



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD JURIQUILLA



LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA

“ASOCIACIONES SIMBIÓTICAS ENTRE
HONGOS EPIBIÓTICOS E *IPOMOEA MURUCOIDES*”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADA EN TECNOLOGÍA

PRESENTA:
SUSANA PINEDA SOLIS

TUTOR:
DR. ALBERTO PRADO FARÍAS
CO-TUTOR:
DRA. ROSARIO VÁZQUEZ MORALES

MIEMBROS DEL JURADO DE GRADO:
DRA. AUREA OROZCO RIVAS
DRA. MARISOL DE LA MORA CURIEL
DR. JESÚS EMMANUEL SOLÍS PÉREZ
DR. LUIS HERNÁNDEZ SANDOVAL

QUERÉTARO, QUERÉTARO, MÉXICO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos a:

La Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por financiar este proyecto PAPIIT con clave IA209323.

Dr. Alberto Prado Farías, Escuela Nacional de Estudios Superiores Juriquilla (ENESJ), UNAM, Profesor de Carrera Asociado C y director de esta tesis.

Dra. Rosario Vázquez Morales, Escuela Nacional de Estudios Superiores Juriquilla (ENESJ), UNAM, Profesora de Carrera Asociado C y codirectora de esta tesis.

Dr. Jean-Luc Boevé, OD Taxonomy and Phylogeny, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Bélgica

Dra. Miriam Rocío Estévez González, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), UNAM, responsable de los Laboratorios de Biomateriales Aplicados y Caracterización de Biomateriales.

C. Alberto Emilio Pineda Martínez por el apoyo para continuar con mi educación universitaria.

Resumen

La mayoría de las plantas forma asociaciones simbióticas con hongos endófitos, los cuales viven dentro del hospedero, y pueden instalarse entre o dentro de las células del tejido vegetal, pudiendo crecer en raíces, tallos y hojas, todo esto sin causar síntomas aparentes de enfermedad y solo algunos de estos hongos emergen para esporular. Los hongos endófitos tienen una estrecha relación con su hospedero, pudiendo modificar sus mecanismos de defensa y conferirle ventajas funcionales. Ejemplo de ello es la familia Convolvulaceae en donde varias especies se asocian con hongos endófitos que producen y transfieren alcaloides a su planta hospedera, estos alcaloides protegen los tejidos de la planta contra depredadores. Uno de estos alcaloides es la swainsonina, responsable de lesiones pancreáticas y renales en animales expuestos a la planta. En este trabajo, se presenta el caso del casahuate, *Ipomoea murucoides*, en el cual, se ha observado la presencia de dos hongos posiblemente simbióticos, los cuales son visibles en su fase epibiótica en hojas jóvenes. Para conocer la identidad y función de estos hongos endófitos, se hizo una reconstrucción filogenética, extrayendo ADN de diferentes poblaciones de *I. murucoides*, ubicadas en el estado de Querétaro. Además, se evaluó la concentración de swainsonina presente en hojas y semillas con relación a la identidad de los hongos endófitos identificados. Se hicieron estudios de granivoría y herbivoría en las poblaciones seleccionadas, en donde se registraron los beneficios que le brindan estos hongos a *I. murucoides*. De forma complementaria a esta investigación, se desarrolló un análisis geoespacial con Sistemas de Información Geográfica (SIG), a fin de conocer si factores ambientales, geológicos o geográficos, beneficiaban el crecimiento de estos hongos, usando la técnica de análisis multicriterio, y como datos de entrada se tiene: la humedad, edafología, precipitación media anual, temperatura mínima, temperatura máxima, elevación del territorio y la presencia del hongo endófito. Los resultados demuestran que los hongos simbiotes del casahuate pertenecen a los órdenes Chaetothyriales y Xylariales. Las semillas y hojas contienen swainsonina, siendo las semillas la estructura con mayor concentración (1-363 µg/g). Los árboles hospederos de hongos Chaetothyriales tienen una mayor concentración de swainsonina en la semilla y menor granivoría por brúquidos. Además, se observó que los hongos se pueden desarrollar en una amplia gama de condiciones medioambientales, y que ninguno de estos factores analizados define su distribución. En conclusión, la granivoría por Bruchidae es menor en los árboles formando simbiosis con el Orden Chaetothyriales que en árboles formando simbiosis con el Orden Xylariales, por lo tanto, la swainsonina está cumpliendo una función protectora para la semilla.

I. Lista de figuras

Figura 1| A) Semillas de *Ipomoea corymbosa*; B) Semillas de *Ipomoea tricolor*.

Figura 2| Hojas de *Ipomoea carnea* con simbionte del hongo Chaetothyriales productor de swainsonina en su fase epífita.

Figura 3| Simbiosis hongo-planta entre los géneros de *Periglandula* e *Ipomoea* o *Periglandula* y *Turbina*.

Figura 4| Estructura química de la swainsonina.

Figura 5| Genes ribosomales de interés con respectivo orden dentro de ADN ribosomal.

Figura 6| Medidas de placa de sílice.

Figura 7| Árbol filogenético para el gen 18S.

Figura 8| Árbol filogenético para el gen ITS1.

Figura 9| Árbol filogenético para el gen 28s.

Figura 10| Árbol filogenético concatenado 18S, ITS1 y 28S.

Figura 11| Concentración de swainsonina detectada en semillas en función del sitio de muestreo.

Figura 12| Concentración de swainsonina detectada en hojas en función del sitio de muestreo.

Figura 13| Concentración de swainsonina en semillas (A) y hojas (B) en función del Orden de hongo.

Figura 14| Concentración de alcaloides en hojas y semillas en el Orden Chaetothyriales (A) y Xylariales (B).

Figura 15| Herbivoría por sitios de muestreo.

Figura 16| Granivoría Bruchidae por sitio de muestreo.

Figura 17| Herbivoría (A) y granivoría Bruchidae (B) en función del Orden de hongo.

Figura 18| Granivoría Bruchidae en función del año de muestreo.

Figura 19| Mapa de regímenes de humedad para la zona de estudio.

Figura 20| Mapa de los tipos de suelos presentes en la zona de estudio.

Figura 21| Mapa de precipitación media anual distribuida por rangos de lluvia en milímetros dentro de la zona de estudio.

Figura 22| Mapa de temperaturas mínimas promedio (en °C), para la zona de estudio.

Figura 23| Mapa de temperaturas máximas promedio (en °C), presentes en la zona de estudio.

Figura 24| Mapa hipsográfico de la zona de estudio.

Figura 25| Mapa de zonas con potencial para el crecimiento de los hongos de interés para la zona de estudio, de acuerdo con la ponderación de AMC.

II. Lista de tablas

Tabla 1| Clasificación de hongos endófitos según Rodríguez *et al.*, (2009).

Tabla 2| Ejemplos de metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos, sus plantas hospederas y su actividad biológica.

Tabla 3| Clasificación de alcaloides por su estructura de anillo.

Tabla 4| Orden de reactivos para realizar el Máster Mix para PCR 1X.

Tabla 5| Secuencias de primers.

Tabla 6| Nomenclatura de etiquetas utilizadas como referencia de los sitios en donde se muestreó el *I. murucoides*.

Tabla 7| Modelos de evolución para cada gen.

Tabla 8| Rangos de concentración de referencia de swainsonina en hojas y semillas.

Tabla 9| Valores ponderados de los factores geográficos y medioambientales analizados por medio de la matriz de Saaty.

Índice

Agradecimientos	i
Resumen.....	ii
I. Lista de figuras.....	iii
II. Lista de tablas.....	v
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	6
2.1 Hongos endófitos.....	6
2.1.1 Clasificación.....	6
2.1.2 Función ecológica.....	7
2.2 Metabolitos secundarios.....	9
2.2.1 Alcaloides.....	11
2.2.2 Swainsonina.....	14
3. Planteamiento del problema.....	17
4. Justificación.....	18
5. Objetivos.....	20
5.1 Objetivo general.....	20
5.2 Objetivos particulares.....	20
6. Métodos.....	21
6.1 Extracción de ADN fúngico.....	21
6.2 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	22
6.3 Electroforesis.....	25
6.4 Análisis bioinformático.....	26
6.5 Extracción de alcaloides en hojas y semillas.....	28
6.6 Cromatografía de capa fina.....	29
6.7 Cromatografía líquida de alta presión de ultra-performance y espectrometría de masas.....	30
6.8 Herbivoría.....	30
6.9 Granivoría.....	31
6.10 Análisis geoespacial.....	31
7. Resultados.....	32

7.1 Análisis bioinformático.....	32
7.2 Alcaloides.....	38
7.3 Análisis geoespacial.....	45
8. Discusión y conclusiones.....	59
9. Anexo A.....	63
10. Referencias.....	66

1. Introducción

La gran mayoría de plantas forman asociaciones simbióticas con hongos endófitos, los cuales viven dentro del hospedero (Rodríguez *et al.*, 2009). Estos hongos se pueden instalar entre o dentro de las células del tejido vegetal, pudiendo crecer dentro de raíces, tallos y/o hojas, algunos de ellos solo emergen para esporular, todo esto sin causar síntomas aparentes de enfermedad (Carroll, 1988; Sherwood & Carroll, 1974). Esta colonización puede conferir ventajas funcionales al hospedero, tales como: tolerancia al estrés abiótico y biótico, aumento de la biomasa, disminución del consumo de agua, una mejor absorción de nutrientes o incremento de su tasa fotosintética (Grum *et al.*, 2013; Quach *et al.*, 2022; Rodríguez *et al.*, 2009). A su vez, los hongos endófitos tienen una estrecha relación con su hospedero y pueden tener la capacidad de modificar sus mecanismos de defensa (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Registros fósiles de hace 400 millones de años, indican que las plantas se han asociado con diferentes hongos endófitos y micorrícicos a lo largo del tiempo, siendo probable que las primeras relaciones simbióticas con hongos permitieran que las plantas salieran del agua y colonizaran la tierra, jugando un rol importante en el impulso de la evolución de la vida continental (Rodríguez *et al.*, 2009). No obstante, a pesar de que contamos con más de 100 años de investigación sobre los hongos endófitos, su importancia ecológica está pobremente caracterizada, por lo que se desconocen ciertas cualidades que brindan a los hospederos. Lo que sí se sabe, es que los hongos endófitos pueden producir compuestos activos (Rodríguez *et al.*, 2009; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013), que pueden proteger al hospedero de diferentes patógenos y herbívoros, entre ellos se han encontrado diversas moléculas novedosas de utilidad en la medicina y en la agricultura (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Un ejemplo interesante de las asociaciones simbióticas entre plantas y hongos se encuentra en la familia pantropical Convolvulaceae.

Dentro de la familia Convolvulaceae existen árboles, arbustos, bejucos y rastreras, en donde la mayoría de las especies son bejucos, plantas herbáceas rastreras y en ocasiones parásitas de otras plantas. Esta familia incluye cerca de 40 géneros, agrupando más de 1400 especies (Carranza, 2007; McDonald, 1991). Se distribuyen en todo el mundo, logrando su mayor diversificación en latitudes intertropicales, especialmente en regiones que tienen temporadas de sequía. Aunque la familia Convolvulaceae es mayormente conocida por sus bejucos y rastreras, México cuenta con 150 especies del género *Ipomoea* las cuales han desarrollado el hábito arborecente, localmente

conocidos como casahuates, ejemplos son: *I. murucoides*, *I. chilopsidis* e *I. pauciflora* (McPerson, 1981).

El género *Ipomoea* tiene una importancia económica por la producción a nivel mundial del camote (*Ipomoea batatas*), siendo la especie más cultivada seguida de la espinaca de agua (*Ipomoea aquatica*) en Asia. Además, varias especies de este género proveen una fuente de medicamentos purgantes, tal como *Ipomoea purga*, más conocida como Raíz de Jalapa, la cual se usa desde tiempos precolombinos (Carranza, 2007). Otras especies en México producen semillas que al ingerirse son alucinógenas como *Ipomoea corymbosa* e *Ipomoea tricolor*, y son usadas en tradiciones indígenas. Algunas otras son consideradas venenosas como *I. carnea* e *I. murucoides*, que también son utilizadas como plantas medicinales (Carranza, 2007).

En la cultura Azteca del México prehispánico, dos especies de la familia Convolvulaceae, *Ipomoea corymbosa* (sinónimo de *Turbina corymbosa*) e *Ipomoea tricolor*, eran utilizadas como enteógenos, como consecuencia de su química peculiar otorgada por una asociación con hongos endófitos. Dentro de algunas crónicas españolas, se relata el uso de dos alucinógenos adivinatorios, los cuales tenían el nombre de ololiuqui y tlitliltzin, siendo importantes no solo para la cultura Azteca sino también para las culturas Mazateca y Chinanteca, tanto en la adivinación como en la medicina (Schultes, 1976). La semilla de ololiuqui era pequeña, redonda y café, tlitliltzin era una semilla negra y angular, las cuales fueron identificadas como las semillas de *Ipomoea corymbosa* e *Ipomoea tricolor* respectivamente (**Figura 1**). Las semillas de *I. corymbosa* fueron las de mayor importancia para los Aztecas, ya que ayudaba a quitar el dolor y eran usadas para comunicarse con sus dioses y recibir mensajes de ellos, por lo que al consumir esta planta eran introducidos a un delirio, deprimiendo los sentidos de quien la consumía (Schultes, 1976).

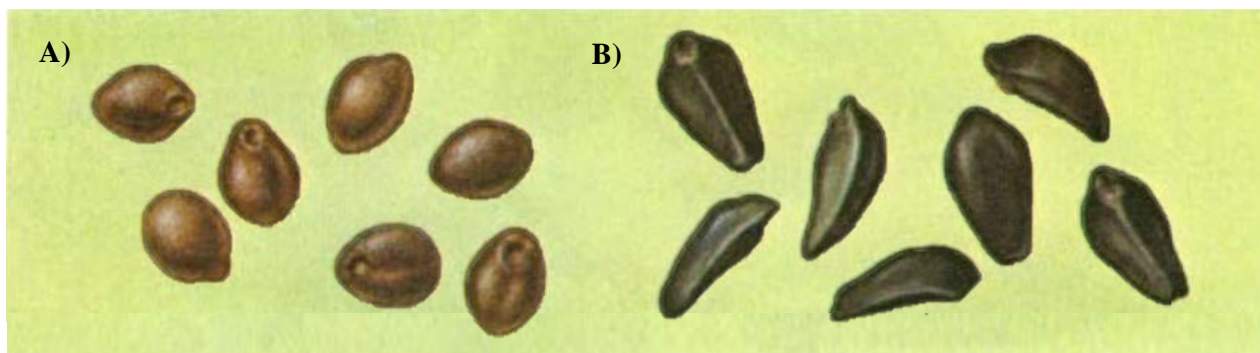


Figura 1 | A) Semillas de *Ipomoea corymbosa*; B) Semillas de *Ipomoea tricolor* (Schultes, 1976).

En este sentido, a pesar de haber relatos de su uso desde Fray Bernardino de Sahagún, es hasta el año 1955 que se expone que el consumo de *I. corymbosa* e *I. tricolor* provoca intoxicación que va acompañada de alucinaciones (Schultes, 1976). En 1960, Albert Hofmann demuestra que uno de los tejidos en donde están contenidos los alcaloides del ergot, son las semillas, esto tanto en *Ipomoea corymbosa* como en *Ipomoea tricolor*. Los psicoactivos predominantes son la ergolina e isoergina, y en menor medida lisergamida y lisergol (Schultes, 1976). En el año 2006, se describe al verdadero productor de los alcaloides del ergot en *I. corymbosa* e *I. tricolor*, el cual es una especie de hongo de la familia Clavicipitaceae, asociada a los tricomas glandulares de las hojas (Durden *et al.*, 2009; Schultes, 1976; Steiner *et al.*, 2006).

Estas especies de *Ipomoea* no son la únicas que contienen alcaloides, *I. carnea* es considerada como tóxica por la presencia de alcaloides como la swainsonina y calisteginas (Rios *et al.*, 2009). En diferentes estudios se ha encontrado que sus diversos alcaloides son los responsables de lesiones renales, pancreáticas y neuronales en animales expuestos a la planta (Rios *et al.*, 2009). Además, se ha estudiado el uso de *I. carnea* en aplicaciones medicinales como agente anticancerígeno, antitumoral, antimetastásico y antirreumático, debido a las cualidades de los alcaloides a inhibir glicosidasas y manosidasas (Escobar-Poveda & Castañeda-Gómez, 2022). De la misma manera que la presencia de los alcaloides del ergot en *I. corymbosa* e *I. tricolor* que dependen de la presencia de un hongo endófito, la producción del alcaloide swainsonina en *I. carnea*, está relacionado con la presencia de otro hongo endófito, esta vez del Orden Chaetothyriales (Cook *et al.*, 2013). El hongo presenta una fase epibiótica donde crece sobre el tejido de la planta, específicamente sobre la superficie de las hojas del hospedero (**Figura 2**) (Cook *et al.*, 2014).



Figura 2 | Hojas de *Ipomoea carnea* con simbionte de hongo Chaetothyriales productor de swainsonina en su fase epífita (Cook *et al.*, 2014).

Los micelios epibióticos son visibles sobre las hojas nuevas alrededor de los tricomas glandulares (**Figura 3**). El hongo coloniza la planta de forma sistemática y existe la presencia de estos hongos

en la semilla, transmitiéndose verticalmente (Kucht *et al.*, 2004). Estos autores demuestran que, el hongo epibiótico es responsable de la producción de alcaloides, ya que al tratar las semillas de *Ipomoea asarifolia* con fungicidas, resulta en la pérdida del micelio epibiótico y de los alcaloides del ergot en el follaje (Steiner *et al.*, 2006).

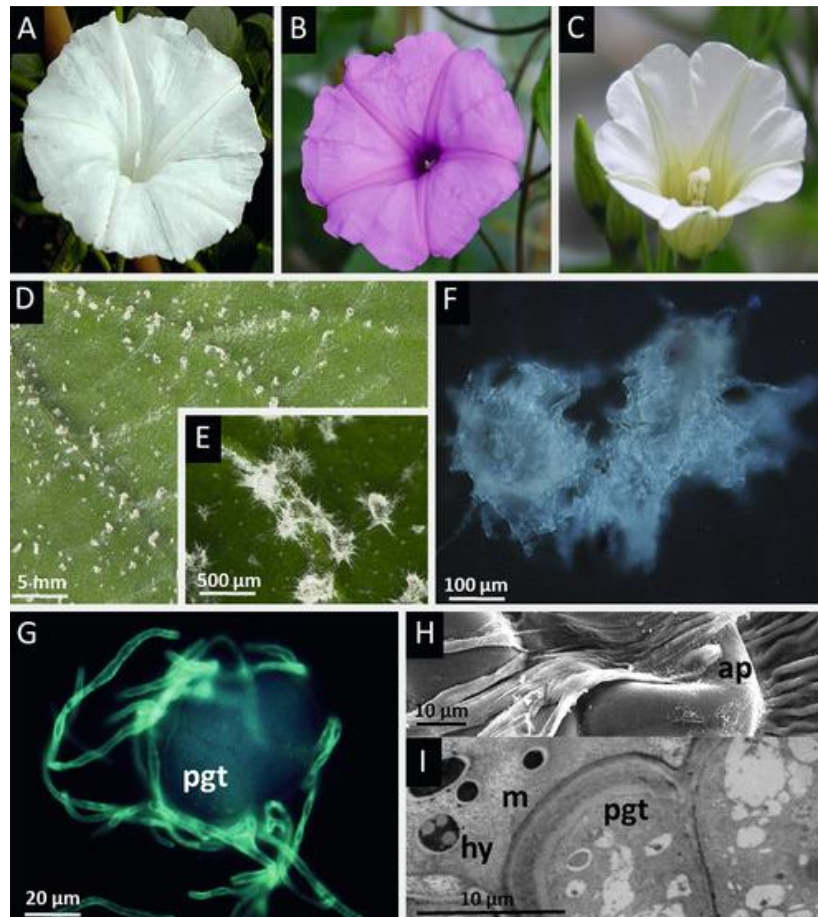


Figura 3 | Simbiosis hongo-planta entre los géneros de *Periglandula* e *Ipomoea* o *Periglandula* y *Turbina*: (A) flores de la planta huésped *I. asarifolia* de floración blanca, (B) *I. asarifolia* de floración roja, (C) *I. corymbosa*; (D, E) colonización epífita de una hoja joven de *I. corymbosa* por *P. turbiniae* formando esteras típicas de micelio a lo largo de las venas; (F) alcaloides de ergolina visualizados por su fluorescencia UV dentro del micelio de una colonia joven de *P. ipomoeae*; (G) un tricoma glandular peltado (pgt) rodeado por hifas de *P. ipomoeae* que forman la interfaz del simbiote; (H) formación de una estructura similar a un apresorio (ap) en la cutícula de la célula secretora del tricoma glandular que indica el estrecho contacto del hongo y la planta en la simbiosis; (I) hifas (hy) de *P. ipomoeae* incrustadas en la matriz (m) del espacio subcuticular del tricoma glandular peltado (pgt) (Steiner & Leistner, 2018).

En *Ipomoea carnea*, la presencia de la swainsonina ocurre solo en individuos que tienen una asociación con hongos del Orden Chaetothyriales, recientemente, se identificó que la swainsonina ocurre en las especies del clado de *Ipomoea perenes* (Quach *et al.*, 2022; Grum *et al.*, 2013). Hasta la fecha no se sabe que tan común es este tipo de asociaciones en la familia Convolvulácea, aunque Quach *et al.* (2023), estiman que alrededor del 40% de las especies presentan asociación con hongos heredables.

En un estudio preliminar de las hojas jóvenes de *I. murucoides* en el campus UNAM Juriquilla, en el estado de Querétaro, se han observado bajo microscopio dos tipos de hongos epibióticos con morfología diferente. Siendo ésta la primera vez que se observa que una misma especie de la familia Convolvulácea forma asociaciones con dos hongos distintos, uno pardo y otro hialino. Se ha de mencionar que aparentemente, hay ciertos individuos de *I. murucoides* asociados al hongo pardo y otros, asociados al hongo hialino, siendo un sistema interesante para evaluar la importancia ecológica de los hongos endófitos. Por lo que se busca describir las asociaciones entre *Ipomoea murucoides* y sus hongos epibióticos, por medio de la caracterización molecular del hongo, caracterización química de hojas y semillas, así como su posible rol defensivo contra herbívoros, y al mismo tiempo identificar y evaluar si la distribución geográfica del hongo está regida por factores geográficos y medioambientales.

2. Marco teórico

2.1 Hongos endófitos

La principal característica de los hongos endófitos es que pasan la mayor parte de su ciclo de vida dentro de los tejidos vivos de una planta hospedera, esto sin causar ningún daño significativo a la misma (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Sin embargo, el endofitismo representa una asociación costo-beneficio donde los costos de alimentar al hongo pueden ser compensados por los beneficios que éste pueda aportar a la planta (Rodríguez *et al.*, 2009). Se han descrito alrededor de 700 especies de hongos endófitos, de las cuales un número reducido de especies ha sido estudiado a mayor profundidad (Borges *et al.*, 2010).

Las primeras investigaciones que se tienen de los hongos endófitos data de 1898, en donde se planteó la hipótesis de que los envenenamientos sufridos por animales se debían al consumo de semillas y pastos de la familia de las gramíneas (*Lolium arvense*, *L. linicolum*, *L. remotum* y *L. temulentum*) infectados por hongos del ergot de la familia Clavicipitaceae. Posteriormente, la investigación es retomada hasta 1977 por Bacon, quien vincula la presencia del hongo *Neotyphodium coenophialum* en los pastos de la especie *Festuca arundinaceae* (gramíneas), a la alta incidencia de intoxicación de ganado (síndrome de verano). Clay en 1988, planteó que diversos hongos endófitos de la familia Clavicipitaceae, presentan relaciones mutualistas, protegiendo a la planta hospedera de animales herbívoros (Carroll, 1988; Clay, 1988).

2.1.1 Clasificación

Los hongos endófitos son diversos, polifacéticos y además pueden habitar en diversas plantas; la mayoría pertenece al phylum Ascomycota y en menos cantidad al Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Rodríguez *et al.* (2009), clasificaron a estos hongos en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, de los cuales el último grupo se subdivide en tres clases (**Tabla 1**). Es importante comprender que la transmisión vertical, se da a través de las semillas del hospedero, ya que son hereditarios. Mientras que la transmisión horizontal, se da por medio de factores ambientales como lo puede ser el agua, aire o algún otro tipo de vector y ayudan a movilizar al simbiote a un nuevo hospedero (Rodríguez *et al.*, 2009).

