



Universidad del Mar
Campus Puerto Escondido

Identificación de tres hongos endófitos de plátano
(*Musa* sp. AAB) y evaluación de su potencial antifúngico
contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

TESIS

Que para obtener el Título Profesional de
Licenciada en Biología

Presenta
Aneliz de Ita Zárate Ortiz

Director de Tesis
Dr. Luis David Maldonado Bonilla

Puerto Escondido, Oaxaca 2023

DEDICATORIA

Con infinito amor y admiración hacia las personas que más quiero, aquellas que me han enseñado el verdadero significado de la frase: Todo lo que ahora ves arder, en realidad te está iluminando @LosRomPen.

A mi mamá Yola, mi principal soporte, guía y refugio.

A mi papá Rodrigo, te abrazo con el alma hasta el cielo. Gracias por velar mis sueños.

A mis hermanos y soulmates. Yadi, Are, Jose y Said, las personas más importantes en mi vida. ¡Lo logramos!

A mis sobrinos, Zoe, Sofi y Liguito, les amo con el alma.

A mi niño de los hoyuelos, desde el plano donde te encuentras, sé que estás feliz por mí.

A la Ane de hace 10 años y la Aneliz que seré en 10 años. ¡Todo pasa!

A ti, que estas por leer este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todos aquellos que estuvieron a mi lado durante estos seis años de arduo trabajo. En especial, deseo dirigirme a mi familia, quienes han brindado un apoyo inquebrantable tanto en el ámbito económico como moral. A mi madre, por impulsarme a estudiar la universidad, por su comprensión, compañía y paciencia en todo el proceso. A mis hermanos, les estoy eternamente agradecida por haber sacrificado sus propios sueños para brindarme oportunidades mejores de las que ellos tuvieron y por depositar su confianza en mí. Principalmente a mi hermana Are, por ser mi inspiración, mi guía, mi mejor amiga y respaldo emocional. A mi hermano Jose, por ser mi mejor amigo, por su apoyo especialmente durante las épocas de crisis existenciales mientras escribía mi tesis, por ser mi lugar seguro y de calma.

A mis revisores, el Dr. Luis Maldonado, Dr. Jose Luis Villarruel, Dr. Juan Manuel, Dr. Eustacio y al Dr. Noé, agradezco el tiempo que tomaron para leer y evaluar mi investigación, así como por sus valiosas críticas constructivas que, sin duda alguna, contribuyeron significativamente a mejorar el documento.

Mi más sincero reconocimiento a mi director de tesis y mi principal mentor el Dr. Luis Maldonado. Desde el momento en que me abrió las puertas del laboratorio de genética, pasando por mi etapa como voluntaria, prestadora de servicio social y finalmente como tesista, su apoyo ha sido invaluable. No solo me ha brindado orientación académica, sino que también ha sido un constante impulsor de mi crecimiento intelectual, personal y me ha alentado a salir de mi zona de confort.

A los distinguidos profesores de la UMAR, quienes desempeñaron un papel fundamental en mi formación como bióloga. Especialmente, a aquellos que brindaron su valiosa contribución a esta investigación y a quienes fueron mis mentores a lo largo de mi trayectoria académica. A la maestra Ana Claudia por proporcionar las plantas de plátano necesarias para llevar a cabo los experimentos, así como por las charlas en el laboratorio y en clase. Al Dr. Villarruel por su apoyo en la identificación, clasificación y captura de imágenes microscópicas de los hongos, además, de las conversaciones enriquecedoras y su constante apoyo moral. A la Dra. Rosalia, por saber compartir sus

conocimientos en clase, por que siempre tiene las palabras adecuadas para calmar mi incertidumbre y gracias confiar en mí e impulsarme a escribir mi primer artículo académico. Al Dr. Eduardo por recibirme como voluntaria en el laboratorio de paleontología mientras me encontraba en el limbo al final de la carrera y por sus conversaciones que trascendieron lo académico. Al Dr. Juan Manuel por su amistad, por creer en mi potencial y alentarme a buscar oportunidades mejores. A la Dra. Calderón por su amistad y por pensar en mi para colaborar en su proyecto. Al Dr. Grajales por permitirme ser voluntaria en el laboratorio de colecciones biológicas. A todos ellos gracias por inspirarme y transmitir su amor por lo que hacen.

