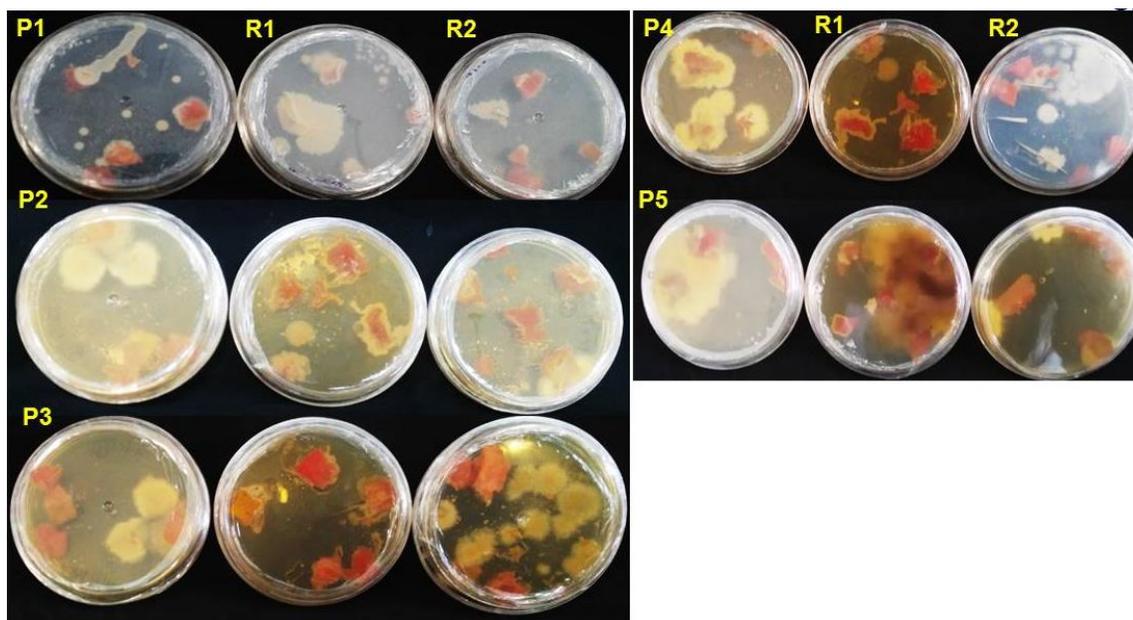
**Figura 37.** Aislamiento de hongos endófitos en muestras de hoja de papaya. **P1, P2, P3, P4,** y **P5.** Representan al número de plantas colectadas desde la planta 1 hasta la planta 5, y las **R1, R2** y **R3** son el número de réplicas por cada planta.



**Figura 38.** Aislamiento de hongos endófitos en flores post- antesis de papaya. **P1, P2, P3, P4,** y **P5.** Representan al número de plantas colectadas desde la planta 1 hasta la planta 5, y las **R1, R2** y **R3** son el número de réplicas por cada planta.