Tabla 1 | Clasificación de hongos endófitos según Rodríguez *et al.*, (2009).

	Clavicipitáceos	No Clavicipitáceos		
		Clase 1	Clase 2	Clase 3
Rango de hospedero	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
Tejidos	Tallo Rizomas	Tallo Hojas Rizomas	Tallos Hojas Corteza Flores Frutos	Raíces
Colonización	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
Transmisión	Vertical Horizontal	Vertical Horizontal	Horizontal	Horizontal
Función ecológica	Incrementa la biomasa de la planta. Confiere tolerancia a la sequía. Producción de metabolitos secundarios tóxicos para herbívoros	Incrementa la biomasa de la planta. Confiere tolerancia al estrés biótico y abiótico. Producción de metabolitos secundarios que ayuda a la protección de hongos patógenos.	Confiere resistencia a enfermedades. Producción de metabolitos secundarios que dan protección a herbívoros y modifican la sensibilidad al estrés abiótico.	Producción de metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de los patógenos y ataque de herbívoros.

2.1.2 Función ecológica

El endofitismo implica costos y a veces beneficios para la planta, ya que los hongos usualmente toman nutrientes del hospedero y pueden, en ocasiones, conferirle ventajas. En una relación mutualista, la presencia de los hongos induce un mayor crecimiento, aumento en la tolerancia de estrés o producción de metabolitos secundarios con una amplia diversidad estructural, brindando a su vez protección y resistencia a herbívoros o microorganismos fitopatógenos (Rodríguez *et al.*, 2009; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Cada vez más, se reconoce que los verdaderos sintetizadores de varios metabolitos secundarios presentes en las plantas son hongos endófitos (Strobel *et al.*, 2004). La mayoría de los ejemplos vienen de hongos endófitos de pastos, y en menor medida de hongos endófitos de plantas leñosas (Schulz & Boyle, 2005). En algunos casos, los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos inhiben el crecimiento de patógenos determinados u otros hongos endófitos que intentan colonizar la planta

(Arnold *et al.*, 2003). Algunos son responsables de efectos alelopáticos del hospedero, a través de la producción de metabolitos secundarios (aleloquímicos), que inhiben el crecimiento y el desarrollo de otras especies de plantas que crecen a su alrededor y suelen competir por el espacio y nutrientes (Strobel *et al.*, 2004; Tan & Zou, 2001).

La protección contra factores bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (sequías, salinidad, variación de temperaturas, metales pesados, etc.), se da por medio de tres mecanismos que pueden actuar de forma simultánea bajo diversas condiciones de estrés (Gao *et al.*, 2010; Herre *et al.*, 2007):

- Directo: a partir de enzimas o metabolitos secundarios con una actividad anti-patógeno, producido directamente por el hongo endófito.
- Indirecto: inducción o aumento de expresión de mecanismos de defensa, químicos o fisiológicos, intrínsecos de la planta hospedera.
- Ecológico: se ocupa el nicho ecológico, hiperparasitismo y predación.

De acuerdo con Arnold *et al.* (2003) y Herre *et al.* (2007), los hongos endófitos tienen dos interacciones, una con su hospedero y la otra con otros hongos endófitos dentro de la planta, esta última se denomina *interacción interespecífica*, que se produce con distintas especies de hongos y están presididas por:

- a. Mecanismos físicos o directos: interacciones entre hifas, contacto con el micelio y el microparasitismo que corresponde a la interferencia hifal.
- b. Mecanismos químicos o indirectos: dados por la producción de compuestos solubles, algunos metabolitos primarios y secundarios, enzimas o compuestos volátiles efectivos a distancia que limitan el crecimiento de las hifas del competidor.

Estos mecanismos sirven de evidencia para algunas interacciones en cultivos *in vitro*, en donde los hongos antagonistas producen metabolitos secundarios como propiedades antifúngicas, mostrando una clara interferencia (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008). Por otro lado, existen escasos estudios en los que se describe el modo de interacción y los compuestos antimicrobianos implicados en las interacciones interespecíficas dentro de las comunidades en la naturaleza (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008). Por lo que el estudio

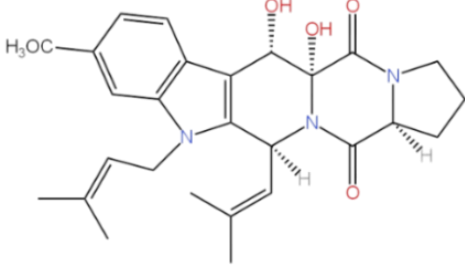
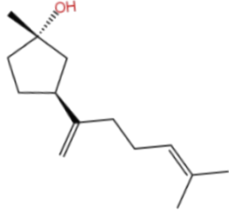
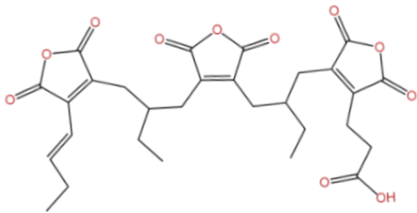
químico y biológico de estas interacciones, conduce al descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos estructuralmente diversos, los cuales se pueden usar en la agricultura y medicina (Strobel *et al.*, 2004; Tan & Zou, 2001).

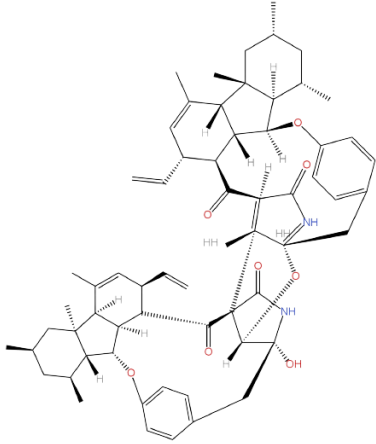
2.2 *Metabolitos secundarios*

Los metabolitos secundarios son la principal razón por la que los hongos endófitos han recibido especial atención en los últimos años, ya que estos metabolitos representan una alternativa al uso de agroquímicos, al controlar plagas y enfermedades de cultivos sin dañar el medio ambiente y la salud (Ibarra *et al.*, 2006). Algunos de estos metabolitos secundarios tienen efectos adversos en otros organismos que no son su hospedero, y pueden ser tóxicos para más de una especie de insecto herbívoro o patógeno (Pucheta Díaz *et al.*, 2006). Sin embargo, las condiciones ambientales pueden favorecer o desfavorecer el crecimiento de los hongos endófitos, por ende, se pueden modular sus efectos (Borges *et al.*, 2010). De hecho, algunos factores ambientales tales como: la temperatura, humedad, pH, etcétera, pueden propiciar el crecimiento de determinados hongos endófitos (Borges *et al.*, 2010).

La acción biológica de los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos es muy variada, ya que algunas de estas sustancias pueden participar en la solubilización de la cutícula de los insectos o en la inhibición de procesos metabólicos y fisiológicos, impidiendo su desarrollo y provocando su muerte (Borges *et al.*, 2010). Sin embargo, no se puede generalizar, ya que cada metabolito secundario tiene una actividad biológica diferente, lo cual se ejemplifica en la **Tabla 2**.

Tabla 2 | Ejemplos de metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos, sus plantas hospederas y su actividad biológica.

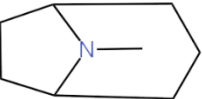
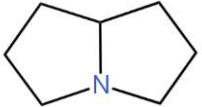
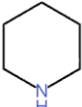
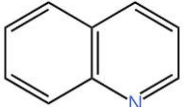
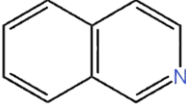
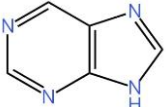
Hongo endófito	Planta hospedera	Metabolito secundario	Actividad biológica
<i>Aspergillus tamarii</i> (Trichocomaceae)	<i>Ficus carica</i> (Moraceae)	<p>Fumitremorgina B</p>  <p>Indolil dicetopiperazínico (Zhang <i>et al.</i>, 2012)</p>	Antifúngico para especies como <i>Botrytis cinérea</i> y <i>Phytophthora oryzae</i> (Sánchez-Fernández <i>et al.</i> , 2013).
<i>Epichloë festucae</i> (Clavicipitaceae)	Varias especies de pastos, por ejemplo, los pertenecientes a la familia Gramineae.	<p>Chokol K</p>  <p>Sesquiterpeno (2,6-ciclofarnesano, solo reportado en endófitos) (Bultman & Leuchtman, 2008).</p>	Atrae a moscas del género <i>Botanophila</i> para la propagación de esporas.
<i>Dwayaangam colodena</i> (Orbiliaceae)	<i>Picea Rubens</i> (Pinaceae)	<p>Cordianhídrido B</p>  <p>Anhídrido derivado de ácidos grasos (Sumarah <i>et al.</i>, 2010).</p>	Insecticida contra el lepidóptero <i>Choristoneura fumiferana</i> .

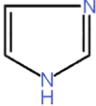
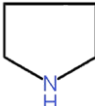
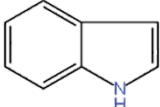
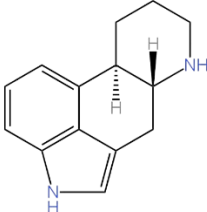
<p><i>Neonectria ramulariae</i> (Nectriaceae)</p>	<p>Árbol no identificado</p>	<p style="text-align: center;">Bispirrocicina</p>  <p style="text-align: center;">Alcaloide dímero de la pirrocicina (Shiono <i>et al.</i>, 2012).</p>	<p>Inhibidor enzimático, actúa sobre la prolilpolipeptidasa, inhibe el crecimiento de células cancerígenas</p>
---	----------------------------------	--	--

2.2.1 Alcaloides

Las plantas son una rica reserva de una amplia gama de metabolitos secundarios con actividad biológica, los cuales a su vez tienen importantes aplicaciones terapéuticas (Rupani & Chavez, 2018; Sadia *et al.*, 2018). Siendo los alcaloides, un grupo químicamente diverso que se ha utilizado como medicina desde hace 4,000 años (Amirkia & Heinrich, 2014). Se pueden clasificar según su biogénesis y por su estructura de anillo. La clasificación por estructura de anillo (**Tabla 3**), es la más completa y está basada en la presencia de un núcleo heterocíclico caracterizado por la presencia de nitrógeno (N), siendo el N, el componente clave de la estructura, ya que caracteriza a los alcaloides. El nitrógeno les da la capacidad de interactuar con sistemas biológicos, pudiendo actuar como: antivirales, antimicrobianos, anticonvulsivos, antitumorales, hipotensores o antiinflamatorios, siendo éstos, ejemplos de sus actividades biológicas (Abello *et al.*, 2008).

Tabla 3 | Clasificación de alcaloides por su estructura de anillo.

Alcaloide	Estructura básica del núcleo	Ejemplos	Actividad biológica	Plantas en las que se encuentran
<p>Tropánico Contienen un anillo de tropano.</p>	 <p>(Hemscheidt, 2000)</p>	Atropina Cocaína	Antiespasmódico Anticolinérgico	<i>Atropa belladonna</i> <i>Erythroxylum coca</i>
<p>Pilirrizidínico Contienen anillo de pilorridina (Vásquez, 2014).</p>	 <p>(Robins, 1982)</p>	Senecionina	Mutagénicos Carcinogénicos Hepatotóxicos Antibacterianos Anticonceptiva	<i>Hypericum perforatum</i> (Hierba de San Juan) <i>Bellis perennis</i> (Margarita).
<p>Piperidénico Contienen un anillo de piperidina (Novais, 2019).</p>	 <p>(Strunz & Findlay, 1985)</p>	Lobelina	Anticolinesterásico Antimicrobiano	<i>Piper nigrum</i> Árboles pertenecientes al género <i>Myristica</i> (<i>Myristica argentea</i> , <i>Myristica fragrans</i> , etc.)
<p>Quinolínicos Contienen anillo de quinolina (Chavarro <i>et al.</i>, 2020).</p>	 <p>(da Silva <i>et al.</i>, 2007)</p>	Cinconina Quinina Quindina	Antimicrobiano Antiviral Anticonvulsivo Antitumoral Antiinflamatorio	<i>Leucojum sativum</i> <i>Narcissus pseudonarcissus</i>
<p>Isoquinolínicos Contiene anillo de isoquinolina (Chavarro <i>et al.</i>, 2020).</p>	 <p>(Schiff, 1987)</p>	Morfina Codeína	Antiviral Antimicroviano Anticonvulsivo Antitumoral Antiinflamatorio	<i>Papaver rhoeas</i> (amapola común).
<p>Purínicos Contienen anillo de purina.</p>	 <p>(Rosemeyer, 2004)</p>	Cafeína Teofilina Teobromina	Estimulante de sistema nervioso Diuréticos Control de asma.	<i>Camellia sinensis</i> (té) Plantas del género <i>Coffea</i> (café).

<p>Imidazolínicos Contienen anillo de imidazol (Vásquez, 2014).</p>	 (Maat & Beyerman, 1984)	Pilocarpina	Herbicidas Anticonseptivo Antibacteriano	Plantas de la familia Solanaceae.
<p>Pirrolizidínicos Contienen anillo de pirrolizidina.</p>	 (Cheeke, 1988)	Higrina Ficina Brevicolina	Hepatotóxicos	Plantas de la familia Asteraceae, y géneros <i>Senecio</i> , <i>Crotalaria</i> , <i>Echium</i> , <i>Heliotropium</i> , <i>Amsinckia</i> , <i>Symphytum</i> .
<p>Indólicos Contienen anillo indol.</p>	 (Somei & Yamada, 2004)	Rutaecarpina Ekebergina Triptamina	Antitumoral Antiviral Antibacteriano Antiparasitario Analgésico Antiinflamatorio	<i>Catharanthus roseus</i> (Vica). <i>Rauwolfia serpentina</i> (Serpentina). <i>Tabernanthe iboga</i> .
<p>Ergóticos Contiene anillo de ergolina (Ministerio de consumo español, 2021).</p>		Ergometrina Ergotamina Ergosina Ergosinina	Vasoconstrictor Antimicrobiano	<i>Ipomoea tricolor</i>

Los alcaloides de indol son el grupo de alcaloides más grande, derivados del aminoácido triptófano y siendo importantes para este trabajo de investigación. Dentro de esta clasificación se encuentran los alcaloides de indolizidina polihidroxiados, que son una clase de compuestos naturales, que han sido aislados de diversas fuentes, incluidos orígenes microbianos, hongos endófitos, plantas superiores y animales; en los cuales se encuentran la lentiginosina, 2-epi-lentiginosina, castanospermina, 6-epi-castanospermina y la swainsonina (**Figura 4**). Estos alcaloides han sido objeto de extensas investigaciones debido a sus diversas actividades biológicas y posibles acciones en la medicina y agricultura, en la cual, *Metarhizium anisopliae* es uno de los hongos más usados para el control biológico de plagas por los alcaloides del ergot que produce (Abello *et al.*, 2008).

2.2.2 Swainsonina

La swainsonina (**Figura 4**), fue aislada por primera vez de la leguminosa australiana *Swainsona canescens*, para luego ser identificada en muchas más especies del mismo género en otras partes del mundo (Michael, 1994). Las especies de *Swainsona* que contienen swainsonina incluye a *S. canescens*, *S. galegfoliu*, y *S. greyana* (fuente más rica). Otras especies tóxicas que probablemente

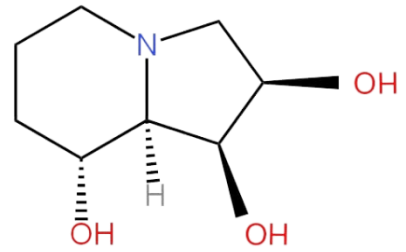


Figura 4 | Estructura química de la swainsonina.

contienen el alcaloide son: *S. luteola*, *S. procumbens* y *S. swainsonioides* (Majak, 1995). Algunas otras fuentes de swainsonina provienen de especies de los géneros de leguminosas: *Astragalus* y *Oxytropis*: *A. ametricus*, *A. bicristatus*, *A. bisulcatus*, *A. didymocarpus*, *A. emoryunus*, *A. flavus*, *A. lentiginosus*, *A. mollissimus*, *A. oocarpus*, *A. oxyphysus*, *A. praelongus*, *A. pycnostachyus*, *A. succumbens*, *A. trichopodus*, *A. wootoni*, *O. kansunsis*, *O. lambertii*, *O. ochrocephala* y *O. sericea*. En la mayoría de estas especies se pueden encontrar dos formas químicas, la swainsonina en mayor cantidad y N-óxido de swainsonina en menor cantidad; además de una posible asociación con el género *Alternaria* (Cook *et al.*, 2016; Oldrup *et al.*, 2010).

Estudios recientes sobre hongos endófitos asociados a los géneros *Astragalus*, *Oxytropis* y *Swainsona* (familia Fabaceae), han demostrado que hongos del género *Alternaria* y *Undifilum*, son los responsables de la producción de swainsonina (Braun *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2013; Pryor *et al.*, 2009). Los hongos endófitos del género *Alternaria* usan diferentes estrategias para su instalación en el huésped y no le causan un daño significativo. El hongo se instala en el huésped, creciendo paralelamente al eje vertical del tallo y en el tejido de la médula de los peciolo del huésped, pareciendo no penetrar las células (Noor *et al.*, 2020). En ambos casos, los taxones de *Astragalus* y *Oxytropis* no presentan síntomas de enfermedades producidas por la colonización de estos hongos, dándose una relación mutualista (Oldrup *et al.*, 2010).

Oldrup *et al.* (2010), han reportado la producción de swainsonina por hongos pertenecientes a diferentes Órdenes, incluyendo: Pleosporales, Onygenales,

Hypocreales y Chaetothyriales, los cuales tienen un impacto diferente en su hospedero. Aunque, un análisis bioinformático donde se estudió la presencia del clúster de genes para producir la swainsonina, incluye además a los Órdenes Xylariales, Capnodiales, Microthyriales, Caliciales, Patellariales y Eurotiales (Neyaz *et al.*, 2022). La swainsonina también se ha descrito como componente activo de *Ipomoea carnea* perteneciente a la familia Convolvulaceae. *I. carnea* está asociada con un hongo no descrito del Orden Chaetothyriales, el cual produce swainsonina, y se transmite de forma vertical a través de la semilla sin causar ningún daño al huésped (Cook *et al.*, 2013; Noor *et al.*, 2020).

Noor *et al.* (2021), mencionan que la observación bajo microscopio del hongo de la familia Chaetothyriales en diferentes secciones del huésped (tallo, peciolo y hojas), mostró que el micelio no penetra las células del huésped, residiendo en el espacio intercelular. De hecho, el hongo se manifiesta en la superficie del haz de la hoja durante su fase epibiótica (Noor *et al.*, 2020). Esto no es el caso de todos los hongos productores de swainsonina, como es el caso del hongo *Slafractonia leguminicola*, productor de swainsonina y eslaframina, el cual sí parasita a su huésped, presentando síntomas de manchas negras en las hojas del hospedero, extendiéndose a toda la planta y causando su muerte eventualmente (Cook *et al.*, 2017; Patrick *et al.*, 1993).

Actualmente se conoce poco sobre los hongos que hacen asociaciones con la familia Convolvulaceae para especies arborescentes, limitando el conocimiento de esta relación ecológica. Por lo que, en este trabajo de investigación, se busca describir las asociaciones que existen entre *I. murucoides* y sus dos hongos epífitos asociados, conociendo qué cambios producen en la química y estructura del hospedero, así como detectar si alguna característica del medio físico o las condiciones ambientales, limitan la distribución de estos hongos en los individuos analizados de *I. murucoides*.

Por otro lado, la swainsonina ha atraído los ojos del mundo por sus propiedades antitumorales tanto en ratones como en humanos. La swainsonina como fármaco, suprime el crecimiento y la metástasis del melanoma y linfoma dentro de ratones (Dennis, Koch, *et al.*, 1989). También reduce la tasa de crecimiento del carcinoma gástrico y de colon, tumor de ascitis S180, hepatoma, carcinoma de mama, tumor

maligno de paté en humanos, así como de las células de glioma *in vitro* y *en vivo* (Dennis *et al.*, 1987; Dennis, Koch, *et al.*, 1989; Dennis, Laferte, *et al.*, 1989; Sun *et al.*, 2007, 2009). Los ensayos clínicos usando la swainsonina como fármaco, han mostrado efectos curativos con buena tolerancia en pacientes con neoplasias malignas avanzadas (Goss *et al.*, 1997). Igualmente, se ha demostrado que promueve actividades inmunomoduladoras antitumorales del sistema inmunitario y protege la medula ósea murina y humana contra la toxicidad de los fármacos quimioterapéuticos (Klein *et al.*, 1999; Oredipe *et al.*, 1991, 2003).

Se ha reportado que la swainsonina tiene efectos de mejora para el rendimiento de agentes antitumorales como 5-fluorouracil (5-Fu) y cisplatino (Hamaguchi *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011), por lo que la swainsonina tiene una actividad anticancerígena en modelos de ratón de cáncer humano y cánceres humanos *in vivo*. Esta actividad se debe a que la swainsonina inhibe la actividad de las manosidasas y altera el procesamiento de las glicoproteínas, lo que inhibe significativamente el crecimiento de las células y la inducción de apoptosis desde las mitocondrias.

Por otro lado, se ha encontrado que la conformación de media silla del N-óxido de la swainsonina (**Figura 4**) es similar y altamente compatible al catión de la α -manosidasa, por lo que la swainsonina inhibe específicamente la α -manosidasa II en el Aparato de Golgi, alterando el sistema de la endomembrana de la célula, provocando la pérdida de actividad de hidrólisis enzimática, así como la enfermedad de almacenamiento lisosomal y la alteración del procesamiento de glicoproteínas (Dorling *et al.*, 1980; Kang & Elbein, 1983; Tulsiani & Touster, 1983).

3. Planteamiento del problema

Los hongos endófitos, son importantes herramientas para el control de enfermedades y plagas por su excepcional cualidad de producir metabolitos secundarios que pueden funcionar como protección para sus hospederos. Estos hongos hacen que sus hospederos sean más vigorosos y tóxicos para los herbívoros (Clay & Holah, 1999). Los compuestos activos producidos por los hongos endófitos pueden también ser utilizados en diferentes áreas como la farmacéutica, la industria alimentaria o agrícola (Borges *et al.*, 2010).

I. murucoides es una de las siete especies de Convolvuláceas que aparecen en el Códice Badiano de 1552. Su uso medicinal es consecuencia de su química peculiar y en la actualidad está principalmente asociado a problemas de la piel, caída de pelo, dolor, inflamación y reumas. Se prepara empleando la cocción de la flor, la hoja, el tallo y la corteza y se administra de forma externa (Chérigo & Pereda-Miranda, 2006).

Algunos otros estudios de la composición química de las hojas de *I. murucoides* han detectado la presencia de alcaloides (Oropeza-Guerrero, 2012; Tecanhuey-Fernández, 2005). Sin embargo, no se sabe si los hongos epibióticos que forman asociaciones con *I. murucoides*, contribuyen a la biosíntesis de algunos de estos compuestos y si estos mismos compuestos, contribuyen a la disminución de la herbivoría y granivoría de esta misma especie.

4. Justificación

La producción de metabolitos secundarios de los hongos endófitos tienen una función protectora que desencadena una relación indirecta con su hospedero, llamada simbiosis defensiva, en la que interactúan como mínimo 3 especies: el hospedero, el simbiote y el enemigo. Sus beneficios, dependen de la presencia o ausencia de depredadores (Clay, 2014); ya que su consumo llega a provocar la muerte o intoxicación de diferentes herbívoros (Clay, 1996; Clay & Schardl, 2002), y la dependencia que desarrolla el huésped con su simbiote por la protección brindada, asegura la transmisión horizontal o vertical del mismo (Łukasik *et al.*, 2013).

Nuevos enfoques y avances tecnológicos están proporcionando conocimientos novedosos de las simbiosis defensivas y de cómo podemos usarlas para nuestro beneficio. La identificación de los actores clave y los mecanismos subyacentes de estas simbiosis, mejorará nuestra comprensión de estas relaciones ecológicas. Además, los compuestos activos involucrados, a su vez podrían tener aplicaciones agrícolas, médicas o alimentarias (Clay, 2014; Turnbaugh *et al.*, 2009; J. F. White & Torres, 2009).

