



**Aislamiento de hongos endófitos de plantas de *Cannabis* medicinal y su  
evaluación como agentes de control biológico frente al hongo fitopatógeno  
*Botrytis cinerea***

**Isolation of endophytic fungi from medicinal *Cannabis* plants and their evaluation as biological  
control agents of the fungus plant pathogen *Botrytis cinerea***

Daniela Vidal Henao

Trabajo de grado presentado para optar al título de Microbiólogo Industrial y Ambiental

Asesora  
Aida Marcela Vasco Palacios, Doctor (PhD) en Biología

Universidad de Antioquia  
Escuela de Microbiología  
Microbiología Industrial y Ambiental  
Medellín, Antioquia, Colombia  
2023

---

<b>Cita</b>	Vidal Henao, D (1)
<b>Referencia</b>	(1) Vidal Henao D. Aislamiento de hongos endófitos de plantas de medicinal y su evaluación como agentes de control biológico frente al hongo fitopatógeno <i>Botrytis cinerea</i> [Trabajo de grado profesional]. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia; 2023.

---



Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

# Aislamiento de hongos endófitos de plantas de *Cannabis* medicinal y su evaluación como agentes de control biológico frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*

Isolation of endophytic fungi from medicinal *Cannabis* plants and their evaluation as biological control agents of the fungus plant pathogen *Botrytis cinerea*

Daniela Vidal Henao\* †, Aída M. Vasco-Palacios\*

## Resumen

**Introducción:** *Botrytis cinerea* es un hongo patógeno de más de mil especies de plantas, una de ellas es el *Cannabis*, rica en terpenos, conocidos en medicina tradicional y contemporánea por su potencial terapéutico en humanos y animales. Una alternativa de biocontrol es el uso de hongos endófitos, estos se distinguen por su potencial antagonístico derivado de los múltiples metabolitos secundarios bioactivos y otros mecanismos de acción.

**Objetivo:** Identificar hongos endófitos de variedades de plantas de *Cannabis* medicinal con actividad antagonística sobre el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

**Materiales y métodos:** Se realizaron aislamientos de endófitos de hojas evaluados por enfrentamiento dual y técnica impronta para determinar el índice de antagonismo con respecto al control.

**Resultados:** Del total de cepas aisladas en el estudio, 12 cepas (26,7 %) redujeron significativamente el crecimiento de la colonia de *B. cinerea* (IA 2) y 6 cepas (13,3%) redujeron el crecimiento y esporularon o invadieron la colonia del fitopatógeno (IA 3) y 27 cepas más (60%) no presentaron efecto antagonístico (IA 0 y IA 1). Las cepas de interés se identificaron con técnicas moleculares como *Aspergillus flavus* (IA 3), *Bjerkandera atroalba* (IA 3), *Bjerkandera* sp. (IA 2), *Colletotrichum lindemuthianum* (IA 2) *Marquandomyces marquandii* (IA 3), dos aislados de *Nigrospora* sp., ambas (IA 3) y una microscópicamente como *Aspergillus* sp.

**Conclusión:** Los hongos endófitos tienen un alto potencial para el control de patógenos fúngicos en plantas. Los endófitos aislados de plantas de *Cannabis* tuvieron un efecto antagonista *in vitro* sobre *B. cinerea*, pero se recomienda la evaluación *in vivo*, en plantas y semillas, así como análisis exhaustivos para confirmar los mecanismos de acción y poder desarrollar estrategias para aplicarlos a campo.

**Palabras clave:** Antagonismo. Bioprospección. Biotecnología. *Cannabis*. Hongos endófitos. Moho gris.

## Abstract

**Introduction:** *Botrytis cinerea* is a fungus plant pathogen for a thousand plant species. *Cannabis*, rich in terpenes, known in traditional and contemporary medicine for its therapeutic potential in humans and animals, is affected by this fungus. Endophytic fungi are recognized for their antagonistic potential derived from multiple bioactive secondary metabolites and mechanisms of action, and for this reason they are an alternative for the biocontrol of phytopathogens.

**Objective:** To identify potential endophytic fungi isolated from medicinal *Cannabis* plant varieties with

antagonistic activity against the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*.

**Materials and methods:** Isolations of leaf endophytes evaluated by dual confrontation and imprint technique were made to determine the antagonism index with respect to the control.

**Results:** A total of 12 isolated strains (26.7%) significantly reduce the growth of the *B. cinerea* colony (IA 2), 6 strains (13.3%) reduced growth and sporulated or invaded the *B. cinerea* colony (IA 3), and 27 strains more (60%) do not have any antagonistic effect (IA 0 and IA 1). The strains of interest were identified with molecular tools

\*†Estudiante de Microbiología Industrial y Ambiental, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Contacto: [daniela.vida1@udea.edu.co](mailto:daniela.vida1@udea.edu.co)

\* Ph.D., MSc. Biología. Grupo de Investigación BIOmicro. Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia UdeA, Medellín, Antioquia, Colombia. Contacto: [aida.vaso@udea.edu.co](mailto:aida.vaso@udea.edu.co)

such as *Aspergillus flavus* (IA 3), *Bjerkandera atrolba* (IA 3), *Bjerkandera* sp. (IA 2), *Colletotrichum lindemuthianum* (IA 2), *Marquandomyces marquandii* (IA 3), two isolated of *Nigrospora* sp., both (IA 3), and one microscopically as *Aspergillus* sp.

#### **Conclusion**

Endophytic fungi have a high potential for the control of fungi plant pathogens. Endophytes isolated from *Cannabis* plants

showed an *in vitro* antagonistic effect on *B. cinerea*. The identified endophytes had an *in vitro* antagonistic effect on *B. cinerea* *in vivo* evaluation is recommended, in plants and seeds as well as exhaustive analyzes to confirm the mechanisms of action that allow the development of strategies to apply these fungi in the field for the biological control of the gray fungus.

**Key words:** Antagonism. Bioprospecting. Biotechnology. *Cannabis*. Endophytic fungi. Gray mold

## **Introducción**

*Cannabis* es una planta de la familia *Cannabaceae* de regiones tropicales y subtropicales, que genera cerca de 500 compuestos químicos diferentes de los cuales se resaltan los terpenos como el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN) presentes en *C. sativa* con propiedades antiinflamatorias, anticonvulsivas, ansiolíticas, antialérgicas para el tratamiento de varios tipos de cáncer, la migraña, el glaucoma, también puede reducir el dolor asociado al VIH y mejorar la calidad de vida de las personas con depresión [1,2]. Además de los terpenos, *Cannabis* produce polifenoles, flavonoides y otras moléculas bioactivas que pueden interactuar con receptores específicos en el sistema biológico humano [3]. En Colombia está permitido el uso de esta planta para fines medicinales y científicos, pero requiere procesos dispendiosos para obtener la licencia de producción [4]; sin embargo, su cultivo sigue teniendo una connotación ilícita al relacionarse con el narcotráfico [5], lo que ha dificultado establecer la dosificación y uso de sus moléculas en humanos y animales para la comercialización de productos [6]. A pesar de esto, su producción sigue siendo prometedora con 57000 hectáreas alrededor del país, que se ven favorecidas por las condiciones climáticas y bajos costos de producción por lo que se tiene como propósito competir en el mercado mundial para el 2025 con hasta USD \$166 billones [6,7].