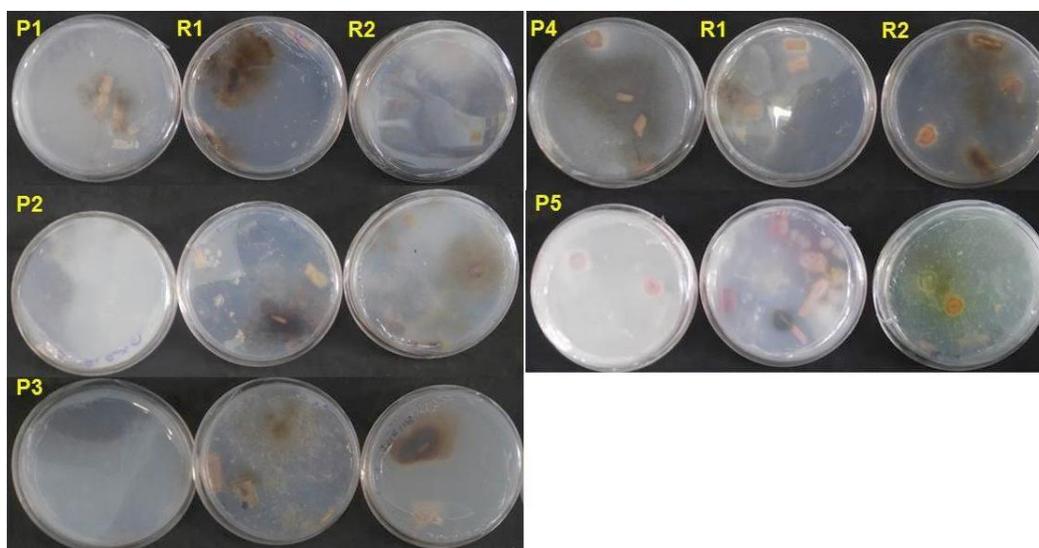


**Figura 39.** Aislamiento de hongos endófitos en fruto inmaduro de papaya. **P1, P2, P3, P4,** y **P5.** Representan al número de plantas colectadas (planta 1 hasta la planta 5), y las **R1, R2** y **R3** = número de réplicas por cada planta colectada. A 10 días después de la siembra en medio PDA.



**Figura 40.** Aislamiento de hongos endófitos en fruto maduro de papaya. **P1, P2, P3, P4,** y **P5.** Representan al número de plantas colectadas, de la planta 1 hasta la planta 5, y las (**R1, R2** y **R3**)

son el número de réplicas por cada planta que se colectó. A 10 días después de la siembra en medio PDA.



**Figura 41.** Aislamiento de hongos endófitos de raíces en plantas adultas de papaya. (P1, P2, P3, P4, y P5). Representan al número de plantas colectadas de la planta 1 hasta la planta 5, y las (R1, R2 y R3) son el número de réplicas por cada planta que se colectó. A 10 días después de la siembra en medio PDA.

#### Anexo 6: Materiales y métodos.

**Cuadro 18 .** Especificaciones de la reacción de PCR.

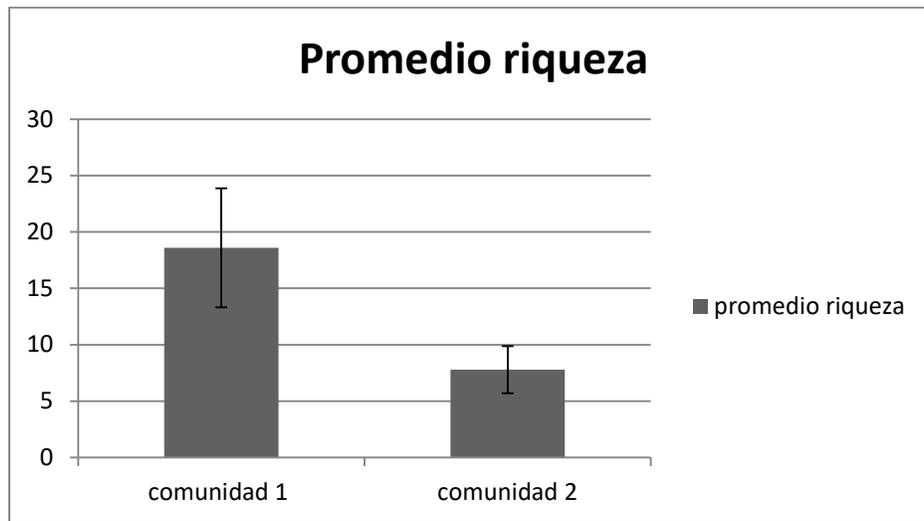
Reacción de PCR	1 reacción	1 reacción	34 Reacciones
Agua libre de nucleasas	10.875 $\mu$ L	31.75 $\mu$ L	1079.5
10X Dream Tal Buffer	2.5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	170 $\mu$ L
dNTP Mix, 10 Mm (NEBs)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	34 $\mu$ L
Cebador ITS1- 20 pmol/ $\mu$ L (Forward)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	34 $\mu$ L
Cebador ITS4 20 pmol/ $\mu$ L (Reverse)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	34 $\mu$ L
Templado de DNA	60 ng	60 ng	60 ng
Dream Tal DNA Polymerase	0.125 $\mu$ L	0.25 $\mu$ L	8.5 $\mu$ L

volumen final	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L	1360.0 $\mu$ L
---------------	------------	------------	----------------

### **Anexo 7. Estudios de la biodiversidad de hongos endófitos (Por morfotipos).**

Para los estudios de la diversidad de hongos endófitos presentes en los dos sitios de muestreo se procedió primero a la identificación de los diferentes morfotipos, una vez que se hayan registrado los datos de morfotipos únicos se elaboraron matrices de presencia-ausencia y matrices de abundancias de ambos sitios. Cabe mencionar que las matrices que más se usaron fueron las de abundancia porque son más prácticas de manejar y menos complejas a la hora de interpretar los datos. Para estos estudios de diversidad empleamos los diferentes morfotipos de 79 identificados en Campeche y 28 encontrados en Yucatán.