En este sentido, la comprensión de relaciones simbióticas defensivas ayuda a desarrollar nuevas alternativas a los insecticidas químicos, ya que el control de plagas de insectos sigue siendo importante en el rendimiento de los diferentes cultivos (Hernández-Trejo *et al.*, 2019). Así que, la utilización de hongos endófitos es una de las alternativas más llamativas, ya que la acción de los metabolitos secundarios producidos por estos simbiotes encontrados en los diferentes tejidos de sus plantas hospederas, pueden ayudar en la solubilización de la cutícula de insectos o en la inhibición de sus procesos metabólicos y fisiológicos, impidiendo su desarrollo y provocando su muerte. Lo que convierte a los hongos endófitos en importantes instrumentos en el control de enfermedades y plagas, pudiendo ser empleados como insecticidas o antibióticos (Borges *et al.*, 2010).

Algunos hongos endófitos muestran potencial para su producción a gran escala para el control de los insectos en el campo, gracias a la poderosa batería enzimática producida por estos simbiotes, que también es un arma importante en la penetración al hospedero (Borges *et al.*, 2010); por lo que este tipo de control biológico es un método alternativo de control de plagas, siendo amigable con el medio ambiente. Además, la swainsonina tiene un uso potencial en tratamientos oncológicos, ya que posee una actividad anticancerígena, esto gracias a que inhibe la actividad de las manosidasas,

altera el procesamiento de las glicoproteínas e inhibe la apoptosis desde las mitocondrias (Hamaguchi *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011).

De acuerdo con todo esto, en esta tesis se reporta por primera vez la ocurrencia de swainsonina en la especie arborecente *Ipomoea murucoides*. Se describe la relación que existe entre la presencia de este alcaloide y la identidad de los hongos a quienes se les podría atribuir su producción. Así como el desarrollo de un análisis de la distribución geográfica de los hongos aquí estudiados, a fin de identificar las relaciones espaciales de éstos con respecto a algunos aspectos geográficos y medioambientales que podrían afectar o bien, predecir su distribución.

Además, el análisis espacial de los hongos epibióticos de *I. murucoides* representado en mapas, puede ayudar a identificar patrones de distribución que no se habían planteado anteriormente (Malczewski & Rinner, 2015), por lo que la inclusión de esta información en el contexto de la presente tesis servirá como un referente en el proceso de la búsqueda de patrones geográficos en el crecimiento de los hongos endófitos que están hospedados en *I. murucoides*.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Describir las asociaciones entre *Ipomoea murucoides* y hongos epibióticos, así como analizar si estas asociaciones tiene un posible rol defensivo contra herbívoros, e identificar si la distribución geográfica del hongo está regida por factores geográficos y medioambientales.

5.2 Objetivos particulares

1. Identificar a los hongos epibióticos presentes en las hojas de *Ipomoea murucoides* en diferentes localidades del estado de Querétaro usando técnicas moleculares.
2. Conocer la concentración de swainsonina existente en el follaje y semillas de *Ipomoea murucoides*.
3. Identificar la relación que existe entre los hongos epibióticos presentes en *Ipomoea murucoides* y los índices de herbivoría y granivoría.
4. Conocer si la distribución geográfica de los hongos epibióticos asociados a *I. murucoides* está regida por factores geográficos y ambientales, considerando los factores: humedad, edafología, precipitación media anual, temperatura mínima, temperatura máxima, elevación y la presencia del hongo.

6. Métodos

6.1 Extracción de ADN fúngico

Para este procedimiento, se utilizó el estuche comercial de Promega Wizard “Genomic DNA Purification Kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante para el desarrollo de esta metodología (Corporation Promega, 2023), pero aumentando la cantidad de materia orgánica del hongo de interés para obtener una mayor concentración ADN en una sola muestra, para posteriormente secuenciarla.

Procedimiento:

1. En un tubo de Eppendorf se agregan 600 µl de Nuclei Lysis de Genomic DNA Purification Kit de la marca de Promega Wizard.
2. Posteriormente se extrae el hongo de las hojas de *I. mururoides* de un mismo árbol con ayuda de una espátula. Luego se sumerge la espátula en el Nuclei Lysis contenido en el tubo del paso anterior para remover el hongo que está en la superficie de las hojas. Esto se hace con sumo cuidado evitando raspar la hoja, ya que solo queremos obtener ADN del hongo, el hongo que se vaya obteniendo del raspado se va colocando dentro del mismo tubo. Cuando se haga cambio de muestras, la espátula se pasa por alcohol y el mechero para desinfectar y usarlo para otra muestra que se colocará en un tubo Eppendorf diferente, repitiendo esto tantas muestras se deseen.
3. Se pasa por Vortex cada muestra por 10 segundos.
4. Se colocan los tubos Eppendorf con muestras en la incubadora a 65°C por 15 min.
5. Se vuelven a pasar las muestras por el Vortex 10 segundos.
6. Se añaden 3µl de ARNasa, para posteriormente pasar por el Vortex 10 segundos.
7. Nuevamente se colocan en la incubadora los tubos a 37°C por 15 minutos, después de ese tiempo se dejan enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos.
8. Se añaden 200 µl de Protein Precipitation y se vuelven a pasar las muestras por el Vortex 10 segundos.
9. Los tubos se introducen a la centrífuga por 2 minutos a 13,000 rpm.
10. Se preparan nuevos tubos Eppendorf con 600 µl de isopropanol.

11. El sobrenadante de las muestras obtenidas en el paso 9 se extrae y se transfiere a los nuevos tubos de Eppendorf obtenidos en el paso 10, desechando el tubo anterior.
12. Las muestras se pasan por el Vortex por 10 segundos y se introducen a la centrifuga por 3 min a 17,000 rpm, y se saca el sobrenadante para desecharlo.
13. Se añaden 600 µl de etanol al 70% en tubos sin sobrenadante y se invierte el tubo un par de veces.
14. Las muestras se colocan en el centrifuga por 5 minutos a 17,000 rpm, haciendo este paso dos veces consecutivas.
15. El sobrenadante se saca y se dejan secar los tubos, dejándolos boca abajo sobre papel durante 10 minutos.
16. Se agregan 50 µl de DNA Rehydratetion Solution, y los tubos se colocan en el Spin 10 segundos para bajar las gotas que hayan quedado en la superficie del tubo.
17. Las muestras se colocan en la incubadora a 65°C por 1 hora, transcurrido ese tiempo se dejan enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos y se guardan para hacer PCR.

6.2 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

En esta metodología es importante añadir en orden los reactivos (**Tabla 4**) para obtener el Máster Mix, el cual se distribuye en 24 µl para 1 µl de muestra de ADN, teniendo un total de 25 µl. Dependiendo del gen que se quiera amplificar (ITS, 18S y 28S), se seleccionan los primers y el ciclo que se deberá seleccionar en el equipo MiniAmp Plus Thermal Cycler de Thermo Fisher Scientific. Para cada ciclo se usa como guía la temperatura media de anillamiento de los primers (**Tabla 5**). Esta metodología ayuda a la identificación de las especies de los hongos endófitos de interés.

Tabla 4 | Orden de reactivos para realizar el Máster Mix para PCR 1X.

Reactivo	Cantidad
1. ddH ₂ O	14.3 µl
2. Flex Buffer	5.0 µl
3. MgCl ₂	3.0 µl
4. Nucleotid Mix	0.5 µl
5. Primer Forwar (Fwd)	0.5 µl
6. Primer Reverse (Rvs)	0.5 µl
7. TAQ Polimerasa	0.2 µl

- a. Procedimiento general para PCR:
- 1) Desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos por un ciclo.
 - 2) Desnaturalización, a 94°C durante 30 segundos, la fase de anillamiento (temperatura de acuerdo con los primers usados) durante 30 segundos, más 30 segundos del alargamiento a 72°C repitiendo esto por 30 ciclos.
 - 3) Elongación final a 72°C durante 1 minuto por un ciclo.
 - 4) Finalmente, a 4°C por un tiempo indefinido durante un ciclo.
- b. Temperaturas de anillamiento (**Tabla 5**):
- i. ITS (Primers: ITS 1 Fwd, ITS 4 Rvs): 58°C.
 - ii. 18S (Primers: UF 1 Fwd, S3Rvs): 57°C.
 - iii. 28S (Primers: LROR Fwd, LR-5 Rvs): 65°C.

Tabla 5 | Secuencias de primers.

Locus	Nombre Primer	Secuencia 5'-3'	Referencia	pb	Temp [°C]	Long pb
ITS						
ITS1, 5.8S and ITS2	ITS1 Fwd	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(Gardes & Bruns, 1993; Steiner <i>et al.</i> , 2006; White <i>et al.</i> , 1990)	19	58	700
ITS1, 5.8S and ITS3	ITS4 RVS	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(Gardes & Bruns, 1993; Steiner <i>et al.</i> , 2006; White <i>et al.</i> , 1990)	20	--	--
18S						
SSU	UF1	CGAATCGCATGGCCTTG	(Kappe <i>et al.</i> , 1996)	17	57	926
SSU	S3	AGTCAAATTAAGCCGCAG	(Kappe <i>et al.</i> , 1996)	18	--	--
28S						
LSU	LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC	(Jeyaprakash <i>et al.</i> , 2014)	17	65	--
LSU	LR5	TCCTGAGGGAACTTCG	(Jeyaprakash <i>et al.</i> , 2014)	17	--	--

Estos primers son seleccionados de acuerdo con estudios taxonómicos de hongos, ya que, frecuentemente se basan en el grupo de genes nucleares ribosómicos mostrados en la **Figura 5**, en donde se incluyen los genes: 18S, que constituye a la subunidad pequeña (Small Subunit Ribosomal, SSU); 5.8S y 28S que constituye a la subunidad grande (Large Subunit Ribosomal, LSU). Se ha conocido que la secuencia entre 18S y 5.8S (ITS1), y la secuencia

entre 5.8S y 28S (ITS2), siendo los marcadores más adecuados para el análisis filogenético y taxonómico de los hongos (White *et al.*, 1990); esto debido a que sus secuencias son propensas a tener una variación significativa como proceso evolutivo, ya que no existe la necesidad de mantenerlos invariables porque no forman parte del ribosoma funcional; en otras palabras no codifican ninguna proteína, por lo que estos genes pueden evolucionar de forma más rápida y son de ayuda para la identificación a nivel de género y especie (Schoch *et al.*, 2012). Además de que la rápida evolución de ITS lo han convertido en el hilo negro de la inferencia filogenética a nivel de especie-género en hongos durante más de 20 años (Álvarez & Wendel, 2003; Schoch *et al.*, 2012).



Figura 5 | Genes ribosomales de interés con respectivo Orden dentro de ADN ribosomal (Henras *et al.*, 2015).

De acuerdo con esto, los genes seleccionados son ITS1, 18S y 28S dando una breve descripción a continuación:

I. ITS1

La región correspondiente a ITS, por sus siglas en inglés Internal Transcribed Spacer, está contenido en el ribosoma nuclear, forma parte de los genes contenidos en el ADN_r, y se compone por 3 subregiones: ITS1, 5.8S e ITS2 (Rosenblad *et al.*, 2016).

La longitud de ITS varía considerablemente entre las especies de hongos, mientras más cercanía evolutiva exista entre estos, la secuencia que constituye dicha región será más parecida; por lo que existe mayor tiempo de divergencia entre especies de familias distintas que entre dos especies de un mismo género, reflejándose en la similitud que hay entre las regiones ITS. Esto permite el establecimiento de la región ITS1 como un código de barras genético por excelencia de los hongos (Schoch *et al.*, 2012); variando su tamaño de 500 a 800 nucleótidos (DeSalle & Goldstein, 2019).

II. 18S y 28S

Ambos genes contienen regiones muy conservadas, ya que forman parte del ribosoma funcional, por lo que participan en la iniciación de síntesis de polipéptidos, aunque el extremo 5' del gen ribosomal 28S, el cual es una región polimórfica, es una zona de identificación, por ser el más informativo debido a su variabilidad (Moncalvo *et al.*, 2000). El gen ribosomal 18S, es la región del genoma más secuenciada para los estudios de filogenia (Simon *et al.*, 1992); además de que se encuentran en unidades repetidas una junto a la otra, teniendo un gran número de copias que facilitan su amplificación.

6.3 Electroforesis

Con el fin de conocer qué muestras contienen el ADN correspondiente a los primers utilizados, es necesario aplicar el método de electroforesis para que se pueda realizar la secuenciación (Atia & Breadmore, 2023). Y para llevar a cabo esta técnica, primero se preparan geles de agarosa al 1% con: a) 25 ml de buffer TBE 1x y b) 0.25g de agarosa. Luego se hace la disolución, elevando su temperatura con un microondas hasta notar que ya no existe ningún residuo de la agarosa, disolviéndose completamente.

Posteriormente, en el molde de un equipo de blueGel, se vierte la disolución del paso anterior, colocándole un peine para los pozos necesarios; luego, se deja enfriar para polimerizar y así formar una matriz porosa. Teniendo esto, se coloca esta matriz en la cámara de electroforesis horizontal el equipo de blueGel y se le añade buffer TBE. Para poder añadir el producto PCR a cada uno de los pozos, será necesario 3 µl de buffer de carga y 2 µl de muestra. Al inicio de cada fila de pozos se coloca una escalera de ADN, para la cual es necesario 3 µl de buffer de carga y 1 µl de escalera (100 pb DNA Ladder Promega). Cabe mencionar que el buffer de carga está compuesto por 500 µl de dH₂O, 100 µl de Load Dye y 1.6 µl Diamon Nucleotid Acid Dye; estos tres de Promega. Posteriormente, ya con los pozos cargados como corresponde, se conecta a corriente para que el ADN se comience a mover. Las muestras en las que se observa una banda de ADN correspondiente al fragmento esperado se mandan al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (LANGEBIO-CINVESTAV) campus Guanajuato, en donde se realiza la secuenciación Sanger (Sanger & Coulson, 1975) en cada una de las muestras.

6.4 Análisis bioinformático

Para la reconstrucción filogenética de los hongos epibióticos relacionados con *Ipomoea murucoides* en diferentes sitios del estado de Querétaro (**Tabla 6**), se siguen los pasos esenciales mencionados por Abascal *et al.* (2014).

Tabla 6 | Nomenclatura de etiquetas utilizadas como referencia de los sitios en donde se muestreó el *I. murucoides*.

Iniciales	Sitio de muestreo
LB	La barreta
JBC	Jardín Botánico de Cadereyta
J	Juriquilla
PG	Pie de Gallo
PC	Peña Colorada
ST	Santa Teresa
ZA	Zamorano

1. Con ayuda del cromatograma obtenido de la secuenciación, se comienza a limpiar cada una de las secuencias de nucleótidos, eliminando los extremos de cada una de éstas, ya que se muestran picos poco uniformes y con demasiado ruido, siendo imposible identificar a qué nucleótido pertenece. Este proceso se lleva a cabo con ayuda del software BioEdit.
2. Se construyen CONTIGS con las secuencias FWD y RVS para cada uno de los genes, poniendo secuencias de nucleótidos en un mismo archivo, siempre y cuando pertenezcan al mismo árbol, y sean producto de la misma extracción; esto se lleva a cabo utilizando el software BioEdit.
3. Con los CONTIGS se prosigue a usar la plataforma de National Center for Biotechnology Information (NCBI). En el apartado de GenBank se busca una coincidencia con el reino Fungi, y si no existe esta coincidencia se elimina la secuencia. Algunas de las secuencias identificadas en este proceso correspondían a *Ipomoea murucoides* que también se eliminaron.
4. Los CONTIGS son usados para la reconstrucción filogenética. Para ello se trabajó primero cada gen por separado, y después un análisis con los tres genes usando la plataforma de Cyberinfrastructure for Phylogenetic

Research (CIPRES). Primero se alinearon las secuencias usando la herramienta de ClustalW; para luego obtener un modelo de evolución para cada uno de los genes usando la herramienta JModelTest2 (Darriba *et al.*, 2012). Esta herramienta selecciona estadísticamente los modelos de evolución más adecuados para las sustituciones de nucleótidos encontradas en cada uno de los paquetes de secuencias, implementando tres estrategias diferentes de selección de modelos (Darriba *et al.*, 2012):

- Pruebas de razón de verosimilitud jerárquica y dinámica (hLRT y dLRT).
- Criterios de información de Akaike y Bayesiana (AIC y BIC).
- Método de teoría de la decisión (CT).

Además, proporciona estimaciones de la incertidumbre de selección del modelo, la importancia de los parámetros, la estimación de parámetros y las topologías del árbol promediadas por el modelo (Darriba *et al.*, 2012).

5. El modelo de evolución obtenido se especifica para la búsqueda de árboles filogenéticos usando MrBayes v3.2.7; con la selección de dos cadenas de Markov y 20 millones de generaciones hasta llegar al árbol concatenado, además de elegir a *Saccharomyces cerevisiae* como el grupo externo (*outgroup*), ya que es un hongo muy estudiado que pertenece a los Ascomycota. Esto se hace con la finalidad de determinar la raíz del árbol.
6. Para el árbol concatenado se hace una partición para señalar cuándo comienza la matriz para el gen 18S, ITS y 28S, incluyendo la especificación de los modelos que le corresponde a cada uno. Cabe mencionar que se incluyen secuencias previamente publicadas y disponibles en NCBI de diferentes Órdenes y familias de hongos.

6.5 Extracción de alcaloides de hojas y semillas:

Para la extracción de alcaloides se utiliza la metodología propuesta por de acuerdo con Kucht *et al.* (2004), para posteriormente confirmar la presencia de alcaloides usando cromatografía de capa fina. A continuación, se describen brevemente los pasos a seguir (Kucht *et al.*, 2004):

1. Se selección las hojas maduras saludables, sin marcas de algún daño del hongo epibiótico, al igual que se seleccionan semillas sanas sin ningún daño.
2. El tejido se coloca en un mortero y se le vierte nitrógeno líquido, la cantidad suficiente para que cubra toda la muestra, y se muele inmediatamente.
3. Se pesan 5 gr del polvo de hoja o 1 gr de polvo de semilla y se transfiere a un tubo Falcon de 50ml.
4. Se agregan 16 ml de cloroformo con ayuda de una propipeta y se agita.
5. Al mismo tubo se agrega 20 ml de ácido acético al 2% esto con ayuda de una propipeta y se deja agitando la solución durante 16 horas a temperatura ambiente.
6. Pasadas la 16 horas las muestras se centrifugan a 20000 rpm, y 15 ml del sobrenadante se transfieren a un tubo nuevo.
7. El sobrenadante extraído se manda a liofilizar al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) en el laboratorio de Biomateriales Aplicados y Caracterización de Biomateriales a cargo de la Dra. Miriam Rocío Estévez González.
8. Una vez liofilizadas, las muestras se resuspenden en 2ml de 0.1% de ácido fórmico, 5% metanol y 95% acetato de amonio 20 mM.
9. Por último, se filtran las muestras con ayuda de filtros de jeringa PTFE 0.45uM, y se guardan en el congelador para cromatografía de capa fina o UPLC-Masas.

6.6 Cromatografía de capa fina

Esta metodología también se lleva a cabo considerando la técnica descrita por Kucht *et al.* (2004); con el fin de conocer si existen alcaloides dentro de las muestras obtenidas y saber si los alcaloides son solubles en la fase móvil de la cromatografía de alta presión. A continuación, se enlistan los pasos a seguir (Kucht *et al.*, 2004):

1. Se prepara una placa de sílice con medidas de 25 x 93 mm, dentro de la placa se coloca una línea con una altura de 1.3 cm (**Figura 6**).

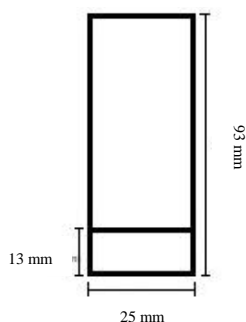


Figura 6 | Medidas de placa de sílice.

2. Teniendo el corte en un frasco con taparrosca se colocan 12 ml de la solución compuesta por 50% agua destilada, 50% acetonitrilo y 0.1% ácido acético.
3. Con ayuda de un filamento se coloca la muestra de interés, con el mayor cuidado posible en el centro de la línea inferior de la placa. La muestra coloca hasta que esta pueda ser perceptible.
4. Una vez que se tiene la placa cargada con la muestra, se deja en el interior del frasco por aproximadamente 20 minutos, para posteriormente observar el desplazamiento de la muestra.
5. En este proceso, la placa se coloca bajo luz UV y se marca con ayuda de un lápiz las manchas que haya revelado la luz.
6. Finalmente, a la placa se le coloca sulfato sérico amoniacal 0.15 M, que actúa como revelador, una vez que a la placa se le haya esparcido una ligera capa de sulfato sérico amoniacal, se coloca en una placa de calentamiento en aproximadamente 50 °C y se vuelven a marcar las manchas nuevas que se revelen al ser expuesta a esta temperatura.

6.7 Cromatografía líquida de alta presión de ultra-performance y espectrometría de masas:

Este análisis se realizó por medio del servicio comercial MOCA de la Universidad Católica de Lovania en Bélgica. Con el fin de conocer la concentración de swainsonina en las muestras. Para ello se llevan los siguientes pasos:

- a. *HPLC*. Para este primer caso se usa una columna HILIC (100 x 2.1mm; 1.8µm) a una temperatura de 30°C, un volumen de inyección de 1 µl y una fluctuación de gradiente pasando de 100% agua/acetonitrilo (95:5) + 0.1% ácido fórmico a 100% acetonitrilo/agua (95:5) + 0.1% ácido fórmico en 10 min con un flujo de 0.3 ml/min.
- b. *Espectrometría de masa*. Para este segundo caso, se usó un espectrómetro de masa ESI en modo positivo con un fragmentador de 100 eV y un nebulizador a 40 psi, así como un flujo de gas de 6 ml/min a una temperatura de 200 °C. Se usaron estándares de la marca Sigma Aldrich para crear curvas de calibración y cuantificar la swainsonina.

6.8 Herbivoría

Para el caso de las tasas de herbivoría de las hojas, se estimaron colocando un marco de madera de 300 x 300 mm, con una rejilla de 50 x 50 mm, encima de una capa de follaje de *Ipomoea murucoides* y estimando visualmente el porcentaje de tejido que había sido comido por los insectos herbívoros masticadores. Se excluyeron los daños bacterianos, fúngicos y cinípidos. Después se realizaron diez mediciones por árbol, siendo este número adecuado para promediar los valores, ya que se tomaron hojas a diferentes alturas de la copa del árbol, ya que presentaba diferente nivel de herbivoría, además así disminuimos el tiempo de análisis, ya que es necesario para cubrir todos nuestros individuos en un corto periodo de tiempo, y así la herbivoría no varíe demasiado por el tiempo de recolección de datos. Con estos datos se procedió a hacer un análisis estadístico en R Studio versión 3.6.3.

6.9 Granivoría

Para obtener el parámetro de granivoría, se recolectaron semillas de *I. murucoides* de los árboles objetivo y se mantuvieron durante 8 meses en el laboratorio en condiciones ambientales ($28 \pm 2^\circ \text{C}$, $73 \pm 3\% \text{RH}$), hasta la aparición del escarabajo, para después contar las semillas sanas y dañadas. En promedio se contaron 134 semillas por árbol, y al igual que en la herbivoría, a estos datos se les hace un análisis estadístico R Studio versión 3.6.3. y para la visualización de los datos se usa la librería ggplot2.

6.10 Análisis geoespacial

Para el análisis de datos geográficos, se crea un proyecto geoespacial utilizando el Sistema de Información Geográfico Quantum GIS (QGIS v.3.32), en el que se incorporan capas vectoriales de los puntos correspondientes a las coordenadas geográficas de cada uno de los árboles muestreados de *I. murucoides* con su respectivo simbionte. Además, se integran otras capas de información tales como: humedad del suelo, edafología, precipitación media anual, temperatura mínima, temperatura máxima, la altitud a la que se encontraron los especímenes de *I. murucoides* y la presencia del hongo. Estos parámetros, se consideran fundamentales para la evaluación de la distribución de los dos hongos presentes en *I. murucoides* que se analizaron espacialmente, delimitando el área de estudio a un polígono conformado por los municipios de Querétaro, Corregidora y Huimilpan.