*Cannabis* como cualquier otra planta, es susceptible al ataque por fitopatógenos como nemátodos, araña, virus y hongos [8]. Entre los hongos fitopatógenos de mayor importancia están *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*, responsables de la enfermedad del “Moho gris” en racimos florales, pudrición de raíz y tallo, y el cancro del cáñamo, respectivamente [9].

*Botrytis cinerea* es particularmente importante en el cultivo de *Cannabis* ya que genera pérdidas en la etapa postcosecha, siendo el segundo patógeno fúngico clave a nivel económico/científico en patología vegetal molecular [10]. Este hongo necrótrofo secreta gran variedad de enzimas y toxinas que degradan la pared celular, modulando la actividad redox de su huésped, continuando con la muerte celular programada y descomposición progresiva del tejido vegetal permitiendo la colonización [11,12]. Otro mecanismo de infección que hace altamente exitoso a este patógeno, es la formación de esclerocios melanizados, estructuras reproductivas vegetativas capaces de dispersarse por el aire hasta tejidos dañados y sobrevivir años en el suelo [11]. Además, se ha encontrado que, debido a mutaciones genéticas, puede generar resistencia a agroquímicos como benzimidazoles, carbamatos, fenilpirroles, pirazol carboxamidas, anilino pirimidinas y fungicidas hidroxianilidas [13,14].

A pesar de esta notable resistencia, el uso de fungicidas es la primera barrera de control rápida, eficiente, y de fácil aplicación, pero su uso intensivo genera efectos adversos en humanos y ecosistemas, por lo que actualmente la necesidad de reducir las tasas de aplicación de agroquímicos, va en aumento y de la mano de los objetivos de desarrollo sostenible para prevenir, detener y revertir la degradación de los ecosistemas de todo el mundo [15] es allí donde se buscan agentes que afecten naturalmente los patógenos de los cultivos limitando su propagación sin dejar de ser respetuosos con el medio ambiente como alternativa de Biocontrol en agricultura sostenible [13]. Esta tecnología se ha evaluado para el control de *B. cinerea* a través de agentes biológicos en los que se incluyen polímeros antimicrobianos naturales, formulaciones que contemplan extractos de plantas, microorganismos, compuestos activos enzimáticos y minerales, entre otros [16,17].

De manera alternativa, se ha propuesto el uso de endófitos como agentes de control biológico sobre patógenos [13,18,19] estos se establecen dentro de los tejidos vegetales de manera asintomática, a través de una simbiosis mutualista. Son reconocidos no solo por su capacidad antagónica, sino que mejoran la resistencia al estrés biótico (patógenos) o abiótico (estrés salino, térmico, hídrico o presencia de

metales), gracias a que sintetizan compuestos bioactivos como exoenzimas y metabolitos volátiles que actúan como antioxidantes, antibacterianos, antivirales y antifúngicos [20,21]; es por esto que pueden ser importantes controladores biológicos. Se ha evaluado la capacidad antagónica de endófitos aislados de diferentes especies vegetales sobre patógenos importantes como *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis* en cultivos agrícolas [13] incluidos aquellos de *Cannabis*, encontrándose mecanismos de acción que implican competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, producción de enzimas líticas, interferencia con el crecimiento del patógeno, la inducción de la resistencia de la planta huésped y la producción de compuestos orgánicos volátiles siendo eficientes contra *B. cinerea* y otros patógenos [22,23].

El presente trabajo propone realizar una bioprospección para evaluar la actividad antagónica *in vitro* de hongos endófitos aislados de variedades de *Cannabis* medicinal contra *B. cinerea* e identificarlos, con el fin de establecer un banco de cepas con potencial para el biocontrol de este fitopatógeno en cultivos comerciales de *Cannabis* del departamento de Antioquia.

## **Metodología**

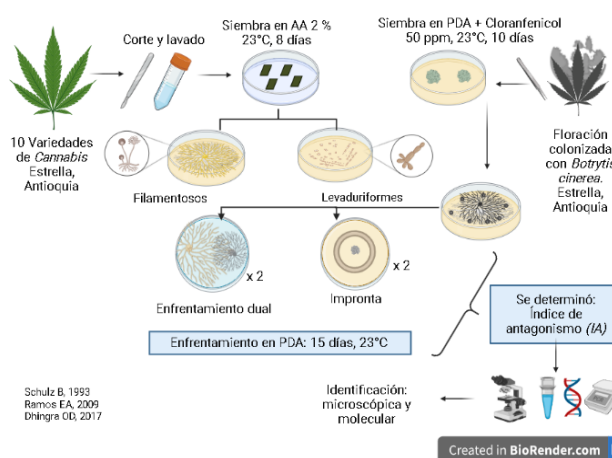
### **Aislamiento de endófitos y *Botrytis cinerea***

Se recolectaron hojas sanas de diez variedades de *Cannabis* de uso medicinal de un sistema de producción certificado, ubicado en el Municipio de la Estrella, Antioquia. Las hojas se almacenaron en bolsas ziploc y se llevaron al laboratorio del Grupo BIOmicro, de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia. En el laboratorio, se obtuvieron fragmentos de 5 x 5 mm aproximadamente de hojas y se lavaron siguiendo el método de Schulz et al. [24] que incluye lavados del material vegetal con Tween 80 al 10 %, hipoclorito de sodio al 3%, y Etanol al 70%, alternando con agua destilada para la eliminación de contaminantes. Cada fragmento de tejido se sembró en cajas de Petri de 150 mm con agar agua (2%) y se incubó a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  por 8 días. Las cajas se revisaban diariamente y a medida que se observaba crecimiento se aislaba en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA) suplementado con cloranfenicol a 50 ppm para evitar el desarrollo de bacterias, con el fin de obtener cepas puras de los hongos endófitos de hojas de *Cannabis* (Figura 1)

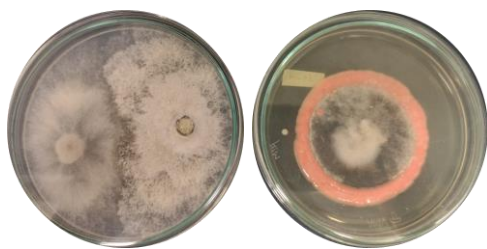
El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* fue aislado a partir de fragmentos de tejido vegetal infectado del mismo sistema productivo. Este se sembró directamente en cajas de Petri con agar PDA suplementado con cloranfenicol a 50 ppm, al cual se le realizó seguimiento microscópico para identificación de características esperadas después de 10 días de crecimiento a temperatura ambiente, aproximadamente  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### Evaluación de la actividad antagónica