Una de las formas de estimación de la diversidad de manera simple, es la riqueza esta representa el número total de individuos presente en las muestras de una comunidad o más (Mayo de 1988; González-Oreja and Lou 2012). Respecto al estudio de la diversidad se obtuvo una riqueza (que indica el cálculo del número de individuos presentes en el sitio o comunidad de muestreo). De un total de **376** individuos únicos se obtuvo una riqueza en Candelaria, Campeche de **S=79** y en Temozón Yucatán de un total de **132** individuos únicos se registró una **S=28**, esto quiere decir que hay más riqueza en el sitio 1 en comparación del sitio 2. En la gráfica (**figura 42**) indica el promedio de la riqueza (**PS**) en la comunidad 1 es de **PS=18.6** y su intervalo de confianza (**IC**) del 95% es el **5.8**, para el sitio 2 tenemos que **PS=7.8** y su (**IC**) del 95% es el **2.9**, esto demuestra que el sitio 1 es más rico en morfotipos respecto al sitio 2, lo que también indica que no hay diferencias significativas en la riqueza de morfotipos aunque el promedio de la comunidad sea diferente al del sitio 2, la abertura del intervalo de confianza es significativamente similar al sitio 1.



**Figura 43.** Gráfica del promedio de la riqueza de morfotipos de los dos sitios de muestreo. La comunidad 1 representa a Candelaria Campeche y el sitio 2 a los morfotipos de Temozón Yucatán.

Una de las métricas para el análisis de la entropía dentro de las comunidades son índice de Simpson y su complemento. Esta métrica indica que tan frecuente es encontrar una especie o un morfotipo en cada muestra dentro de un sitio de muestreo. En nuestras poblaciones se mostró que el grado de incertidumbre de que un morfotipo sea encontrado en el sitio 1 fue de **0.02** mientras que su complemento fue **0.98** y **0.97** respectivamente para el sitio 2. El índice de Simpson mostró que en Temozón hay una alta probabilidad de encontrar un mismo morfotipo **0.03**, estos resultados concuerdan los obtenidos de la caracterización macroscópica donde se vio la incidencia de morfotipos encontrados en más de un órgano. Adicionalmente el índice de Simpson indica que Campeche es más diverso que el sitio 2. Pero la diferencia no es estadísticamente significativa en cuanto al sitio 1.

**Cuadro 19.** Resultados de la métrica del índice de Simpson y su complemento Sitio 1.

	Índice de Simpson	Complemento 1-D
Sitio 1. Candelaria	<b>0.02</b>	<b>0.98</b>
Sitio 2. Temozón	<b>0.03</b>	<b>0.97</b>

Otra métrica que mide la biodiversidad de especies en una o más comunidades es Shannon-Wiener. Esta métrica pondera valores en logaritmo natural y en base 10 para la estimación de la diversidad (González-Oreja and Lou 2012). Para este caso se empleó el programa Stimate 0.8 para computar la información de ambas poblaciones, posteriormente se analizan en formatos de Excel. Para los análisis de la diversidad se utilizaron las matrices de abundancias de los sitios de muestreo.

En Candelaria Campeche de 79 morfotipos con características únicas la diversidad total del sitio fue  $H' = 4.17$  y la diversidad máxima alcanzada fue de  $H' \text{ Max} = 4.37$ , en comparación con el sitio 2 de Temozón Yucatán con un  $H' = 3.25$ ,

La diversidad máxima alcanzada fue de  $H' \text{ Max} = 3.33$ . Estos resultados de la comparación de la entropía de las dos poblaciones indican que la diversidad más alta se registró en Campeche. Pero los resultados de la diversidad utilizando ambos logaritmos (logaritmo natural y el de base 10) (**cuadro 20** y **cuadro 21**). El cálculo del índice de Shannon-Wiener nos permite medir la equidad de especies en nuestro caso de los diferentes morfotipos. Podemos ver (**cuadro 20** y **cuadro 21**) que el valor máximo de la diversidad de Shannon-Wiener, es la equidad. Este tipo de análisis me indica que la comunidad 2 es más equitativa que la comunidad 1 por presentar un valor de  $JH=98$  en comparación del valor  $HJ=96$ , cabe mencionar que una comunidad es equitativa cuando las especies encontradas son más comunes (González-Oreja and Lou 2012) en nuestro caso en Temozón obtuvimos que la mayoría de los morfotipos fueron encontrados en más de un órgano y concuerda con la equidad de morfotipos de ese sitio.