Además de haber realizado un análisis visual preliminar del comportamiento de estos parámetros con respecto a la localización de ambos hongos, se procedió a realizar un Análisis Multicriterio (AMC) basando en la sumatoria lineal ponderada o Weighted Linear Combination (WLC, Malczewski, 2000). Con este método se obtiene la ponderación de cada parámetro, dando como resultado la implementación de una matriz de Saaty (Saaty, 1987) en la que se pondera la importancia relativa de cada parámetro con respecto al desarrollo de estos dos hongos. Una vez obtenidos los coeficientes de ponderación, los parámetros analizados son convertidos a nuevas capas en formato ráster, las cuáles se multiplican por sus respectivos coeficientes y finalmente, se realiza una sumatoria (WLC) de los archivos ráster obtenidos en el paso anterior, para así obtener un mapa en el que se identifican las zonas que geográficamente cuentan con los parámetros ambientales idóneos para el desarrollo de los dos hongos identificados en esta investigación.

7. Resultados

7.1 Análisis bioinformático

Para obtener los árboles filogenéticos, primeramente, se obtuvieron los modelos de evolución correspondientes a cada uno de los genes (**Tabla 7**), los cuales fueron obtenidos por medio de la herramienta jModelTest2 (Darriba *et al.*, 2012) del servidor de CIPRES (CIPRES Science Gateway).

Tabla 7 | Modelos de evolución para cada gen.

Gen	Modelo de evolución	Descripción
28S	SYM	Modelo simétrico (Zharkikh, 1994)
ITS	SYM + γ	Modelo simétrico + desviación gamma
18S	TrNef + G	Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993)

Recordemos que el análisis para la reconstrucción de la filogenia se lleva a cabo con ayuda de la estadística bayesiana, eligiendo este método por ser robusto y validado; además de que arroja las probabilidades posteriores asociadas a las ramas de los árboles filogenéticos. Haciendo uso de la herramienta MrBayes 3.2.7 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) del servidor de CIPRES (CIPRES Science Gateway), por lo que se hace un análisis bayesiano por veinte millones de generaciones y 2 cadenas de Markov, teniendo una comparación paralela, obteniendo así dos puntos de comparación. De todos los árboles encontrados por la inferencia bayesiana, se obtiene un árbol consenso determinado por la mayoría de los árboles (“*majority rule*”), que son los árboles finales para cada uno de los genes y el concatenado.

Los árboles filogenéticos obtenidos, se muestran en las **Figuras 7, 8, 9 y 10**, en donde la última (**Figura 10**) corresponde a la concatenación de los 3 genes de interés. Estos cuatro árboles filogenéticos son el resultado de un consenso basado en un análisis Bayesiano, usando MrBayes v3.2.7, con una selección de dos cadenas de Markov y 20 millones de generaciones. Las ramas que se observan en todas estas figuras son proporcionales al

número de cambios en la secuencia de nucleótidos y los números asociados a los nodos representan las probabilidades posteriores de la rama.

En cada uno de los árboles filogenéticos, se han destacado los Órdenes Chaetothyriales y Xylariales (rojo y verde respectivamente). La etiqueta de las secuencias de los hongos epibióticos de *I. murucoides*, lleva las iniciales del sitio de muestreo (**Tabla 6**), el número de árbol de donde se obtuvo la muestra y el año de muestreo.

La **Figura 7**, muestra el árbol filogenético para el gen 18S, observando que 17 de las 23 muestras se encuentran en el Orden de Chaetothyriales, y 6 muestras en el Orden Xylariales. Para la **Figura 8**, tenemos el árbol filogenético para el gen ITS1, observando que 11 de las 13 muestras están contenidas en el Orden Chaetothyriales, y 2 en el Orden Xylariales. La **Figura 9** corresponde al árbol filogenético del gen 28S, observando que 14 de las 18 muestras están en el Orden Chaetothyriales y 4 en el Orden Xylariales, en este caso la distancia es casi nula, no solo en las muestras repetidas de los años 2021 y 2022 sino que también dentro de las muestras correspondientes a diferentes individuos de hongos epibióticos de *I. murucoides*, formando un cepillo en el árbol, reflejándose fuertemente en el Orden Chaetothyriales ya que es el que contiene un mayor número de individuos. Finalmente tenemos el árbol filogenético concatenado (**Figura 10**), se observa que 23 de las 28 muestras, pertenecen al Orden de Chaetothyriales y únicamente 5 al Orden Xylariales.

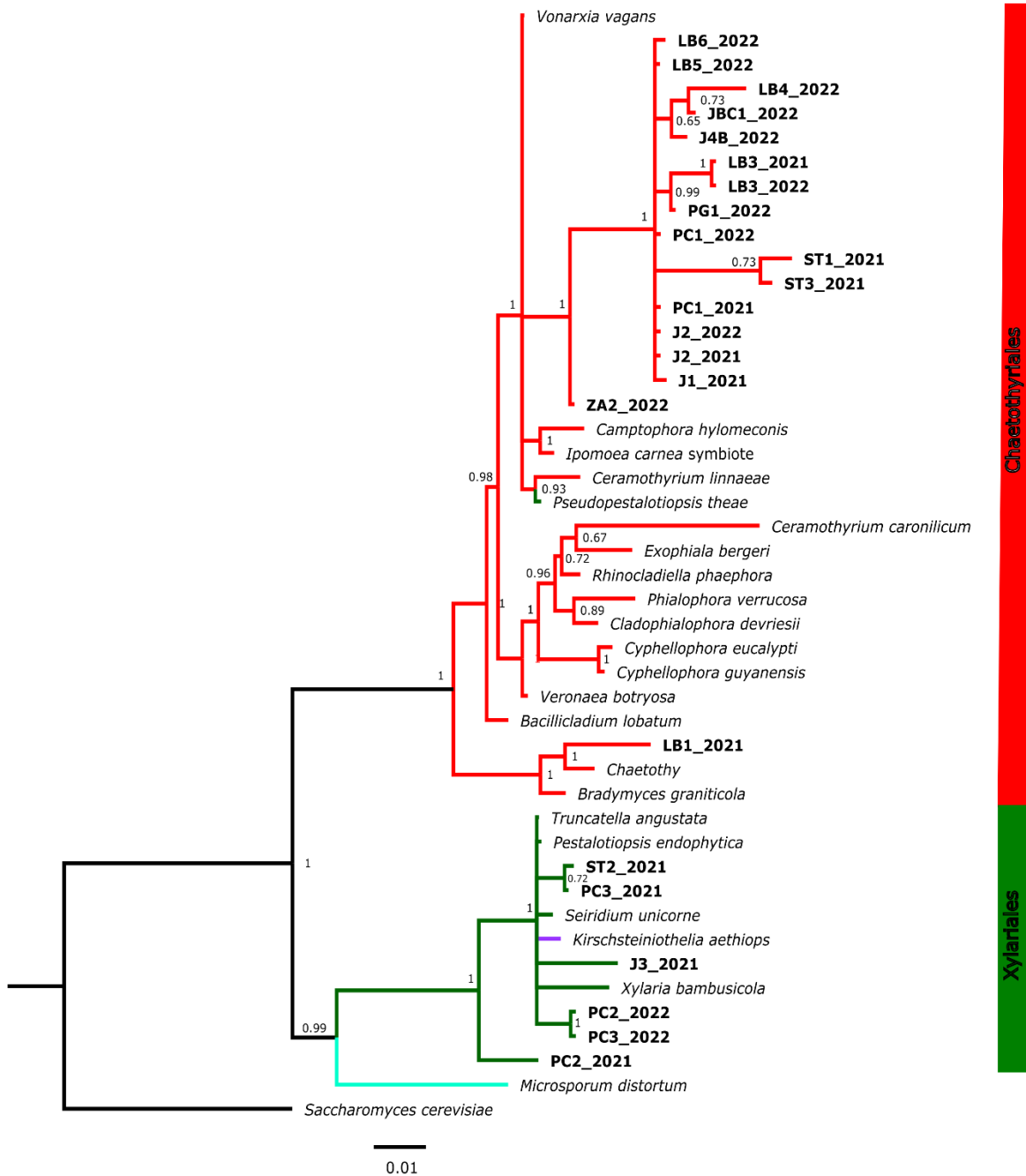


Figura 7 | Árbol filogenético para el gen 18S. Resultado del consenso basado en el análisis Bayesiano, con una selección de dos cadenas de Markov y 20 millones de generaciones, correspondientes al ADN fúngico de los simbiontes de *I. murucoides*, extraídos de la superficie de hojas jóvenes de diferentes individuos, denotando las muestras (en negrilla) por las iniciales del sitio de muestreo, número de individuo y año de colecta.

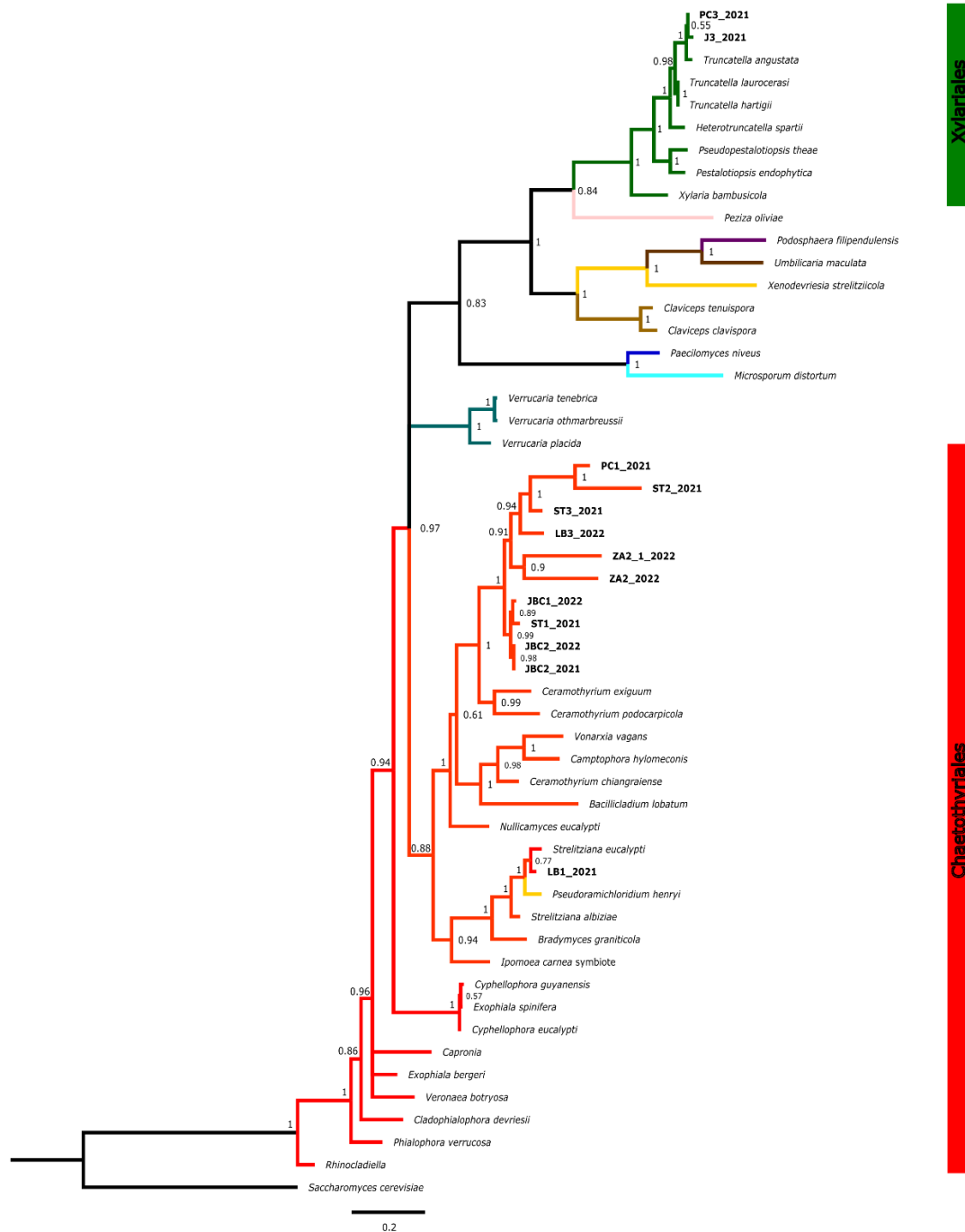


Figura 8 | Árbol filogenético para el gen ITS1. Resultado del consenso basado en el análisis Bayesiano, con una selección de dos cadenas de Markov y 20 millones de generaciones, correspondientes al ADN fúngico de los simbiontes de *I. murucoides*, extraídos de la superficie de hojas jóvenes de diferentes individuos, denotando las muestras (en negrilla) por las iniciales del sitio de muestreo, número de individuo y año de colecta.

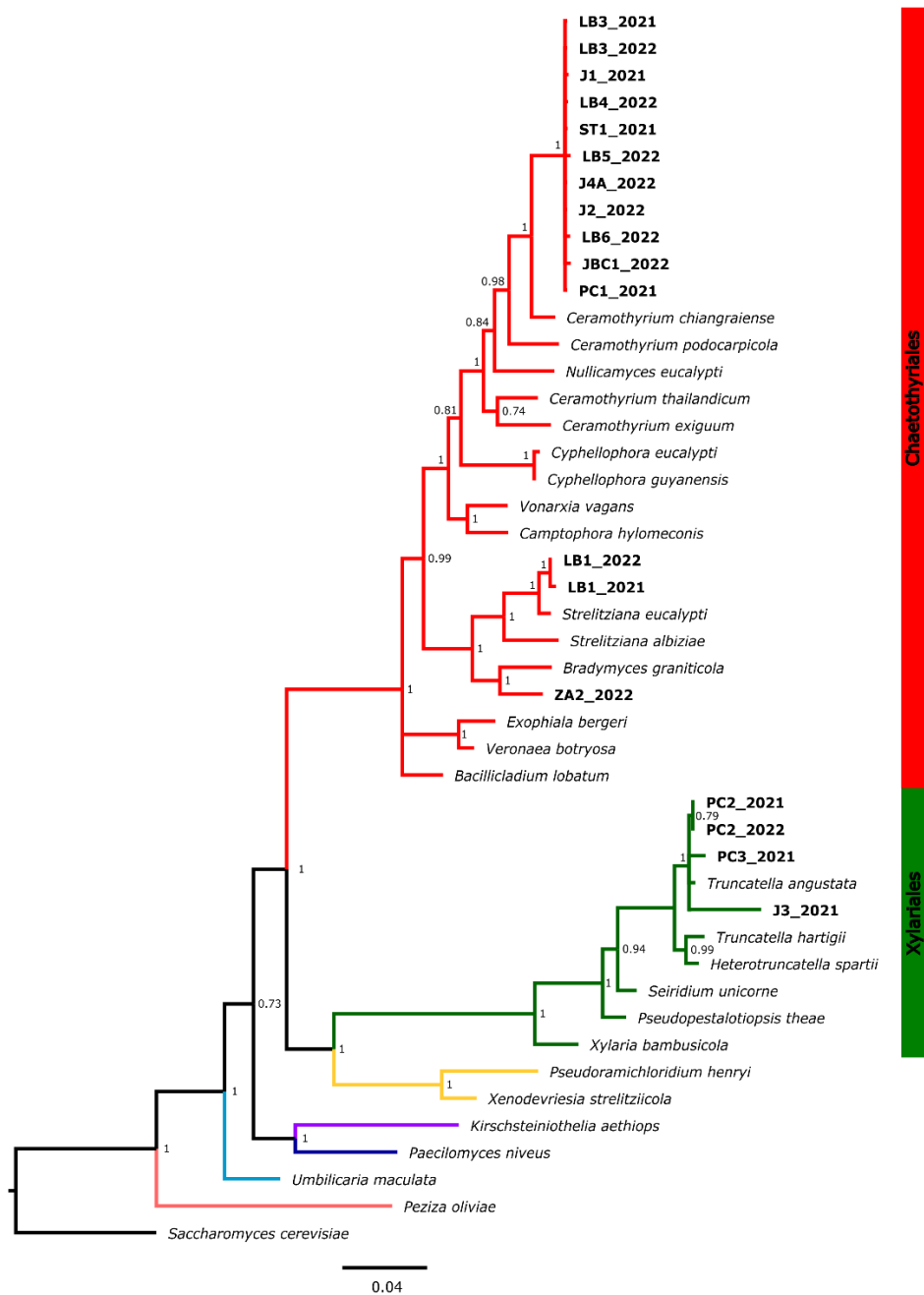


Figura 9| Árbol filogenético para el gen 28S. Resultado del consenso basado en el análisis Bayesiano, con una selección de dos cadenas de Markov y 20 millones de generaciones, correspondientes al ADN fúngico de los simbiontes de *I. murucoides*, extraídos de la superficie de hojas jóvenes de diferentes individuos, denotando las muestras (en negrillas) por las iniciales del sitio muestreo, número de individuo y año de colecta.

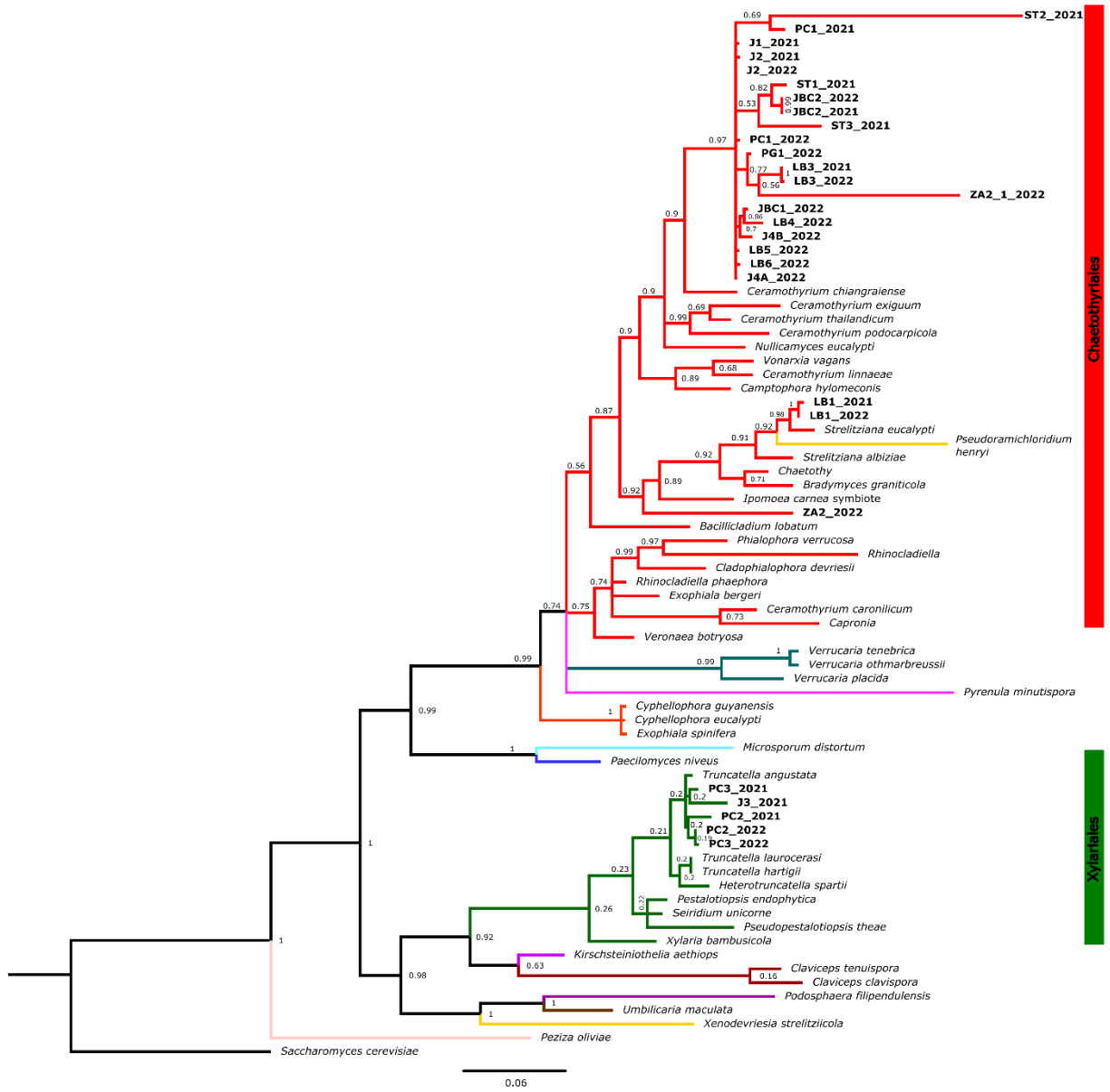


Figura 10 | Árbol filogenético concatenado 18S, ITS1 y 28S. Resultado del consenso basado en el análisis Bayesiano, con una selección de dos cadenas de Markov y 20 millones de generaciones, se enlaza la información genética de los tres genes analizados con el siguiente orden: 18S, ITS1 y 28S, denotando las muestras (en negrillas) por las iniciales del sitio de muestreo, número de individuo y año de colecta.

En cada árbol filogenético se observa que el simbionte de *Ipomoea carnea* está agrupado en el Orden Chaetothyriales, aunque no parece ser un grupo hermano de los simbiontes de *Ipomoea murucoides*, ya que la distancia observada es considerable, además, se encuentra en un clado diferente de los hongos simbiontes de *I. murucoides*.

De acuerdo con la estructura del árbol filogenético concatenado (**Figura 10**), se observa que los simbiontes de *Ipomoea murucoides* se encuentran en los Ordenes Xylariales y Chaetothyrial, siendo mayormente representado el Orden Chaetothyriales con 23 secuencias, seguido del Orden Xylariales con 5 secuencias; en este mismo árbol filogenético, la muestra LB1 de los años 2021 y 2022, se agrupó dentro del Orden Chaetothyriales, pero dentro de un linaje afín a la Familia Trichomeriaceae.

Además, un aspecto importante de mencionar es que los árboles que se lograron muestrear durante los años 2021 y 2022, se mostraron como secuencias idénticas o muy similares, ya que las muestras se agrupan dentro del mismo Orden y con una distancia mínima. Igualmente, es importante recalcar que las secuencias conservan el Orden al que pertenecen en los tres genes (18S, ITS, 28S), así como en árbol filogenético concatenado. Actualmente, estos hongos no se encuentran descritos y estos análisis no permiten asignarlos a una Familia o Género.

7.2 Alcaloides

En el análisis de la concentración de swainsonina se obtienen diferentes rangos tanto en hojas como en semillas de los individuos de *I. murucoides*, indicados en la **Tabla 8**, la cual es ocupada de aquí en adelante como referencia para los siguientes análisis. A continuación, también se determina si la localidad, el Orden de los hongos o el año de recolección, afectan en la concentración de swainsonina en estos dos tejidos; al mismo tiempo, se establece si la concentración afecta en la herbivoría o en la granivoría.

Tabla 8 | Rangos de concentración de referencia de swainsonina en hojas y semillas.

Tejido	Concentración Swainsonina [$\mu\text{g/g}$]
Hojas	2 - 410
Semillas	1 - 363

La **Figura 11**, tiene representada la concentración de swainsonina en semillas, cuantificada en función de la localidad de la que se extrajeron las muestras: Peña Colorada, La Barreta y Juriquilla. Para comprender las diferencias observadas en la concentración de swainsonina se realizan pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk), como complemento de los gráficos (*box-plot*) mostrados en la **Figura 11**. Esto se llevó a cabo ya que nos encontramos con una prueba sensible al tamaño de muestreo. Por lo tanto, con el tipo de distribución obtenido y la comparativa con los gráficos, se decide utilizar el test estadístico de contraste de Kruskal-Wallis (no paramétrico), el cual arrojó que la concentración de swainsonina no depende de la localidad en la que se recolectaron las muestras.