A la Universidad del Mar (UMAR), campus Puerto Escondido y sus instalaciones. Al laboratorio de colecciones biológicas y el laboratorio de paleontología, donde inicialmente exploré hasta encontrar mi verdadera pasión. Al laboratorio de genética, donde realicé la mayoría de mis experimentos.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), principalmente al laboratorio de proteómica y metabolómica, donde se procesaron y analizaron las muestras de los hongos, así como al laboratorio de microbiología y al técnico que me permitieron incubar y procesar los hongos. Al Dr. Aldo Moreno Ulloa, le agradezco por recibirme en su grupo y compartir su conocimiento, tanto dentro como fuera del CICESE. Al técnico Rommel por su apoyo en el procesamiento y análisis de datos metabolómicos. A Jordan y Alan les agradezco por sus consejos y sugerencias en el análisis de datos en metabolómica.

A todos con los que coincidí y conectamos en este espacio-tiempo. Principalmente a Ale, por ser su amistad incondicional, por los días llenos de risas, las noches de café y las madrugadas de párpados cansados. A Teffy y Lore por abrirme las puertas de su casa y cora y hacer de mi estancia en Ensenada un viaje único.

A sam, tus melodías calmaron mi mundo mas de una vez.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecerme a mí misma. Por la energía y tiempo dedicados, por superarme cada día, por trabajar y estudiar hasta tarde, por los sacrificios, por aferrarme y nunca desistir. Pero sobre todo por creer en mi.

CONTENIDO

LISTADO DE FIGURAS	iii
LISTADO DE TABLAS	iv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades de plátanos y bananos (<i>Musa</i> spp.)	3
1.2 Importancia agrícola de plátanos y bananos	4
1.3 <i>Fusarium</i> como amenaza para las plantas de plátano: Mal de Panamá	5
1.4 Agente causal: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	6
1.5 Mecanismo de infección y síntomas causados por <i>Fusarium</i>	7
1.6 Razas patógenas de <i>Fusarium</i>	8
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Control biológico como alternativa para controlar a <i>Fusarium</i>	10
2.2 Hongos endófitos como agentes de control biológico	11
2.3 Mecanismo de interacción de los hongos endófitos	12
2.4 Agentes de control biológico para combatir a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	13
2.5 Código de barras para identificación molecular de hongos	15
2.6 Metabolómica como herramienta para identificar compuestos bioactivos de hongos.....	16
3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	21
4. OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos	22
5. HIPÓTESIS.....	22

6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Identificación molecular de N10, N11 y N12	22
6.2 Descripción de las características macro y microscópicas e identificación morfológica de los hongos N10, N11 y N12	24
6.3 Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i> : efecto de N10, N11 y N12 sobre el crecimiento micelial de <i>FocM5</i>	26
6.4 Evaluación de extractos de N110, N11 y N12 sobre el crecimiento micelial y germinación de conidios de <i>FocM5</i>	29
6.5 Perfiles metabólicos del extracto de sobrenadantes y biomasa de N10, N11 y N12.....	32
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1 Identificación molecular del género y especie de los hongos N10, N11 y N12	35
7.2 Identificación macro y micromorfológica de los hongos N10, N11 y N12.....	38
7.3 Efecto antagónico a través de la confrontación directa e indirecta: efecto en el crecimiento micelial de <i>FocM5</i>	49
7.4 Efecto antagónico a través de la confrontación indirecta: efecto en la germinación de conidios de <i>FocM5</i>	52
7.5 Evaluación del extracto de sobrenadantes de <i>Talaromyces</i> sobre el crecimiento micelial de <i>FocM5</i>	54
7.6 Evaluación del extracto del sobrenadante de N12 sobre germinación de conidios de <i>FocM5</i>	55
7.7 Perfiles metabólicos del extracto de sobrenadante y biomasa de N10, N11 y N12.....	58
8. CONCLUSIONES	66
9. PERSPECTIVAS	67
10. LITERATURA CITADA	68
11. MATERIAL SUPLEMENTARIO	82