**Cuadro 20.** Índice de Shannon-Wiener del sitio 1: Candelaria Campeche.

	Sitio 1: Candelaria Campeche	
Índice Shannon-Wiener	diversidad LOG natural	diversidad base 10
$H'$	4.17	1.81
$H' \text{ Max}$	4.37	1.90
Equidad ( $JH'$ )	0.96	0.96

**Cuadro 21.** Índice de Shannon-Wiener del sitio 2: Temozón Yucatán

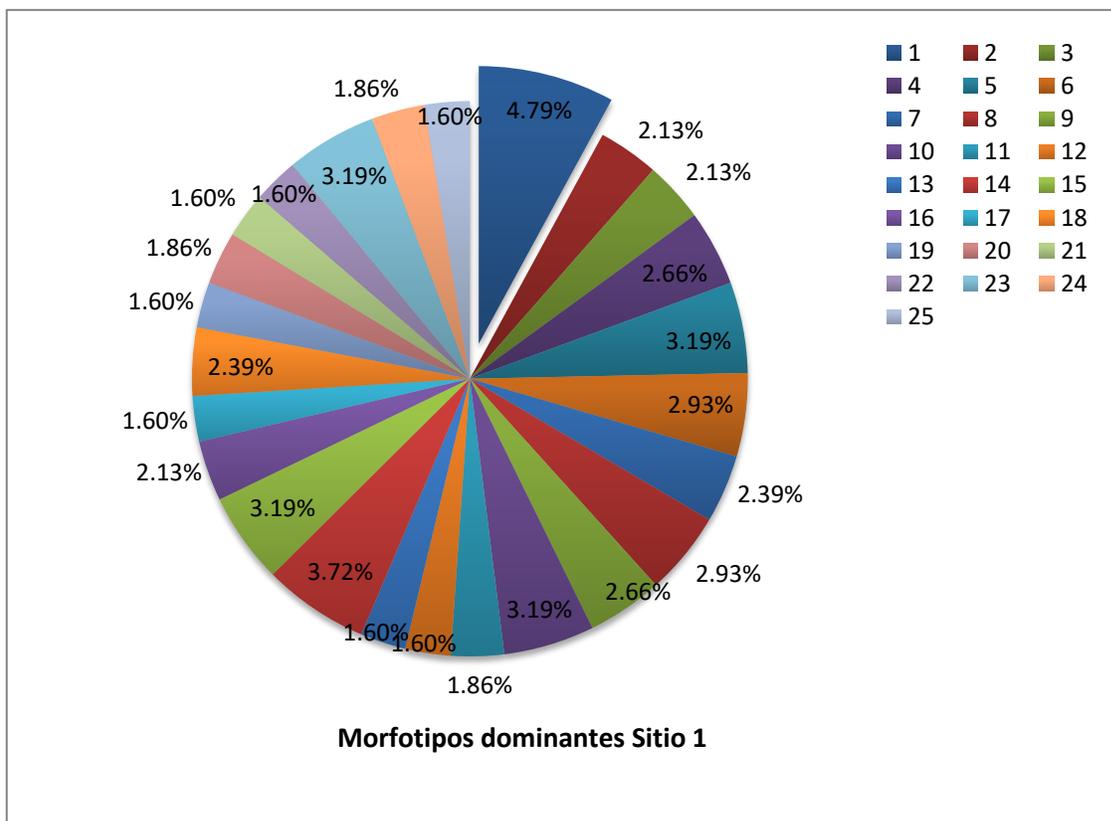
Sitio 2:Temozón Yucatán		
Índice Shannon-Wiener	diversidad LOG natural	diversidad base 10
H'	3.25	1.41
H' Max	3.33	1.45
Equidad (JH')	0.98	0.98

La dominancia se refiere al índice de frecuencia de especies dentro de una comunidad. Se identificó al morfotipo que mayor dominancia presentó en el muestreo (**cuadro 22**). El **60.37%** fueron morfotipos dominantes en el sitio 1, el morfotipo **M-15** fue el más representativo con el **4.79%** (**figura 44**). Los morfotipos no dominantes representaron el **39.63%**.