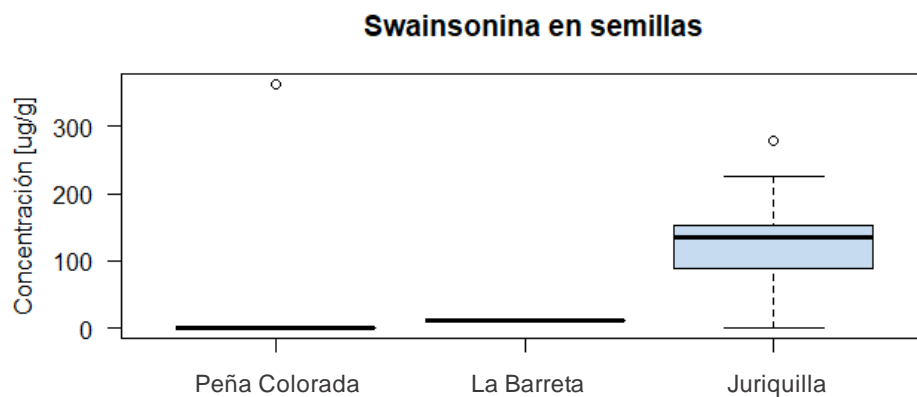


Figura 11 | Concentración de swainsonina detectada en semillas en función del sitio de muestreo. Analizando su concentración con el método no paramétrico Kruskal-Wallis obtenemos $\chi^2 = 4.2959$, $df = 2$, $p = 0.117$.

Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento que se ocupó para la **Figura 11**, pero ahora para identificar la relación existente entre la concentración de swainsonina en hojas y la localidad en la que se tomaron las muestras (Peña Colorada, Santa Teresa, Juriquilla y La Barreta); obteniendo una diferencia significativa en el alcaloide de interés, por lo que en este caso, se interpreta que la concentración de la swainsonina en hojas sí se ve afectada por la localidad de la que se extrajeron las muestras (**Figura 12**). Cabe resaltar que, a comparación de los datos analizados para semillas, los análisis de concentración de swainsonina en hojas, muestran una localidad más, Santa Teresa, ya que se pudieron recolectar muestras de hojas, pero de semillas no, por lo que en la **Figura 12**, aparecen estas cuatro localidades (Peña Colorada, Santa Teresa, Juriquilla y La Barreta).

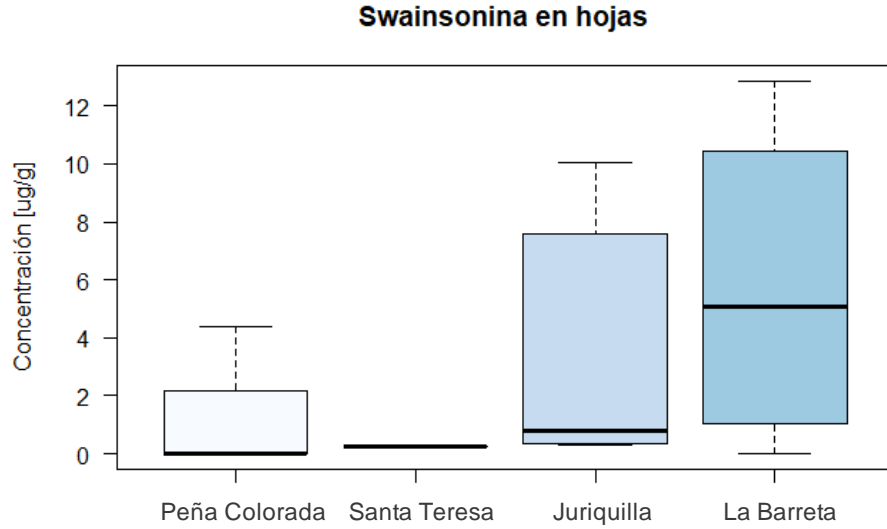


Figura 12 | Concentración de swainsonina detectada en hojas en función del sitio de muestreo. Analizando su concentración con el método no paramétrico de Kruskal-Wallis se obtiene $\chi^2 = 3.3981$, $df = 3$, $p = 0.334$.

Por otro lado, debido a que dentro de los datos obtenidos en esta análisis, se tiene diferenciado el Orden de hongo que contiene cada una de las muestras, en la **Figura 13** se muestran los resultados del análisis de concentración de swainsonina en función del Orden de hongo correspondiente a las muestras, esto tanto en semillas (**Figura 13-A**) como en hojas (**Figura 13-B**). En el caso de semillas (**Figura 13-A**), se utilizó el método estadístico de contraste de Wilcoxon, obteniendo que, la concentración de swainsonina sí tiene una diferencia significativa dependiendo del tipo de hongo. En este sentido, Chaetothyriales tiene una mayor producción de swainsonina en semillas, esto en comparación con la concentración de Xylariales. Mientras que, para la concentración de swainsonina en hojas en función del Orden de hongo (**Figura 13-B**), usando de igual manera el test no paramétrico de Wilcoxon, se tiene que la concentración de swainsonina no se ve afectada por el tipo hongo. Es decir, independientemente del tipo de hongo analizado, la concentración de swainsonina en hojas no varía significativamente.

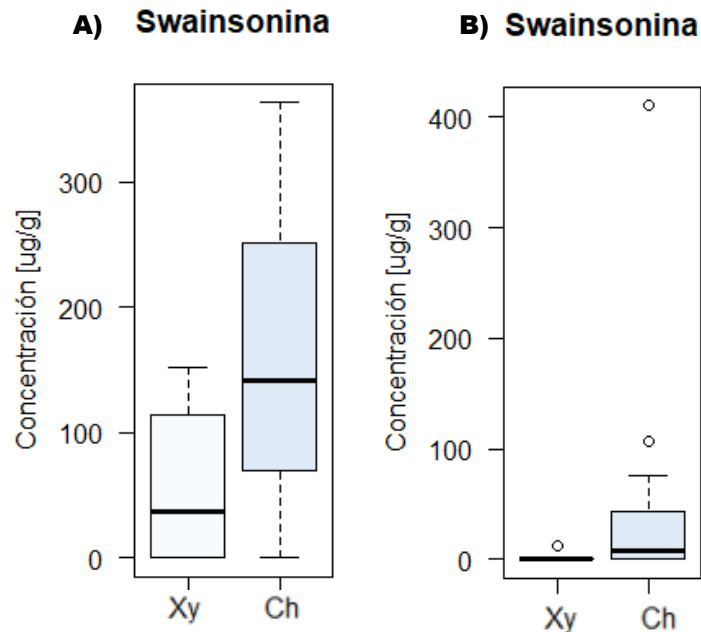


Figura 13 | Concentración de swainsonina en semillas (A) y hojas (B) en función del Orden de hongo. Analizando la concentración con el método no paramétrico de Wilcoxon, se obtiene para **semillas**: $W = 52$, $p = 0.039$; **hojas**: $W = 55$, $p = 0.082$.

Asimismo, se llevó a cabo un análisis para comprender el comportamiento de la concentración de swainsonina en hojas y en semillas en función del Orden del hongo (**Figura 14**), para ver si entre ellos existen diferencias de concentración en ambos tejidos, teniendo datos para Chaetothyriales y Xylariales. En Chaetothyriales (**Figura 14-A**), se utiliza el método estadístico de contraste de Wilcoxon, esto después de conocer el tipo de distribución que tienen los datos, mostrando que la concentración de swainsonina presenta una diferencia significativa, siendo en las semillas, en donde hay una mayor concentración de swainsonina que en las hojas. Para Xylariales (**Figura 14-B**), también se usó el método estadístico de contraste de Wilcoxon, con el cual no se observó una diferencia significativa entre los tejidos, por lo tanto, hojas y semillas contienen un rango similar de concentración de swainsonina.

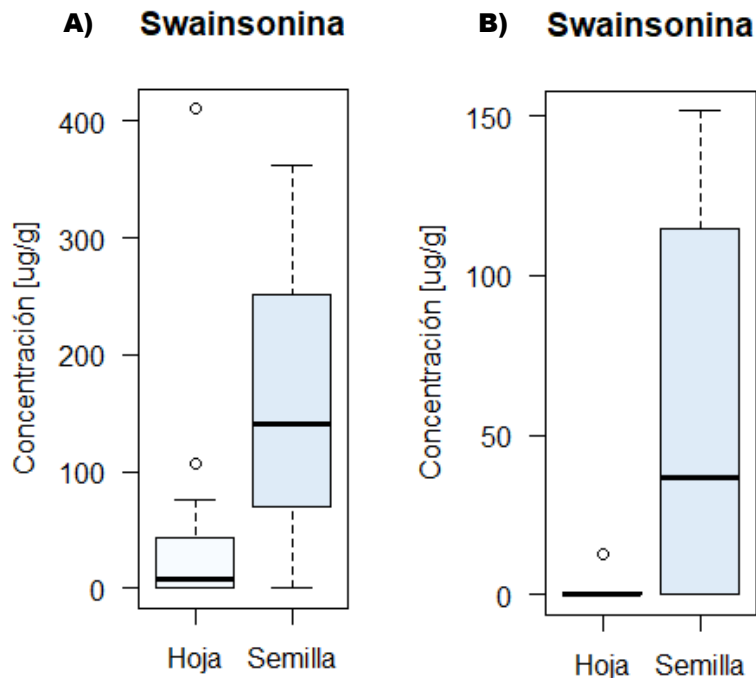


Figura 14 | Concentración de alcaloides en hojas y semillas en el Orden Chaetothyriales (A) y Xylariales (B). Analizada por el método no paramétrico de Wilcoxon se obtiene para **swainsonina en Chaetothyriales**: $W = 18$, $p = 0.020$; **swainsonina en Xylariales**: $W = 19$ y $p = 0.552$.

Por otro lado, debido a que la hipótesis de la simbiosis defensiva de Clay (Clay, 2014) plantea que las defensas químicas brindadas por el hongo, ayudan a proteger a la planta de sus enemigos. Procedimos a realizar un análisis entre el nivel de herbivoría y granivoría (**Figuras 15 y 16**, respectivamente) que hay en cada uno de los sitios muestreados: La Barreta, Peña Colorada, Santa Teresa y Juriquilla. La granivoría que se cuantificó, fue ocasionada por los escarabajos del género *Megacerus* Familia Bruchidae, que dejan una marca característica en la semilla. Por lo que, para comparar los niveles de herbivoría y granivoría entre las localidades muestradas, se utilizaron análisis no paramétricos Kruskal-Wallis.

En la **Figura 15**, se presenta la variación de la herbivoría con respecto a los sitios muestreados. Sin embargo, al aplicar el método de Kruskal-Wallis, se observa que no existe una diferencia significativa en la herbivoría de las diferentes locaciones, por lo que se puede decir que este parámetro no depende de la ubicación geográfica de los sitios de muestreo. Sin embargo, en el caso de la granivoría por brúquidos (**Figura 16**), sí observó una diferencia significativa de éstos valores, de los cuales Joya La Barreta, presentó una mayor

depredación de semillas, seguido por el sitio de Peña Colorada, Santa Teresa y finalmente Juriquilla.

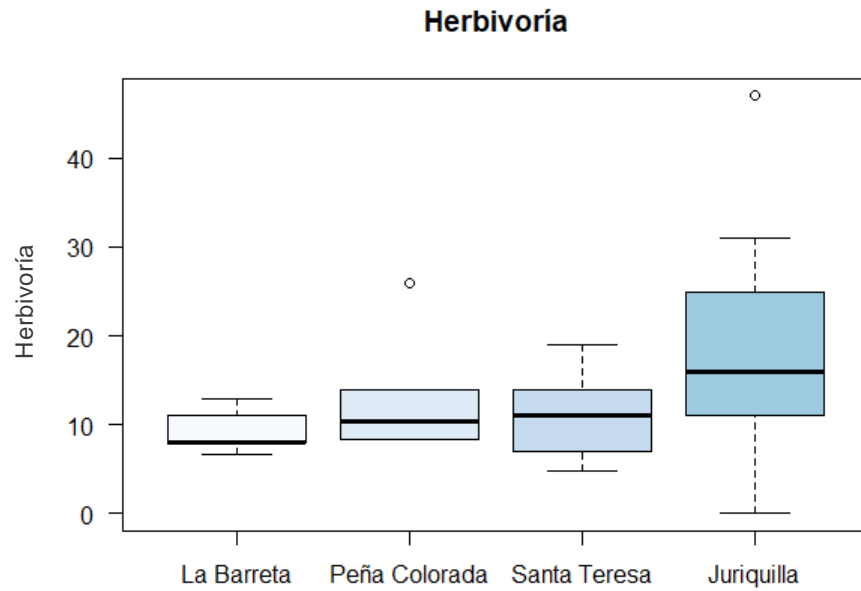


Figura 15 | Herbivoría por sitios de muestreo. Analizando los grupos por el método no paramétrico de Kruskal-Wallis se tiene $\chi^2 = 7.0358$, $df = 3$, $p = 0.071$.

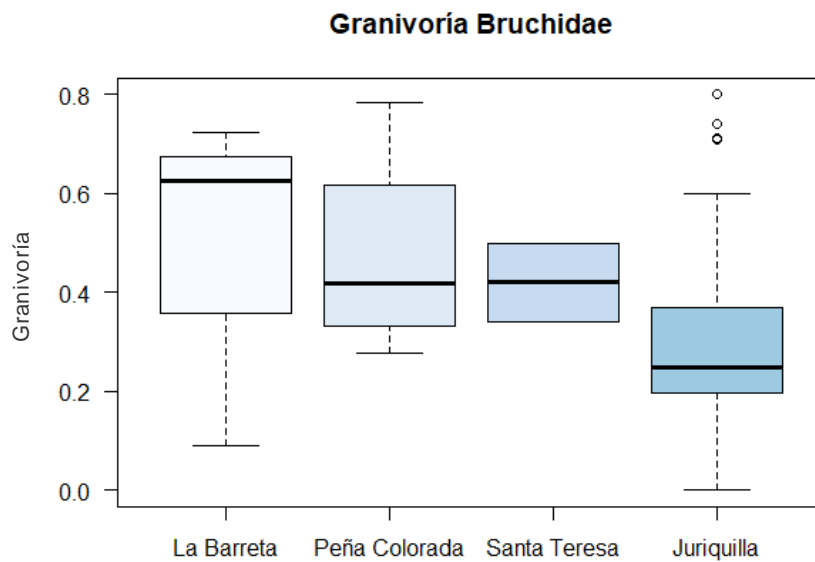


Figura 16 | Granivoría Bruchidae por sitio de muestreo. Analizando los grupos por el método no paramétrico de Kruskal-Wallis, se tiene $\chi^2 = 11.081$, $df = 3$, $p = 0.011$.

Siguiendo con el análisis del comportamiento de la herbivoría y la granivoría Bruchidae, posteriormente, se evalúa si existe alguna relación entre estos parámetros y el Orden de hongo (**Figura 17**). Para ello se utilizó el método de Wilcoxon para ambos casos. En el caso de la herbivoría (**Figura 17-A**), no se identificó una diferencia significativa entre los valores de herbivoría presentada en los árboles que contienen hongos Chaetothyriales y los que contienen Xylariales, por lo que no hay una disminución o aumento de herbivoría entre uno u otro Orden. En contraste, sí se detectó que existe una diferencia significativa en la granivoría por Brúquidos (**Figura 17-B**), siendo el Orden Chaetothyriales, el que tiene una menor granivoría por brúquidos en comparación con los valores presentados en el Orden Xylariales.

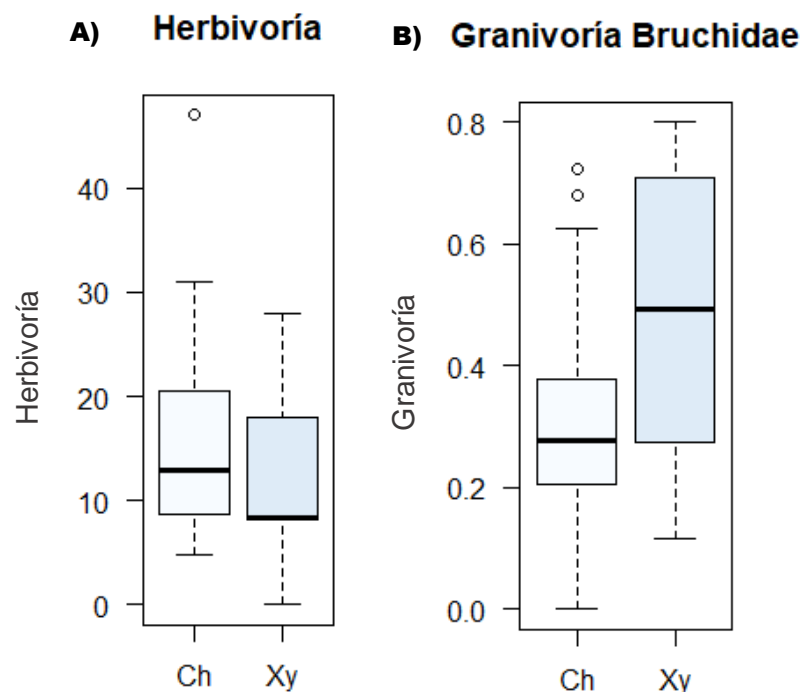


Figura 17 | Herbivoría (A) y granivoría Bruchidae (B) en función del Orden de hongo. Analizando los dos casos por el método de Wilcoxon, se tiene para **Herbivoría**: $W = 132.5$, $p = 0.375$; y para **Granivoría Bruchidae**: $W = 232$, $p = 0.009$.

Finalmente, para tener una referencia de las diferencias o bien, el comportamiento entre la granivoría Bruchidae de acuerdo con los años en las que se tomaron las muestras, se utilizó el análisis no paramétrico de Wilcoxon, teniendo como resultado que la granivoría

Bruchidae no se ve afectada con respecto al año en el que se recolectaron las muestras, al no encontrar una diferencia significativa en estos valores (**Figura 18**).

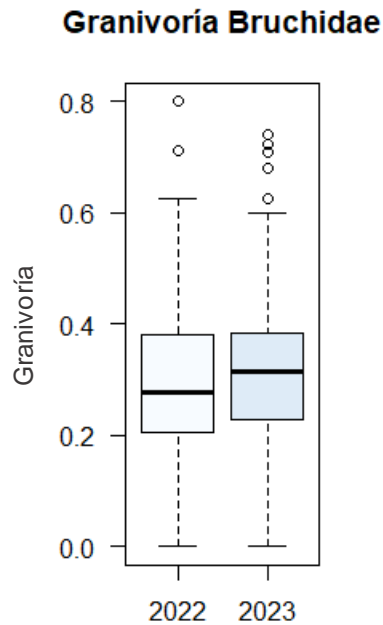


Figura 18| Granivoría Bruchidae en función del año de muestreo. Analizada por el método no paramétrico de Wilcoxon se tiene: $W = 382$, $p = 0.554$.

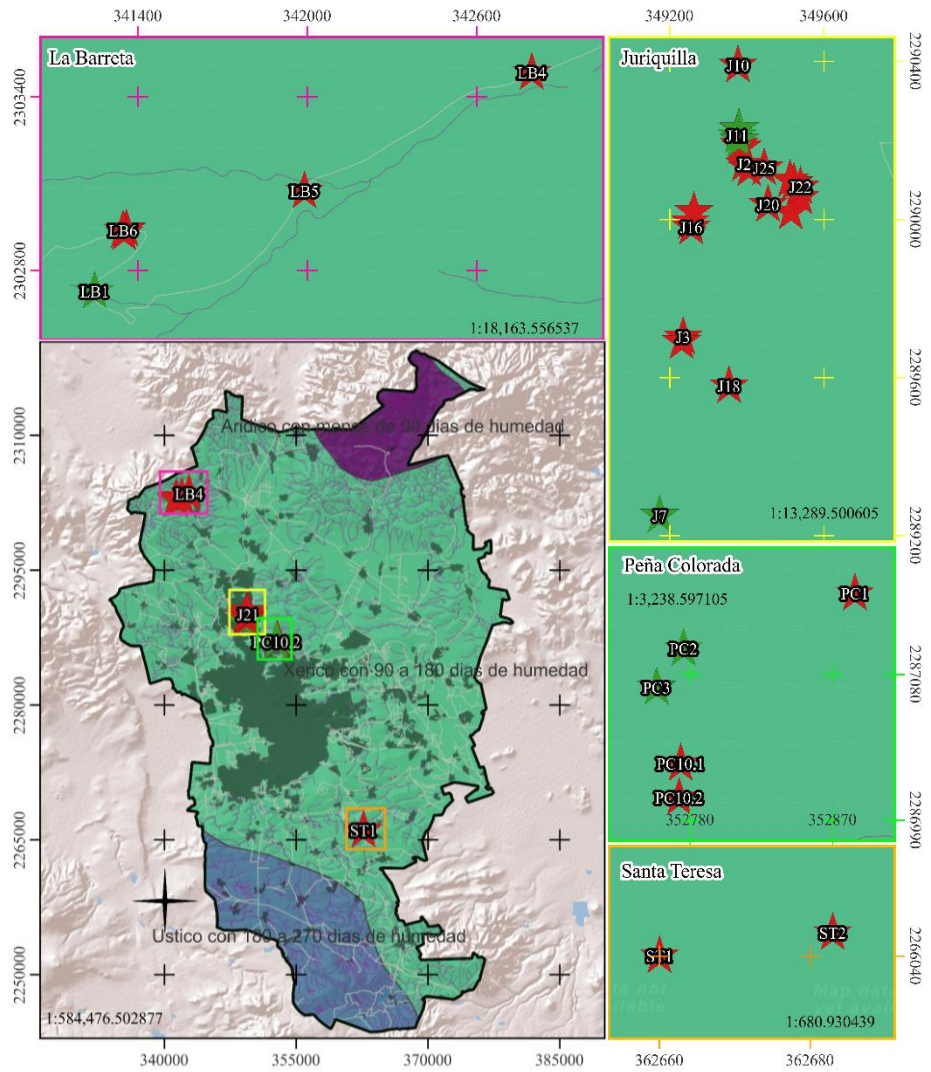
7.3 Análisis geoespacial

A continuación, se describen los mapas obtenidos a partir de QGIS, resultado del análisis geoespacial de los parámetros geográficos y ambientales seleccionados. Esto para identificar si alguno de ellos incide en la distribución geográfica de los hongos analizados en este trabajo. Para ello y como se mencionó en secciones anteriores, se delimitó un polígono de la zona de estudio, que está compuesto por los límites geográficos de los municipios de Querétaro, Corregidora y Huimilpan, abarcando una superficie aproximada de 1314.4 km² (Municipio de Querétaro, 2021). En cada mapa mostrado de la **Figura 19** a la **25**, se incluyen recuadros de acercamiento a las zonas de muestreo del *I. murucoides* en: La Barreta (recuadro color magenta), Juriquilla (recuadro color amarillo), Peña Colorada (recuadro color verde) y Santa Teresa (recuadro color anaranjado); con el fin de apreciar mejor los datos de muestreo.

La **Figura 19**, presenta los regímenes de humedad registrados en el polígono de la zona de estudio, los cuáles fueron obtenidos a partir de la clasificación de regímenes de humedad del suelo a nivel nacional, con escala 1:4,000,000 (Maples-Vermeersch, 1992). En el mapa se observa que todos los sitios en donde se muestrearon los hongos Chaetothyriales y Xylariales, se encuentran en la zona con régimen de humedad Xérico. Es decir, con un intervalo de humedad en el suelo que va de 90 a 180 días (de tres a seis meses). Además, en el mapa presentado en la **Figura 19**, también se observa que, dentro del polígono hay dos pequeñas zonas con regímenes de humedad Arídico (menos de 90 días de humedad) y Ústico (de 180 a 270 días de humedad), ubicadas en los extremos norte y sur de la zona de estudio, respectivamente. Desafortunadamente no se cuenta con muestras de *I. murucoides* en estas dos regiones, para que se pueda considerar que la humedad del suelo sea determinante para la distribución de los hongos, especialmente porque ambos se presentan en el *I. murucoides* dentro del mismo régimen de humedad.

La **Figura 20**, presenta el mapa de los tipos de suelos (edafología) presentes en el polígono de la zona de estudio. Los datos de este mapa fueron obtenidos a partir de la Carta Edafológica Querétaro escala 1:250,000 Serie II del Continuo Nacional (clave F14-10) edición 2007, elaborada por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2007). En el mapa se observa que los hongos se encuentran distribuidos de manera indistinta en suelos de tipo Vertisol, Leptosol y Phaeozem, sin ninguna preferencia de los Chaetothyriales o Xylariales por algún tipo de suelo en particular. Lo que nos hace suponer que este parámetro, tampoco es determinante para la distribución de los hongos.