Para el antagonismo de los hongos sobre *B. cinerea* se usó el método de cultivo dual, en el cual, en un extremo de la placa de Petri se sembró un disco de agar de 4 mm con micelio del patógeno y en el extremo opuesto un disco de igual tamaño del hongo endófito axénico. La inoculación se realizó simultáneamente siguiendo el método de Ramos et al [25]. Los morfotipos con patrones y características de levaduras, se enfrentaron por medio de la técnica impronta [26] la cual consistió en el crecimiento de la levadura endofítica formando una circunferencia en la caja de Petri derivada de su crecimiento en caldo ESP (Extracto de malta 13.6 g/L, Sacarosa 8.8 g/L, Peptona 0,8 g/L), después inoculada en la caja a modo de impronta o sello, y en el interior de la circunferencia, el hongo fitopatógeno (Figura 2). La inoculación se realizó con 12 horas de diferencia respecto al patógeno para garantizar el crecimiento axénico de la levadura. En ambos casos se tuvo tratamiento control del endófito y el patógeno. Los enfrentamientos se realizaron por duplicado. Todos se incubaron por 15 días a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .



**Figura 1:** Descripción de metodología empleada para el aislamiento de hongos endófitos de plantas de *Cannabis* y del fitopatógeno *B. cinerea*, así como el montaje para su enfrentamiento dual e identificación.



**Figura 2:** Representación de enfrentamientos realizados para evaluar la actividad antagónica de los aislados y el fitopatógeno. Izquierda: Enfrentamiento dual Filamentoso - *B. cinerea* (izquierda). Derecha: Impronta de levadura - *B. cinerea* (centro)

### Screening de Actividad antagónica

Se realizó en función de la reducción, invasión y esporulación del hongo endófito sobre el patógeno, teniendo como control el comportamiento de *B. cinerea* en las mismas condiciones de crecimiento. Se determinó de manera cualitativa, asignando un índice de antagonismo (*IA*) definido por nosotros, según su capacidad, como se describe en la tabla I.

**Tabla I.** Índices de antagonismo para evaluación de la capacidad antagónica del hongo endófito contra *Botrytis cinerea*

IA	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión del antagonista sobre la colonia de <i>Botrytis cinerea</i>
1	Evita invasión de la colonia de <i>Botrytis cinerea</i>
2	Reduce el crecimiento de la colonia de <i>Botrytis cinerea</i>
3	Reduce el crecimiento y esporula o invade la colonia de <i>Botrytis cinerea</i>

### Identificación de los aislados potenciales

Los hongos endófitos que presentaron una capacidad antagónica tipo “IA 3”, se estudiaron morfológica y molecularmente. Las colonias inoculadas en PDA se describieron y fotografiaron, se realizaron montajes de estructuras en fresco coloreadas con azul de lactofenol y se observaron en un microscopio óptico Olympus CX 21 a través del objetivo 40X.



Para la identificación molecular, se siguió la metodología establecida en el grupo de investigación Micofradía, del grupo BIOmicro de la Universidad de Antioquia. Para esto, se colectó la biomasa fúngica de 15 mL caldo ESP mencionado anteriormente, después de 8 días de crecimiento a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , inclinados tipo bisel. El tejido obtenido se separó del medio de cultivo con centrifugación a 14.000 rpm por 15 minutos y se lavó con agua destilada estéril. Posteriormente se le adicionó 100  $\mu\text{L}$  de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) y perlas de vidrio 1 mm, el tejido se fraccionó mediante lisis mecánica y física de manera alternada usando vórtex y choque térmico en baño seco  $70^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min, y el sobrenadante se utilizó para el proceso de PCR. Se utilizaron los cebadores universales para hongos ITS 5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [26] correspondientes a la región ITS (Espaciador transcrito interno del ADN ribosomal) que incluye la región ITS-1, 5.8S e ITS-2. La reacción contenía 2  $\mu\text{L}$  de ADN fúngico, 1X de buffer Taq polimerasa, 1 mM de dNTP's (mix de nucleótidos, nucleósidos trifosfatados), 0.2  $\mu\text{M}$  de ITS 4, 0.2  $\mu\text{M}$  de ITS 5, 3% de DMSO (dimetilsulfóxido), 0.5 mg/mL BSA (seroalbúmina bovina) 0.025 U/ $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa SMOBIO y agua ultrapura MilliQ. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Bio-Rad MyCycler con las siguientes condiciones: 5 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ ; 40 ciclos de 30 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$ ; 45 segundos a  $52^{\circ}\text{C}$ ; 30 segundos a  $72^{\circ}\text{C}$  y etapa de elongación de 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Se incorporaron controles de las reacciones PCR. Los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa 1% con buffer de carga más gel red como revelador y se compararon con marcador de peso molecular de ThermoFisher. Los productos purificados se enviaron a Macrogen, Corea para su secuenciación.

### **Análisis de datos**

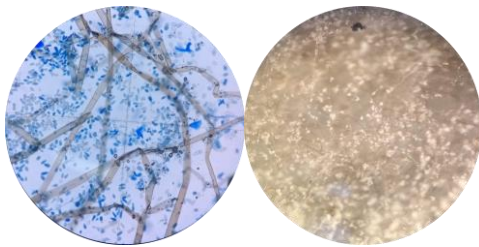
Los datos se tabularon usando la herramienta Excel Microsoft Office Plus 2019 y se calcularon los porcentajes asociados al número de endófitos aislados y el índice de antagonismo que presentó cada uno. Para el análisis filogenético, se utilizó el Software UGENE, con la base de datos NCBI a partir de las secuencias obtenidas

del proceso de secuenciación. Se seleccionaron las secuencias que exhibieron la mayor identidad y puntaje en relación con nuestras secuencias para la identificación de nuestros aislados y así mismo, se realizó el árbol filogenético basado en el análisis Neighbor-Joining [27] con nuestros aislados.

## Resultados

### Aislamiento de hongos

En el presente trabajo, se obtuvieron un total de 45 morfotipos o cepas de hongos endófitos a partir de variedades de plantas de *Cannabis* de uso medicinal de un cultivo comercial en el Municipio de la Estrella, Antioquia. De estos, 21 fueron de tipo levaduriforme y 24 filamentosos, con un promedio de 5 endófitos por variedad. La cepa *Botrytis cinerea*, aislada de *Cannabis* presentó coloración grisácea inicialmente, hasta café oscuro con formación de esclerocios dispersos (Figura 3), micelio hialino septado, con conidióforos anchos y ramificados simulando árboles.