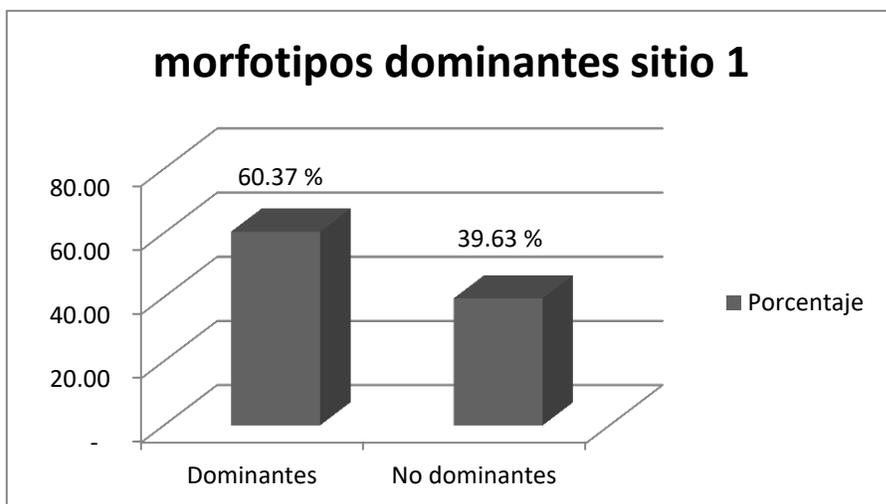
**Cuadro 22.** Morfotipos dominantes de Candelaria Campeche.

			Morfotipos dominantes	
			MAX ni/ N	% de Dominancia
1	<b>M-18</b>	<b>Dom</b>	0.04787234	4.79
2	<b>M-2</b>	<b>Dom</b>	0.021276596	2.13
3	<b>M-4</b>	<b>Dom</b>	0.021276596	2.13
4	<b>M-5</b>	<b>Dom</b>	0.026595745	2.66
5	<b>M-6</b>	<b>Dom</b>	0.031914894	3.19
6	<b>M-7</b>	<b>Dom</b>	0.029255319	2.93
7	<b>M-8</b>	<b>Dom</b>	0.02393617	2.39
8	<b>M-9</b>	<b>Dom</b>	0.029255319	2.93
9	<b>M10-C</b>	<b>Dom</b>	0.026595745	2.66
10	<b>M-18</b>	<b>Dom</b>	0.031914894	3.19

11	M-25	Dom	0.018617021	1.86
12	M-37-C	Dom	0.015957447	1.60
13	M-39	Dom	0.015957447	1.60
14	M-42	Dom	0.037234043	3.72
15	M-45	Dom	0.031914894	3.19
16	M-43	Dom	0.021276596	2.13
17	M-46	Dom	0.015957447	1.60
18	M-50	Dom	0.02393617	2.39
19	M-51	Dom	0.015957447	1.60
20	M-23-F	Dom	0.018617021	1.86
21	M-54	Dom	0.015957447	1.60
22	M-55	Dom	0.015957447	1.60
23	M-60-TRI	Dom	0.031914894	3.19
24	M-68	Dom	0.018617021	1.86
25	M-59	Dom	0.015957447	1.60
			<b>Dominantes</b>	<b>60.37</b>
			<b>No dominantes</b>	<b>39.63</b>



**Figura 44.** Gráfico de morfotipos dominantes del **sitio 1: candelaria Campeche**. El **M-15** está representado por el **(4.79%)** como el más dominante del sitio de colecta.



**Figura 45.** Gráfico del porcentaje de dominancia de los morfotipos de Candelaria, Campeche.

En comparación con el sitio 2, vemos que los morfotipos dominantes fueron 10 (**cuadro 23**) de los cuales están representados por el **51.22%**, y el morfotipo más dominante fue **M-73** con **6.82%**. Respecto a los morfotipos menos dominantes representaron el **48.48%** (**Figura 45 y 46**).