Mapa de regímenes de humedad para la zona de estudio

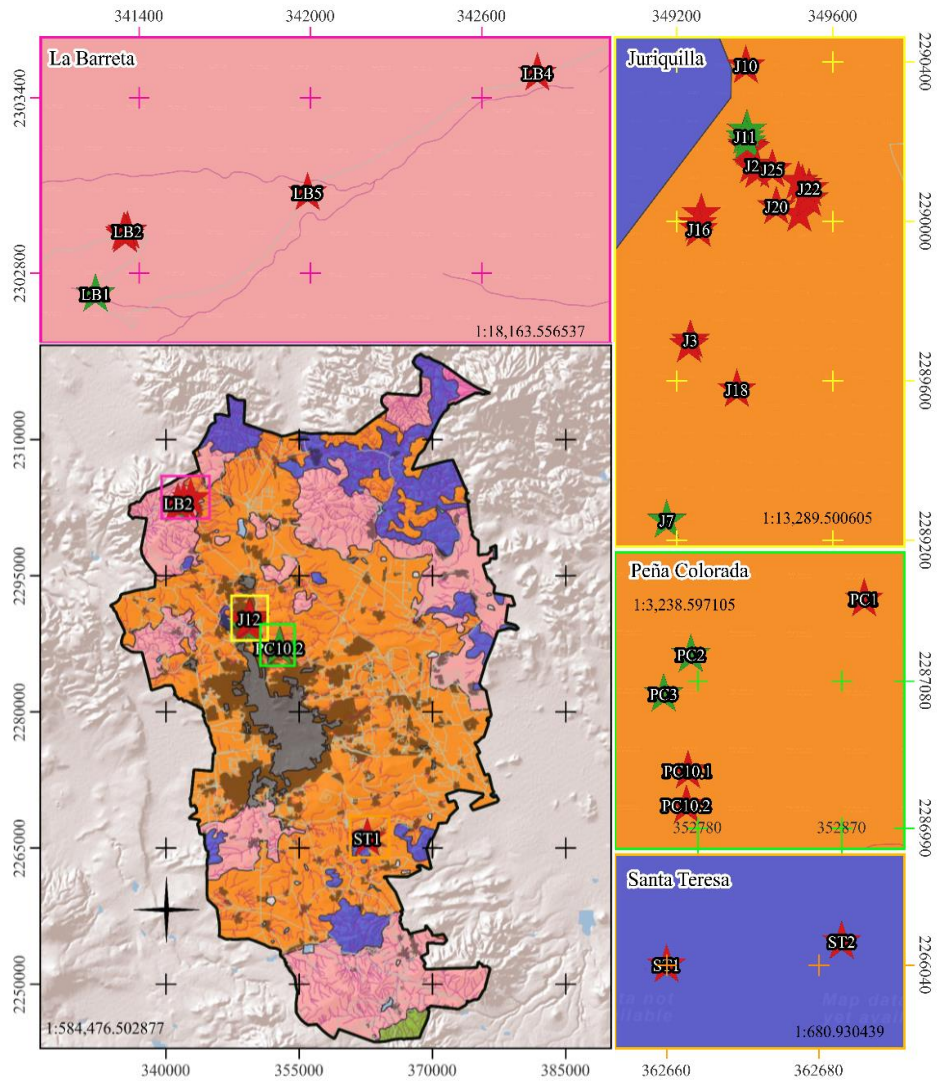


- | | |
|----------------------|--|
| Hongos | ■ Áreas urbanas |
| ★ Chactothyriales | Humedad |
| ★ Xylariales | ■ Árido con menos de 90 días de humedad. |
| — Carreteras | ■ Ústico con 180 a 270 días de humedad. |
| — Corrientes de agua | ■ Xérico con 90 a 180 días de humedad. |

Proyecto: Asociaciones simbióticas entre hongos epibióticos e *Ipomoea murucoides*.
 Elaborado por Susana Pineda Solís.
 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
 Escuela Nacional de Estudios Superiores Juriquilla (ENES J).

Figura 19 | Mapa de regímenes de humedad para la zona de estudio.

Mapa de los tipos de suelos presentes en la zona de estudio.



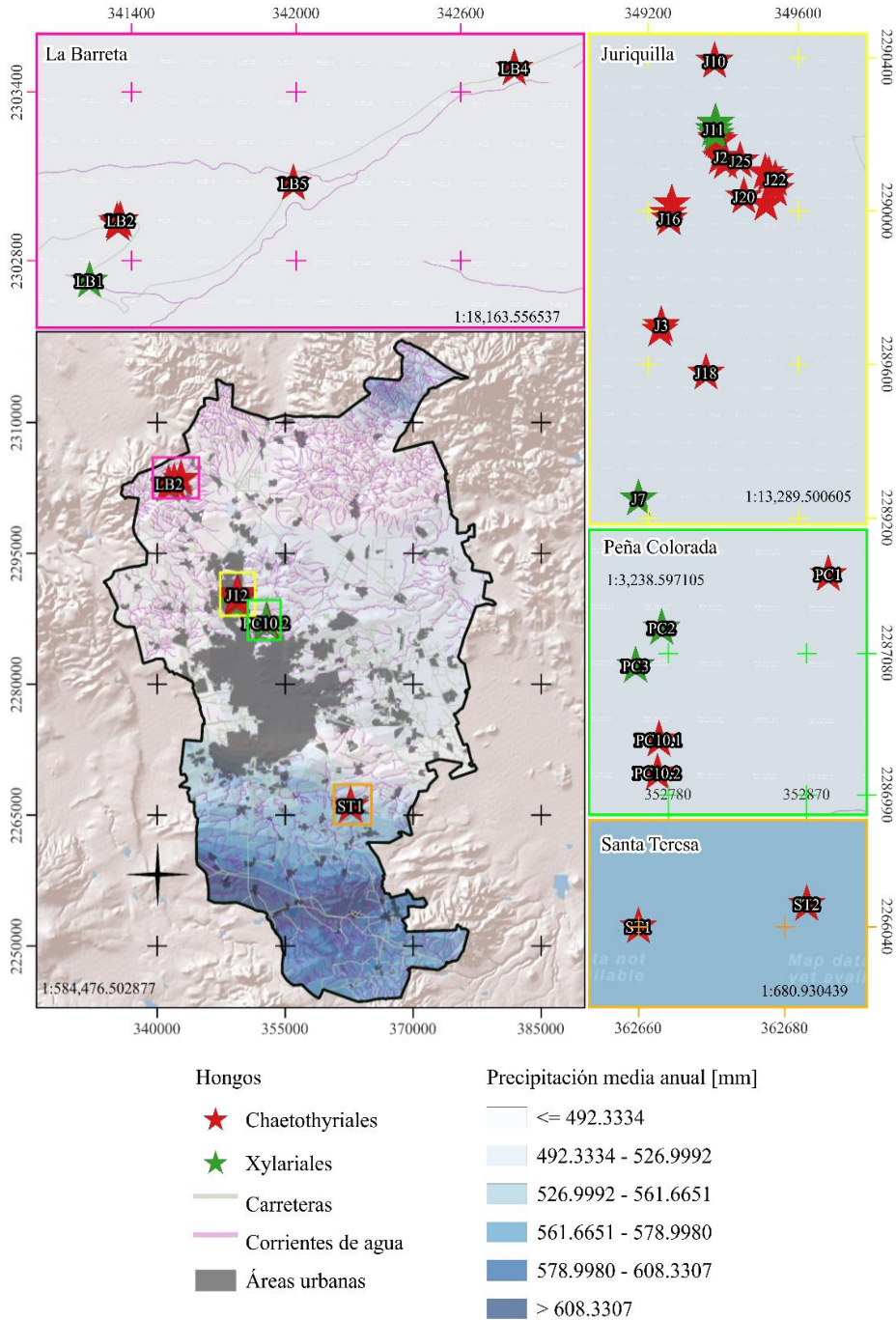
Proyecto: Asociaciones simbióticas entre hongos epibióticos e *Ipomoea murucoides*.
 Elaborado por Susana Pineda Solís.
 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
 Escuela Nacional de Estudios Superiores Juriquilla (ENES J).

Figura 20 | Mapa de los tipos de suelos presentes en la zona de estudio.

La **Figura 21**, presenta el mapa de la precipitación media anual distribuida por intervalos de lluvia en milímetros, dentro del polígono de la zona de estudio. Los datos de este mapa fueron obtenidos a partir de la Cartas de Efectos Climáticos Regionales (mayo-octubre) Querétaro, escala 1:250,000 del primer periodo del Continuo Nacional (clave F14-10) edición 1989, elaborada por el INEGI (INEGI, 1989). En donde observamos que el rango de precipitación en el que los hongos se desarrollan va desde 492.3 mm hasta 561.6 mm, denotando que, en los extremos norte y sur, se tienen rangos desde 561.7 hasta > 608.3 mm. Sin embargo, como se había mencionado anteriormente, no se recolectaron ejemplares de *I. murucoides* en estas áreas, por lo que tampoco podemos determinar si la precipitación es un factor determinante para el desarrollo de los hongos en *I. murucoides*.

La **Figura 22**, muestra el mapa de temperaturas mínimas promedio del área de interés (en °C). Los datos para este mapa fueron tomados de la Cartas de Efectos Climáticos Regionales (mayo-octubre) Querétaro, escala 1:250,000 del primer periodo del Continuo Nacional (clave F14-10) edición 1989, elaborada por el INEGI (INEGI, 1989). Se observa que, para este mapa, las temperaturas en las que se distribuyen los especímenes de *I. murucoides* que se recolectaron, rondan entre los 9°C y 12°C. Aunque, también hay zonas en las que se observan temperaturas incluso menores a los 8°C, nuevamente en las partes más extremas del mapa (hacia el norte y sur de la zona de estudio), en donde no se tienen datos de *I. murucoides*. Por lo tanto, tampoco se puede definir a este parámetro como un factor definitivo para la distribución geográfica de los hongos.

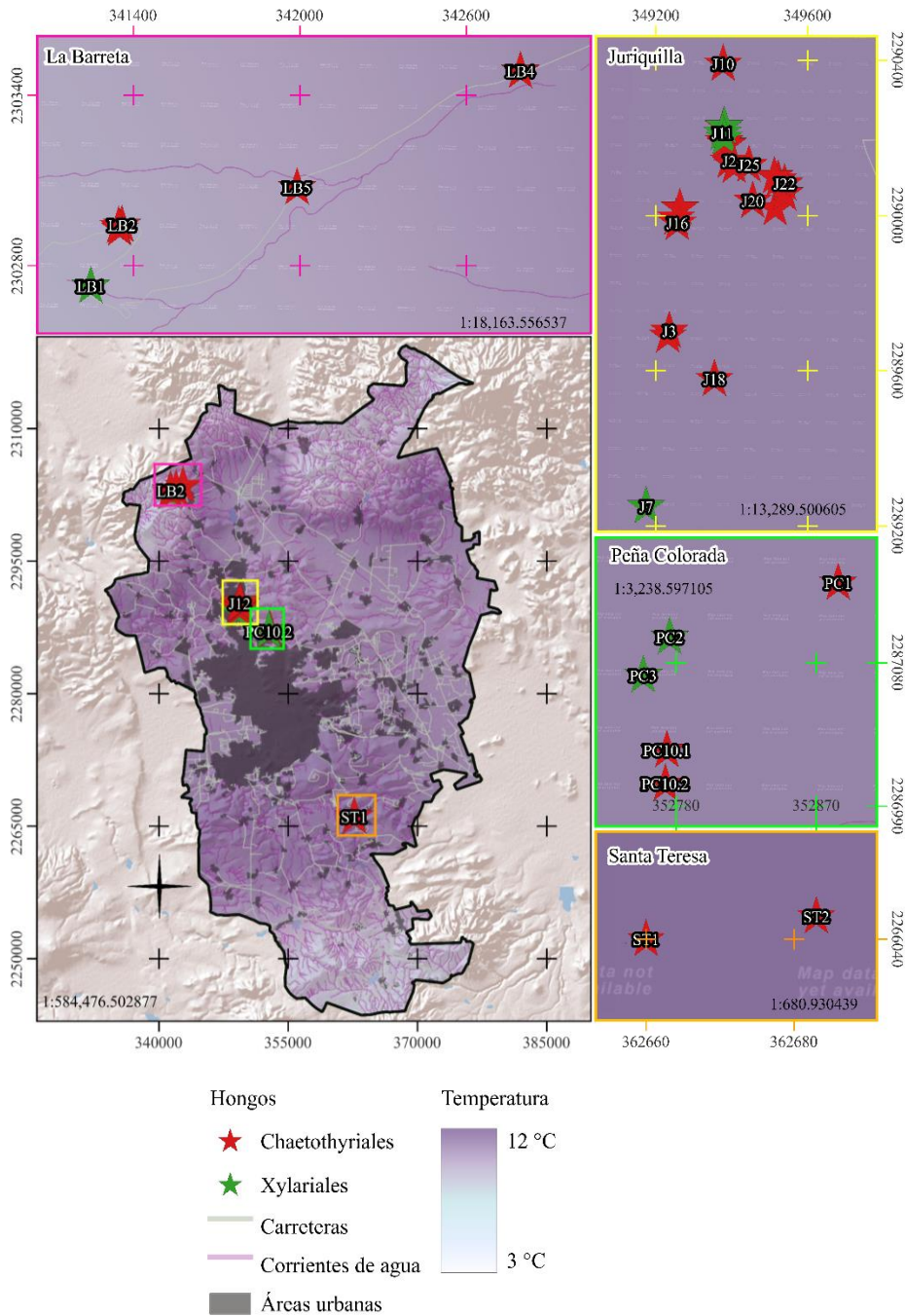
Mapa de precipitación media anual en la zona de estudio.



Proyecto: Asociaciones simbióticas entre hongos epibióticos e *Ipomoea murucoides*.
 Elaborado por Susana Pineda Solís.
 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
 Escuela Nacional de Estudios Superiores Juriquilla (ENES J).

Figura 21 | Mapa de precipitación media anual distribuida por rangos de lluvia en milímetros dentro de la zona de estudio.

Mapa de temperaturas mínimas promedio para la zona de estudio



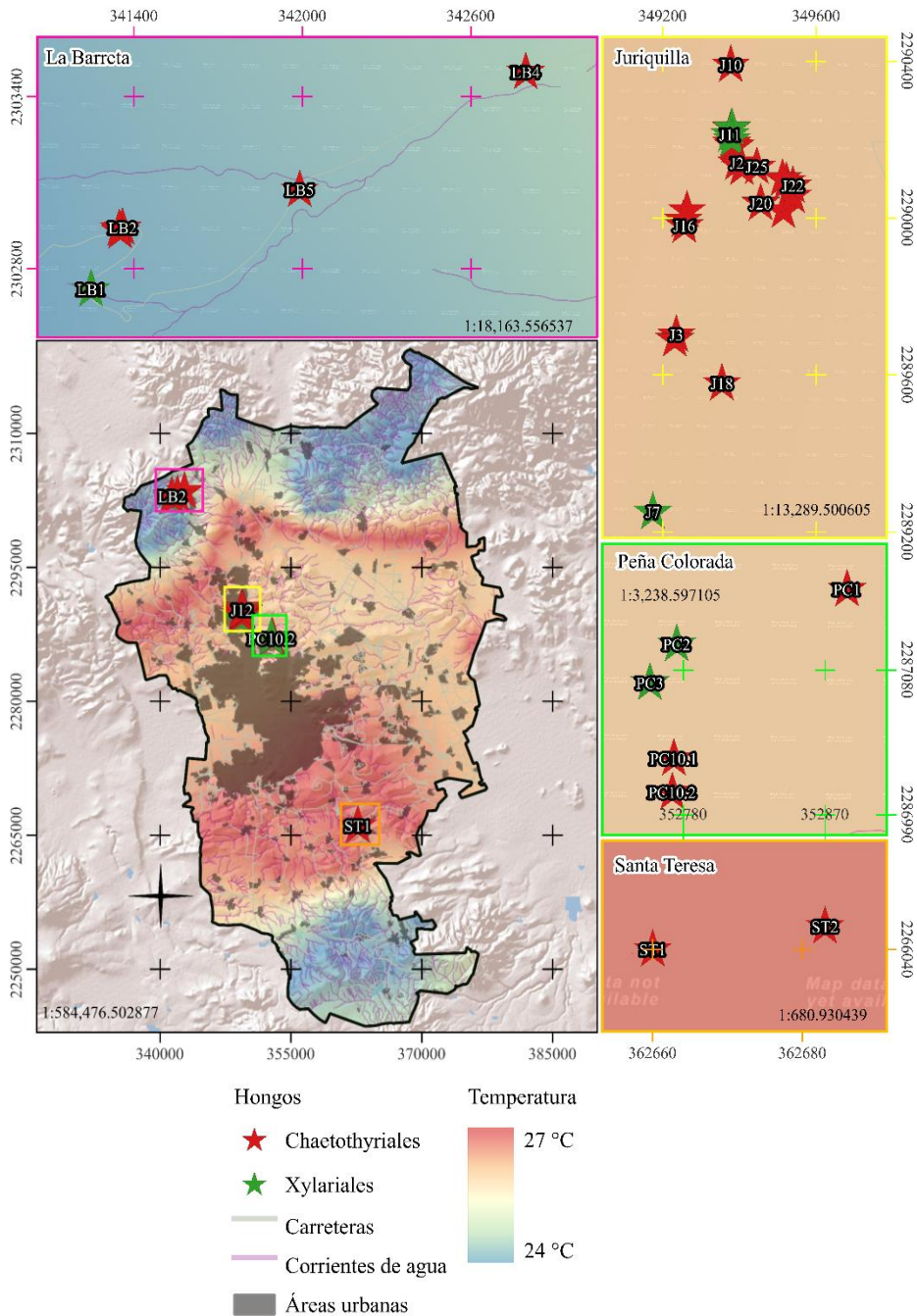
Proyecto: Asociaciones simbióticas entre hongos epibioticos e *Ipomoea murucoides*.
 Elaborado por Susana Pineda Solís.
 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
 Escuela Nacional de Estudios Superiores Juriquilla (ENES J).

Figura 22 | Mapa de temperaturas mínimas promedio (en °C), para la zona de estudio.

La **Figura 23**, corresponde al mapa de temperaturas máximas promedio (en °C) presentes en el área de interés. Los datos para este mapa también fueron recuperados de la Cartas de Efectos Climáticos Regionales (mayo-octubre) Querétaro, escala 1:250,000 del primer periodo del Continuo Nacional (clave F14-10) edición 1989, elaborada por el INEGI (INEGI, 1989), tal como en el caso de los datos presentados en las **Figuras 21 y 22**. Se observa que el rango de temperaturas en el que se tomaron las muestras del *I. murucoides* varía desde los 24°C hasta los 27°C, sin que alguno de los Órdenes de los hongos se presenten preferentemente en algún rango de temperatura en particular. Esto sugiere que su distribución, tampoco está asociada a regímenes de temperaturas altas.

La **Figura 24**, correspondiente al mapa de elevaciones o topografía, representado por intervalos hipsográficos que van desde ~2000 hasta ~3000 m. s. n. m., fue integrado a partir de los datos obtenidos del modelo digital de elevaciones (DEM) ALOS PALSAR , los cuales tienen una resolución de píxel 12.5 m (ASF, 2010). Se observa que los sitios en donde se muestreó *I. murucoides*, se distribuyen en los rangos que van desde ≤ 2039 m s. n. m., hasta los 2535 m. s. n. m. Y que, de hecho, los dos Órdenes de hongos se distribuyen aleatoriamente sobre todo este intervalo de elevación. Esta situación permite suponer que la variabilidad topográfica del terreno tampoco es un factor indispensable para la distribución de los hongos aquí analizados.

Mapa de temperaturas máximas promedio en la zona de estudio



Proyecto: Asociaciones simbióticas entre hongos epibióticos e *Ipomoea murucoides*.

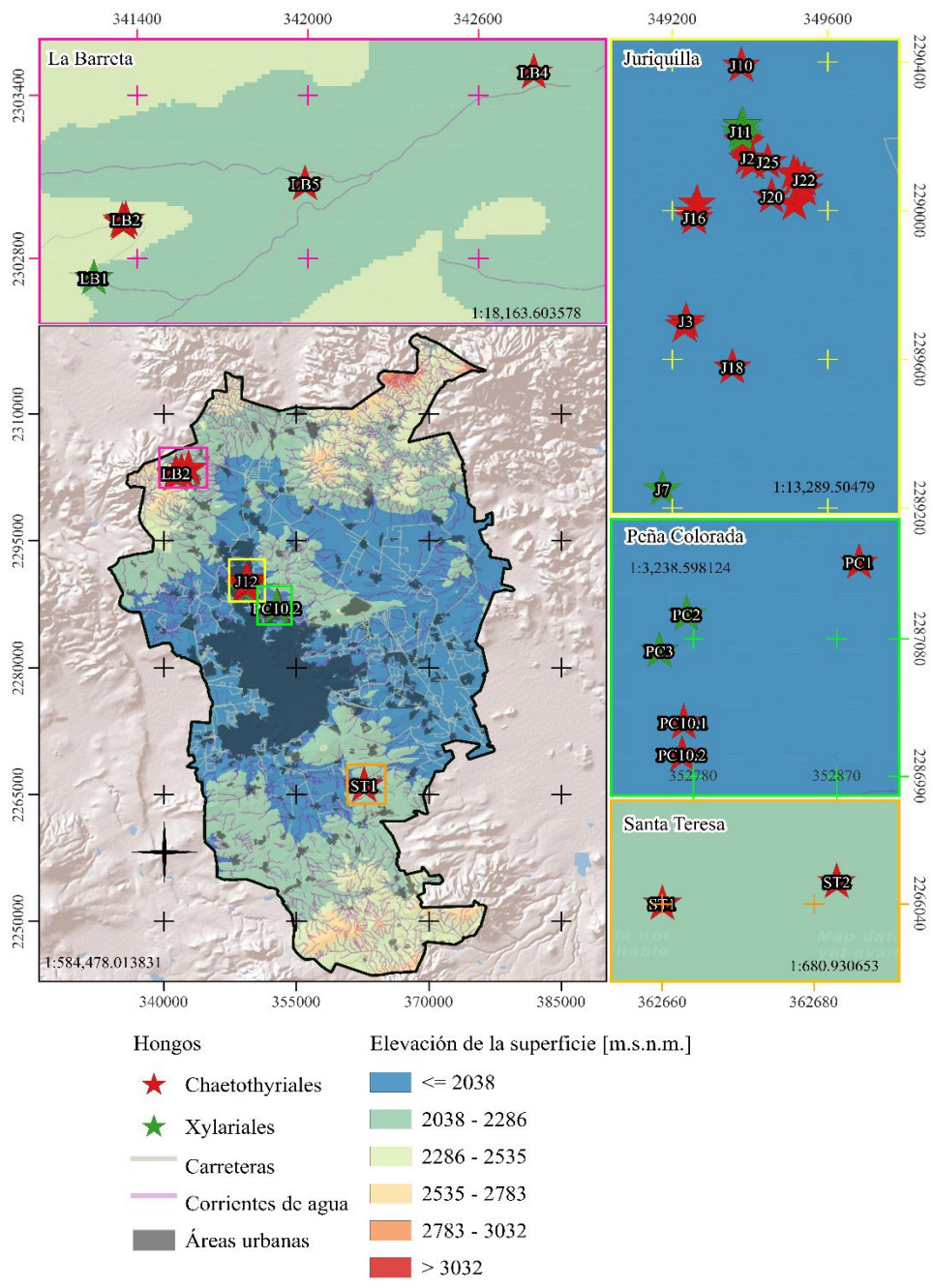
Elaborado por Susana Pineda Solís.

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Escuela Nacional de Estudios Superiores Juriquilla (ENESJ).

Figura 23 | Mapa de temperaturas máximas promedio (en °C), presentes en la zona de estudio.

Mapa hipsográfico de la zona de estudio



Proyecto: Asociaciones simbióticas entre hongos epibióticos e *Ipomoea murucoides*.
 Elaborado por Susana Pineda Solís.
 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
 Escuela Nacional de Estudios Superiores Juriquilla (ENES J).