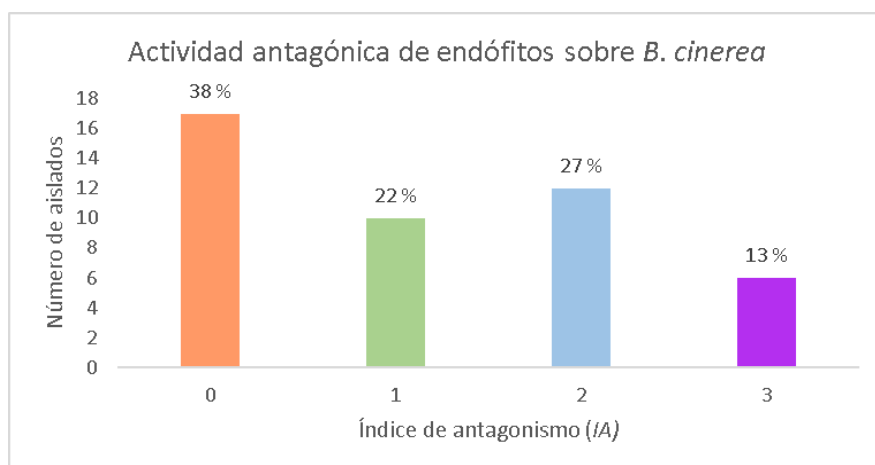


**Figura 3:** *Botrytis cinerea* aislado de floración colonizada en plantas de *Cannabis* medicinal. Izquierda: Hifas y

esporas de *B. cinerea* observadas en microscopio a 40X con azul de lactofenol. Derecha: Cúmulos de conidios formando ramificaciones simulando árboles que se extienden en hifas hialinas, y un esclerocio en su fase inicial, a través de un estereoscopio.

### Actividad antagónica

Se encontró que, de nuestras 45 cepas aisladas, 17 no presentaron ninguna actividad antagónica con el fitopatógeno *B. cinerea*, 10 presentaron actividad IA 1, 12 tipo IA 2 y 6 tipo IA 3 (Figura 1). De acuerdo a la capacidad del endófito en función de la reducción, invasión y esporulación, las cepas con índice de antagonismo IA 3 se consideraron como promisorias para el biocontrol de *B. cinerea* (Figura 4) y se seleccionaron para posteriores ensayos.

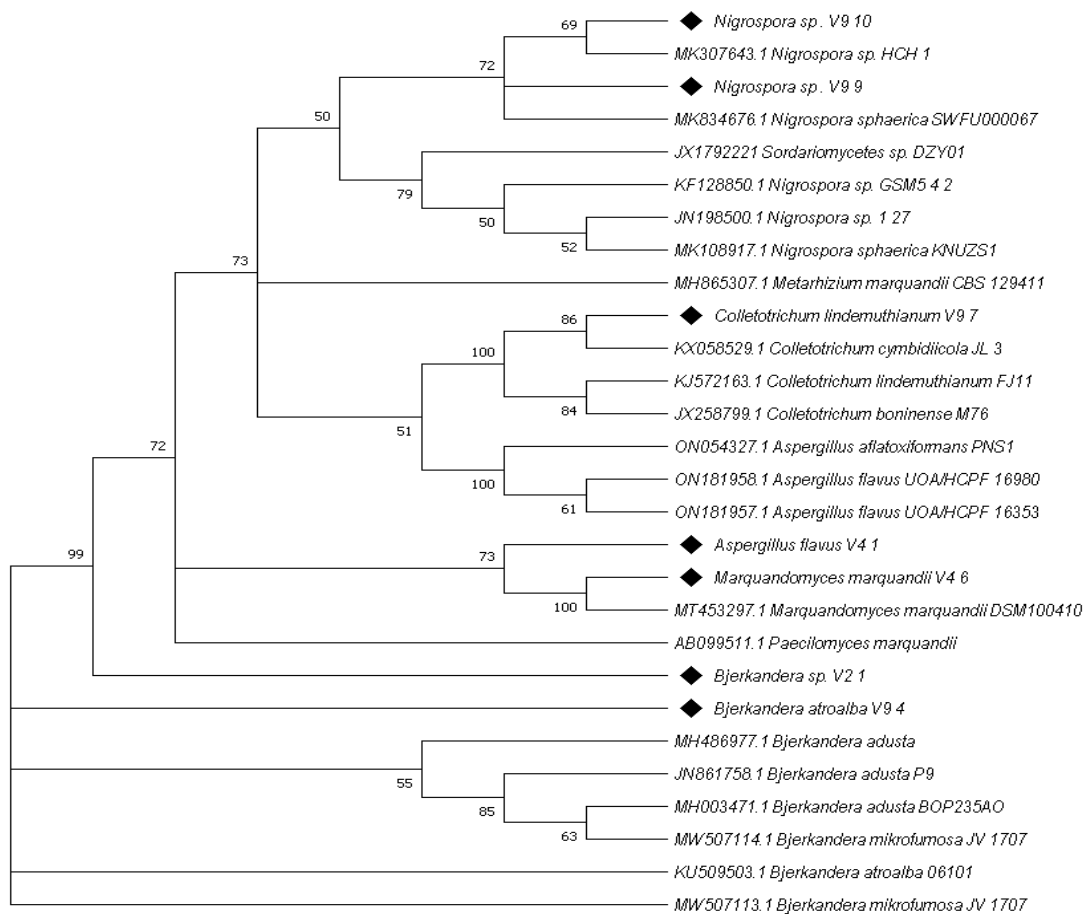


**Figura 4:** Actividad antagónica del total de endófitos aislados de *Cannabis* medicinal sobre *B. cinerea* según el índice de antagonismo que lo caracterizó.

Se identificaron taxonómicamente los endófitos considerados potenciales (Tabla II). Además, se realizó un análisis filogenético a partir de sus secuencias ITS.