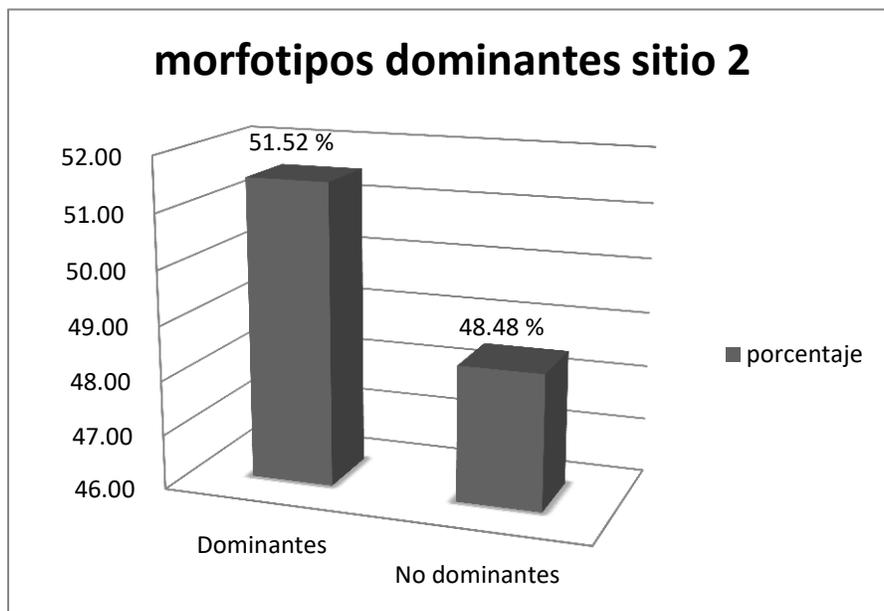
**Cuadro 23.** Morfotipos dominantes de Temozón Yucatán.

			MAX ni/ N	% de Dominancia
1	<b>M-71</b>	Dom	<b>0.053030303</b>	<b>5.30</b>
2	<b>M-72</b>	Dom	<b>0.045454545</b>	<b>4.55</b>
3	<b>M-73</b>	Dom	<b>0.068181818</b>	<b>6.82</b>
4	<b>M-74</b>	Dom	<b>0.060606061</b>	<b>6.06</b>
5	<b>M-55</b>	Dom	<b>0.045454545</b>	<b>4.55</b>
6	<b>M-58</b>	Dom	<b>0.045454545</b>	<b>4.55</b>
7	<b>M-78</b>	Dom	<b>0.045454545</b>	<b>4.55</b>
8	<b>M-80-TRI</b>	Dom	<b>0.045454545</b>	<b>4.55</b>
9	<b>M-82</b>	Dom	<b>0.060606061</b>	<b>6.06</b>
10	<b>M-82-A</b>	Dom	<b>0.045454545</b>	<b>4.55</b>

Dominantes	51.52
No dominantes	48.48



Figura 45. Gráfico de dominancia de los morfotipos del sitio 2: Temozón, Yucatán.



---

---

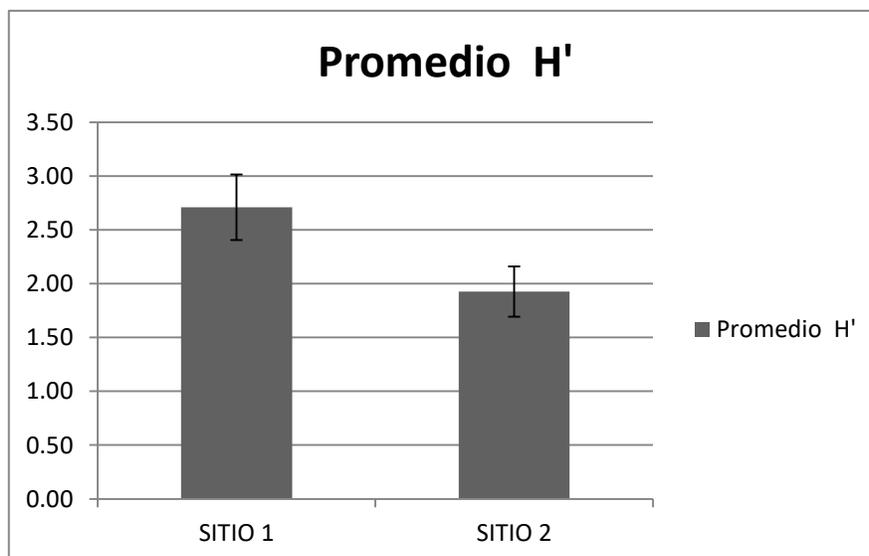
**Figura 46.** Gráfico del porcentaje de dominancia de los morfotipos de Temozón, Yucatán

### 3.9.1 Estudio de la diversidad de morfotipos por órganos

Para saber que sitio fue más diverso, se hicieron las mismas métricas de diversidad pero por muestras (órganos) para identificar la dominancia, la equidad y la diversidad de Shannon-Wiener. Para ello se realizaron los cálculos, se computaron en Stimate 9.1, y se graficaron en Excel. En Candelaria Campeche tenemos que el promedio de la diversidad de Shannon-Wiener indica que el sitio 1 es más diverso en los diferentes órganos con un valor de  $PH' = 2.71$  y con un intervalo de confianza del 95% (**IC**) = **0.30**, respecto al sitio 2 tiene un  $PH' = 1.93$  y su (**IC**) **0.23** (**cuadro 12**). Estos valores indican que la diversidad de ambos sitios de muestreo no hay diferencias significativas, aunque el promedio sea más en el sitio 1 a diferencia del sitio 2. Aunque los intervalos de confianza este solapados, esto significa que el promedio del sitio 1 incluye al promedio del sitio 2. Como lo muestra la gráfica en la (**figura 47**).

