

Caracterización molecular de hongos aislados a partir de la rizósfera de frailejones (*Espeletia pycnophylla* Cuatrec) en el páramo de Paja Blanca en el Departamento de Nariño, Colombia.

Angela Vanessa Alvarez Coral

Universidad de Nariño

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Programa de Biología

San Juan de Pasto

2022

Caracterización molecular de hongos aislados a partir de la rizósfera de frailejones (*Espeletia pycnophylla* Cuatrec) en el páramo de Paja Blanca en el Departamento de Nariño, Colombia.

Angela Vanessa Alvarez Coral

Trabajo de grado

Asesora

Luz Estela Lagos Mora

MSc Ciencias Biológicas

Universidad de Nariño

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Programa de Biología

San Juan de Pasto

2022

Nota de responsabilidad

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado son responsabilidades exclusivas de los autores” Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Luz Estela Lagos Mora, MSc

Asesora

Oscar Burbano Figueroa, PhD

Jurado

Pablo Fernández Izquierdo, PhD

Jurado

San Juan de Pasto, junio 1 de 2022

Agradecimientos

A la Universidad de Nariño, La facultad de Ciencias Exactas y Naturales por brindar sus instalaciones y los medios para la realización de esta investigación.

Al Departamento de Biología y sus docentes, por hacer posible mi formación académica.

Al Centro de Estudios Ambientales por la financiación parcial de esta investigación.

A mi asesora Luz Estela Lagos Mora por su dedicación, ayuda en campo, recomendaciones y disponibilidad de tiempo para resolver mis dudas durante el desarrollo de este trabajo.

A mis jurados los doctores Oscar Burbano Figueroa y Pablo Fernández Izquierdo por las correcciones, recomendaciones y valiosos comentarios.

Al grupo de investigación en Genética y Evolución de Organismos Tropicales por hacerme parte y brindar los medios para la obtención de recursos económicos, facilitar el laboratorio, equipos y reactivos necesarios.

Al apoyo de los grupos de Investigación en Bioquímica y Estudios Genéticos y al grupo de Sanidad vegetal.

A Alfonso Benítez, Carlos Flórez, Eliana Galíndez, Luis Recalde, Tharling Hernández y Julián Martínez por su colaboración en campo, laboratorio y ayuda en la discusión y análisis de los resultados.

Dedicatoria

Dedicado con inmenso amor a mi familia y especialmente a Fernando Santander, con quien comparto la misma pasión y amor por la ciencia, gracias por guiar y apoyar mi carrera con tu valiosa presencia y sobre todo gracias por ser esa fuerza química y biológica primordial para la existencia temporal que compartimos.

Resumen

Por medio de salidas de campo al páramo de Paja Blanca los grupos de investigación de Biología de Páramos y Ecosistemas Andinos, Sanidad Vegetal, Ecología Evolutiva y Genética y Evolución de Organismos Tropicales de la Universidad de Nariño describieron síntomas de afectación en *Espeletia pycnophylla* tales como deformaciones en las hojas (entorchamiento), marchitez acompañada de manchas foliares y necrosis en inflorescencias. Al realizar cortes transversales de plantas afectadas se observó pudrición radicular, por lo que fue necesario estudiar la rizósfera de *E. pycnophylla* en el páramo de Paja Blanca. Considerando las características de las lesiones y aislamientos ya realizados se infiere que la afectación puede deberse a una infección por hongos fitopatógenos. Benítez (2018) realizó la caracterización morfológica de aislados a partir de la rizósfera de frailejones encontrando que estos pertenecen a 30 géneros aproximadamente. Sin embargo, no se han logrado confirmar los morfotipos a nivel de género y aproximación a las especies debido a que existen algunas limitaciones en la identificación fenotípica, como el estado del ciclo vital en el que se encuentra el hongo, plasticidad fenotípica, especiación críptica, tiempo de ejecución de técnicas morfológicas, esfuerzo y experticia de los investigadores. Por tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo la identificación molecular de los morfotipos aislados a partir de la rizósfera de frailejones con síntomas de enfermedad en el páramo de Paja Blanca en el Departamento de Nariño, mediante la secuenciación y análisis de fragmentos ITS y β -tubulina encontrándose que los aislados pertenecen a 9 órdenes, 20 familias y 23 géneros. En total 10 géneros de hongos reportan especies fitopatógenas entre los que se encuentran *Corallomycetella*, *Microdochium*, *Pezicula*, *Mollisia*, *Phialocephala*, *Alternaria*, *Paraconiothyrium*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Bjerkandera*.

Palabras clave: frailejón, ITS, β -tubulina, identificación, fitopatógeno

Abstract

In field trips to the páramo de Paja Blanca the research groups of Biología de páramos y Ecosistemas Andinos, Sanidad Vegetal, Genética y Evolución de Organismos Tropicales of the University of Nariño have described symptoms of affectation in *Espeletia pycnophylla* such as deformations in the leaves, wilting accompanied by foliar spots and necrosis in inflorescences. When performing transversal cuts of affected plants root rot was observed for which it was necessary to study the rhizosphere of *E. pycnophylla* in the páramo de Paja Blanca. Considering the characteristics of the lesions and isolations already performed, it is inferred that the affectation may be due to a phytopathogenic fungal infection. Benítez (2018) carried out the morphological characterization of isolates from the rhizosphere of frailejones finding that these belong to 30 genera approximately. However, it has not been possible to confirm the morphotypes at the genus level and approximation to the species because there are some limitations in phenotypic identification such as the state of its life cycle in which the fungus is found, phenotypic plasticity, cryptic speciation, morphological techniques take more time, effort and expertise from researchers. Therefore, the present work aims at the molecular identification of the isolated morphotypes from the rhizosphere of frailejones with symptoms of disease in the paramo of Paja Blanca in the Department of Nariño, through sequencing and analysis of ITS and beta-tubulin fragments were found that the isolates belong to 9 orders, 20 families and 23 genera. In total 10 genera that report phytopathogenic species including *Corallomycetella*, *Microdochium*, *Pezicula*, *Mollisia*, *Phialocephala*, *Alternaria*, *Paraconiothyrium*, *Cladosporium*, *Penicillium* and *Bjerkandera*.

Keywords: frailejón, ITS, - tubulin, identification, phytopathogen

Tabla de contenido

Introducción	13
Planteamiento del problema	14
Pregunta de Investigación	17
Justificación	17
Objetivos	18
Objetivo General	18
Objetivos específicos	18
Marco teórico	18
Marco de antecedentes	35
Materiales y Métodos	38
Resultados y Discusión	43
Conclusiones	94
Recomendaciones	95
Referencias Bibliográficas	96

Lista de Tablas

Tabla 1. Ubicación y condiciones de muestreo	38
Tabla 2. Comparación de los Tamaños Obtenidos para las Regiones ITS y β -tubulina.	44
Tabla 3. Comparación de la identificación morfológica y molecular mediante los marcadores ITS y β -tubulina de los aislados de la endorizósfera	49
Tabla 4. Comparación de la identificación morfológica y molecular mediante los marcadores ITS y β -tubulina de los aislados de la ectorizósfera	50
Tabla 5. Secuencias de mayor similitud obtenidas de BLAST para el aislado SR MU4 M17 con el nivel taxonómico arrojado.	62