Figura 24 | Mapa hipsográfico de la zona de estudio.

Para finalizar este estudio, se presenta la **Tabla 9** con los valores ponderados de los factores geográficos y medioambientales analizados por medio de la matriz de Saaty. Estos valores (coeficientes de ponderación) fueron utilizados en el AMC espacial con el que se obtuvo el mapa de la **Figura 25**, a partir de la fórmula **7.3.1**.

$$AMC = (Humedad * 0.0264173) + (Edafología * 0.0492879) + (Hongo * 0.37005707)(Precipitación * 0.0840442) + (T min * 0.1126751) + (T máx * 0.1521412) + (Hipsografía * 0.2048636) \quad (7.3.1)$$

De los valores presentes en la **Tabla 9**, resalta la importancia del parámetro “Hongo”, ya que son las zonas en las que se cuenta con la existencia de estos Hongos, ya que deberían guiar la búsqueda de las zonas aptas para su crecimiento, por lo que se les otorga un mayor valor de ponderación con respecto a los demás factores considerados. Mientras que el parámetro “Humedad”, es el de menor coeficiente de ponderación, debido a que el hongo obtiene sus recursos de su hospedero.

Tabla 9 | Valores ponderados de los factores geográficos y medioambientales analizados por medio de la matriz de Saaty.

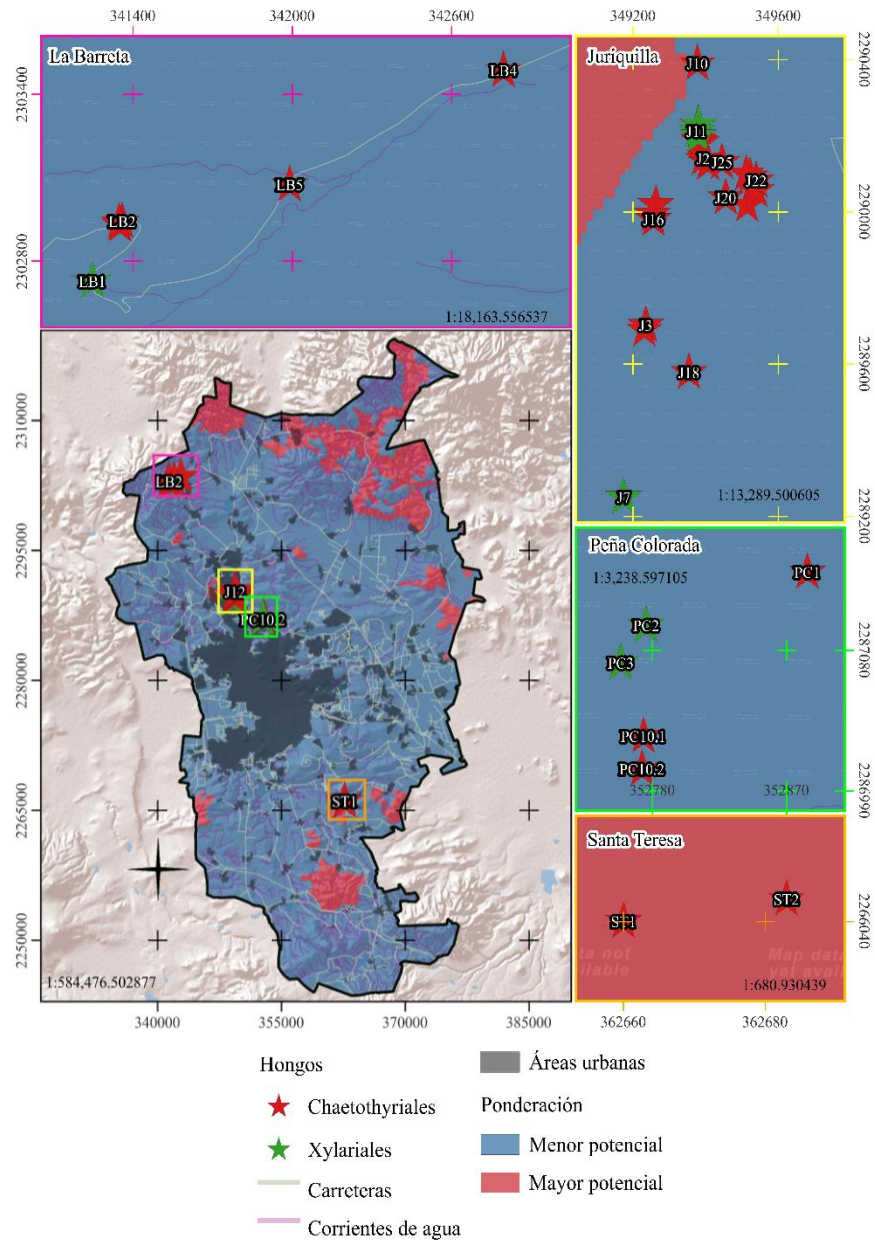
Parámetros	Humedad	Edafología	Hongo	Precipitación	T min	T max	Hipsografía	Coefficientes de ponderación
Humedad	1	1/5	1/7	1/5	1/4	1/4	1/7	0.0264173
Edafología	5	1	1/7	1/5	1/6	1/6	1/4	0.0492879
Hongo	7	7	1	7	6	6	7	0.37005707
Precipitación	5	5	1/7	1	1/3	1/3	1/2	0.0840442
T min	4	6	1/6	3	1	¼	1/5	0.1126751
T max	4	6	1/6	3	4	1	1/5	0.1521412
Hipsografía	7	4	1/7	2	5	5	1	0.2048636

En el mapa de la **Figura 25**, se representa con una escala de colores, las zonas con mayor (rojo) y menor potencial (azul) para el crecimiento de los hongos estudiados en el *I. murucoides*, de acuerdo con la ponderación lineal de los parámetros listados en la **Tabla 9**. Este zoneamiento, se interpreta de forma que, aquellas zonas en color rojo, consideradas con un “mayor potencial” para el desarrollo de los hongos presentes en el *I. murucoides*, integran aquellas regiones que, de acuerdo a la ponderación lineal de los diferentes parámetros geográficos y medioambientales analizados, contienen valores altos de

ponderación, con respecto a los demás, que, al ser sumados durante el álgebra de mapas desde QGIS, arrojan valores de píxel cercanos o igual a 1; mientras que las regiones con “potencial menor”, contienen valores de ponderación baja, y al ser sumados, arrojan por su parte, valores de píxel cercanos o igual a 0. En este sentido, las zonas en colores rojos indicarían aquellos píxeles que reunirían la mayor cantidad de características geográficas y medioambientales con mejor ponderación para el desarrollo de los hongos estudiados, y en colores azules, los píxeles que reúnen las características con más baja ponderación para el desarrollo de los hongos.

Sin embargo, de acuerdo con esta zonificación y la ubicación de los sitios en donde se muestreó el *I. murucoides*, se observa claramente que esta especie y sus hongos, se distribuye tanto en las zonas con menor, como con mayor potencial, de acuerdo con el AMC.

Mapa de zonas con potencial para el crecimiento de los hongos de interés para la zona de estudio



Proyecto: Asociaciones simbióticas entre hongos epibióticos e *Ipomoea murucoides*.
 Elaborado por Susana Pineda Solís.
 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
 Escuela Nacional de Estudios Superiores Juriquilla (ENES J).

Figura 25 | Mapa de zonas con potencial para el crecimiento de los hongos de interés para la zona de estudio, de acuerdo con la ponderación de AMC.

Por otro lado, si analizamos la distribución de los hongos dentro de este zoneamiento, se observa que, el Orden Xylariales se presenta en las zonas con “menor potencial”; mientras que el Orden Chaetothyriales, se distribuye de manera indistinta, tanto en las zonas con mayor, como con menor potencial, de acuerdo con el AMC. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el número de individuos de cada Orden entre cada sitio muestreado no es equivalente; y, por lo tanto, su distribución entre las zonas con mayor o menor potencial para su crecimiento, de acuerdo con el zoneamiento del AMC, puede no ser del todo representativo, indicando un alto nivel de incertidumbre para este tipo de análisis, debido a la baja cantidad de sitios muestreados.

No obstante, los resultados arrojados con el análisis del AMC, indican regiones en las que sería viable buscar a futuro, la especie del *I. murucoides*; a fin de verificar primero, la existencia de estas plantas, y en segundo, la de los hongos. Así como también, es deseable, hacer un mayor muestreo de número de individuos de los hongos Xylariales, no sólo en los sitios ya muestreados, sino en otros sitios distribuidos en la zonificación de “menor potencial”, para verificar si este Orden, en realidad tiene relación con esta zonificación o no. Y de ser así, buscar otros parámetros o factores que, dentro de esta zona, estén incidiendo en su distribución.

Por otro lado, también convendría obtener un mismo número de individuos de ambos hongos en cada uno de los sitios muestreados, con el fin de verificar si la distribución de éstos, realmente está sujeta a la variabilidad geográfica de los sitios analizados o no; ya que, considerando los resultados del mapa de la **Figura 25**, pareciera que el sitio con mayor potencial para hospedar a los hongos, de acuerdo con la ponderación del AMC, es Santa Teresa, seguido por el sitio de Juriquilla y con mucho menor potencial, los sitios de La Barreta y Peña Colorada; particularmente para el Orden Xylariales. Sin embargo, como ya se puntualizó previamente, las observaciones e interpretaciones obtenidas por medio de este análisis geoespacial, se deben tomar con precaución.

8. Discusión y conclusiones

Gracias a los resultados del análisis filogenético para los hongos, podemos afirmar que el Orden donde se agruparon las secuencias de los genes, fue el mismo para los tres (18S, ITS y 28S). De hecho, se logró corroborar que, efectivamente *I. muruoides* presenta asociaciones simbióticas con dos tipos diferentes de hongos en los Órdenes Chaetothyriales y Xylariales. Siendo el Orden Chaetothyriales el mayormente representado en los sitios muestreados para este estudio.

Los resultados aquí obtenidos, plantean un cierto problema con respecto a la suposición de que estos hongos se transmiten verticalmente, ya que aún no se tiene certeza de cómo se da el proceso por el cual algunos individuos forman asociaciones con el Orden Chaetothyriales y otros con el Orden Xylariales, ya que si los hongos se transmitieran únicamente de forma vertical, solo deberían de existir asociaciones con el Orden Chaetothyriales o con el Orden Xylariales; pero, de acuerdo con los resultados obtenidos y observados en los árboles filogenéticos, suponemos que estos Órdenes, también se transmiten de forma horizontal. Esto sugiere la posibilidad de que existan ambos casos: a) la transmisión vertical a través de la semilla, que ocurre en la mayoría de los casos; b) la posibilidad de remplazo del simbionte, esto a través de una transmisión horizontal. Este último es uno de los aspectos que deben ser estudiados con mayor profundidad en futuras investigaciones.

Otra cuestión, que se observó con los análisis realizados, es el hecho de que ambos Órdenes de hongos contienen los genes necesarios para sintetizar swainsonina (Cook *et al.*, 2017), lo cual podría indicar que la producción de swainsonina, es un requisito para poder colonizar a la planta; sin embargo, se desconoce de algún mecanismo por el cual esto podría ocurrir. Además, si consideramos que *I. muruoides* pierde sus hojas durante la época seca, se refuerza la idea de que estos hongos colonizan a los árboles sistémicamente, y se manifiestan año con año en las hojas nuevas, ya que se presentan pequeñas distancias entre las secuencias provenientes del mismo árbol en diferentes años (ej. PC3_2021 y PC3_2022 en árbol filogenético concatenado en la **Figura 10**); justificando estas distancias con la variación genética intragenómica, ya que los hongos pueden tener varias copias del ITS (Álvarez & Wendel, 2003).

Por otro lado, en cuanto a los análisis de los factores que afectan la concentración de la swainsonina en tejidos de semillas y hojas, tenemos que, tanto en semillas como en hojas, la concentración de swainsonina se ve afectada por el Orden de hongo presente en el hospedero, teniendo mayor concentración en Chaetothyriales que en Xylariales. Asimismo, cuando se realizó la comparación

de concentración de swainsonina en función del tejido para cada Orden, se obtuvo que en el Orden Chaetothyriales se tiene mayor concentración en semillas y una menor concentración en hojas, mientras que en el Orden Xylariales, tanto en hojas como en semillas no tienen diferencia de concentración de swainsonina.

En cuanto a la herbivoría, se observó que ésta no se ve afectada ni por el sitio en el que se muestreó *I. murucoides*, ni por el Orden de hongo; así como tampoco, disminuye su valor, aun cuando las hojas tienen swainsonina. Esto último, podría deberse a la baja concentración que contienen. Sin embargo, para el caso de la granivoría Bruchidae, sus valores sí se ven afectados por el sitio de muestreo y el Orden de hongo presente en el hospedero; teniendo una mayor granivoría en el sitio de La Barreta, seguida de Peña Colorada, Santa Teresa y en menor cantidad Juriquilla; por otro lado, se tiene una mayor granivoría Bruchidae en el Orden Xylariales, y menor en el Orden Chaetothyriales.

Por lo que, a pesar de que no se encontró una relación entre el sitio de muestreo y la concentración de swainsonina en semillas y hojas para ninguno de los dos Órdenes analizados, sí se observa que existe una relación entre una mayor concentración de alcaloides en semillas, y una disminución de la granivoría Bruchidae. Esto se observa en el sitio de Juriquilla, en donde existe una mayor concentración de swainsonina en semillas y una menor granivoría Bruchidae, seguido del sitio de La Barreta y finalmente Peña Colorada. Por el contrario, esto no sucede con el grado de herbivoría de hojas, ya que, a una mayor concentración de swainsonina en hojas, no se tiene una menor herbivoría. Por lo que, el tener una mayor concentración de swainsonina en hojas no implicará una protección para el árbol hacia sus depredadores foliares. Mientras que, el tener una mayor concentración de swainsonina en semillas, sí implica una disminución en la granivoría Bruchidae.

Con estos resultados es de esperar que, la granivoría Bruchidae sea menor en el Orden Chaetothyrial que en el Orden Xylariales, por lo tanto, se puede concluir que la identidad del hongo sí está relacionada con la concentración de swainsonina, y ésta a su vez, se relaciona con el nivel de granivoría. En otras palabras, si tenemos un hongo del Orden Chaetothyrial, tendremos una mayor concentración de swainsonina en semillas y por ende una menor granivoría Bruchidae.

Otra conclusión a la que podemos llegar, es que los hongos epibióticos de *I. murucoides* le otorgan una protección indirecta, ya que la swainsonina actúa como una defensa química, consecuencia de la simbiosis defensiva (Clay, 2014), en donde los 3 personajes necesarios sí están presentes y son:

I. murucoides (hospedero), hongo del Orden Chaetothyriales o Xylarial (huésped) y los brúquidos (depredadores). Por lo que, de esta manera, se tiene identificada la relación ecológica entre *I. murucoides* y su huésped.

Ahora bien, también es importante clasificar a los hongos endófitos de *I. murucoides*, por lo que, de acuerdo con las observaciones anteriores, así como los datos de la **Tabla 1**, se puede clasificar a estos hongos como no Clavicipitáceos de la clase 1, sin poder inclinarse a algún tipo de transmisión. Esto a pesar de que actualmente se postula que los hongos del Orden Chaetothyriales son heredados a través de la semilla (transferencia vertical) (Quach *et al.*, 2022; Rodríguez *et al.*, 2009). Sin embargo, no podemos mantener esta afirmación ya que, el hecho de que algunos árboles presenten hongos del Orden Chaetothyriales y otros del Orden Xylariales, hace sospechar que también puede darse una transferencia horizontal.

De hecho, el análisis geoespacial confirmó que los dos Órdenes de hongos crecen a pesar de existir una gran variabilidad en los factores geográficos y medioambientales considerados; ya que no se observó alguna distribución particular de alguno de ellos, con respecto a alguno de los parámetros analizados geoespacialmente. No obstante, estas primeras conclusiones respecto a la distribución geográfica de los hongos, se debe de tomar con cierta reserva, ya que el número de sitios de muestreo es pequeño en comparación con la superficie delimitada como zona de estudio. Además, el número de individuos muestreado en cada una de las localidades estudiadas no fue el mismo, y tampoco, el número de individuos muestreado de cada uno de los Órdenes. Estas particularidades, aportan una gran incertidumbre a los resultados obtenidos con el análisis geoespacial; así como el hecho de que la escala espacial de los conjuntos de datos utilizados (i.e., 1:250,000) y la antigüedad de algunos de ellos, podrían no estar representando las características ambientales y climáticas actuales de la zona de estudio, lo que, a su vez, estaría causando una interpretación geográfica errónea de la relación geoespacial de los hongos con los factores analizados.

No obstante, a pesar de estas limitaciones, las evidencias arrojadas por los mapas obtenidos, así como el resultado del análisis multicriterio, permitieron identificar zonas que podrían evaluarse en el futuro, con el fin de comprobar que efectivamente se encuentren especímenes de *I. murucoides* y que éstas contengan los Órdenes de hongo estudiados aquí.

Gracias a los análisis realizados en este trabajo de tesis, se logró identificar los Órdenes de los hongos simbiotes de *I. murucoides* y cuantificar su concentración de swainsonina. Llegando a la

conclusión de que, las altas concentraciones de swainsonina en semillas, otorgadas por el hongo del Orden Chaetothyrial, hacen de *Ipomoea murucoides*, una fuente importante de swainsonina. Además, de que las condiciones geográficas y ambientales analizadas no parecen beneficiar el desarrollo de estos hongos, por lo que es importante replantear un muestreo más robusto y geográficamente distribuido, si se quiere seguir utilizando la metodología del análisis geoespacial de especies epibióticas en un futuro.

9. Anexo A

Tabla I | Secuencias con sus respectivos genes. Se muestra en que orden se encuentra cada una de las secuencias, Xylariales (verde) y Chaetothyriales (rojo).

18S	ITS	28S	Concatenado
• LB6_2022	-----	• LB6_2022	• LB6_2022
• LB5_2022	-----	• LB5_2022	• LB5_2022
• LB4_2022	-----	• LB4_2022	• LB4_2022
• JBC1_2022	• JBC1_2022	• JBC1_2022	• JBC1_2022
• J4B_2022	-----	-----	• J4B_2022
• LB3_2021	-----	• LB3_2021	• LB3_2021
• LB3_2022	• LB3_2022	• LB3_2022	• LB3_2022
• PG1_2022	-----	-----	• PG1_2022
• PC1_2022	-----	-----	• PC1_2022
• ST1_2021	• ST1_2021	• ST1_2021	• ST1_2021
• ST3_2021	• ST3_2021	-----	• ST3_2021
• PC1_2021	• PC1_2021	• PC1_2021	• PC1_2021
• J2_2022	-----	• J2_2022	• J2_2022
• J2_2021	-----	-----	• J2_2021
• J1_2021	-----	• J1_2021	• J1_2021
• ZA2_2022	• ZA2_2022	• ZA2_2022	• ZA2_2022
• LB1_2021	• LB1_2021	• LB1_2021	• LB1_2021
• ST2_2021	• ST2_2021	-----	• ST2_2021
• PC3_2021	• PC3_2021	• PC3_2021	• PC3_2021
• J3_2021	• J3_2021	• J3_2021	• J3_2021
• PC2_2022	-----	• PC2_2022	• PC2_2022
• PC3_2022	-----	-----	• PC3_2022
• PC2_2021	-----	• PC2_2021	• PC2_2021
-----	• ZA_1_2022	-----	• ZA2_1_2022
-----	• JBC2_2022	-----	• JBC2_2022
-----	• JBC2_2021	-----	• JBC2_2021
-----	-----	• J4A_2022	• J4A_2022
-----	-----	• LB1_2022	• LB1_2022

Tabla II | Herbivoría y granivoría por sitios de muestreo.

Herbivoría por sitios de muestreo						
Locación	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks			Kruskal.test
			W	p-value	Distribución	
La Barreta	9.1	8	0.85621	0.1766	No normal	Kruskal-Wallis chi-squared = 7.0358, df = 3, p-value = 0.07077
Peña Colorada	13.4	10.4	0.78072	0.0559	No normal	
Santa Teresa	11.1	11	0.98235	0.9626	Normal	
Juriquilla	17.5	16	0.94021	0.1497	Normal	
Granivoría Bruchidae por sitios de muestreo						
Locación	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks			Kruskal.test
			W	p-value	Distribución	
La Barreta	0.516	0.625	0.76218	0.04988	No normal	Kruskal-Wallis chi-squared = 11.081, df = 3, p-value = 0.0113
Peña Colorada	0.468	0.417	0.89843	0.2105	Normal	
Santa Teresa	0.42	0.42	0.75	< 2.2e-16	No normal	

Locación	Mean	Median	W	p-value	Distribución	Wilcoxon	
Juriquilla	0.3	0.25	0.89769	0.0006082	No normal	Kruskal-Wallis chi-squared = 10.02, df = 3, p-value = 0.01839	
Granivoría por sitios de muestreo							
Locación	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks				Wilcoxon
			W	p-value	Distribución		
La Barreta	0.531	0.625	0.77601	0.0657	Normal		
Peña Colorada	0.48	0.417	0.89919	0.2146	Normal		
Santa Teresa	0.42	0.41	0.75	< 2.2e-16	No normal		
Juriquilla	0.325	0.283	0.93315	0.009886	No normal		

Tabla III | Herbivoría y granivoría Bruchidae por Orden de hongos.

Herbivoría por orden						
Hongo	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks			Wilcoxon
			W	p-value	Distribución	
Ch	15.7	13	0.86568	0.0007685	No normal	W = 132.5, p-value = 0.3752 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
Xy	12.7	8.4	0.86654	0.1731	Normal	
Granivoría Bruchidae por Orden de hongo						
Hongo	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks			Wilcoxon
			W	p-value	Distribución	
Ch	0.293	0.278	0.94633	0.03693	No normal	W = 232, p-value = 0.008667 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
Xy	0.473	0.494	0.9256	0.1624	Normal	
Xy	0.485	0.494	0.94251	0.3197	Normal	

Tabla IV | Granivoría Bruchidae por año de muestreo.

Año	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks			Wilcoxon
			W	p-value	Distribución	
2022	0.31	0.278	0.92906	0.04636	No normal	W = 382, p-value = 0.5545 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
2023	0.347	0.314	0.91393	0.02146	No normal	

Tabla V | Concentración de swainsonina en función de los sitios de muestreo.

Locación	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks			Kruskal-Wallis
			W	p-value	Distribución	
Peña Colorada	72.6428895	0	0.55255	0.0001327	No Normal	Kruskal-Wallis chi-squared = 4.2959, df = 2, p-value = 0.1167
La Barreta	10.8187355	10.8187355	-----	-----	-----	
Juriquilla	137.000495	135.070179	0.95821	0.7653	Normal	

Tabla VI | Concentración de swainsonina en semillas por Orden de hongo.

Hongo	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks			Wilcoxon
			W	p-value	Distribución	
Xy	56.7	36.6	0.80613	0.03328	No normal	W = 52, p-value = 0.03998 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
Ch	161.3	141.2	0.95024	0.7136	Normal	
Ch	37.3	3.48	0.75485	0.009241	No normal	

Tabla VII | Concentración de swainsonina en hojas de acuerdo con el sitio de muestreo.

Locación	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks			Kruskal-Wallis
			W	p-value	Distribución	
Peña Colorada	1.46	0	0.75	< 2.2e-16	No normal	Kruskal-Wallis chi-squared = 3.3981, df = 3, p-value = 0.3342
Santa Teresa	0.24	0.24	----	-----	-----	
Juriquilla	3.85	0.77	0.77725	0.02422	No normal	
La Barreta	5.75	5.05	0.94525	0.6866	Normal	

Tabla VIII | Concentración de swainsonina en hojas según el Orden de hongo.

Hongo	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks			Wilcoxon
			W	p-value	Distribución	
Xy	2.37	0.306	0.54442	9.232e-05	No normal	W = 55, p-value = 0.08252 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
Ch	52.75	7.449	0.51184	2.163e-05	Normal	

Tabla IX | Swainsonina en hojas y semillas para Chaetothyriales.

Material	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks			Wilcoxon
			W	p-value	Distribución	
Hoja	52.8	7.45	0.51184	2.163e-05	No normal	W = 18, p-value = 0.02013 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
Semilla	161.3	141.24	0.95024	0.7136	Normal	

Tabla X | Swainsonina en hojas y semillas en el Orden Xylariales.

