

Identificación de las especies cultivables de hongos endófitos asociados a cladodios de *Opuntia elatior* (Cactaceae) silvestres del municipio de Santafé de Antioquia, Antioquia, Colombia

Identification of cultivable species of endophyte fungi associated with cladodes of *Opuntia elatior* (Cactaceae) in Santafé de Antioquia, Colombia

Yurani Caicedo Chalapud*, Marisol Pérez Barrientos*; Aída Ma Vasco Palacios†.

Grupo Microbiología Ambiental, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia

Resumen

Introducción: Los hongos endófitos que se encuentran en los cladodios de cactus *Opuntia elatior* han sido poco estudiados y representan una posible fuente importante de metabolitos con diversas aplicaciones, por lo que su aislamiento permitirá el establecimiento de un cepario para futuros estudios biotecnológicos.

Objetivos: Identificar las especies cultivables de hongos endófitos asociados a cladodios de *Opuntia elatior* en el municipio de Santa fe de Antioquia con el fin de establecer un cepario para la futura exploración de su potencial biotecnológico.

Métodos: Obtención de colonias de hongos aisladas y puras, para extracción de ADN y posterior identificación molecular, mediante el estudio de la región espaciador transcrito interno (ITS, del inglés).

Resultados: Se encontraron 41 cepas de hongos endófitos asociados a cladodios de cactus *Opuntia elatior* correspondientes a 31 morfotipos diferentes, y se lograron identificar 11 a nivel de especie y 1 a nivel de género, conformando una colección de referencia.

Conclusión: Algunas de las especies identificadas fueron reportadas por primera vez para el país en este estudio y otras se reportaron por primera vez como endófitas para *Opuntia*. Se determinó que las especies identificadas poseen usos biotecnológicos que aún no se han desarrollado en Colombia y se recomienda realizar estudios posteriores sobre estos hongos para la exploración y desarrollo de su potencial biotecnológico que permitan promover el desarrollo de la bioeconomía en Colombia.

Para los morfotipos no identificados en el presente estudio, se sugiere en estudios futuros el uso de genes diferentes a las regiones ITS del rDNA.

Palabras clave: biotecnología, cactus, Colombia, hongos endófitos, nuevos registros, Santa Fe de Antioquia.

ABSTRACT

Introduction: The endophytic fungi found in the *Opuntia elatior* cactus cladodes have been little studied and represent a possible important source of metabolites with various applications, so their isolation will allow the establishment of a strain collection for future studies with biotechnological applications.

Objectives: To identify the cultivable species of endophytic fungi associated with cladodes of *Opuntia elatior* in the municipality of Santa Fe de Antioquia in order to establish a strain collection for the future exploration of its biotechnological potential.

Methods: Obtaining isolated and pure fungal colonies for DNA extraction and subsequent molecular identification, by studying the internal transcribed spacer (ITS) region.

Results: 41 strains of endophytic fungi associated with *Opuntia elatior* cactus cladodes corresponding to 31 different morphotypes were found, and 11 were identified at the species level and 1 at the genus level, forming a reference collection.

Conclusion: Some of the identified species were reported for the first time for the country in this study and others were reported for the

first time as endophytes for *Opuntia*. It was determined that the identified species have biotechnological uses that have not yet been developed in Colombia and further studies on these fungi are recommended for the exploration and development of their biotechnological potential to promote the development of the bioeconomy in Colombia. For the morphotypes not identified in the present study, the use of genes other than the ITS regions of the rDNA is suggested in future studies.

Keywords: biotechnology, cactus, Colombia, endophytic fungi, new records, Santa Fe de Antioquia.

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país que cuenta con una amplia variedad de climas, entre los que destacan el clima tropical de estepa o tropical de desierto, donde se alcanzan temperaturas mayores a los 25°C¹. En las zonas que presentan estos climas la vegetación más representativa es el bosque seco tropical y el monte espinoso tropical; que se caracterizan por la baja disponibilidad de agua debido a la baja precipitación y a los altos niveles de

radiación solar incidente durante todo el año. La flora es escasa, baja y dispersa; y está conformada principalmente por estepas o hierbas bajas, arbustos aislados y plantas espinosas como cactus y matorrales².

Los cactus son componentes clave de este tipo de ecosistemas y son fundamentales para la supervivencia de muchas especies animales ya que tienen la capacidad de almacenar agua en sus raíces y tallos bajo condiciones de xerofilia³, proporcionando una fuente de agua y alimento para muchas especies y manteniendo así el equilibrio del ecosistema. Muchas especies de cactus son ampliamente utilizadas por el ser humano en actividades como el comercio hortícola, la alimentación y en aplicaciones medicinales⁴. El género *Opuntia* se distribuye prácticamente en todo el continente americano, existen evidencias de uso desde tiempos prehispánicos y se ha determinado su importancia en la industria alimentaria y farmacológica, entre los cuales se encuentran la fabricación de productos como jugos, conservas, bebidas alcohólicas y pigmentos naturales como betalaínas que presentan efectos antioxidantes, anticancerígenos y antimicrobianos, e incluso se ha descrito que el consumo de los cladodios de *Opuntia* favorece la disminución de colesterol, triglicéridos e hipoglucemia⁵.