Lista de Figuras

Figura 1. Síntomas encontrados en <i>E. pycnophylla</i> .	16
Figura 2. Corte transversal de la raíz de <i>E. pycnophylla</i>	16
Figura 3. Rizósfera	23
Figura 4. Árbol filogenético de la clase Sordariomycetes utilizando la región ITS	57
Figura 5. Árbol filogenético de la clase Letiomycetes utilizando la secuencia parcial ITS	60
Figura 6. Árbol filogenético de la clase Dothideomycetes utilizando la región ITS	65
Figura 7. Árbol filogenético de la clase Agaricomycetes (Basidiomycota) utilizando la región ITS	66
Figura 8. Árbol filogenético de la clase Eurotiomycetes utilizando la región ITS	68
Figura 9. Árbol filogenético de la clase Mortierellomycetes utilizando la región ITS	70
Figura 10. Árbol filogenético comparativo de los géneros en común del presente estudio y el de Flórez y colaboradores (2020) utilizando la región ITS	72
Figura 11. Diversidad de hongos encontrada en el Frailejón (<i>E. pycnophylla</i> en el Páramo de Paja Blanca en el Departamento de Nariño	74
Figura 12. Árbol filogenético de los aislados usando la región β -tubulina	76

Lista de Anexos

Anexo A. Metabolitos secundarios producidos por los hongos pueden afectar el proceso de extracción de ADN.	128
Anexo B. Filogenia del aislado SR MU4 M17 comparado con todos los géneros del presente estudio	130
Anexo C. Filogenia del aislado SR MU4 M17 comparado con los géneros de la clase Letiomycetes y las secuencias similares del GenBank	132
Anexo D. Tabla resumen de las características de los géneros reportados	134

Introducción

Los frailejones son el tipo de vegetación que simboliza y caracteriza a los ecosistemas de páramo más que cualquier otro grupo de plantas, puesto que este género constituye una de las unidades principales en las comunidades de alta montaña, distribuyéndose entre los 3100 y 4500 m.s.n.m. (Vargas, 2016). Dentro de la subtribu Espeletiinae actualmente se reconocen ocho géneros, 141 especies (Díazgranados, 2012), entre las cuales se destaca *Espeletia pycnophylla* por encontrarse distribuida principalmente al norte de Ecuador y al sur de Colombia en los páramos del departamento de Nariño (Solarte et al., 2007; Vargas, 2016) los cuales hacen parte de tres complejos: complejo Doña Juana-Chimayoy, la Cocha- Patascoy y el complejo Chiles-Cumbal al cual pertenece el páramo de Paja Blanca (Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt- Universidad de Nariño, 2015).

Medina (2009) reporta por primera vez frailejones afectados con graves síntomas en el Parque Nacional Natural Chingaza (PNN Chingaza). Gonzales (2012) llevó a cabo un estudio de la composición de hongos endófitos en *Espeletia argentea* en la cuenca de la quebrada Calostros en el mismo páramo, aislando un total de 43 morfotipos tanto de frailejones sanos como enfermos. En el 2018 se realizó la identificación de hongos asociados a cuatro lesiones (homosis, homaposis, abdosis y mertesis) de frailejones (*Espeletia spp.*) en páramos de Cundinamarca, logrando aislar 33 morfotipos de los cuales solo *Fusarium avenaceum*, *Curvularia sp* y *Epicoccum nigrum* reprodujeron una de las lesiones (homosis), lo que de acuerdo a Gaitán (2018) podrían estar implicados en la afectación de este género.

En el mismo año, los grupos de investigación de Biología de páramos y Ecosistemas Andinos, Sanidad Vegetal, Ecología Evolutiva y Genética y Evolución de Organismos Tropicales de la Universidad de Nariño en visitas al páramo de Paja Blanca lograron observar síntomas similares a los descritos por Medina (2009), adicionalmente se reporta una nueva afectación al realizar cortes transversales en la raíz de *E. pycnophylla* observando un grave patrón de necrosis, por lo que Benítez (2019) realizaron el aislamiento y caracterización de hongos asociados a la rizósfera de frailejones del Páramo de Paja Blanca,

describiendo estos morfotipos dentro de 30 géneros. De igual forma se estudió la composición fúngica asociada a individuos afectados de *E. pycnophylla*, realizándose el aislamiento de hongos a partir de tejidos de hoja, inflorescencia, tallo, raíz y semilla encontrando que los morfos pertenecen a 19 géneros tales como: *Fusarium*, *Phoma*, *Ilyonectria* y *Botrytis*, *Trichoderma*, *Epicoccum*, *Clonostachys*, *Tolypocladium* y *Sordaria* (Flórez et al., 2019). Galíndez y colaboradores (2020) investigaron los hongos de la entomofauna asociada a *E. pycnophylla* encontrando géneros como: *Fusarium*, *Botrytis*, *Epicoccum* y *Cladosporium* aislados de estructuras de insectos de los géneros *Neomyopites* sp., *Diabrotica* sp., *Bradysia* sp. y *Dyscolus* sp.

De los estudios realizados en el Páramo de Paja Blanca y citados anteriormente reposa una colección biológica de los hongos aislados, de los cuales los ejemplares de Flórez (2019) y Galíndez y colaboradores (2020) se encuentran caracterizados tanto morfológica como molecularmente. Sin embargo, solo se cuenta con la caracterización morfológica de los ejemplares colectados por Benítez y colaboradores (2019). Por lo que fue necesario complementar el estudio debido a las limitaciones de las herramientas de identificación morfológica y la necesidad de verificar la información que se tiene acerca de esta emblemática especie. El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar molecularmente los aislados de la rizósfera de *E. pycnophylla* en el páramo de Paja Blanca en el Departamento de Nariño, para lo cual se realizó cultivos monospóricos, extracción de ADN, amplificación y secuenciación de las regiones ITS y β tubulina utilizando los pares de cebadores ITS1, ITS4, β 2a y β 2b. Las secuencias se analizaron con la herramienta BLAST del NCBI y se verificaron en la base de datos UNITE, las cepas registradas con mayor porcentaje de identidad se utilizaron para realizar el análisis filogenético y obtener un mayor soporte de los datos.

Planteamiento del problema

Medina (2009) reportó en la zona de amortiguación del PNN Chingaza, frailejones con graves lesiones, presentando cambios en el color natural o clorosis, pudrición de las hojas e inflorescencias y entorchamiento se planteó que estas afectaciones pueden ser producidas por hongos fitopatógenos debido

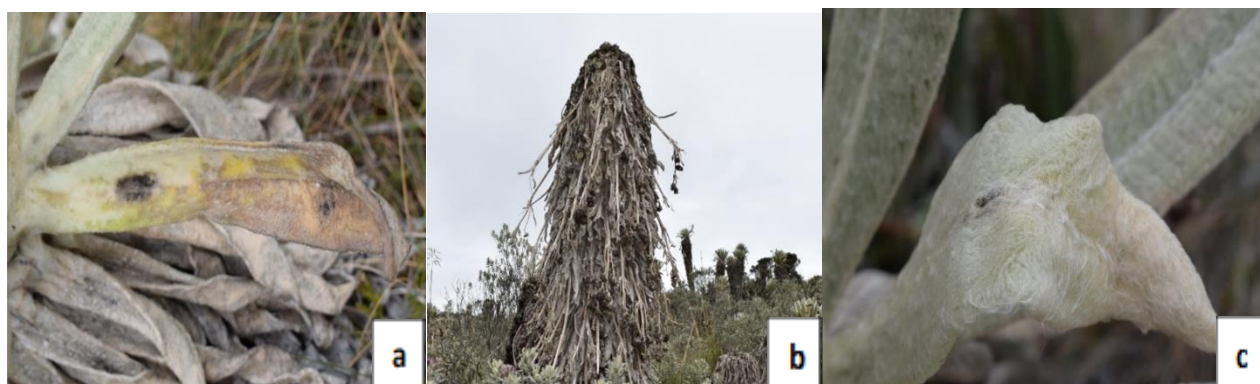
a la relación de los síntomas con plantas cultivadas e infectadas con este tipo de organismos. Mediante salidas de campo al Páramo de Paja Blanca los grupos de investigación anteriormente mencionados lograron describir síntomas similares en *E. pycnophylla* (figuras 1 a, b y c). Además de un nuevo síntoma descrito después de realizar cortes transversales de la parte inferior de la planta, notando la severa pudrición de la raíz que ascendía por el tallo (figura 2). Por tanto, se planteó así la hipótesis de que *E. pycnophylla* en el páramo de Paja Blanca está sufriendo muerte ascendente (Benítez et al., 2019). Estas anotaciones fueron socializadas en el Primer Simposio Internacional de Problemas Fitosanitarios en los Páramos Relacionados con Cambio Climático: Avances y Perspectivas de la Investigación, realizado por la Universidad Pontificia Javeriana y el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt (2018).