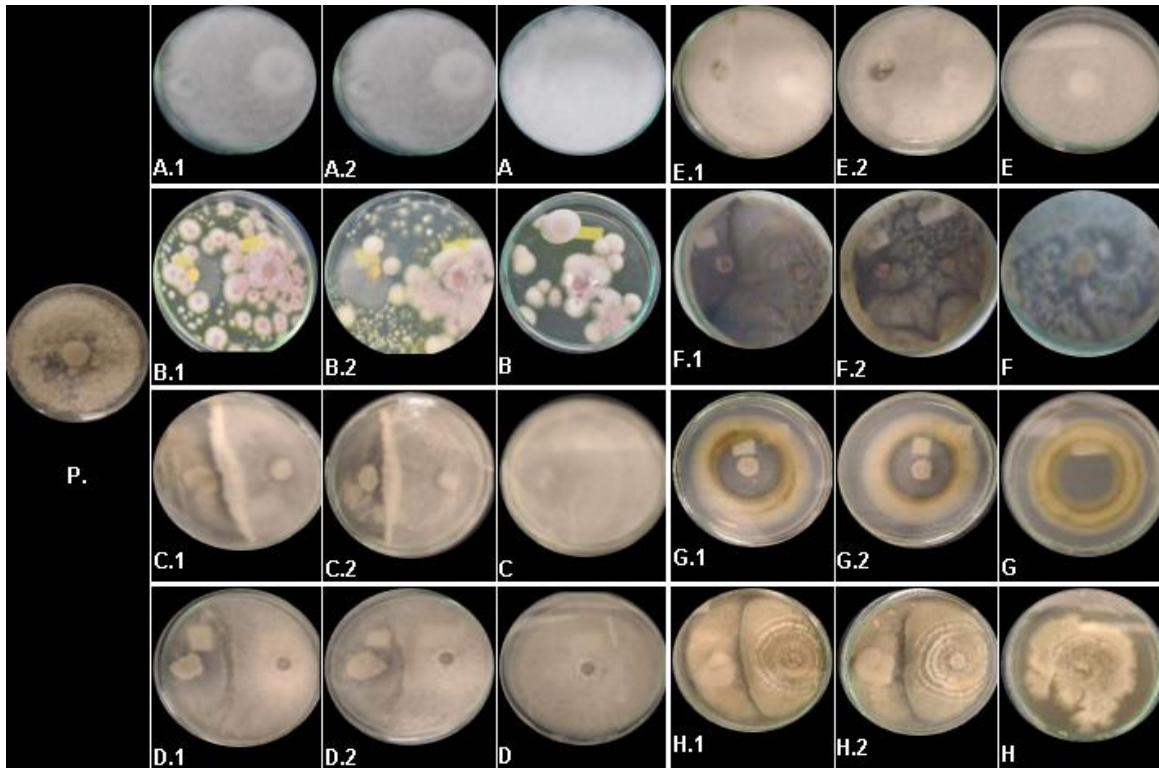
**Tabla II:** Identificación de aislados con potencial antagonista de acuerdo a su IA

Identificación	IA	Código en cepario	Porcentaje de similitud y código de acceso de la secuencia mejor alineada
<i>Aspergillus flavus</i>	3	V 4-1	100%, ON181958
<i>Aspergillus</i> sp.	3	V 10-1	Según morfología
<i>Bjerkandera atroalba</i>	3	V 9-4	97.88%, KU509503
<i>Bjerkandera</i> sp.	2	V2-1	68.56%, MH003471
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	2	V 9-7	99.47%, KJ572163
<i>Marquandomyces marquandii</i>	3	V4-6	98.48%, AB099511
<i>Nigrospora</i> sp. 1	3	V 9-9	97.61%, JN198500
<i>Nigrospora</i> sp. 2	3	V 9-10	95.8%, KF128850



**Figura 5.** La historia evolutiva se dedujo con el método Neighbor-Joining [27]. El árbol de consenso bootstrap inferido de 1000 repeticiones [28] se toma para la historia evolutiva de los taxones analizados [28]. Las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos del 50 % de réplicas de arranque se colapsan. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque [1000 repeticiones] se muestra junto a las ramas [28]. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de 2 parámetros de Kimura [29] y están en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. Este análisis involucró 28 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron las posiciones ambiguas para cada par de secuencias. Hubo un total de 687 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en el software UGENE.

Nuestros aislados endófitos fúngicos de plantas de *Cannabis* presentan un rombo y su número de cepario y las secuencias relacionadas en el BLAST con su respectivo número de acceso.



**Figura 6:** Resultados de la evaluación del efecto antagonista de las cepas de hongos endófitos obtenidas a partir de plantas de *Cannabis* medicinal (a la derecha en el enfrentamiento) y el patógeno *B. cinerea* (a la izquierda en el enfrentamiento). Los números 1 y 2 indican las réplicas por tratamiento, la letra sola muestra las características morfológicas de la cepa pura. **A.** *Aspergillus flavus* (V4-1), **B.** *Marquandomyces marquandii* (V4-6), **C.** *Bjerkandera atroalba* (V9-4), **D.** *Nigrospora* sp.1 (V9-9), **E.** *Nigrospora* sp.2 (V9-10), **F.** *Aspergillus* sp. (V10-1), **G.** *Bjerkandera* sp. (V2-1), **H.** *Colletotrichum lindemuthianum* (V9-7). **P.** Control de crecimiento patógeno *Botrytis cinerea*.

## Discusión

Aislamos de hojas sanas de *Cannabis* un total de 45 endófitos fúngicos de material vegetal de *Cannabis* de variedades medicinales cultivadas en el departamento de Antioquia, de los cuales, 21 fueron de tipo levaduriforme y 24 filamentosos. De ellos, el 27% fue capaz de reducir el crecimiento de la colonia del patógeno (*IA 2*) y el 13%, los más representativos de los aislados, no sólo redujeron el crecimiento, sino también esporularon o invadieron la colonia de *B. cinerea* (*IA 3*), siendo potenciales antagonistas. Los demás aislados no tuvieron efecto significativo sobre el patógeno, por lo que se clasificaron en los índices 0 y 1 con un 38 % y 22 %, respectivamente (Figura 4).

Es interesante resaltar, que la mayor proporción de *IA 2*, fueron levaduras (67 %) al reducir la colonia del patógeno. Se ha encontrado que las levaduras tienen diferentes mecanismos de acción sobre el patógeno como son la producción de compuestos orgánicos volátiles, la liberación de enzimas extracelulares hidrolíticas difusibles [30], producción de sideróforos que aumentan la competencia por metales [31] y la competencia por nutrientes [30,32]

Centrándonos en aquellos morfotipos con alta capacidad antagónica sobre *B. cinerea*, clasificados aquí como *IA 3*, observamos que, este está representado únicamente por organismos filamentosos y esporulados, al igual que se ha registrado previamente por ser el tipo dominantes de los hongos presentes en el microbioma de plantas de *Cannabis* [33]. En general, estos hongos se caracterizaron por su crecimiento rápido y formación de micelio denso sobre el patógeno, incluso en algunos se dio la formación de metabolitos secundarios que se observaron como exudados traslúcidos sobre el micelio, representando los mecanismos acción reportados en la literatura para los hongos filamentosos, como son la competencia por espacio y nutrientes, sumadas por otras acciones como antibiosis, producción de enzimas líticas y la producción de compuestos orgánicos volátiles aunque esto no se evaluó en este trabajo [22,23].

Entre los hongos con capacidad IA3 se encuentra *Bjerkandera atroalba*, que se caracteriza por su importante producción de enzimas antioxidantes [34]. También obtuvimos otro morfotipo (V2-1) del género, con muy bajo porcentaje de identidad (68,56 %) debido a inconvenientes en la amplificación de la región ITS (Figura 5). La secuencia similar, fue de un endófito asociados al género *Polylepis* [35,36], que se encuentra en la literatura como capaz de degradar un compuesto xenobiótico recalcitrante [37] además de ser antagónica de *Fusarium oxysporum* f. sp *herbemontis* [38] y *F. graminearum*, donde presentó además promotores de crecimiento vegetal [39] y 3 tipos de alcaloides como compuestos volátiles [40]. Igualmente, consideramos que es necesario confirmar esta identificación mediante el uso de otros marcadores como el de la subunidad larga y del gen peroxidasa [41] o como lo hizo Robles C., [42] a través de análisis filogenéticos.