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas causados por <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i> cubense</i> en plantas de plátano.....	8
Figura 2. Operón ribosomal de la región <i>ITS</i> completa y parte del <i>LSU</i>	16
Figura 3. Localización de oligonucleótidos <i>ITS1F</i> y <i>LR5</i> utilizados para amplificar y secuenciar la región <i>ITS-LSU</i>	24
Figura 4. Método indirecto mediante la técnica del papel celofán: Efecto de los hongos N10, N11 y N12 sobre el crecimiento micelial de <i>FocM5</i>	28
Figura 5. Método indirecto mediante la técnica del papel celofán: Efecto de los hongos N10, N11 y N12 sobre la germinación de conidios de <i>FocM5</i>	28
Figura 6. Obtención de extractos de N10, N11 y N12..	30
Figura 7. Microcultivo en portaobjetos: evaluación del efecto del extracto de N12 sobre la germinación de conidios de <i>FocM5</i>	31
Figura 8. Análisis electroforético de la región <i>ITS-LSU</i> amplificada por PCR.....	36
Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la región <i>ITS</i> de especies tipo de la sección <i>Talaromyces</i>	37
Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la región <i>LSU</i> de especies tipo de la sección <i>Talaromyces</i>	38
Figura 11. Morfología N10, N11 y N12 en diferentes medios de cultivo.	40
Figura 12. Morfología de N12 en diferentes medios de cultivo.	40
Figura 13. Micromorfología de N10, N11 y N12.....	42
Figura 14. Bioensayo de confrontación directa.	51
Figura 15. Bioensayo de confrontación indirecta.	52
Figura 16. Germinación de conidios en presencia de <i>Talaromyces</i>	53
Figura 17. Inhibición de la germinación de conidios de <i>FocM5</i> en presencia de <i>Talaromyces</i>	54
Figura 18. Evaluación del extracto crudo de <i>Talaromyces</i>	55
Figura 19. Alteración morfológica de las hifas de <i>FocM5</i>	58
Figura 20. Red molecular de <i>Talaromyces</i>	61

Figura 21. Subredes del sobrenadante.	63
Figura 22. Alineamiento múltiple de las secuencias <i>ITS-LSU</i> de los hongos N10, N11 y N12.....	83
Figura 23- Cromatograma de iones totales del sobrenadante.....	84
Figura 24. Cromatograma de iones totales de la biomasa..	84

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Razas patógenas de <i>Foc</i> y variedad de <i>Musa</i> spp. que infecta	9
Tabla 2. Cebadores o primers universales comúnmente utilizados para amplificar la región <i>ITS</i> completa y <i>LSU</i>	16
Tabla 3. Secuencias de <i>ITS</i> y <i>LSU</i> sometidas al BLASTN por separado.	36
Tabla 4. Características macromorfológicas de N10, N11 y N12 y de especies relacionadas filogenéticamente.	45
Tabla 5. Características micromorfológicas de N10, N11 y N12 y de especies relacionadas filogenéticamente.	47
Tabla 6. Identificador del NCBI de especies del género <i>Talaromyces</i> , sección <i>Talaromyces</i> utilizadas para el árbol filogenético.	85
Tabla 7. Principales metabolitos encontrados en biomasa y sobrenadante.....	86

RESUMEN

La producción de plátanos y bananos ha sido afectada por una enfermedad llamada mal de Panamá, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), y dada la severidad de esta enfermedad, es necesario controlar este fitopatógeno mediante medidas sustentables como el control biológico. En este contexto, el objetivo de esta investigación fue la identificación molecular y morfológica de los hongos N10, N11 y N12, que se encuentran en plantas de plátano de la región Costa de Oaxaca, así como la evaluación *in vitro* de su capacidad antifúngica contra la cepa *FocM5*.