Se ha observado que plantas del género *Opuntia* tienen una resistencia muy alta a soportar largos periodos de sequía, incluso más que otras plantas de sistemas xerofíticos, lo que les da una ventaja biológica con respecto al cambio climático y esta característica las convierte en un elemento indispensable para los ecosistemas y, por ende, un objeto de conservación. El almacenamiento de agua en estos cactus se da en los cladodios, tallos modificados, aplanados, que cumple las funciones de una hoja⁶.

Varias especies de cactus establecen relaciones con hongos endófitos. Los hongos endófitos habitan en las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad, incluso se han descrito como protectores contra el ataque de otros organismos ya que pueden producir fitohormonas, enzimas y otros compuestos químicos, lo que brinda ventajas para la planta huésped⁷. Se ha demostrado, que los hongos endófitos ayudan al cactus a superar el estrés biótico y abiótico mediante la producción de metabolitos bioactivos secundarios. Estos hongos toman nutrientes y protección de la planta hospedera y en retribución a esta, desempeñan un papel mutualista, aumentando su tolerancia al estrés y brindándole resistencia y protección contra herbívoros, microorganismos fitopatógenos y en algunos casos, especies entomopatógenas⁸. Los hongos producen

enzimas hidrolíticas extracelulares como parte de su mecanismo de resistencia para superar las defensas del huésped contra la invasión microbiana y/o para obtener nutrientes del suelo. Estas enzimas incluyen pectinasas, esterasas, celulasas, lipasas, proteasas y xilanasas⁹. Además de ayudar a superar el estrés de las plantas, los hongos endófitos tienen un gran potencial biotecnológico en la producción de enzimas, como agentes promotores del crecimiento de plantas, en la biorremediación, la biotransformación y en los ciclos de nutrientes por lo que pueden ser aplicados en la industria agrícola, farmacéutica y medicinal^{7,8,9}. Se ha demostrado que algunos de los compuestos aislados a partir de hongos endófitos tienen actividad antibacteriana, insecticida y anticancerígena, entre otras. Entre las especies de hongos endófitos más comunes encontrados en *Opuntia* se encuentran *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Acremonium terricola*; *Monodictys castaneae*, *Penicillium glandicola*, *Phoma tropica* y *Xylaria sp.*¹⁰.

A pesar de la importancia biológica, social y económica que el cultivo de especies de *Opuntia* representa, los trabajos de investigación científica a nivel nacional e internacional con respecto a la identificación de los hongos asociados endófitos de *Opuntia* son reducidos, por lo tanto, el

conocimiento y la literatura que existe sobre el tema es escasa. El aislamiento y la identificación de hongos endófitos de plantas como *Opuntia*, que son resistentes a ambientes extremos como los ambientes xerofíticos, representa una oportunidad de establecer un cepario de hongos para la futura exploración del potencial biotecnológico de estos organismos que contribuyan al desarrollo económico y científico basado en uso de los recursos de la biodiversidad del país.

MÉTODOS

Sitio de estudio y recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas en el municipio de Santa Fe de Antioquia, ubicado en el departamento de Antioquia, Colombia, (6.56°N 75.83°O, 571 m.s.n.m) con una temperatura promedio de 28°C. Se escogieron al azar en los alrededores de la cabecera municipal 10 plantas de cactus de *Opuntia elatior* que medían más de 50 cm, de cada una de estas se tomaron al azar 4 cladodios, los cuales fueron empacadas en bolsas de papel y transportados hasta el laboratorio.

Procesamiento de las muestras y aislamiento de hongos endófitos

En el laboratorio, se realizó un lavado superficial de los cladodios según el protocolo usado por Petrini y Fisher (1990), para esto se cortaron fragmentos de 5mm² de tejido y se desinfectaron en la superficie mediante inmersión en etanol al 70% por 1 min, seguido de un enjuague en agua destilada por 2 minutos, luego se lavaron con hipoclorito de sodio al 2% por 3 min, y finalmente se lavaron con agua destilada estéril 2 min, por 2 veces. Después de escurrirlos, los fragmentos se colocaron en cajas de petri con agar Papa-Dextrosa (PDA) suplementado con cloranfenicol (200µg/mL) y se incubaron a 30°C durante 10 días a temperatura ambiente hasta observar el crecimiento de colonias de hongos. Posteriormente, se realizaron repiques de los hongos aislados en PDA hasta obtener cultivos puros de cada morfotipo. Una vez aislados se mantuvieron a 4°C, hasta el proceso de identificación.

Identificación de hongos endófitos.

Las cepas obtenidas en el presente proyecto e identificadas a nivel de género o especie serán depositadas en la Colección de Cepas de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, CM-EM-UdeA (registro RNC 250), para dar cumplimiento a los requerimientos del Permiso de Recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica 0524-

27052014 otorgado a la Universidad de Antioquia, bajo el cual se enmarca este proyecto.

Identificación molecular.

Para la identificación molecular, se obtuvo micelio fresco de las cepas de hongos aisladas. Para esto se se tomó el micelio del cultivo en sólido en PDA y se sembró en el medio líquido ME (Extracto de malta (30,0g/L), peptona (5,0g/L) y agar (15,0 g/l), los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente por un periodo de 8 a 10 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento de la cepa. Una vez se tenía material suficiente, el tejido, se extrajo del medio y este se lavó con agua destilada estéril y se centrifugó a 14000 rpm aproximadamente de 5 min a 10 min.