Otros dos aislamientos obtenidos pertenecen al género *Aspergillus*, uno de ellos identificado molecularmente como *A. flavus* y el otro hasta género de acuerdo a su morfología. Sus enfrentamientos fueron interesantes, debido a que uno de ellos exhibió un rápido crecimiento filamentoso y el otro enteramente esporulado. En ambos aislados, la estrategia de antagonismo permitió la reducción de crecimiento y esporulación sobre el patógeno, a través de la competencia, la posible producción de enzimas líticas o de 7 tipos de xantonas, 11 derivados de asteltoxina prenilada y furanona [40] como se enuncia en la literatura. De manera similar al mecanismo de acción de otro biocontrolador muy utilizado: *Trichoderma* que expresa una mejor capacidad para movilizarse y absorber nutrientes [43] gracias a su morfología esporulada. Además, este tipo de aislados, se han considerado como agentes de biocontrol de patógenos como *Fusarium* sp. [44] *C. gloeosporioides* [45] *C. lunata* [46] *Sclerotinia sclerotiorum* [18]. Estos géneros se han probado a partir de sus extractos y en combinación con segmentos de plantas de *Cannabis* y otros de sus endófitos, potenciando su efecto inhibitorio [46], esta podría ser una metodología a implementar a futuro sobre nuestro patógeno. Con el fin de corroborar de estas dos cepas de interés, se recomienda estudiarlas con otros marcadores moleculares importantes para el género, como son el gen de la  $\beta$ -tubulina, calmodulina y la RNA

pol II [47], debido a que la región ITS no presenta suficiente variabilidad para identificar especies del género *Aspergillus* [48].

Un aislado particularmente interesante, fue *Marquandomyces marquandii* anteriormente llamado *Paecilomyces marquandii* [49]. Se tiene muy poca información de nuestra especie, pero se resalta su capacidad para descontaminar ambientes con el pesticida [50] lo que podría ser una ventaja de la especie en el campo agrícola, no solo por el efecto antagonista observado aquí sobre *B. cinerea*, sino también como biorremediador y su diversa producción enzimática [51]. A pesar de la separación filogenética *Marquandomyces* guarda cierta similaridad y cercanía con el género *Paecilomyces*, por lo que se espera que se compartan algunas de sus características ecológicas como promotor del crecimiento vegetal, supresor de nemátodos y producción de proteínas hidrolíticas [52], adicionalmente, el género *Paecilomyces* ha sido reportado como endófito de *Cannabis* en hojas, ramas y cogollos con éxito de inhibición en el mismo patógeno *B. cinerea* [46]. Esta cepa, al igual que los *Aspergillus*, coloniza rápidamente el medio gracias a que esporula rápidamente, despojando al patógeno de los nutrientes cercanos. Su acción puede obedecer a un mecanismo sinérgico de antagonismo al producir metabolitos secundarios, para el género *Paecilomyces* con al menos unos 140 metabolitos entre policétidos, terpenoides y esteroides [51].

Aislamos también un morfotipo del género *Colletotrichum* sp. que, en nuestro enfrentamiento, exhibió competencia por su rápida colonización y observamos que al entrar en contacto con el patógeno formó una zona de inhibición entre ambos. Esta inhibición puede ser posible gracias a varios metabolitos bioactivos presentes en este género, como son 10 tipos de esteroides, 6 de policétidos y xantonas [40]. Esto podría significar que a nivel *in vitro* podría mitigar la dispersión de la enfermedad. Este género es muy diverso, más de 1300 especies, algunas de ellas son patógenas causando antracnosis, otros son endófitos de plantas como *Cannabis* [46], promotores del crecimiento, entomopatógenos o patógenos humanos [53]. En este estudio encontramos *C. lindemuthianum*, sin embargo, la



región ITS no tiene resolución suficiente para delimitar una especie del género por lo que se recomienda una tipificación de secuencias multilocus (MLST), en particular de los genes como *act*, *ApMat*, *apn2*, *cal* [53]. Sin embargo, *C. lindemuthianum* guarda cierta especificidad entre huéspedes de plantas dicotiledóneas, al igual que en nuestro caso el *Cannabis* [54]. De manera interesante, se ha considerado antagonismo con *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* [38] mostrando esas características oportunistas en la naturaleza.

Obtuvimos también dos morfotipos identificados como *Nigrospora* sp., uno de ellos creció completamente sobre el patógeno, el otro tuvo un crecimiento más reducido, pero la interacción entre micelios mostró una inhibición más pronunciada. Este género se ha aislado como endófito de varias plantas medicinales, plantas marinas, en especies vegetales oleaginosas, pero es la primera vez que se encuentra asociada a la microbiota de *Cannabis* [33]. En China, se demostró la actividad antifúngica del metabolito Solanapirona C aislado de *Nigrospora*, además de poseer diversidad enzimática que incluye proteasas, celulasas, lipasa y fosfatasa, entre otras [55,56]. En nuestro caso, estos metabolitos, pudieron tener actividad inhibidora sobre el patógeno con un mecanismo tipo antibiosis. Este género es interesante, al presentar efecto antagónico sobre patógenos como *C. acutatum*, *F. oxysporum* y *F. solani*. [18,55,56]. Se recomienda complementar la identificación siguiendo un enfoque polifásico entre características fenotípicas y genéticas.

En este estudio, los géneros de endófitos encontrados como parte del microbioma de plantas de *Cannabis* medicinal fueron *Aspergillus*, *Colletotrichum* y *Paecilomyces* (*Marquandomyces*), han sido previamente reportados como endófitos de plantas de *Cannabis* en India, y Países Bajos [46,57]. La presencia de estos géneros, que además puede estar relacionada con las condiciones ambientales y condiciones bióticas y abióticas de la planta [33] sobre todo la humedad, podría ser indicador de semejanza entre las variedades de *Cannabis* que muestreamos y otros cultivos, obteniendo similares aislados del mismo órgano vegetal [46].

En Colombia se han aislado endófitos con capacidad antimicrobiana, como solubilizadores de fosfato y con potenciales interacciones planta – hongo que podrían promover la biosíntesis de productos naturales con diversas aplicaciones, incluidos compuestos anticancerígenos, antifúngicos, antidiabéticos e inmunosupresores [23]. Toda esa capacidad metabólica albergada en los hongos endófitos de plantas como *Cannabis* con los compuestos bioactivos, capaces de actuar como agentes de biocontrol fúngico, no sólo actúan sobre el patógeno de interés, sino que podrían ayudar a reducir severidad de otras enfermedades, controlar la propagación de los patógenos e inducir en la planta promotores de crecimiento y así contribuir a la disminución de las pérdidas económicas y productivas en la industria agrícola causada por los fitopatógenos. Es importante continuar con los procesos de bioprospección, y su aplicación *in vivo* en plantas y semillas, así como el uso de extractos de nuestros hongos y sus combinaciones, para así lograr encontrar alternativas eficientes al uso de agroquímicos y establecer sus mecanismos de acción y aplicabilidad para lograr una soberanía alimentaria, industrial y sostenible.