**Cuadro 23.** Promedio de la diversidad de Shannon-Wiener en ambos sitios de estudio.

	Promedio H'	95%IC
SITIO 1	2.71	0.30
SITIO 2	1.93	0.23



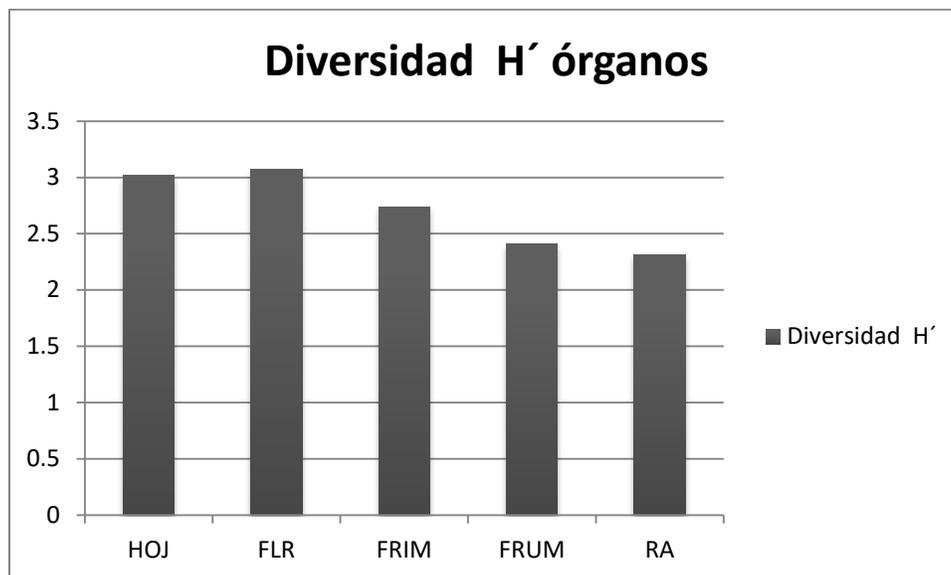
---

**Figura 48.** Gráfico del promedio de la diversidad de ambos sitios de muestreo sitio 1: Candelaria Campeche y sitio 2: Temozón, Yucatán.

Para la estimación de la diversidad por órganos de ambos sitio vemos que en Campeche se vio más diversidad en órganos de flores con  $H' = 3.07$ , seguido de hojas con  $H' = 3.02$ , fruto inmaduro con  $H' = 2.74$ , fruto maduro con  $H' = 2.41$  y raíces con  $H' = 2.31$  de diversidad encontrada (**cuadro 23 y figura 48**).

**Cuadro 24.** Diversidad de Shannon-Wiener en órganos del sitio 1.

<b>SITIO 1:Candelaria Campeche</b>	<b>H' Órganos</b>
<b>HOJ</b>	3.02
<b>FLR</b>	3.07
<b>FRIM</b>	2.74
<b>FRUM</b>	2.41
<b>RA</b>	2.31