Para la lisis, se adicionaron perlas de vidrio, agua destilada estéril y buffer TE a tubos eppendorf que contenían el micelio y se puso en un vortex a 15000 rpm para romper el tejido. Para ayudar a la lisis, se realizaron además y de manera simultánea por choques térmicos a -20°C y 70°C en baño seco, combinando cada paso con aproximadamente 10 minutos en el vórtex, hasta observar un rompimiento significativo del tejido. Luego, se centrifugaron las muestras nuevamente a 15000 rpm por 10 min, y se tomaron de 100 a 200 uL del

sobrenadante que contiene el ADN , se colocó en tubos de 1.5 ml y se conservaron a -20 °C.

Amplificación de ADN, y Electroforesis

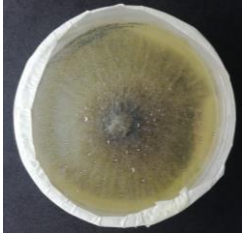
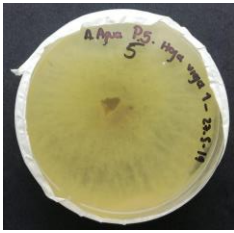



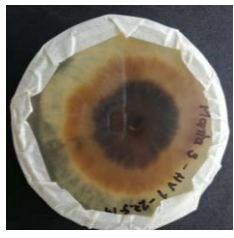




Para el estudio de la región espaciadora transcrito interno del ADN ribosomal fúngico se amplificaron las regiones ITS 1- ITS 2 con los cebadores ITS 1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), e ITS 4 (3'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-5'). Para esto se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la Taq DNA polimerasa (SMOBIO) con su respectivo buffer de PCR [10x], deoxinucleotídidos trifosfatos (dNTP's [2mM]), BSA (seroalbúmina bovina) como estabilizador de enzimas, que aumenta el rendimiento de PCR y evita la adhesión de enzimas, DMSO, agua ultrapura MilliQ, y el ADN a amplificar. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Bio-Rad MyCycler con las siguientes condiciones: 5 minutos a 94°C; 40 ciclos de 30 segundos a 94°C; 45 segundos a 52°C; 30 segundos a 72°C y la etapa de elongación de 5 minutos a 72°C. Para evaluar el amplificado se preparó gel de agarosa con Buffer TAE 1x, para el corrido de las muestras de ADN se utilizó Buffer TAE de corrido del gel 1x, se usó Buffer de carga

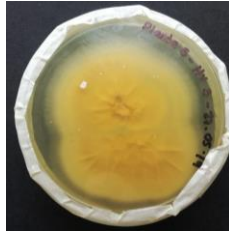
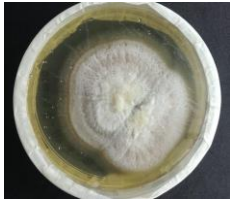
para cada muestra con GelRed™Nucleic Acid gel stain (Biotium, Inc., Fremont, CA, USA) como revelador, y marcador de peso molecular. Los fragmentos amplificados se secuenciaron mediante método de Sanger en Macrogen, usando pares de cebadores ITS1 e ITS4. Las secuencias obtenidas fueron editadas usando el software BioEdit¹¹ y luego comparadas con la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI)¹² usando la búsqueda BLASTn. Las especies se delimitaron con base en una similaridad del 97% para garantizar que los resultados fueran confiables, basándonos en estudios similares. El potencial biotecnológico de cada cepa identificada se estableció mediante una búsqueda bibliográfica.

RESULTADOS

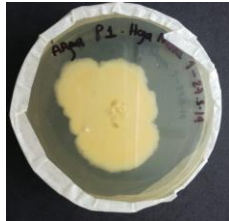
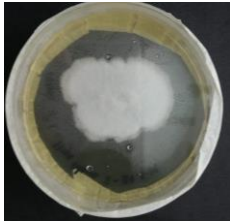
En total se aislaron 41 cepas puras correspondientes a 31 morfotipos diferentes de hongos endófitos de cladodios de plantas de Opuntia del municipio de Santafé de Antioquia, departamento de Antioquia, Colombia. Sin embargo, para este trabajo se lograron identificar molecularmente sólo 12 de ellas, es decir, el 39% del total de los diferentes morfotipos.

Tabla I. Morfología de los hongos endófitos aislados de *Opuntia elatior*

Morfología		Voucher
Anverso	Reverso	
		<i>Mucor circinelloides</i> (P5-V1)
		<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (P7-V1)
		<i>Diaporthe cucurbitae</i> (P3-V1-1)
		<i>Penicillium isariiforme</i> (P2-N1)
		<i>Blackwellomyces cardinalis</i> (P7-V3-1)



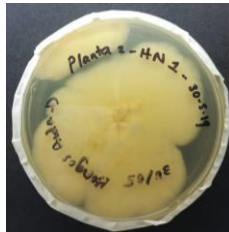
***Fusarium sp.* (P5-V3)**



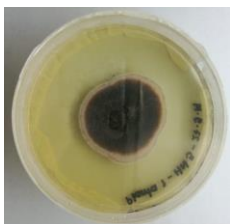
***Fusarium irregulare* (P1-N1)**



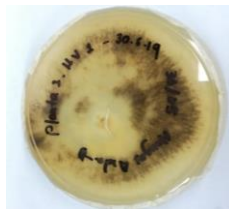
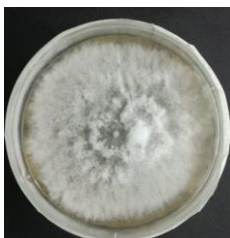
***Fusarium longifundum* (P2-N1-2)**