## **Conclusión**

La diversidad de hongos endófitos que subyacen los tejidos de las plantas productivas y potenciales como *Cannabis* medicinal, esconden alternativas sostenibles, aplicables a la agricultura, para el control biológico ante fitopatógenos como el *Botrytis cinerea*. Este es el caso de al menos 18 cepas de hongos endófitos con potencial *in vitro* cuya eficacia puede seguir siendo estudiada para futuros desarrollos en el control del moho gris, contribuyendo a reducir las pérdidas económicas que genera anualmente este patógeno en cultivos del departamento de Antioquia, así como reducir la contaminación resultante del uso indiscriminado de agroquímicos, protegiendo la flor como órgano clave para la producción de compuestos activos utilizados en la industria farmacéutica.

## Agradecimientos

Agradecemos a NuSierra por la financiación y las muestras para el proyecto. Este trabajo cuenta con el Permiso Marco de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica no comercial otorgado a la Universidad de Antioquia mediante la Resolución 0524 del 27 de mayo de 2014. Además de aprobación por NuSierra con licencia de cultivo y producción de *Cannabis* psicoactivo en la resolución 00128 del 2018.

## Referencias

1. Barrales-Cureño HJ, López-Valdez LG, Reyes C, Cetina-Alcalá VM, Vasquez-García I, Diaz-Lira OF, et al. Chemical Characteristics, Therapeutic Uses, and Legal Aspects of the Cannabinoids of *Cannabis sativa*: A Review. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [Internet]. 2020 Aug 10 [cited 2022 Jun 8];63:2020. Available from: <https://acortar.link/rM68DA>
2. Cox-Georgian D, Ramadoss N, Dona C, Basu C. Therapeutic and medicinal uses of terpenes. *Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Jun 8];333–59. Available from: <https://acortar.link/SWaD8G>
3. Pattnaik F, Nanda S, Mohanty S, Dalai AK, Kumar V, et al. Cannabis: Chemistry, extraction and therapeutic applications. *Chemosphere* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jun 9];289. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133012>
4. Lista la normativa para el cannabis medicinal en Colombia [Internet]. [cited 2022 Jul 6]. Available from: <https://acortar.link/urEuZD>
5. Cubillos Sánchez PA. Panorama del cannabis con fines médicos y científicos en Colombia Cannabis for medical and scientific purposes: the Colombian landscape. 2021 [cited 2022 Jul 5]; Available from: <https://doi.org/10.5554/22562087.e954>
6. Cannabis, el oro verde legalizado e industrializado que puede conquistar el mercado. *Asocolcanna* [Internet]. [cited 2022 Jul 6]. Available from: <https://acortar.link/MGFJb1>
7. Juan Mauricio Ramírez. Industria del Cannabis medicinal en Colombia. 2019; Available from: <https://www.repository.fedesarrollo.org.co/handle/11445/3823>
8. Orientador E, Vargas Barrera R, Rubiano Moreno, Daniel. Diseño de un plan de negocios para el cultivo, procesamiento y comercialización de Cannabis medicinal. Monografía para optar por el título de Especialista en Gerencia
9. Scott M, Rani M, Samsatly J. Endophytes of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars: identification of culturable bacteria and fungi in leaves, petioles, and seeds. *PubMed* [Internet]. 2018; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29911410/>
10. Dean R, van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, di Pietro A, Spanu PD, et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2012 May;13(4):414–30.
11. Amselem J, Cuomo CA, van Kan JAL, Viaud M, Benito EP, Couloux A, et al. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum*

- and *Botrytis cinerea*. PLoS Genetics [Internet]. 2011 Aug [cited 2022 May 14];7(8):1002230. Available from: /pmc/articles/PMC3158057/
12. Tamim M, Abdel-Wareth A. Fungal Secondary Metabolites: Current Research, Commercial Aspects, and Applications. 2021 [cited 2022 May 16];299–346. Available from: [https://link-springer-com.udea.lookproxy.com/chapter/10.1007/978-3-030-85603-8\\_8](https://link-springer-com.udea.lookproxy.com/chapter/10.1007/978-3-030-85603-8_8)
  13. de Silva NI, Brooks S, Lumyong S, Hyde KD. Use of endophytes as biocontrol agents. Fungal Biology Reviews [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 May 16];33(2):133–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001>
  14. Wang M, Du Y, Liu C, Yang X, Qin P, Qi Z, et al. Development of novel 2-substituted acylaminoethylsulfonamide derivatives as fungicides against *Botrytis cinerea*. Bioorganic Chemistry. 2019 Jun 1;87:56–69.
  15. Objetivos y metas de desarrollo sostenible - Desarrollo Sostenible [Internet]. [cited 2022 Jun 9]. Available from: <https://acortar.link/tk3hK>
  16. Ma D, Ji D, Zhang Z, Li B, Qin G, Xu Y, et al. Efficacy of rapamycin in modulating autophagic activity of *Botrytis cinerea* for controlling gray mold. Postharvest Biology and Technology. 2019 Apr 1;150:158–65.
  17. Nicot PC, Stewart A, Bardin M, Elad Y. Biological control and biopesticide suppression of *Botrytis*-incited diseases. *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. 2015 Jan 1;165–87.
  18. Segaran G, Sathiavelu M. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019 Sep 1;21:101284.
  19. Ajay Kumar. Microbial Biocontrol: Food Security and Post Harvest Management. Microbial Biocontrol: Food Security and Post Harvest Management. 2022;
  20. Meena H, Hnamte S, Siddhardha B. Secondary Metabolites from Endophytic Fungi: Chemical Diversity and Application. 2019;145–69.
  21. Paz ICP, Santin R de CM, Guimarães AM, Rosa OPP da, Quecine MC, Silva M de CP e., et al. Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Calonectria gracilis* by eucalypts growth promoters *Bacillus* spp. Microb Pathog [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2022 May 16];121:106–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29777829/>
  22. Bolívar Anillo HJ, Garrido C, Collado IG. Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Springer Nature. 2019;
  23. José Bolívar-Anillo H, Abdellah E, da Silva Lima G, Izquierdo-Bueno I, Moraga J, Franco dos Santos G, et al. Endophytic Fungal Community Associated with Colombian Plants. Neotropical Endophytic Fungi [Internet]. 2021 [cited 2022 May 20];93–108. Available from: [https://link-springer-com.udea.lookproxy.com/chapter/10.1007/978-3-030-53506-3\\_5](https://link-springer-com.udea.lookproxy.com/chapter/10.1007/978-3-030-53506-3_5)
  24. Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust HJ. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. Mycological Research. 1993 Dec 1;97(12):1447–50.
  25. Ramos EA, Violeth JB, Zumaqué LO. EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO Y MULTIPLICACIÓN DE *Trichoderma* sp. EN SUSTRATO DE PLÁTANO EN MEDIO LÍQUIDO ESTÁTICO. Acta Biológica Colombiana [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2022 May 20];14(3):61–70. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/12597>