Se amplificó y secuenció la región *ITS-LSU* para clasificar a los hongos por criterios moleculares. Se llevó a cabo la descripción morfológica del crecimiento de los hongos en diferentes medios de cultivo, y su descripción microscópica se hizo por observaciones de sus estructuras reproductoras con microscopía óptica. Los tres hongos fueron identificados dentro del género *Talaromyces*, formando un solo clado cercano a *T. rubicundus*. Sin embargo, no fue posible asignar una especie conocida.

Se realizaron pruebas de confrontación *in vitro* directa e indirecta, evidenciándose que los tres hongos pueden inhibir el crecimiento de *FocM5*, y que moléculas difusibles tienen un papel preponderante en la inhibición. Se realizó una extracción con acetato de etilo del medio líquido donde crecieron los tres hongos. El extracto inhibió el crecimiento micelial y retrasó la germinación de conidios de *FocM5*. El extracto se analizó mediante LC-MS2 y para una primera anotación de metabolitos se utilizó la herramienta GNPS.

Se detectaron los poliésteres orbucina y 32-hidroxiorbucina, reportados como inhibidores de la síntesis de pared celular. Estos compuestos podrían estar involucrados en la malformación hifal observada en *FocM5* en esta investigación.

Por lo tanto, se evidenció que los hongos endófitos N10, N11 y N12 aislados de plantas de plátano Manzano tienen el potencial de ser implementadas como control biológico de *FocM5*, ya que secretan moléculas que inhiben el crecimiento de este hongo posiblemente al afectar la síntesis de polisacáridos de la pared celular. Además, se evidenció la riqueza de metabolitos de una posible nueva especie endófito de *Talaromyces*.

ABSTRACT

The production of plantains and bananas has been affected by a disease called Panama disease, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), and given the severity of this disease, it is necessary to control this phytopathogen through sustainable measures such as biological control. In this context, the objective of this research was the molecular and morphological identification of the N10, N11 and N12 fungi, which are found in plantain plants in the Coastal region of Oaxaca, as well as the in vitro evaluation of their antifungal capacity against the *FocM5* strain.

The *ITS-LSU* region was amplified and sequenced to classify the fungi based on molecular criteria. Morphological description of fungal growth was conducted on different culture media, and their microscopic description was done through observations of their reproductive structures using optical microscopy. The three fungi were identified within the *Talaromyces* genus, forming a single clade closely related to *T. rubicundus*. However, it was not possible to assign a known species.

Direct and indirect in vitro confrontation tests were performed, evidencing that all three fungi can inhibit the growth of *FocM5*, and that diffusible molecules have a preponderant role in the inhibition. An ethyl acetate extraction was carried out from the liquid medium in which the three fungi grew. The extract inhibited mycelial growth and delayed the germination of *FocM5* conidia. The extract was analyzed using LC-MS2, and the GNPS tool was used for initial metabolite annotation.

The polyesters orbucicin and 32-hydroxyorbucicin were detected. They were reported as inhibitors of cell wall biosynthesis. These compounds might be involved in the observed hyphal malformation in *FocM5* in this investigation.

Therefore, it was evident that the endophytic fungi N10, N11, and N12 isolated from plantain plants have the potential to be implemented as biological control agents against *FocM5*, since they secrete molecules that inhibit the growth of this fungus, possibly by affecting polysaccharide synthesis in the cell wall. In addition, the richness of metabolites of such new endophytic species of *Talaromyces* was evidenced.