***Fusarium pernambucanum* (P2-N1-2) y
(P1-N2-2)**



***Curvularia aerea* (P1-N3)**



***Neopestalotiopsis mesopotamica* (P1-
V1)**



***Pestalotiopsis kenyana* (P4-V2)**

Para la identificación se aseguró que coincidieran la morfología con la especie encontrada en la base de datos NCBI de acuerdo con su crecimiento en Agar PDA. En la tabla II se muestra la información taxonómica de las especies identificadas,

organizadas en orden jerárquico teniendo en cuenta división, orden, familia y especie, el autor, el voucher (código de identificación asignado), el código de acceso a la secuencia NCBI y el porcentaje de similaridad.

Tabla II. Información taxonómica de las especies identificadas con base en las secuencias ITS obtenidas, las especies se presentan en orden alfabético.

Taxonomía	Voucher	Porcentaje de similaridad y código de acceso de la secuencia mejor alineada*
MUCOROMYCOTA		
Mucorales		
Mucoraceae		
<i>Mucor circinelloides</i> Tiegh.	P5V1	100%, MH859111.1
ASCOMYCOTA		
Botryosphaeriales		

Botryosphaeriaceae

Lasiodiplodia P7-V1 99,60%, MW448701.1
pseudotheobromae A.J.L.
Phillips, A. Alves & Crous

Diaporthales

Diaporthaceae

*Diaporthe cucurbitae*** P3-V1-1 97.75%,
Udayanga & Castl.

Eurotiales

Aspergillaceae

Penicillium isariiforme Stolk P2N1 100%., NR_138269.1
& J.A. Meyer

Hypocreales

Cordycipitaceae

Blackwellomyces cardinalis P7V3-1 99,26%, NR_159788.1
Spatafora & Luangsa-ard.

Nectriaceae

Fusarium sp. P5-V3 100%, MN428026.1

*Fusarium irregulare*** M.M. P1-N1 100.00%, NR_164595.1
Wang, Qian Chen & L. Cai

*Fusarium longifundum*** P2-N1-2 99,4% NR_2675882
J.W. Xia, L. Lombard, Sand.
-Den., X.G. Zhang & Crous

*Fusarium pernambucanum***

A.C.S. Santos, C.S. Lima, P2-N1-2, P1-N2-2 100%, ON054310.1
P.V. Tiago & N.T. Oliveira

Pleosporales

Pleosporaceae

Curvularia aerea Bat., J.A. P1-N3 99,81%, MT043775.1
Lima & C.T. Vasconc.

Xylariales

Sporocadaceae

Neopestalotiopsis P1V1 100.00%. MZ047602.1
*mesopotamica***
Maharachch., K.D. Hyde &
Crous

*Pestalotiopsis kenyana*** P4-V2 100.00%, MT509798.1
Maharachch., K.D. Hyde &
Crous

* Las especies se delimitaron con base en una similaridad del 97% en la búsqueda Blastn en la base de datos del NCBI.

** Nuevas especies registradas en Colombia.

DISCUSIÓN

En total se aislaron 41 colonias puras correspondientes a 31 morfotipos diferentes de hongos endófitos a partir de cladodios de plantas de *Opuntia elatior* en el municipio de Santafé de Antioquia, departamento de Antioquia, Colombia, de las cuales, 11 se

identificaron a nivel de especie y 1 a nivel de género (Tabla 1). Este es el primer trabajo caracterizando las especies de hongos endófitos asociadas a plantas silvestres de *Opuntia elatior* en Colombia y se creará la primera colección de referencia de los mismos, la cual estará depositada en la Colección de Cepas de la Escuela de

Microbiología de la Universidad de Antioquia, CM-EM-UdeA (registro RNC 250).

Comparado con estudios similares, la diversidad de hongos endófitos encontrados en este trabajo fue similar a la diversidad reportada por Bezerra y colaboradores¹⁰ quienes aislaron 44 especies de hongos endófitos de *Opuntia ficus - indica Mill.* en Brasil, y a la reportada por Ortiz¹³ para otras plantas en Colombia, quien encontró un total de 15 géneros y 35 especies de endófitos asociados a frailejón (*Espeletia hartwegiana*).

Muchas de las especies de hongos identificadas han sido previamente reportadas para Colombia, tales como *Mucor circinelloides* (P5V1)¹⁵, que normalmente se encuentra a altitudes mayores a 2900 m.s.n.m y se ha reportado en el departamento de Boyacá aislado de suelo de páramos asociados a material celulósico¹⁶, sin embargo, en este estudio en particular fue aislado a 571 m.s.n.m en el municipio de Santafé de Antioquia, Antioquia, lo que ampliará la información sobre la distribución geográfica de este microorganismo. También se han registrado *Blackwellomyces cardinalis* (P7V3-1) aislado de pupa de mariposa (insecta: lepidoptera) en el departamento de Risaralda¹⁷; *Curvularia aerea* (P1N3) como endófito de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) en el

departamento de Antioquia en zona de bosques de niebla¹⁸; *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (P7V1) aislados de ñame espino (*Dioscorea rotundata Poir.*) en el departamento de Córdoba en zona costera del Caribe Colombiano¹⁹ y *Penicillium isariiforme* (P2N1) aislado de suelos rizosféricas de cultivos de arroz en los departamentos del Tolima y Meta en bosque seco tropical²⁰.