La rizósfera es conocida por ser una de las partes de la planta que alberga una alta diversidad microbiana por lo que se considera una alta concentración de interacciones biológicas (Datta et al., 2020) ayudando al crecimiento y desarrollo vegetal y calidad del suelo. Por tanto, la comunidad microbiana tiene la capacidad de servir como indicador temprano del deterioro del suelo que afecta directamente el bienestar vegetal (Pedraza et al., 2010).

Los hongos son la microdiversidad más destacada y menos estudiada en comparación con las bacterias (Nath et al., 2019), esta diversidad fúngica rizosférica puede ocasionar efectos positivos sobre las plantas generando relaciones simbióticas como endomicorrizas y ectomicorrizas, proporcionando nutrientes, ayudando en la fotosíntesis y, por lo tanto, mejorando la productividad, suprimiendo enfermedades y mitigando el estrés (Gunjal & Shinde, 2021). Por otra parte, puede traer efectos deletéreos a las plantas cuando no se encuentra en equilibrio o condiciones desfavorables, en muchos casos, estas enfermedades son causadas por un complejo de especies de hongos (Miao et al., 2015). Estudiar los organismos fúngicos asociados a la rizósfera es importante en la identificación de potenciales patógenos que puedan estar relacionados con la muerte ascendente de esta planta. por lo que fue necesario estudiar la rizósfera fúngica de *Espeletia pycnophylla* en el páramo de Paja Blanca.

Figura 1

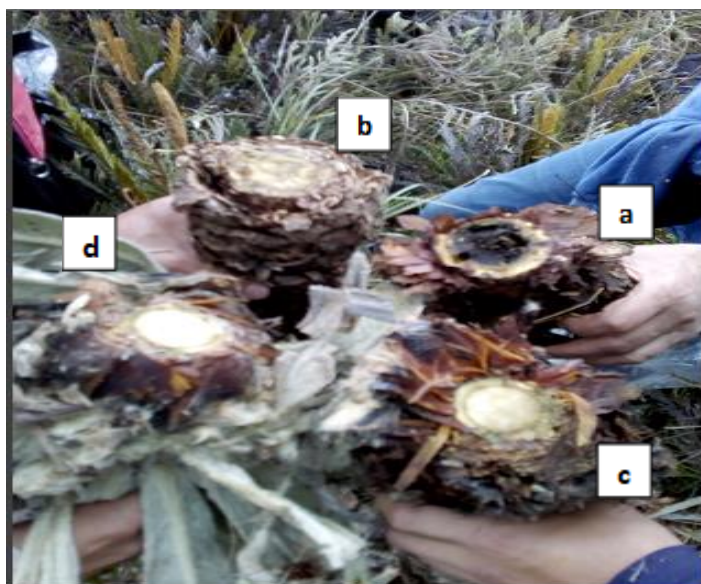
Síntomas Encontrados en E. pycnophylla



Nota: a) Cambio de color en las hojas (clorosis), b) Necrosis de las hojas e inflorescencias, c) Entorchamiento o deformación. Tomado de Galíndez et al., 2020.

Figura 2

Corte transversal de la raíz de E. pycnophylla afectado



Nota: **a)** Se nota severas lesiones en raíces **b)** que se propagan hacia el tallo **c)** y **d)** en los dos siguientes cortes se observa como la infección está llegando a las hojas. Tomada de Benítez et al., 2019.

Un estudio previo usando caracterizaciones morfológicas identificó 30 géneros de hongos en la rizosfera de frailejones del Páramo Paja Blanca (Benítez et al., 2019). Este estudio avanzó los resultados obtenidos por Benítez (2019), al identificar molecularmente los morfotipos fúngicos asociados a la rizosfera de frailejones.

Dicho lo anterior el presente estudio tuvo como objetivo identificar molecularmente los morfotipos aislados a partir de la rizósfera de frailejones con síntomas de enfermedad (*Espeletia pycnophylla*) en el páramo de Paja Blanca del Departamento de Nariño.

Pregunta de Investigación

¿Cuáles son las especies de hongos aisladas a partir de la rizósfera de *E.pycnophylla* con muerte ascendente en el Páramo de Paja Blanca, Nariño?

Justificación

Los páramos tienen un importante valor científico y paisajístico, siendo ecológicamente relevantes al albergar flora y fauna endémica, caracterizándose por servir como proveedores de materia prima y agua, cumpliendo un papel de alta relevancia en la regulación de la hidrología (Andrade et al., 2002). Es un bioma neotropical que ha sido definido como extensas zonas en las cordilleras entre el bosque andino, catalogándose como una región natural por la relación entre el suelo, el clima y la biota (Rangel, 2015). Se caracteriza por ser el ecosistema con mayor irradiación solar del mundo, lo que genera la flora de montaña más rica del planeta. Con un nivel de endemismos de aproximadamente 3379 especies de plantas; 70 especies de mamíferos, 154 especies de aves y 90 especies de anfibios sumado a esto, Colombia tiene el 49% de los páramos del planeta ocupando el 1,7% del territorio nacional, con 34 páramos para una superficie total de 1'932395 hectáreas (Cabrera & Ramírez, 2014; IAvH, 2013)

Entre los organismos vegetales predominantes del páramo encontramos a los frailejones (*Espeletia spp*), cuyas especies cumplen un papel fundamental en los procesos hidrobiológicos por medio de la captación, almacenamiento y regulación de flujos hídricos siendo cruciales en el mantenimiento de

la humedad ambiental, son hábitat de otras especies endémicas como anfibios, insectos y microorganismos. Por tanto, fue fundamental investigar qué factores y organismos pueden estar provocando la pudrición de la raíz y la muerte ascendente de los frailejones en el Páramo de Paja Blanca (Benítez et al., 2019; Burbano et al., 2020).

Teniendo en cuenta los síntomas que presentan los frailejones en esta zona y que se describen en el problema de investigación es importante el estudio de la rizósfera, ya que la identificación de estos microorganismos permitirá avanzar en el conocimiento de los agentes causantes de la afectación. El presente trabajo se realizó con el fin de complementar los estudios fenotípicos de los aislados de la rizósfera de frailejones que sufren muerte ascendente en el páramo de Paja Blanca y así identificar molecularmente las especies asociadas a la rizósfera de *E. pycnophylla*.

Objetivos

Objetivo General

Identificar los morfotipos de hongos aislados a partir de la rizósfera de *Espeletia pycnophylla* con muerte ascendente mediante secuenciación de regiones específicas de ADN.

Objetivos específicos

Describir la diversidad fúngica asociada a la rizósfera de *Espeletia pycnophylla* con muerte ascendente en el páramo de Paja Blanca.

Determinar en los hongos identificados el potencial para ser categorizados como fitopatógenos e inocuos con base en la literatura reportada.