Material	Mean	Median	Test Shapiro-Wilks			Wilcoxon
			W	p-value	Distribución	
Hoja	2.37	0.306	0.5443	9.199e-05	No normal	W = 19, p-value = 0.5524 alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
Semilla	56.74	36.599	0.80613	0.03328	No normal	

10. Referencias

- Abascal, F., Irisarri, I., & Zardoya, R. (2014). Filogenia y evolución molecular. In *Manual de usuario de PAML* (pp. 231–259).
- Abello, J., Kelemu, S., & García, C. (2008). Agrobacterium-mediated transformation of the endophytic fungus *Acremonium implicatum* associated with *Brachiaria* grasses. *Mycological Research*, *112*(3), 407–413. <https://doi.org/10.1016/J.MYCRES.2007.10.008>
- Álvarez, I., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *29*(3), 417–434. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2)
- Amirkia, V., & Heinrich, M. (2014). Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. *Phytochemistry Letters*, *10*, xlvi–liii. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2014.06.015>
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(26), 15649–15654. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2533483100>
- ASF. (2010). *Dataset: ©JAXA/METI ALOS PALSAR L1.0 2010*. <https://search.asf.alaska.edu/#/>
- Atia, M. A., & Breadmore, M. C. (2023). Capillary Electrophoresis. *Encyclopedia of Forensic Sciences: Volume 1-4, Third Edition*, *1*, 430–458. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823677-2.00262-2>
- Borges, D., Díaz, A., San Juan, A., & Gómez, E. (2010). Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA, Sobre Los Derivados de Caña y Azúcar*, *44*(3), 49–55.
- Braun, K., Romero, J., Liddell, C., & Creamer, R. (2003). Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweed. *Mycological Research*, *107*(8), 980–988. <https://doi.org/10.1017/S095375620300813X>
- Bultman, T. L., & Leuchtman, A. (2008). Biology of the *Epichloë*-*Botanophila* interaction: An intriguing association between fungi and insects. *Fungal Biology Reviews*, *22*(3–4), 131–138. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2009.04.003>
- Carranza, E. (2007). Familia Convolvulaceae. *Flora Del Bajío y de Regiones Adyacentes*, *151*, 1–132.
- Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, *69*(1), 2–9. <https://doi.org/10.2307/1943154>
- Chavarro, C. F. G., Gutiérrez, M. C., Blanco, V. C. P., & Ruiz, X. M. C. (2020). Amaryllidaceae: fuente potencial de alcaloides. Actividades biológicas y farmacológicas. *Ciencia y Agricultura*, *17*(3), 78–94. <https://doi.org/10.19053/01228420.V17.N3.2020.11379>

- Cheeke, P. R. (1988). Toxicity and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids. *Journal of Animal Science*, 66(9), 2343–2350. <https://doi.org/10.2527/JAS1988.6692343X>
- Chérigo, L., & Pereda-Miranda, R. (2006). Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *Journal of Natural Products*, 69(4), 595–599. <https://doi.org/10.1021/NP0504457/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NP0504457N00001.GIF>
- CIPRES Science Gateway | Login. (n.d.). Retrieved September 25, 2023, from <https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>
- Clay, K. (1988). Fungal Endophytes of Grasses: A Defensive Mutualism between Plants and Fungi. *Ecology*, 69(1), 10–16. <https://doi.org/10.2307/1943155>
- Clay, K. (1996). Interactions among Fungal Endophytes, Grasses and Herbivores. *Society of Population Ecology*, 38(2), 191–201.
- Clay, K. (2014). Defensive symbiosis: A microbial perspective. *Functional Ecology*, 28(2), 293–298. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12258>
- Clay, K., & Holah, J. (1999). Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5434), 1742–1744. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.285.5434.1742>
- Clay, K., & Schardl, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 160, 99–127. <https://doi.org/10.1086/342161>
- Cook, D., Beaulieu, W. T., Mott, I. W., Riet-Correa, F., Gardner, D. R., Grum, D., Pfister, J. A., Clay, K., & Marcolongo-Pereira, C. (2013). Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endosymbiont of the ascomycete order chaetothyriales in the host *ipomoea carnea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(16), 3797–3803. <https://doi.org/10.1021/jf4008423>
- Cook, D., Donzelli, B. G. G., Creamer, R., Baucom, D. L., Gardner, D. R., Pan, J., Moore, N., Krasnoff, S. B., Jaromczyk, J. W., & Schardl, C. L. (2017). Swainsonine biosynthesis genes in diverse symbiotic and pathogenic fungi. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(6), 1791–1797. <https://doi.org/10.1534/G3.117.041384/-/DC1/FILES1.PDF>
- Cook, D., Gardner, D. R., Lee, S. T., Pfister, J. A., Stonecipher, C. A., & Welsh, S. L. (2016). A swainsonine survey of North American *Astragalus* and *Oxytropis* taxa implicated as locoweeds. *Toxicon*, 118, 104–111. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2016.04.033>
- Cook, D., Gardner, D. R., & Pfister, J. A. (2014). Swainsonine-containing plants and their relationship to endophytic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(30), 7326–7334. <https://doi.org/10.1021/jf501674r>
- Corporation Promega. (2023). Wizard(R) Genomic DNA Purification Kit Technical Manual #TM050. In *Promega*. www.promega.com

- da Silva, M. F. das G. F., Soares, M. S., Fernandes, J. B., & Viera, P. C. (2007). Alkyl, aryl, alkylarylquinoline, and related alkaloids. *The Alkaloids. Chemistry and Biology*, *64*, 139–214. [https://doi.org/10.1016/S1099-4831\(07\)64004-8](https://doi.org/10.1016/S1099-4831(07)64004-8)
- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, *9*(8), 772. <https://github.com/ddarriba/jmodeltest2>
- Dennis, J. W., Koch, K., & Beckner, D. (1989). Inhibition of human HT29 colon carcinoma growth in vitro and in vivo by swainsonine and human interferon-alpha 2. *Journal of the National Cancer Institute*, *81*(13), 1028–1033. <https://doi.org/10.1093/JNCI/81.13.1028>
- Dennis, J. W., Laferté, S., Waghome, C., Breitman, M. L., & Kerbel, R. S. (1987). Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science (New York, N.Y.)*, *236*(4801), 582–585. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2953071>
- Dennis, J. W., Laferte, S., Yagel, S., & Breitman, M. L. (1989). Asparagine-linked oligosaccharides associated with metastatic cancer. *Cancer Cells (Cold Spring Harbor, N.Y. : 1989)*, *1*(3), 87–92. <https://europepmc.org/article/med/2701653>
- DeSalle, R., & Goldstein, P. (2019). Review and Interpretation of Trends in DNA Barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *7*, 426–460. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2019.00302/BIBTEX>
- Dorling, P. R., Huxtable, C. R., & Colegate, S. M. (1980). Inhibition of lysosomal alpha-mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. *Biochemical Journal*, *191*(2), 649. <https://doi.org/10.1042/BJ1910649>
- Durden, L., Wang, D., Panaccione, D., & Clay, K. (2009). Decreased Root-Knot Nematode Gall Formation in Roots of the Morning Glory *Ipomoea tricolor* Symbiotic with Ergot Alkaloid-Producing Fungal *Periglandula* Sp. *Journal of Chemical Ecology*, *45*, 879–887. <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01109-w>
- Escobar-Poveda, J. C., & Castañeda-Gómez, J. F. (2022). Evaluación antimicrobiana del crudo alcaloidal de la especie vegetal *Ipomoea carnea* sobre enterobacterias. *Revista Productos Naturales*, *5*(2), 149–150. <https://doi.org/10.3407/RPN.V5I2.6905>
- Gao, F.-K., Dai, C.-C., & Liu, X.-Z. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, *4*(13), 1346–1351. <http://www.academicjournals.org/ajmr>
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, *2*(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.1993.TB00005.X>
- Goss, P. E., Reid, C. L., Bailey, D., & Dennis, J. W. (1997). *Phase IB clinical trial of the oligosaccharide processing inhibitor swainsonine in patients with advanced malignancies*. <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807.1/77>

- Grum, D. S., Cook, D., Baucom, D., Mott, I. W., Gardner, D. R., Creamer, R., & Allen, J. G. (2013). Production of the alkaloid Swainsonine by a fungal endophyte in the host *Swainsona canescens*. *Journal of Natural Products*, 76(10), 1984–1988. https://doi.org/10.1021/NP400274N/SUPPL_FILE/NP400274N_SI_001.PDF
- Hamaguchi, J., Nakagawa, H., Takahashi, M., Kudo, T., Kamiyama, N., Sun, B., Oshima, T., Sato, Y., Deguchi, K., Todo, S., & Nishimura, S. I. (2007). Swainsonine reduces 5-fluorouracil tolerance in the multistage resistance of colorectal cancer cell lines. *Molecular Cancer*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-58/FIGURES/6>
- Hemscheidt, T. (2000). Tropane and Related Alkaloids. *Topics in Current Chemistry*, 209, 175–206. https://doi.org/10.1007/3-540-48146-X_4
- Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O’Donohue, M. F., Chakraborty, A., & Gleizes, P. E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6(2), 225–242. <https://doi.org/10.1002/WRNA.1269>
- Hernández-Trejo, A., Benigno-Estrada, D., Rodríguez-Herrera, R., García-Giron, J. M., Patiño-Arellano, S. A., & Osorio-Hernández, E. (2019). Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(4), 803–813. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V10I4.1665>
- Herre, E. A., Mejía, L. C., Kylló, D. A., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A., & Van Bael, S. A. (2007). Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 88(3), 550–558. <https://doi.org/10.1890/05-1606>
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/17.8.754>
- Ibarra, J. E., Cristina, M., Castro, D. R., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Carrillo, J. A., Pereyra-Alfárez, B., Alcázar-Pizaña, A., Luna-Olvera, H., Galán-Wong, L., Pardo, L., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Soberón, M., & Bravo, A. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Medigraphic*, 48(2), 113–120.
- INEGI. (1989). *Conjunto de datos vectoriales del Continuo Nacional. Efectos climáticos regionales (mayo-octubre) Querétaro.* <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825680404>
- INEGI. (2007). *Carta Edafológica Querétaro escala 1:250,000 Serie II del Continuo Nacional (clave F14-10).* <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825235659>
- Jeyaprakash, A., Davison, D. A., & Schubert, T. S. (2014). Molecular Detection of the Laurel Wilt Fungus, *Raffaelea lauricola*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0894-RE>, 98(4), 559–564. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0894-RE>
- Kang, M. S., & Elbein, A. D. (1983). Mechanism of Inhibition of Jack Bean α -Mannosidase by Swainsonine. *Plant Physiology*, 71(3), 551. <https://doi.org/10.1104/PP.71.3.551>

- Kappe, R., Fauser, C., Okeke, C. N., & Maiwald, M. (1996). Universal fungus-specific primer systems and group-specific hybridization oligonucleotides for 18S rDNA. *Mycoses*, 39(1–2), 25–30. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0507.1996.TB00079.X>
- Klein, J. L. D., Roberts, J. D., George, M. D., Kurtzberg, J., Breton, P., Chermann, J. C., & Olden, K. (1999). Swainsonine protects both murine and human haematopoietic systems from chemotherapeutic toxicity. *British Journal of Cancer*, 80(1–2), 87–95. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6690326>
- Kucht, S., Groß, J., Hussein, Y., Grothe, T., Keller, U., Basar, S., König, W. A., Steiner, U., & Leistner, E. (2004). Elimination of ergoline alkaloids following treatment of *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) with fungicides. *Planta*, 219(4), 619–625. <https://doi.org/10.1007/S00425-004-1261-2>
- Łukasik, P., van Asch, M., Guo, H., Ferrari, J., & Charles, H. (2013). Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. *Ecology Letters*, 16(2), 214–218. <https://doi.org/10.1111/ELE.12031>
- Maat, L., & Beyerman, H. C. (1984). Chapter 5 The Imidazole Alkaloids. *Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 22, 281–333. [https://doi.org/10.1016/S0099-9598\(08\)60180-7](https://doi.org/10.1016/S0099-9598(08)60180-7)
- Macías-Rubalcava, M. L., Hernández-Bautista, B. E., Jiménez-Estrada, M., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., Hernández-Ortega, S., Saucedo-García, A., Muria-González, J. M., & Anaya, A. L. (2008). Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry*, 69(5), 1185–1196. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2007.12.006>
- Majak, W. (1995). Toxicology of plant and fungal compounds: Handbook of Natural Toxins. *Animal Feed Science and Technology*, 51, 342–343. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)90040-3)
- Malczewski, J. (2000). On the Use of Weighted Linear Combination Method in GIS: Common and Best Practice Approaches. *Transactions in GIS*, 4(1), 5–22.
- Malczewski, J., & Rinner, C. (2015). *Advances in Geographic Information Science Multicriteria Decision Analysis in Geographic Information Science*. Springer. <http://www.springer.com/series/7712>
- Maples-Vermeersch. (1992). *Regímenes de humedad del suelo, escala 1:4000000*. En: *Regímenes de humedad del suelo. Tomo II, Sección IV, 6.2. Atlas Nacional de México (1990-1992)*. Instituto de Geografía, UNAM, México. <http://geoportal.conabio.gob.mx/metadatos/doc/html/rehsu4mgw.html>
- McDonald, A. (1991). Origin and diversity of Mexican Convolvulaceae. *Anales Del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 62(1), 65–82.

- McPerson, G. (1981). STUDIES IN IPOMOEA (CONVOLVULACEAE) I. THE ARBORESCENS GROUP'. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 527–545. <https://about.jstor.org/terms>
- Michael, J. P. (1994). Indolizidine and quinolizidine alkaloids. *Natural Product Reports*, 11, 17–39. <https://doi.org/10.1039/NP9941100017>
- Ministerio de consumo español. (2021). *Alcaloides ergóticos*.
- Moncalvo, J. M., Lutzoni, F. M., Rehner, S. A., Johnson, J., & Vilgalys, R. (2000). Phylogenetic Relationships of Agaric Fungi Based on Nuclear Large Subunit Ribosomal DNA Sequences. *Systematic Biology*, 49(2), 278–305. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/49.2.278>
- Municipio de Querétaro. (2021). Información demográfica general. In *Anuario Económico Municipal*.
- Neyaz, M., Das, S., Cook, D., & Creamer, R. (2022). Phylogenetic Comparison of Swainsonine Biosynthetic Gene Clusters among Fungi. *Journal of Fungi*, 8(4), 359. <https://doi.org/10.3390/JOF8040359/S1>
- Noor, A. I., Neyaz, M., Cook, D., & Creamer, R. (2020). Molecular Characterization of a Fungal Ketide Synthase Gene Among Swainsonine-Producing *Alternaria* Species in the USA. *Current Microbiology*, 77(9), 2554–2563. <https://doi.org/10.1007/S00284-020-02111-2/METRICS>
- Novais, R. (2019). *Análise estereoquímica dos alcaloides piperidínicos isolados de Senna spectabilis e avaliação do potencial anticolinesterásico*.
- Oldrup, E., Mclain-Romero, J., Padilla, A., Moya, A., Gardner, D., & Creamer, R. (2010). Localization of endophytic *Undifilum* fungi in locoweed seed and influence of environmental parameters on a locoweed in vitro culture system. *Botany*, 88(5), 512–521. <https://doi.org/10.1139/B10-026>
- Oredipe, O. A., Furbert-Harris, P. M., Laniyan, I., Green, W. R., White, S. L., Olden, K., Parish-Gause, D., Vaughn, T., Griffin, W. M., & Sridhar, R. (2003). Enhanced proliferation of functionally competent bone marrow cells in different strains of mice treated with swainsonine. *International Immunopharmacology*, 3(3), 445–455. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(03\)00042-0](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00042-0)
- Oredipe, O. A., White, S. L., Grzegorzewski, K., Gause, B. L., Cha, J. K., Miles, V. A., & Olden, K. (1991). Protective effects of swainsonine on murine survival and bone marrow proliferation during cytotoxic chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(16), 1149–1156. <https://doi.org/10.1093/JNCI/83.16.1149>
- Oropeza-Guerrero, M. P. (2012). *Alcaloides totales y actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las hojas de Ipomoea murucoides (casahuate)*. Universidad Tecnológica de la Mixteca.

- Patrick, M., Adlard, M. W., & Keshavarz, T. (1993). Production of an indolizidine alkaloid, swainsonine by the filamentous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnology Letters*, *15*(10), 997–1000. <https://doi.org/10.1007/BF00129924/METRICS>
- Pryor, B. M., Creamer, R., Shoemaker, R. A., McLain-Romero, J., & Hambleton, S. (2009). *Undifilum*, a new genus for endophytic *Embellisia oxytropis* and parasitic *Helminthosporium bornmuelleri* on legumes. *Botany*, *87*(2), 178–194. <https://doi.org/10.1139/B08-130>
- Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & de la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, *31*(12), 856–860. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Quach, Q. N., Gardner, D. R., Clay, K., & Cook, D. (2022). Phylogenetic Patterns of Swainsonine Presence in Morning Glories. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.871148>
- Rios, E., Cholich, L., Teibler, G., Bogado, F., & Mussart, N. (2009). Lesiones renales y pancreáticas inducidas por *Ipomoea carnea* en cabras. *Revista Veterinaria*, *20*(1), 45–49. <https://doi.org/10.30972/VET.2011882>
- Robins, D. J. (1982). The pyrrolizidine alkaloids. *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Progrès Dans La Chimie Des Substances Organiques Naturelles*, *41*, 115–203. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8656-5_4/COVER
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytologist*, *182*(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Rosemeyer, H. (2004). The chemodiversity of purine as a constituent of natural products. *Chemistry and Biodiversity*, *1*(3), 361–401. <https://doi.org/10.1002/CBDV.200490033>
- Rosenblad, M. A., Martín, M. P., Tedersoo, L., Ryberg, M., Larsson, E., Wurzbacher, C., Abarenkov, K., & Henrik Nilsson, R. (2016). Detection of signal recognition particle (SRP) RNAs in the nuclear ribosomal internal transcribed spacer I (ITS1) of three lineages of ectomycorrhizal fungi (Agaricomycetes, Basidiomycota). *MycKeys*, *13*, 21–33. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.13.8579>
- Rupani, R., & Chavez, A. (2018). Medicinal plants with traditional use: Ethnobotany in the Indian subcontinent. *Clinics in Dermatology*, *36*(3), 306–309. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2018.03.005>
- Saaty, R. W. (1987). The analytic hierarchy process—what it is and how it is used. *Mathematical Modelling*, *9*(3–5), 161–176. [https://doi.org/10.1016/0270-0255\(87\)90473-8](https://doi.org/10.1016/0270-0255(87)90473-8)

- Sadia, S., Tariq, A., Shaheen, S., Malik, K., Khan, F., Ahmad, M., Qureshi, H., & Nayyar, B. G. (2018). Ethnopharmacological profile of anti-arthritic plants of Asia—a systematic review. *Journal of Herbal Medicine*, *13*, 8–25. <https://doi.org/10.1016/J.HERMED.2018.08.003>
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: Fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *D.R. © TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *16*(2), 132–146.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, *94*(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Santos, F. M., Latorre, A. O., Hueza, I. M., Sanches, D. S., Lippi, L. L., Gardner, D. R., & Spinosa, H. S. (2011). Increased antitumor efficacy by the combined administration of swainsonine and cisplatin in vivo. *Phytomedicine*, *18*(12), 1096–1101. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.005>
- Schiff, P. L. (1987). Bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*, *50*(4), 529–599. https://doi.org/10.1021/NP50052A001/ASSET/NP50052A001.FP.PNG_V03
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K. D., Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(16), 6241–6246. https://doi.org/10.1073/PNAS.1117018109/SUPPL_FILE/SD01.XLS
- Schultes, R. E. (1976). *Hallucinogenic plants*. Golden Press. <https://www.holybooks.com>:
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *The British Mycological Society*, *109*(6), 661–686. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>
- Sherwood, M., & Carroll, G. (1974). Fungal Succession on Needles and Young Twigs of Old-Growth Douglas Fir. *Mycologia*, *66*(3), 499. <https://doi.org/10.2307/3758493>
- Shiono, Y., Kosukegawa, A., Koseki, T., Murayama, T., Kwon, E., Uesugi, S., & Kimura, K. I. (2012). A dimeric pyrrolic acid from *Neonectria ramulariae* is an inhibitor of prolyl oligopeptidase. *Phytochemistry Letters*, *5*(1), 91–95. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2011.10.008>
- Simon, L., Lalonde, M., & Bruns, T. D. (1992). Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(1), 291. <https://doi.org/10.1128/AEM.58.1.291-295.1992>

- Somei, M., & Yamada, F. (2004). Simple indole alkaloids and those with a nonrearranged monoterpenoid unit. *Natural Product Reports*, 21(2), 278–311. <https://doi.org/10.1039/B212257J>
- Steiner, U., Ahimsa-Müller, M. A., Markert, A., Kucht, S., Groß, J., Kauf, N., Kuzma, M., Zych, M., Lamshöft, M., Furmanowa, M., Knoop, V., Drewke, C., & Leistner, E. (2006). Molecular characterization of a seed transmitted clavicipitaceous fungus occurring on dicotyledoneous plants (Convolvulaceae) Author(s). *Source: Planta*, 224(3), 533–544. <https://doi.org/10.1007/S00425-006-0241-0>
- Steiner, U., & Leistner, E. (2018). Ergot Alkaloids and their Hallucinogenic Potential in Morning Glories. *Planta Medica*, 84(11), 751–758. <https://doi.org/10.1055/A-0577-8049/BIB>
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257–268. <https://doi.org/10.1021/NP030397V/ASSET/IMAGES/LARGE/NP030397VF00011.JPEG>
- Strunz, G. M., & Findlay, J. A. (1985). Chapter 3 Pyridine and Piperidine Alkaloids. *Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 26(C), 89–183. [https://doi.org/10.1016/S0099-9598\(08\)60194-7](https://doi.org/10.1016/S0099-9598(08)60194-7)
- Sumarah, M. W., Puniani, E., Sørensen, D., Blackwell, B. A., & Miller, J. D. (2010). Secondary metabolites from anti-insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens*. *Phytochemistry*, 71(7), 760–765. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2010.01.015>
- Sun, J. Y., Yang, H., Miao, S., Li, J. P., Wang, S. W., Zhu, M. Z., Xie, Y. H., Wang, J. B., Liu, Z., & Yang, Q. (2009). Suppressive effects of swainsonine on C6 glioma cell in vitro and in vivo. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 16(11), 1070–1074. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2009.02.012>
- Sun, J. Y., Zhu, M. Z., Wang, S. W., Miao, S., Xie, Y. H., & Wang, J. B. (2007). Inhibition of the growth of human gastric carcinoma in vivo and in vitro by swainsonine. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 14(5), 353–359. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2006.08.003>
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512–526. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A040023>
- Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 18(4), 448–459. <https://doi.org/10.1039/B100918O>
- Tecanhuey-Fernández, L. R. (2005). *Estudio Fitoquímico de Ipomoea murucoides*. Universidad de las Américas Puebla.
- Tulsiani, D. R. P., & Touster, O. (1983). Swainsonine, a potent mannosidase inhibitor, elevates rat liver and brain lysosomal α -d-mannosidase, decreases Golgi α -d-mannosidase II, and

- increases the plasma levels of several acid hydrolases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 224(2), 594–600. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90247-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90247-3)
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480–484. <https://doi.org/10.1038/NATURE07540>
- Vásquez, M. R. S. (2014). *Actividad antinociceptiva y antibacteriana de los alcaloides totales de dos especies de la familia Solanaceae*.
- White, J. F., & Torres, M. S. (2009). Defensive mutualism in microbial symbiosis. *Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis*, 1–430. <https://doi.org/10.1201/9781420069327>
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual* (pp. 315–322). Academic Press. https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Lee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics
- Zhang, H. C., Ma, Y. M., Liu, R., & Zhou, F. (2012). Endophytic fungus *Aspergillus tamarii* from *Ficus carica* L., a new source of indolyl diketopiperazines. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45, 31–33. <https://doi.org/10.1016/J.BSE.2012.07.020>
- Zharkikh, A. (1994). Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 39(3), 315–329. <https://doi.org/10.1007/BF00160155/METRICS>