Algunas de las especies obtenidas no habían sido reportadas para Colombia, tales como *Diaporthe cucurbitae* (P3V1-1), *Fusarium irregulare* (P1N1), *Fusarium longifundum* (P2N1-2), *Fusarium pernambucanum* (P1N2-2 y P2N1-2), *Neopestalotiopsis mesopotamica* (P1V1) y *Pestalotiopsis kenyana* (P4V2), por lo que este estudio permitió ampliar la información sobre diversidad de hongos en el país. Encontramos que algunas de las especies aisladas tienen distribución global, como es el caso de *Mucor circinelloides* y *Curvularia aerea*²¹. Otros como *Penicillium isariiforme* se han registrado en la República Democrática del Congo y Zambia; *Blackwellomyces cardinalis* ha sido reportado para Estados Unidos, Japón, Brasil y Dominica; *Fusarium pernambucanum* se ha reportado en India, Brasil y Estados Unidos²¹; *Diaporthe cucurbitae* se ha reportado en Canadá²²; *Pestalotiopsis kenyana* se ha reportado en Kenia, China, Antártica y Tailandia; *Fusarium*

longifundum se ha reportado en Curazao²⁰ y China²³ y *Fusarium irregulare* ha sido reportado en China, Tailandia y Estados Unidos²⁰. Sin embargo, algunas especies poseen una distribución más limitada, como *Neopestalotiopsis mesopotamica* que, según Bate-Smith *et al.*²⁴, se conocía de una distribución pantropical y se ha aislado principalmente de bosque seco espinoso y bosque caducifolio seco, y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* reportada principalmente en áreas tropicales y subtropicales de Australia, China y Costa Rica.²⁵ Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, puesto que los hongos fueron aislados de *Opuntia elatior*, una planta que habita en ecosistemas xerofíticos principalmente.

A pesar de que se aislaron 31 morfotipos diferentes de hongos endófitos, no fue posible identificar molecularmente todas las cepas aisladas, debido a que para algunos hongos se requiere estudiar genes diferentes a las regiones ITS del rDNA para su identificación molecular, dependiendo de la morfología del espécimen a identificar. Este es el caso de *Fusarium*, que para identificar las especies es necesario un estudio multigénico que incluya otros genes como el factor de elongación de la traducción 1 α (TEF-1 α)²⁶, un gen de única copia con alta capacidad discriminatoria entre especies del mismo género, según Karlsson *et al.*²⁶ o el

uso de los genes de la β -tubulina y el gen de la actina los cuales permiten mejorar la identificación a nivel de especie de aquellos organismos donde las regiones del DNA ribosómico no tienen la suficiente resolución. También se han usado las regiones génicas rpb1 (subunidad más grande de ARN polimerasa) y rpb2 (segunda subunidad más grande de ARN polimerasa) para identificar a nivel de especie ciertas órdenes de hongos como Eurotiales, que incluye *Aspergillus* y *Penicillium*²⁷. Para los morfotipos que no se pudieron identificar en el presente estudio, se sugiere en estudios futuros el uso de genes diferentes a las regiones ITS del rDNA, como los genes TEF-1 α , β -tubulina, actina, rpb1 o rpb2 de acuerdo a su identificación morfológica.

En cuanto al hábitat y ecología, muchas de las especies encontradas se han aislado de diferentes matrices, principalmente de suelo, como *Penicillium isariiforme*, *Fusarium longifundum* y *Fusarium sp.*²⁰ Otras han sido aisladas de insectos siendo consideradas entomopatógenas como *Blackwellomyces cardinalis* que se ha aislado de larvas de lepidópteros de *Duponchelia fovealis*, y *Fusarium pernambucanum* que se ha aislado de *Dactylopius opuntiae*, insecto plaga de las plantas del género *Opuntia*, indicando que este último puede considerarse como endófito entomopatógeno de *Opuntia elatior*, es decir, que puede desempeñar ambos

roles dependiendo del lugar donde se encuentre, puesto que, cuando el insecto ocasiona daño al tejido de la planta, se infecta con el hongo, se enferma y se limita su reproducción, reduciendo así el daño en el cultivo^{28,29}. También se han aislado como fitopatógenos *Diaporthe cucurbitae* de tallos y frutos de *Cucumis sativus*,²² *Curvularia aeria* de plantas de la familia Asteraceae³⁰ y *Pestalotiopsis kenjana* de plantas del género *Coffea*³¹.

Por otro lado, Silva-Hughes y colaboradores³² reportaron algunos géneros de hongos como *Alternaria*, *Diaporthe* y *Pestalotiopsis* como endófitos de la especie *Opuntia humifusa* en Estados Unidos. Algunas de las especies encontradas en nuestro estudio se han reportado previamente como endófitos de otras plantas, este es el caso de *Mucor circinelloides* que ha sido reportado como endófito de *Arabidopsis aerona*, *Salvia miltiorrhiza*³³ y *Hupersia serrata*³⁴; *Neopestalotiopsis mesopotamica* que se ha reportado como endófito de *Pinus brutia*, *Bridelia retusa*, *Cordia dichotoma*, *Achras sapota* y *Eucalyptus sp.*³⁵, y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* que se ha reportado como endófito de *Illigera rhodantha*²⁰.