Marco teórico

Ecosistemas de Páramo

Los páramos son sistemas biológicos de alta complejidad, caracterizados por ser endémicos de los Andes tropicales venezolanos, ecuatorianos, peruanos y colombianos, extendiéndose hasta Costa Rica y Panamá (Morales & Estévez, 2006), localizándose en Colombia en las cordilleras Occidental, Central y

Oriental entre los 3100 y 4500 m.s.n.m (Vargas, 2016) y abarca aproximadamente el 1.7% de la extensión del país (IAvH, 2013). Además de ser ambientes poco comunes y limitados a los andes del norte, estos brindan múltiples servicios ambientales, cumpliendo funciones naturales importantes, como su capacidad de regulación hídrica por medio de la captación y almacenamiento de aguas subterráneas y superficiales, por lo que en estas zonas nace una gran cantidad de ríos, quebradas y lagos que conforman extensas cuencas hidrogeográficas fundamentales para el desarrollo y la economía de las regiones, ya que estas abastecen el consumo humano tanto rural como urbanos, la producción agroindustrial, y la generación de energía hidroeléctrica (Hofstede et al., 2014).

Este ecosistema es reconocido por ser crucial en la regulación climática por medio de la captación y fijación de carbono a través de la necromasa y la lenta descomposición de esta materia orgánica (Castañeda & Montes, 2018). Por tanto, el páramo es un importante bioma donde ocurren numerosas interacciones ecológicas que involucran especies endémicas y los servicios ecosistémicos que ofrece son de relevancia económica y cultural para los diversos grupos humanos que los habitan, ya sean campesinos o indígenas; además de proporcionar paisajes únicos con potencial para el turismo científico (Andrade et al., 2002).

Parque Nacional Natural-Paramo de Paja Blanca

El Páramo de Paja Blanca, se localiza al sur del Departamento de Nariño entre las coordenadas 0° 50'-1° 06' de latitud norte y 77° 45'-77° 25' de longitud oeste (Corponariño, 2010), presentando una distribución altitudinal entre los 3000 y 3600 msnm, cuya cumbre corresponde a un cráter antiguo con productos volcánicos extensos, esta zona cobija 26 veredas de varios municipios entre los que se encuentran Ospina, Sapuyes, Iles, Gualmatán, Pupiales, Guachucal y El Contadero; hace parte del complejo orográfico andino conocido como el Nudo de los Pastos o macizo de Huaca y tiene una extensión aproximada de 3107 a 4634 hectáreas, con su mayor extensión en el municipio de Pupiales que cuenta con 1081 hectáreas (Delgado et al., 2010; Muñoz, 2017).

De la zona alta del páramo, surgen 36 corrientes que surten de agua a 13 microcuencas principales, cuyo flujo abastece aproximadamente 36 acueductos veredales y 6 acueductos urbanos. Por tanto, se considera al Páramo de Paja Blanca como una fuente importante hídrica en el sur del departamento de Nariño (Delgado et al., 2010).

Espeletia pycnophylla

Dentro de la subtribu Espeletiinae actualmente se reconocen 8 géneros, 141 especies, 17 subespecies y 22 variedades, el género *Espeletia* se caracteriza por ser el más diverso dentro de la subtribu. En Colombia este género reporta 74 especies entre las cuales 36 se encuentran en algún grado de amenaza según el libro rojo (N. García, 2007). Sus especies son conocidas como frailejones y son la vegetación emblemática de los páramos Andinos (Diazgranados, 2012; Rodriguez et al., 2017; Vargas, 2016).

Los frailejones morfológicamente son rosetas caulescentes, perennes, de hojas densamente pubescentes, obovadas, oblongas, sésiles e inflorescencias desnudas. Las especies del género tienen una eficiente absorción de nutrientes lo que hace posible que se encuentren presentes en zonas con temperaturas ambientales tan bajas. Por tanto, la fisiología de la planta es eficiente con el manejo del recurso hídrico, nutrientes y carbono. Una de las características más notorias de las espeletias es que están compuestas por un 73.5 % en necromasa entre hojas y estructuras muertas de reproducción y se estima que tan solo un 26% corresponde a biomasa, dividiéndose entre raíces y ramas. Se caracterizan también por tener una raíz subdesarrollada ya que estas plantas obtienen los nutrientes principalmente de la lluvia y no explotan el sustrato terrestre. Son ecológicamente importantes ya que además de aportar a la fijación de carbono con su alto porcentaje de necromasa, son hábitat y sostienen múltiples interacciones con fauna de la zona proporcionando comida y protección, convirtiéndose en el refugio perfecto para macroartrópodos (Diazgranados, 2012; Lizarazo-Medina & Gómez-Vásquez, 2015).

En cuanto a la especiación del género posiblemente se originó en un periodo glaciario del Pleistoceno temprano o tardío según Cuatrecasas (1986) mediante un proceso de especiación rápido conocido como

radiación adaptativa en la Cordillera Occidental de Venezuela. También la ha sido reconocida durante mucho tiempo como un caso destacado de radiación adaptativa y que dada la relativa juventud de los macizos montañosos andinos esta vegetación puede provenir ya sea de la evolución de plantas de tierras bajas que se adaptó a las gradualmente a las nuevas condiciones ambientales que iban surgiendo durante la elevación de la cordillera ó de la llegada del sur o norte del continente y ya poseían la capacidad de resistir condiciones adversas como la altura, presión, temperatura y niveles de precipitación (Pouchon et al., 2018; Vásquez & Buitrago, 2011). Otra característica de los frailejones que ha promovido el aislamiento geográfico es que carecen de estructuras que faciliten la dispersión a larga distancia, lo que a su vez favorece los procesos de especiación alopátricos (Diazgranados & Barber, 2017).

Espeletia pycnophylla es una especie considerada parte del ultimo evento de especiación de la subtribu Espeletiinae, se encuentra distribuida al norte de Ecuador en el páramo del Angel y al sur de la Cordillera Occidental en Colombia en los páramos del departamento de Nariño (Benavides et al., 2007; Vargas, 2016), los cuales hacen parte de tres complejos: Doña Juana-Chimayoy, la Cocha- Patascoy y Chiles-Cumbal al cual pertenece el páramo de Paja Blanca (Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt- Universidad de Nariño, 2015).

Rizósfera

La rizósfera corresponde al volumen del suelo que rodea las raíces y es influenciado por estas, en donde hay un ambiente físico, químico y biológico diferente al sustrato terrestre circundante. Las raíces producen en la superficie de sus pelos absorbentes sustancias mucosas en donde se protegen y persisten colonias microbianas, además de ser un excelente hábitat para resguardar una amplia gama de microorganismos, como bacterias, hongos, virus y protozoos, también alberga nematodos y microartrópodos los cuales coexisten en la rizósfera y muestran una variedad de interacciones entre ellos y con la planta (Cheng & Gershenson, 2007; Lines, 2005).

Dicho lo anterior la rizósfera tiene un enorme conjunto de microorganismos del suelo y se considera el "hot spot" para la actividad y la colonización microbiana, es una zona delgada que puede oscilar entre 1

y 2 mm de espesor, aunque el volumen de suelo contenido en ella varía dependiendo de la especie vegetal, el tipo de suelo y la estructura radicular. Debido a su proximidad y / o asociación continua con la planta, los microorganismos que se encuentran en la rizósfera influyen en la planta de diversas maneras ya sea como efectos beneficiosos que conducen a la mejora de la salud y el crecimiento de la planta o efectos dañinos por medio de actividades patógenas (Marcial et al., 2003).