26. Dhingra OD, Sinclair JB. Basic plant pathology methods. *Basic Plant Pathology Methods* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 May 20];1–434. Available from: <https://acortar.link/XbMoJE>
27. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425. 1987.
28. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791. 1985.
29. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120. 1980.
30. Parafati L, Vitale A, Restuccia C, Cirvilleri G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*. 2015 May 1;47:85–92.
31. Fernandez-San Millan A, Larraya L, Farran I, Ancin M, Veramendi J. Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. *Biological Control*. 2021 Sep 1;160:104683.
32. Sun C, Fu D, Jin L, Chen M, Zheng X, Yu T. Chitin isolated from yeast cell wall induces the resistance of tomato fruit to *Botrytis cinerea*. *Carbohydrate Polymers*. 2018 Nov 1;199:341–52.
33. Taghinasab M, Jabaji S. Cannabis Microbiome and the Role of Endophytes in Modulating the Production of Secondary Metabolites: An Overview. *Microorganisms* 2020, Vol 8, Page 355 [Internet]. 2020 Mar 2 [cited 2022 May 22];8(3):355. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/3/355/htm>
34. Bastos Santos T. Bioprospecting of endophytic filamentous fungi of medicinal species with potential to produce molecules of biotechnological interest [Internet]. [Sorocaba]: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS; 2018 [cited 2022 May 21]. Available from: <https://acortar.link/eL3UWQ>
35. Resumen de GenBank [Internet]. [cited 2022 Jun 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
36. Portero C. Diversidad de hongos endófitos asociados al género *Polylepis* en el ecosistema del Páramo Andino en los Andes del Norte [Internet]. Pontificia Universidad Católica de Ecuador. 2013 [cited 2022 Jun 1]. Available from: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/12099>
37. Dhiman N, Jasrotia T, Sharma P, Negi S, Chaudhary S, Kumar R, et al. Immobilization interaction between xenobiotic and *Bjerkandera adusta* for the biodegradation of atrazine. *Chemosphere*. 2020 Oct 1;257:127060.
38. Brum MC, Araújo WL, Maki CS, Azevedo JL. Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. *Genet Mol Res*. 2012;11(4):4187–97.
39. Li SuPing, Feng Xiao, Zhu YunYun. Análisis del efecto de control de la cepa del hongo biocontrolador *Bjerkandera adusta* M-1 sobre la roña de la plántula de trigo y su mecanismo fisiológico y bioquímico. [Internet]. *Journal of Plant Protection*. 2019 [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20193488043>
40. Cao D, Sun P, Bhowmick S, Wei Y, Guo B, Wei Y, et al. Secondary metabolites of endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata*. *Fitoterapia*. 2021 Nov 1;155:104970.

41. Surian E. Caracterización molecular y enzimática de enzimas lignolíticas producidas por *Oxyporus latemarginatus* en fermentación sumergida. [Tlaxcala]; 2017.
42. Robles CA, Carmarán CC, Lopez SE. Molecular techniques based on ITS analysis: useful tools for the identification of wood-decay Basidiomycetes in urban trees? *Tomo*. 2012;37(1):91–108.
43. Sood M, Kapoor D, Kumar V, Sheteiwy MS, Ramakrishnan M, Landi M, et al. Trichoderma: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants* 2020, Vol 9, Page 762 [Internet]. 2020 Jun 18 [cited 2022 Jul 3];9(6):762. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/6/762/htm>
44. Aldinary AM, Morsy Abdelaziz A, Farrag AA, Attia MS. Biocontrol of tomato Fusarium wilt disease by a new *Moringa* endophytic *Aspergillus* isolates. *Materials Today: Proceedings*. 2021 Apr 8;
45. Gupta S, Choudhary M, Singh B, Singh R, Dhar MK, Kaul S. Diversity and biological activity of fungal endophytes of *Zingiber officinale* Rosc. with emphasis on *Aspergillus terreus* as a biocontrol agent of its leaf spot. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2022 Jan 1;39:102234.
46. Gautam AK, Kant M, Thakur Y. Isolation of endophytic fungi from *Cannabis sativa* and study their antifungal potential. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2013 Apr;46(6):627–35.
47. Montoya Villa YV, Montes Correa LA, López A, Hernández O. Estandarización de técnicas moleculares basadas en amplificación y análisis de restricción para la identificación de especies de *Aspergillus* spp. *Biblioteca digital UdeA*. 2020;
48. Nasri T, Hedayati MT, Abastabar M, Pasqualotto AC, Armaki MT, Hoseinnejad A, et al. PCR-RFLP on  $\beta$ -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus*. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2022 Jul 10];117:144–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26264625/>
49. Index Fungorum - Registro de nombres [Internet]. [cited 2022 Jul 6]. Available from: <https://acortar.link/nBUdcC>
50. Słaba M, Szewczyk R, Bernat P, Długoński J. Simultaneous toxic action of zinc andalachlor resulted in enhancement of zinc uptake by the filamentous fungus *Paecilomyces marquandii*. *Science of The Total Environment*. 2009 Jun 15;407(13):4127–33.
51. Li XQ, Xu K, Liu XM, Zhang P. A Systematic Review on Secondary Metabolites of *Paecilomyces* Species: Chemical Diversity and Biological Activity. *Planta Medica* [Internet]. 2020 Jul 9 [cited 2022 May 21];86(12):805–21. Available from: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/a-1196-1906>
52. Moreno-Gavira A, Huertas V, Diánez F, Santos M, Sánchez-Montesinos B. *Paecilomyces* and Its Importance in the Biological Control of Agricultural Pests and Diseases. *Plants* 2020, Vol 9, Page 1746 [Internet]. 2020 Dec 10 [cited 2022 Jul 6];9(12):1746. Available from: <https://acortar.link/LdMfUu>
53. Talhinhos P, Baroncelli R. *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity* 2021 110:1 [Internet]. 2021 Sep 29 [cited 2022 May 25];110(1):109–98. Available from: <https://acortar.link/hRGQN7>
54. Rojo-Báez I, Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A, Allende-Molar R, et al. Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista mexicana de*

fitopatología [Internet]. 2017 Jun 9 [cited 2022 May 25];35(3):549–70. Available from: <https://acortar.link/89IOf6>

55. Bhim Pratap Singh. Advances in Endophytic Fungal Research. Singh BP, editor. 2019 [cited 2022 May 16]; Available from: <https://acortar.link/xHeK3M>
56. Rana KL, Kour D, Sheikh I, Yadav N, Yadav AN, Kumar V, et al. Biodiversity of Endophytic Fungi from Diverse Niches and Their Biotechnological Applications. 2019;105–44.
57. Kusari P, Kusari S, Spiteller M, Kayser O. Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: Diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. *Fungal Diversity*. 2013 May 1;60(1):137–51.