Algunos hongos endófitos también se han reportado como entomopatógenos de plantas, como *Beauveria bassiana* que ha sido aislado como endófito natural de plantas

como *Coffea arabica*, *Eucalyptus globulus*, *Labill Pinus radiata*, entre otros; *Metarhizium anisopliae* aislado del pasto *Cynodon dactylon*, y *Lecanicillium lecanii* aislado de *Gossypium hirsutum*, *Carpinus caroliniana* y *Dactylis glomerata*²⁸. Se ha demostrado que estos hongos favorecen el crecimiento y el rendimiento de las plantas que habitan y afecta negativamente la supervivencia y desarrollo de los insectos plaga, como en el caso de *Beauveria bassiana* que, según Russo, et al.²⁸, mostró un efecto negativo sobre los insectos *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa gelotopoeon*. El descubrimiento de la naturaleza endofítica de hongos entomopatógenos se considera como un nuevo enfoque para su uso en la agricultura²⁹, abriendo paso a nuevas exploraciones sobre el uso biotecnológico de los endófitos identificados en este estudio.

En cuanto a las ventajas que le otorgan los endófitos a las plantas que habitan en bosques secos como *Opuntia elatior*, se ha demostrado que los hongos endófitos ayudan a superar el estrés bajo condiciones xerofíticas, puesto que estos tienen la capacidad de absorber y almacenar nutrientes para la planta. *Phialocephala fortinii* endófito de *Asparagus officinalis* acumula altos niveles de glucógeno, proteína, polifosfato y fósforo, que sirven como nutrientes para la planta²³. Otros estudios han demostrado que los hongos

endófitos producen moléculas osmoprotectoras que estabilizan las membranas celulares de la planta, mantienen la turgencia celular y disminuyen el estrés oxidativo, lo que conlleva al aumento de los mecanismos fisiológicos de la misma. Por ejemplo, la presencia del hongo endófito *Piriformospora indica* en *Arabidopsis thaliana* se asoció con una mayor y más temprana expresión en genes que responden a la deshidratación en individuos sometidos a estrés por sequía³⁶.

Los hongos endófitos también representan una fuente importante de metabolitos que pueden ser usados en la industria, este es el caso de *Mucor circinelloides* aislado de la planta medicinal *Rhizoma smilacis glabrae*, que promueve la acumulación de taxifolina en su huésped, un flavonoide de importancia médica usado en el tratamiento del cáncer³³. También se ha reportado que esta especie produce una amplia gama de aceites y lípidos como el ácido γ -linolénico (GLA), que puede utilizarse para la producción de biodiesel³⁶, y aunque *M. circinelloides* se ha reportado en Colombia, no se ha reportado este tipo de uso, por lo que esta especie representa una potencial fuente para la producción de biocombustible en el país. También se ha demostrado el uso de *M. circinelloides* en procesos de biorremediación por su capacidad de

adsorción de metales pesados como Cadmio, Plomo y Arsénico³⁸.

Los hongos endófitos poseen también diversidad de usos biotecnológicos en la agricultura. Varias especies del género *Fusarium* se han utilizado en el control biológico contra fitopatógenos, y otras como *Blackwellomyces cardinalis* y *Fusarium perambucanum* son utilizados para conferir resistencia frente a las plagas en cultivos de importancia económica como el arroz (*Oryza sativa* L)³⁹, estos hongos también se han usado como promotores del crecimiento y micoherbicidas, por su potencial para destruir algunas malezas⁴⁰. Por otro lado, en la industria farmacéutica se han utilizado hongos endófitos como fuente importante de metabolitos, como *Blackwellomyces cardinalis* que produce compuestos anti-tripanosómicos utilizados para tratar la enfermedad del chagas⁴¹; *Curvularia aeria* que se ha utilizado para la producción de rifamicina-S (RS) a partir de rifamicina-B.n, un antibiótico contra bacterias Gram-positivas que se usa para tratar infecciones causadas por *E. coli*, la lepra y la tuberculosis⁴²; y *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, que produce lasiodiplinas con poder antibacteriano contra las cepas clínicas *Streptococcus sp.*, *Bacteroides vulgatus*, *Peptostreptococcus sp.* y *Veillonella parvulata*⁴³. En la industria en general, las enzimas producidas por hongos

endófitos poseen diversas aplicaciones como las lacasas producidas por *Pestalotiopsis kenyana* que se usan como agentes detoxificantes, estabilizadores de bebidas, detergentes, entre otros³¹.

Los estudios acerca de hongos endófitos en plantas son necesarios para proporcionar información sobre la diversidad y distribución de hongos a nivel mundial, aspectos teóricos de la ecología de comunidades, interacción planta microorganismo y el descubrimiento de nuevas especies con posibles aplicaciones biotecnológicas. Este estudio deja una colección de referencia de hongos endófitos y abre la posibilidad a nuevas investigaciones sobre estas que puedan tener aplicaciones biotecnológicas en la industria, representando así una ventaja para promover el desarrollo de la bioeconomía en Colombia, entendiéndose como una economía basada en recursos biológicos renovables y un elemento clave para la sostenibilidad a largo plazo, puesto que los hongos endófitos son una fuente importante para la producción de metabolitos que pueden usarse en la industria agrícola, farmacéutica y en la medicina y además como agentes promotores del crecimiento de plantas, en procesos de biorremediación y biotransformación y en los ciclos de nutrientes, representando un beneficio económico e intelectual para el país.