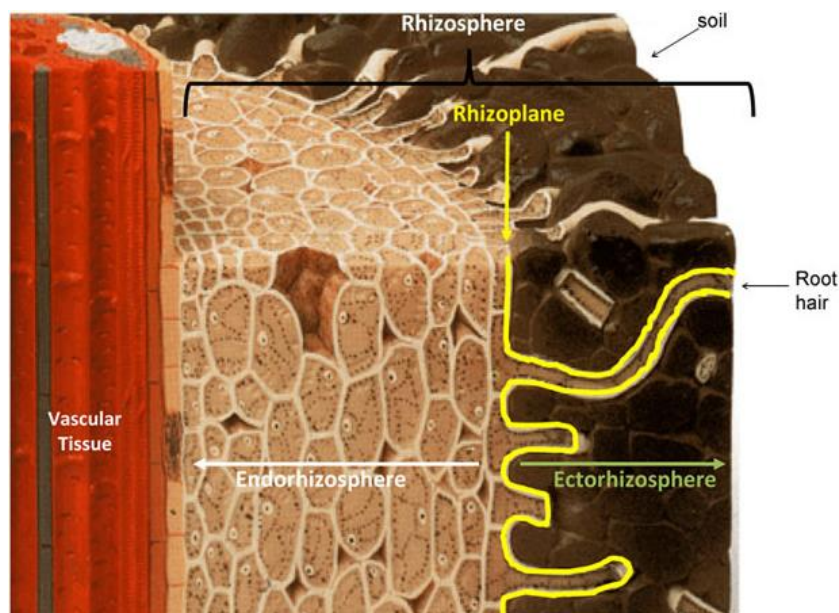
El término "rizósfera" se deriva de la palabra griega "rhiza", que significa raíz, y "esfera", que significa campo de influencia. El primero en definir y usar este término fue el científico alemán Hiltner en 1904; desde entonces se ha usado este concepto para incluir el volumen de suelo influenciado por la raíz y partes de los tejidos de esta. La rizósfera se divide principalmente en tres partes (Figura 3):

1. **Endorizósfera:** esta consiste en el tejido de la raíz incluyendo la endodermis y las capas corticales.
2. **Rizoplano:** Parte superficial de la raíz donde se adhieren las partículas del suelo y los microorganismos; compuesta principalmente de epidermis, corteza y polisacárido mucilaginoso.
3. **Ectorizósfera:** que consiste en un suelo inmediatamente adyacente a la raíz

La raíz en sí misma es una parte de la rizósfera, ya que los microorganismos endófitos colonizan también los tejidos de la raíz interna. El volumen del suelo que no es parte de la rizósfera, es decir, que no está influenciado por la raíz se conoce como suelo en masa; Por lo tanto, la rizósfera se puede considerar como una región única y distinta del suelo como tal (McNear, 2013; Prashar et al., 2014).

figura 3

Partes de la rizósfera.



Nota: El grafico es una representación de las partes de la rizósfera. Tomado de McNear, 2013.

Hongos

El reino Fungi se clasifica principalmente en los filos Chytridiomycota, Glomeromycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Ribeiro & Danuza, 2006). Los organismos pertenecientes a este reino son eucariotas heterótrofos que digieren los alimentos externamente absorbiendo los nutrientes después de descomponerlos en pequeñas moléculas, es decir, liberan enzimas a los sustratos donde colonizan para realizar la absorción a través de sus paredes celulares mediante difusión o con la ayuda de las proteínas de transporte, favoreciendo así su metabolismo y por esta razón son degradadores primarios de materia orgánica en la naturaleza, participando activamente en los ciclos del carbono, nitrógeno y fósforo. Algunos hongos obtienen sus nutrientes de un organismo vivo ya sea animal o vegetal, estos reciben el nombre de biótrofos y los que obtienen sus nutrientes de organismos muertos se llaman saprófitos, otros infectan a un hospedero vivo, pero matan las células del organismo con el fin de obtener sus nutrientes; Estos son llamados necrótrofos (Carris et al., 2007; Rani, 2013; Sheehan, 2014).

Los organismos fúngicos son unicelulares o pluricelulares y pueden reproducirse tanto de forma sexual como asexual, así como también por medio del fenómeno de parasexualidad, que consiste en la recombinación genética en la mitosis. Las estructuras reproductivas difieren de aquellas somáticas, mostrando una variedad de formas que se utilizan en la clasificación de los hongos. Tienen un cuerpo o talo compuesto por células tubulares microscópicas llamadas hifas, que en agrupaciones originan el micelio (Carris et al., 2007; Cuevas, 2016).

Hongos asociados a la rizósfera

La rizosfera es un sustrato rico en compuestos orgánicos y factores de crecimiento que favorecen el tiempo de generación microbiana y la actividad metabólica de las diversas comunidades que subsisten en él, los exudados radiculares que se encuentran disponibles en el suelo hacen parte de un importante nicho donde ocurren las interacciones entre diversas comunidades microbiológicas y las plantas (Dias et al., 2015). Estas comunidades son capaces de influir en el crecimiento de plantas a través del aumento en la disponibilidad de nutrientes minerales, de la producción de hormonas de crecimiento como giberelinas y auxinas y de la supresión de microorganismos deletéreos de la rizósfera de plantas por medio de relaciones antagónicas (McNear, 2013).

Entre los microorganismos habitantes de la rizósfera, los hongos son de gran importancia ya que, si se encuentran en el suelo alrededor a las raíces son capaces de formar una red cohesionadora de partículas disponibles en el sustrato como los nutrientes y micronutrientes gracias a la gran cantidad de micelio que estos organismos son capaces de producir, haciendo de estos suelos óptimos para el crecimiento vegetal (Kaoping et al., 2017). Los hongos del suelo por lo general son saprofitos y crecen en sustratos ricos en materia orgánica. Algunos pueden ser facultativos invasores del suelo ectorizosférico, estos últimos son heterótrofos que secretan enzimas extracelulares que degradan las sustancias alimenticias complejas en sustancias más simples haciéndolas más fáciles de absorber. Además, este tipo de organismos son fundamentales para el control biológico de fitopatógenos como bien pueden ser las bacterias, insectos y otros hongos (Rani, 2013; Tedersoo et al., 2014).

Por tanto, las actividades metabólicas de las raíces crean un hábitat favorable para el desarrollo de las poblaciones fúngicas, ya que la proximidad a estas resulta en la germinación de las esporas durmientes que son predominantes en el suelo. Generalmente, las densidades de las poblaciones fúngicas alcanzan 107 UFC por gramo de suelo rizosférico (Dias et al., 2015). Algunos de los géneros más representativos encontrados en la rizósfera de las plantas cultivadas son: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Acaulospora*, *Fusarium*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Scutellospora*. Entre las especies fitopatógenas pertenecientes a estos géneros se encuentran: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Fusarium mangiferae*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *graminearum*, *M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *Alternaria infectori* y *A. arborescens* (J. Silva et al., 2009). En cuanto a plantas silvestres se han reportado géneros como *Mortierella*, *Phyllosticta*, *Talaromyces*, *Phoma*, *Paecilomyces*, *Fusarium* y *Cryptococcus* (Dawkins & Esiobu, 2017).

Por otro lado, y de igual importancia se encuentran también los hongos micorrízicos que se están asociados simbióticamente a las raíces de las plantas y se dividen en los siguientes grupos:

1. **Ectomicorrizicos:** se conocen como hongos de revestimiento, ya que las hifas cubren las raíces secundarias con una vaina o capa. Su principal función es la absorción de agua y nutrientes que son transferidos a la raíz de la planta, además de mejorar la solubilización del fosfato y facilitar el acceso al nitrógeno orgánico (Van Der Linde et al., 2018).