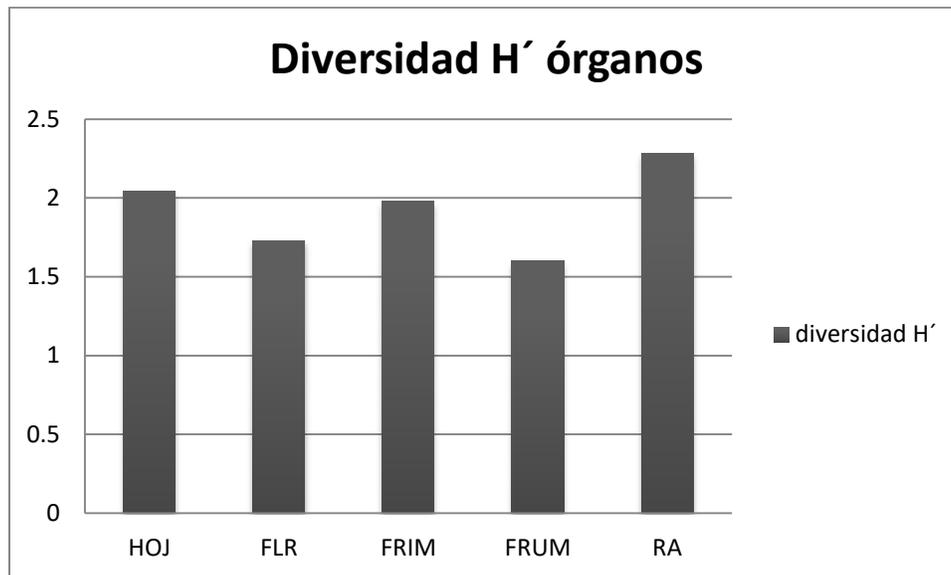


**Figura 49** Gráfico de la diversidad de Shannon-Wiener en órganos del sitio 1: Candelaria Campeche.

Respecto a la diversidad de órganos en el sitio 2: Temozón Yucatán, tenemos que la mayor diversidad se vio en raíces  $H' = 2.28$ , seguido de hojas con  $H' = 2.04$ , fruto inmaduro con  $H' = 1.98$ , y el órgano que presentó menos diversidad fue fruto maduro con  $H' = 1.60$  (cuadro 25 y figura 50).

**Cuadro 25.** Diversidad de Shannon-Wiener en órganos del sitio 2.

SITIO 2: Temozón Yucatán	H' Órganos
HOJ	2.04
FLR	1.73
FRIM	1.98
FRUM	1.60
RA	2.28

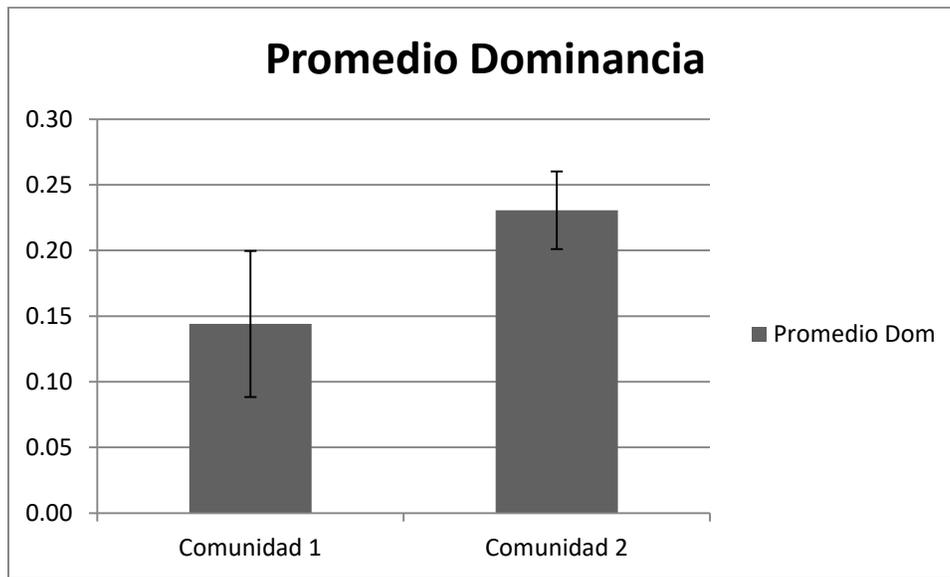


**Figura 50.** Gráfico de la diversidad de Shannon-Wiener en órganos del sitio 2: Temozón, Yucatán.

Por último se tiene que el promedio de la dominancia es mayor en Temozón con  $pD= 0.231$ , a diferencia Candelaria con  $pD= 0.14$ , no es el mismo valor que la dominancia de las muestras. Este valor engloba a todos los morfotipos dominantes pero en relación a su promedio y al intervalo de confianza para las muestras. Esto indica que la dominancia del sitio 1 fue inferior a la dominancia del sitio 2, y los intervalos de confianza se solapan, por tanto no existe diferencias significativas entre los valores de dominancia para ambos sitios.

**Cuadro 26.** Promedio de la dominancia en ambos sitios de estudio.

	Promedio Dom	95%IC
sitio 1:Candelaria, Camp	0.14	0.06
Sitio 2: Temozón, Yuc	0.231	0.03



**Figura 51.** Gráfico del promedio de dominancia de ambos sitios de muestreo sitio 1: Candelaria Campeche y sitio 2: Temozón, Yucatán.