CONCLUSIONES

Aislamos 31 morfotipos diferentes de hongos endófitos asociados a cladodios de *Opuntia elatior* en el municipio de Santafé de Antioquia, Colombia de los cuales 11 de ellos se identificaron a nivel de especie y uno a nivel de género. Algunas de las especies identificadas fueron reportadas por primera vez para el país y otras se reportaron por primera vez como endófitas para el género *Opuntia*, como es el caso de *Diaporthe cucurbitae* y *Fusarium irregulare*. Además, se logró determinar que *B. cardinalis* y *F. pernambucanum* son endófitos y entomopatógenos a la vez, por lo que tienen gran potencial para su uso en la agricultura y se recomienda realizar estudios posteriores sobre estos hongos y sus posibles usos para el control de plagas en cultivos. Algunas de las especies identificadas poseen usos biotecnológicos que aún no se han desarrollado en Colombia, como la producción de biodiesel a partir de *M. circinelloides*, o la producción de metabolitos que pueden tener diversas aplicaciones en industria por lo que se sugiere el uso de la colección de referencia creada en este estudio para la futura exploración y desarrollo de su potencial biotecnológico que permitan promover el desarrollo de la bioeconomía en Colombia.

REFERENCIAS

1. Zea, J., León, G., Hurtado, G., González, O. C., Montealegre, J. E., & Pabón, J. D. (2018). La atmósfera, el tiempo y el clima.
2. Verheye, W. (2006). Dry lands and desertification. Land use, land cover and soil sciences, 5.
3. Granados, D., Lopez, G. F., & Gama, J. L. (1998). Adaptaciones y estrategias de las plantas de zonas áridas. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo (Mexico).
4. Ahumada, M. L., & Trillo, C. (2017). Diversidad de especies naturalizadas del género *Opuntia* (Cactaceae) utilizadas por los pobladores del norte de Córdoba (Argentina). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 52(1), 191-206.
5. García Herrera, E. J., Estrella Chulim, N., Manzo Ramos, F., & Delgado Wise, R. (2004). Componentes de una estrategia para el desarrollo agrícola regional en Pinos, Zacatecas: el nopal tunero como su elemento central.
6. Alvarado-Solano, D. P., & Ospina, J. T. O. (2015). Distribución espacial del bosque seco tropical en el Valle del Cauca, Colombia. Acta Biológica Colombiana, 20(3), 141-153.
7. Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 16(2), 132-146.
8. Ratnaweera, P. B., de Silva, E. D., Williams, D. E., & Andersen, R. J. (2015). Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. BMC complementary and alternative medicine, 15(1), 220.
9. Molano-Campuzano, J. (1964). Zonas áridas de Colombia. Boletín de la Sociedad Geográfica de Colombia, 22(83-84).
10. Bezerra, J. D. P., Santos, M. G. S., Svedese, V. M., Lima, D. M. M., Fernandes, M. J. S., Paiva, L. M., & Souza-Motta, C. M. (2012). Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill.(Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(5), 1989-1995.
11. Hall T, Biosciences I, Carlsbad C (2011) BioEdit: un software importante

- para biología molecular. GEF Toro Biosci 2: 60–6
12. NCBI (National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2022 Jun 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
 13. Aristizabal Ortiz, C. (2021). Diversidad de hongos endófitos asociados al frailejón (*Espeletia hartwegiana*) en un marco de cambio climático, páramo de Romerales, Quindío, Colombia (Master's thesis, Quito, EC: Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador).
 14. Chi Chi, L. C. (2020). Diversidad de hongos endófitos asociados a una variedad comercial de *Carica papaya* L. en la Península de Yucatán.
 15. ColFungi (2022). "Useful Fungi of Colombia. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <https://colfungi.org/>. Retrieved 23 June 2022.
 16. Chaparro Pedraza, A. P., & Campuzano, S. E. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de la actividad antimicrobiana de metabolitos producidos por *Mucor circinelloides* (Cepa Nativa SPG 321). *Nova*, 16(29), 63-70.
 17. Osorio Posada, J. A. (2018). Caracterización Morfológica De *Cordyceps* sp.(Ascomycota: Hypocreales) Aislado De Una Pupa De Mariposa (Insecta: Lepidoptera) Del Mariposario Amaranta De Colombia, Pereira, Risaralda.
 18. VANEGAS BERROUET, KATHERIN M. , & GUTIÉRREZ SÁNCHEZ, PABLO A. , & MARÍN MONTOYA, MAURICIO A. (2014). IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS AISLADOS DE TEJIDOS DE FRÍJOL CON SÍNTOMAS DE ANTRACNOSIS. *Acta Biológica Colombiana*, 19(2),143-153.[fecha de Consulta 13 de Septiembre de 2022]. ISSN: 0120-548X.
 19. Arrieta Guerra, J. J., Díaz-Cabadiaz, A. T., Pérez-Pazos, J. V., Cadena-Torres, J., & Sánchez-López, D. B. (2021). Hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir.) en Córdoba, Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 32(3), 790-807.
 20. García Castillo, C. Evaluación del efecto de la luz sobre la morfología, el crecimiento y la conidiogénesis de *penicillium* sp. hc1.
 21. Kirk, P. (2020). *Species Fungorum for CoL+*. In O. Bánki, Y. Roskov, M. Döring, G. Ower, L. Vandepitte, D. Hobern, D. Remsen, P. Schalk, R. E.