2. **Endomicorrizicos:** La mayor parte del hongo se encuentra dentro de la raíz siendo intracelular. El organismo penetra en las células corticales. Los hongos micorrízicos arbusculares vesiculares forman arbusculos en la corteza vegetal (Jamiołkowska et al., 2017).

3. **Ectendomycorrizicos:** Es intermedio entre estos dos grupos. El micelio crece tanto de forma intercelular como intracelular (Rani, 2013).

Hongos fitopatógenos de la rizósfera

Dentro de las múltiples interacciones que ocurren en la rizósfera estas pueden ser de tipo patogénicas ya que alrededor de 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colonia por gramo de suelo rizosférico son hongos fitopatógenos (I. García et al., 2013). La mayoría de las enfermedades más importantes de las raíces son producidas por hongos y cromistas retardando el desarrollo de la planta restándole vitalidad y posiblemente causándole la muerte (Cotes et al., 2010). Entre los principales agentes patógenos fúngicos rizosféricos encontramos a especies de géneros como: *Alternaria*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Gibberella*, *Sclerotinia*, *Agrobacterium*, *Gaeumannomyces* y *Stemphylium*, estos pueden encontrarse en forma latente (clamidosporas, esclerocios, estructuras de origen sexual, esporas de reposo) o en estado activo, nutriéndose de la materia vegetal (Na et al., 2019). Estos organismos penetran los tejidos vegetales en forma directa mediante acción mecánica y enzimática, o a través de heridas ocasionadas por plagas u otros animales (Agrios, 2005; García et al., 2013).

Técnicas de Biología Molecular

La biología molecular se caracteriza por estudiar las moléculas de la vida, principalmente proteínas y ácidos nucleicos; por tanto, son todas aquellas que aíslan, extraen, purifican, cortan editan y clonan las moléculas anteriormente nombradas, empleando técnicas de laboratorio que han tenido un desarrollo dinámico en las últimas décadas, y que ha revolucionado el desarrollo científico y tecnológico (Peña, Ramírez, & Barrera, 2013).

Estas técnicas se han convertido en pioneras en áreas como la medicina, la genética, la bioquímica, la biotecnología entre otras, ya que permiten por medio de la amplificación de una región o más el estudio de diversos fenómenos biológicos, como por ejemplo nos permite realizar cortes específicos con enzimas de restricción para ver si han ocurrido mutaciones por medio de la ganancia o pérdida de un sitio de restricción, sirviendo como aplicación en el análisis de mutaciones por RFLP (restriction fragment length polymorphism), estudiar la genética de poblaciones, patrones de evolución e identificación de especies e individuos (Angarita et al., 2017).

En cuanto a las técnicas de biología molecular que se utilizan para identificar organismos se debe tener en cuenta que se basan en la amplificación y secuenciación de regiones específicas dentro del genoma de interés (marcadores moleculares). Algunas de estas técnicas son ADN fingerprinting o huellas genéticas que se utilizan para distinguir organismos a nivel intraespecífico haciendo uso de secuencias altamente variables (Lan et al., 2020). Otra técnica muy usada es el barcoding o códigos de barras genéticos que permiten distinguir organismos a nivel interespecífico, son secuencias relativamente cortas con baja variabilidad intraespecífica que pueden amplificarse fácilmente mediante la técnica de PCR (Raja et al., 2017), esta técnica es ampliamente utilizada para la identificación de organismos presentes en muestras ambientales y su historia comenzó hace más de 20 años, con desarrollo permanente a través del diseño de marcadores moleculares. Para la identificación de hongos, la primera descripción científica de estos métodos se basa en la secuenciación de la subunidad principal ribosomal (LSU), la subunidad ribosomal pequeña (SSU) y la región transcrita interna (ITS), su publicación marcó el inicio de la identificación molecular en este reino (White et al., 1990).

Otro método muy completo y ampliamente usado para la identificación de organismos es la tipificación multilocus la cual es una técnica genética para la caracterización taxonómica de microorganismos, mediante el uso de secuencias provenientes de diversos genes, donde se combinan marcadores moleculares universales que clasifican los organismos en niveles taxonómicos superiores y marcadores moleculares específicos como genes que codifican para proteínas los cuales arrojan niveles taxonómicos a nivel de género o especies y se complementan a su vez con técnicas más específicas que diferencian cepas a niveles intraespecíficos como la técnica de RFLP (Taylor & Fisher, 2003).

Marcadores moleculares

Un marcador molecular es una secuencia de ADN que posee una ubicación conocida en determinado genoma y por lo general está asociado con un gen o rasgo en particular. Se pueden describir como una variación, que surge debido a una mutación o alteración en los loci genómicos que se pueden observar (Rashad & Kazaz, 2015).

La utilidad de estos es que se pueden vincular con un comportamiento funcional, con una característica morfológica y fisiológica, descifrando así eventos ocultos de la biología fúngica. De igual forma son indispensables en el estudio filogenético y evolutivo, mapeo comparativo del genoma para explorar la adaptación de los hongos a diferentes entornos, estudio de la genética de poblaciones, epidemiología e identificación taxonomía de estos organismos (Singh & Kumar, 2017).

Marcadores moleculares utilizados en la identificación de hongos

Estos marcadores han demostrado que son capaces de detectar la presencia de hongos en variedad de muestras tanto clínicas como ambientales, y diferenciar entre especies y variedades dentro de un mismo género y proporcionar el perfil genético preciso de cada organismo estudiado. Además, permiten monitorear al agente etiológico durante el tratamiento de la infección y estudiar la epidemiología molecular de las infecciones fúngicas. Estos marcadores también intentan localizar alelos o genes específicos, o putativos, que determinen características fenotípicas del hongo y teniendo múltiples aplicaciones en bioprospección (Raja et al., 2017; Stielow et al., 2015).

Entre los principales marcadores moleculares se destacan dos grupos:

1) Marcadores moleculares basados en huellas genéticas (fingerprinting)

Son secuencias génicas codificantes o no codificantes que pueden estar distribuidas ya sea en una región en específico o aleatoriamente en el genoma, su fundamento es el tamaño de las secuencias amplificadas debido a la detección por enzimas de restricción de polimorfismos en el ADN, creando así patrones de bandas que son característicos de cada individuo. Entre las principales aplicaciones de este tipo de marcadores se encuentran el estudio de la relación filogenética, estudio a nivel poblacional y la detección de hongos en niveles taxonómicos inferiores, e incluso para la diferenciación de cepas dentro de la misma especie con distinto rango de hospedadores y virulencia (Lan et al., 2020). Entre estos marcadores podemos destacar aquellos que son de locus específico, génicos, no génicos y los aleatorios dentro de los cuales se encuentran los bien conocidos RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), los

AFLP (los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) y los ISSR (inter microsatélites) (Iglesias, 2019).

2) Marcadores moleculares basados en código de barras de ADN

Estos marcadores pueden usarse para establecer distintos niveles taxonómicos por su buena resolución interespecífica para definir la identidad de diversos organismos, por lo que han sido de gran utilidad para el descubrimiento de especies nuevas. En este grupo encontramos estos marcadores divididos a su vez en dos importantes subgrupos: los marcadores universales y los parcialmente universales.