- DeWalt, M. Keping, J. Miller, T. Orrell, R. Aalbu, R. Adlard, E. M. Adriaenssens, C. Aedo, E. Aesch, N. Akkari, P. Alfenas-Zerbini, et al., Catalogue of Life Checklist (Feb 2020). <https://doi.org/10.48580/dfp3-4hj>.
22. Udayanga, D., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2015). The *Diaporthe sojae* species complex: Phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops. *Fungal Biology*, 119(5), 383-407.
 23. Yu, T., Nassuth, A., & Peterson, R. L. (2001). Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(8), 741-753.
 24. Bate-Smith, E. C., & Metcalfe, C. R. (1957). Leuco-anthocyanins. 3. The nature and systematic distribution of tannins in dicotyledonous plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 55(362), 669-705.
 25. Zhao, J. P., Lu, Q., Liang, J., Decock, C., & Zhang, X. Y. (2010). *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, a new record of pathogenic fungus from some subtropical and tropical trees in southern China. *Cryptogamie-Mycologie*, 31(4), 431.
 26. Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M. B., Kolseth, A. K., Steinberg, C., ... & Friberg, H. (2016). Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. *Applied and environmental microbiology*, 82(2), 491-501.
 27. 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.
 28. Russo, M. L. (2017). Hongos entomopatógenos: colonización endofítica y control de insectos plaga en cultivos agrícolas (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
 29. Vega, F. E., Posada, F., Aime, M. C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., & Rehner, S. A. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological control*, 46(1), 72-82.
 30. Velázquez-del Valle, M. G., Poudel, B., & Zhang, S. (2017). First report of *Curvularia* blight on sunflower caused by *Curvularia aerea* in Mexico. *Plant Disease*, 101(11), 1955-1955.
 31. Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79(1), 121-186.

32. Silva-Hughes, AF, Wedge, DE, Cantrell, CL, Carvalho, CR, Pan, Z., Moraes, RM, ... & Rosa, LH (2015). Diversidad y actividad antifúngica de los hongos endófitos asociados con el cactus medicinal nativo *Opuntia humifusa* (Cactaceae) de los Estados Unidos. *Investigación microbiológica*, 175, 67-77.
33. Chen, H., Qi, Y., He, X., Xu, L., Zhang, W., Lv, X., ... & Liang, Z. (2021). Endophytic fungus *Mucor circinelloides* DF20 promote tanshinone biosynthesis and accumulation in *Salvia miltiorrhiza* root. *Plant Science*, 307, 110898.
34. Thi Minh Le, T., Thi Hong Hoang, A., Thi Bich Le, T., Thi Bich Vo, T., Van Quyen, D., & Hoang Chu, H. (2019). Isolation of endophytic fungi and screening of Huperzine A-producing fungus from *Huperzia serrata* in Vietnam. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13.
35. Reddy, M. S., Murali, T. S., Suryanarayanan, T. S., Rajulu, M. G., & Thirunavukkarasu, N. (2016). *Pestalotiopsis* species occur as generalist endophytes in trees of Western Ghats forests of southern India. *Fungal ecology*, 24, 70-75.
36. Camehl, I., Sherameti, I., Venus, Y., Bethke, G., Varma, A., Lee, J., & Oelmüller, R. (2010). Ethylene signaling and ethylene-targeted transcription factors are required to balance beneficial and non beneficial traits in the symbiosis between the endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 185(4), 1062-1073.
37. Fazili, A. B. A., Shah, A. M., Zan, X., Naz, T., Nosheen, S., Nazir, Y., ... & Song, Y. (2022). *Mucor circinelloides*: a model organism for oleaginous fungi and its potential applications in bioactive lipid production. *Microbial cell factories*, 21(1), 1-19.
38. Li, X., Lan, X., Feng, X., Luan, X., Cao, X., & Cui, Z. (2021). Biosorption capacity of *Mucor circinelloides* bioaugmented with *Solanum nigrum* L. for the cleanup of lead, cadmium and arsenic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 212, 112014.
39. Neninger, L. H., Hidalgo, E. I., Barrios, L. M., & Pueyo, M. (2003). Hongos presentes en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) en Cuba. *Fitosanidad*, 7(3), 7-11.
40. Torres, G. A. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía colombiana*, 17(1-3), 11-16.
41. Umeyama, A., Takahashi, K., Grudniewska, A., Shimizu, M., Hayashi, S., Kato, M., ... & Hashimoto, T. (2014). In vitro antitrypanosomal activity of the cyclodepsipeptides, cardinalisamides A–C, from the insect pathogenic fungus

Cordyceps cardinalis NBRC 103832.
The Journal of Antibiotics, 67(2), 163-
166

42. .Banerjee, U. C. (1993).
Characterization of soluble rifamycin
oxidase from Curvularia lunata var.
aeria. *Letters in applied microbiology*,
17(1), 1-3.
43. Wei, W., Jiang, N., Mei, Y. N., Chu, Y.
L., Ge, H. M., Song, Y. C., ... & Tan, R.
X. (2014). An antibacterial metabolite
from Lasiodiplodia pseudotheobromae
F2. *Phytochemistry*, 100, 103-109.