Los marcadores universales de códigos de barras de ADN son secuencias genómicas altamente conservadas como las de ADN ribosómico que codifican para ARN ribosómico que consta de tres importantes partes, la subunidad ribosómica pequeña, la subunidad grande y las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS), otras regiones conservadas incluyen los genes de subunidad grande (LSU) y subunidad pequeña (SSU) que se han utilizado para estudiar las relaciones filogenéticas entre hongos a niveles taxonómicos superiores considerando las variaciones genéticas interespecíficas. La utilidad de estos marcadores radica en que son capaces de amplificar secuencias diana del genoma de cualquier especie fúngica sin necesidad de información genómica previa (Badotti et al., 2017). Entre los genes ribosomales nucleares más usados en la identificación de hongos se describe la región SSU, la cual es recomendada para alcanzar niveles taxonómicos superiores como familia, clase, orden y phylum, debido a su lenta tasa de evolución por lo que posee la menor cantidad de variación entre taxones, esta región puede amplificarse y secuenciarse utilizando la combinación de cebadores NS1 y NS4. Otra zona altamente conservada pero que permite la identificación a niveles intermedios de familia y género es la región LSU, que contiene los dominios hipervariables D1 y D2 que pueden ser amplificadas y secuenciadas utilizando la combinación de cebadores LROR y LR6 (Raja et al., 2017; Rashad & Kazaz, 2015).

La tercera región genómica corresponde a los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal o ITS, que han sido ampliamente estudiados y utilizados, ya que es la porción génica de evolución más rápida del cistron de ARNr. Debido a su facilidad en la amplificación, su uso generalizado y la diferencia entre la variación interespecífica, el consorcio de micólogos eligió el ITS como el marcador molecular oficial para los hongos (Raja et al., 2017). La región ITS se puede usar sola o junto con otros genes codificadores de proteínas para la identificación de especies. Estos genes se han utilizado ampliamente en estudios importantes en sistemas sistemáticos de hongos, como el Ensamblaje del Árbol de Vida Fúngico (AFTOL). Por lo tanto, en el GenBank existen grandes números de secuencias de ADN-*nr* y ARNr fúngico para la identificación de especies mediante códigos de barras y análisis filogenético (Schoch et al., 2012).

A pesar de que esta región se desempeña bien como un marcador molecular fúngico, ha sido objeto de debate, debido a las secuencias de ITS idénticas en diferentes especies de complejos de género lo que hace que la tipificación molecular sea limitada. Por ejemplo, la identificación de especies micotoxigénicas críticas, industriales y de importancia médica. Otra importante desventaja es que la región ITS no funciona adecuadamente en algunos géneros altamente específicos, debido a que estos taxones tienen espacios de código de barras pequeños o nulos en sus regiones ITS (Badotti et al., 2017); por lo que el uso de un segundo marcador es necesario para completar el estudio y arrojar resultados más concisos en cuanto a la identificación de las especies fúngicas aisladas a partir de la rizosfera de *E. pycnophylla* en el Páramo de Paja Blanca. A continuación, se especifican los marcadores secundarios usados para identificación.

Los marcadores de códigos de barras de ADN parcialmente universales son generalmente secuencias de ADN codificadoras de proteínas, estas secuencias son altamente conservadas entre grupos fúngicos relacionados lejanamente, pero pueden contener intrones cortos que pueden ser extremadamente variables en la posición y el número de inserción. Esta variación de secuencia en intrones puede usarse como marcadores complementarios para diferenciar especies y subespecies de hongos estrechamente

relacionadas y así aprovecharlos como marcadores de código de barras de hongos (Singh & Kumar, 2017). Generalmente pueden variar o ser más eficientes en determinados géneros de hongos, han sido usados en la sistemática para construir filogenias moleculares, ayudar en la identificación y clasificación de los taxones y aportar al ensamblaje del árbol fúngico de la vida (Iglesias, 2019).

Entre las principales ventajas del uso de esta región es que los ITS están entre los marcadores con el mayor número de identificaciones correctas para un grupo muy amplio de hongos muestreados, reconociéndose como un código de barras fúngico adecuado. Además, la mayoría de estudios metagenómicos utilizan secuenciación moderna que puede ayudar en la identificación rápida de hongos sin la necesidad de clonar los amplicones o poseer información genómica previa (Dentinger et al., 2011). En cuanto a la identificación molecular de hongos basada en ITS es muy usada debido a la fácil amplificación por PCR inclusive a partir de cantidades bajas de ADN ya que su tamaño es relativamente corto de aproximadamente una 500 a 800 pb cuando se utiliza cebadores ITS1 y 4 (Crous et al., 2015; Singh & Kumar, 2017). Por consiguiente, el presente estudio hace uso de esta importante herramienta para esclarecer la identificación y apoyar las descripciones morfológicas.

Entre los marcadores codificantes de proteínas están las subunidades 1 y 2 de la ARN polimerasa II nuclear, la subunidad más grande RPB1 pesa entre 180 y 210 kDa y la RPB2 pesa de 130 a 150 kDa. Estos genes transcriben los ARNm del núcleo, su evolución es muy limitada y en consecuencia lenta, por lo que a pesar de ser un marcador de tipo ADN fingerprint no es utilizado para definir hasta nivel de especie, sino que se constituye como un marcador secundario para resolver niveles taxonómicos superiores (Liu et al., 2006).

Otro marcador proteico es el factor de elongación de la traducción 1- α (tef1), el cual es una zona rica en intrones que actúa en el acople del aminoacil tRNA al sitio A del ribosoma y controla la velocidad de la síntesis, esto ocurre durante la fase de elongación de la cadena proteica. Se usa ampliamente en filogenia y en micología ya que tiene el mejor potencial para servir como marcador secundario. Entre los principales géneros que se han identificado exitosamente con esta región están: *Trichoderma*, *Fusarium*,

Lecanicillium, *Asteromassaria*, *Arthrinium*, *Botrytis* y *Candida*. Las secuencias génicas de esta región por lo general se amplifican mediante los cebadores EF1-1018F y EF1-1620R (O'Donnell et al., 2010; Serna et al., 2018; Stielow et al., 2015).

La calmodulina CaM modula la señalización del calcio intracelular ya que pertenece a una vasta familia de proteínas de unión al calcio y actúa sobre varias vías metabólicas y la regulación de la expresión, es una proteína altamente conservada que generalmente es codificada por un gen de uno a 15 kb y en los hongos actúa en la diferenciación y la formación de los tubos germinativos (Carvalho et al., 2003). También pertenece a este grupo de marcadores y es usado con fines de discriminación entre las especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Talaromyces*, su amplificación se logra mediante los iniciadores CL1/CL2 y CL3/CL4 (Raja et al., 2017).

La región génica que codifica para actina ACT proteína indispensable para el crecimiento de las hifas, también se utiliza como complemento en la identificación. Para secuenciar esta zona se usan los primers ACT-512F y ACT-783R (Stielow et al., 2015). Genes mitocondriales como COX multicopia I y COX II y su región intergénica se reportan como herramientas para alcanzar una discriminación profunda de los nodos terminales de la filogenia fúngica y dilucidar problemas taxonómicos en el género *Fusarium*, *Candida*, *Microdochium* y *Alternaria* (Raja et al., 2017).

En este orden de ideas otro importante marcador en el gen de la β -tubulina contiene una secuencia 3,5 veces con más información filogenética que el gen SSU rRNA, por lo que se ha informado que este gen es ideal para el análisis de filogenias de nivel profundo y resolutivo a nivel de especie (Hsun et al., 2009). En la presente investigación se decidió utilizar la zona génica codificante para β -tubulina (tub2), para inferir relaciones taxonómicas y filogenéticas, ya que la gran mayoría de géneros reportados morfológicamente se encuentran descritos molecularmente con esta región, tales como *Penicillium* en el cual está bien estudiado que es útil para esclarecer su taxonomía hasta el nivel de especie; también ha sido usado en géneros como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Torula*, *Botrytis*, *Isaria*, *Alternaria*, *Clonostachys* y

Mucor (Majid et al., 2015; Abreu et al., 2014; Visagie et al., 2014). Además, según un estudio de perfiles filogenéticos el gen codificante para β -tubulina muestra un perfil informativo alto (Townsend, 2007).

El análisis de una segunda región, como lo es el gen de la β -tubulina, que según Gonzales y colaboradores (2012) es necesario para complementar los análisis y asegurar una identificación adecuada; ya que este gen codifica para la proteína que constituye los microtúbulos de las células eucariotas y a pesar que esta proteína es altamente conservada, la comparación de regiones intrónicas permite establecer diferencias entre individuos de una misma especie (Garzón, 2013). Otra gran ventaja de este marcador es que al ser la beta tubulina una proteína implicada en la forma celular proporciona apoyo molecular para descripción de especies basadas en fenotipos (Walker et al., 2012).

Extracción de Ácidos Nucleicos

La extracción de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) es el primer paso hacia la realización de la mayoría de las metodologías de biología molecular. Pueden obtenerse a partir de innumerables tipos de tejidos y células, existiendo así una infinidad de protocolos para la realización de tal procedimiento. La elección del protocolo dependerá de factores como tipo de tejido, grado de pureza e integridad de la muestra (Kreebs et al., 2014).

El proceso de extracción de ADN consiste en dos etapas. La primera, es la extracción propiamente dicha y consiste en primer lugar en la realización de un proceso físico de maceración para procesar con mayor facilidad el tejido y realizar posteriormente la lisis o rompimiento de las membranas y paredes celulares por la acción de detergentes como el SDS (dodecil sulfato de sodio) y CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) que traen como consecuencia la exteriorización del ADN. La segunda fase consiste en la purificación del ADN para separarlo de los otros componentes celulares como restos de membrana, proteínas y ARN mediante la acción de enzimas de digestión, para posteriormente proceder a la precipitación garantizando así la máxima pureza del ácido nucleico. Este proceso generalmente se hace utilizando alcohol (etanol o isopropanol) que, en presencia de cationes monovalentes, promueve una

transición estructural en la molécula, resultando en agregación y precipitación de la biomolécula (Simoni & Almeida, 2003).

La extracción de ADN en organismos fúngicos presenta algunos inconvenientes ya que la estructura de su pared celular es altamente compleja. Está compuesta por una capa de quitina, 1,3- β -D-glucano, 1,6 β -glucano, lípidos y péptidos. Algunas especies fúngicas presentan una capa superficial de melanina que es altamente resistente a la luz UV, perjudicando la revelación en gel de agarosa, y también resistente a la digestión enzimática y la descomposición química. Estas características físicas han impedido el desarrollo de un método único de extracción de ADN. Por tanto, muchos de los protocolos usados utilizan una variedad de métodos para lisar las células, incluyendo enzimas de digestión, tales como la proteinasa K, la liticasa y lisozimas; tratamiento con productos químicos alcalinos, detergentes y los xantogenatos, los cuales también se han reportado para producir grandes cantidades de ADN de buena calidad. Existen también en el mercado gran variedad de kits para extracción de ADN en estos organismos (Santos et al., 2007).

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es un método que simula in vitro el proceso de la replicación del ADN. Convirtiéndose así en una herramienta mundialmente estandarizada y usada en la biología molecular, que consiste en la síntesis dirigida de millones de copias de moléculas de ADN en minutos. La principal ventaja de esta técnica es que el estudio del ADN ya no está restringido a las concentraciones o a sus propiedades químicas naturales. La PCR posibilita entonces la amplificación de secuencias de ADN que están presentes en mezclas complejas y permite varios estudios, tales como el desarrollo de métodos de diagnóstico altamente sensibles y específicos, obtención de grandes cantidades de ADN para secuenciación y análisis sobre la diversidad genética de poblaciones entre muchos otros (Oliveira et al., 2007; Peña, Ramírez, & Figueroa, 2013).

Análisis Filogenético

Este tipo de análisis es una importante herramienta para estudiar la historia evolutiva, ecología, biotecnología y taxonomía de los organismos, ya que se ha identificado un gran número de especies de hongos ayudando a los científicos a comprender la naturaleza críptica de muchos grupos de hongos patógenos clasificados en el orden Pleosporales como *Alternaria*, *Phoma*, *Coniothyrium*, *Paraconiothyrium* y *Paraphaeosphaeria* (Ariyawansa et al., 2020). Una filogenia es la historia de la división de las especies inferida a través del tiempo (Rincón, 2014). Existen dos tipos de caracteres los ancestrales o primitivos y los derivados los cuales son los más recientes, estos fueron denominados por Willi Hennig reconocido como el padre de la sistemática. El criterio mayor del concepto filogenético es que las especies deben ser unidades monofiléticas que compartan caracteres derivados, también llamados sinapomorfías (Montes et al., 2003). El análisis filogenético en hongos es especialmente útil debido a que en la mayoría de casos no es suficiente con la identificación morfológica y un solo análisis no es suficiente para aproximarse a su adecuada identificación. Además, el uso del concepto filogenético de especie ha sido propiciado por los cambios en la sistemática tradicional e introducido, principalmente, por el uso e incorporación de las técnicas de biología molecular (Townsend, 2007).

Marco de antecedentes

Medina (2009), describe por primera vez síntomas de enfermedad en frailejones del Parque Nacional Natural Páramo de Chingaza, específicamente en la especie *Espeletia grandiflora*, los cuales son el cambio de color, entorchamiento de las hojas, y apariencia necrótica en los tallos; la investigadora teniendo en cuenta los síntomas de enfermedad atribuye estos daños principalmente a insectos en estado inmaduro o de larva que son capaces de establecer la relaciones de herbivoría, o a hongos fitopatógenos. Gracias a estas primeras observaciones se derivaron otros estudios como el de González (2012) sobre la composición de hongos entre frailejones sanos y enfermos para establecer la relación entre estos y la grave afectación, comparando las hojas de veinte individuos con síntomas y hojas de individuos sanos de *Espeletia argentea* en el PNN Chingaza en donde se aislaron e identificaron los hongos endófitos de dos

rangos altitudinales diferentes, revelando que no se encontraron diferencias entre las altitudes ni entre el estado de los frailejones.

También existe un estudio de la identificación de hongos asociados a lesiones de frailejones (*Espeletia sp*) en páramos de Cundinamarca, asociados principalmente a cuatro lesiones las cuales son: homosis, abdosis y mertesis, síntomas que se han evidenciado y reportado en los últimos años en frailejones en diferentes páramos de Colombia, en este estudio se colectó las hojas de frailejones con sintomatología, estos morfotipos de hongos obtenidos fueron identificados morfológicamente por medio de claves taxonómicas y por medio del uso de técnicas de biología molecular. Como principal resultado se obtuvieron 33 morfotipos de hongos correspondientes a 18 géneros distintos; posteriormente se realizó también pruebas de patogenicidad para determinar si los hongos son los causantes de las afectaciones, encontrando que de los morfotipos evaluados solo *Fusarium avenaceum*, *Curvularia sp* y *Epicoccum nigrum* reprodujeron una de las lesiones (homosis), por consiguiente la autora sugiere como parte de sus conclusiones que estas especies podrían estar implicadas en la afectación de esta importante especie (Gaitán, 2018).

En las limitantes para la restauración ecológica de los páramos en Colombia: Transformación y herramientas para su conservación, se describen síntomas como en el consumo y pérdida del meristemo, entorchamiento y deformación de las hojas, cambios de coloración hacia el amarillo, herbivoría de aproximadamente el 50% de las hojas y pudrición del tallo de individuos vivos; los autores reportan además que la consecuencia más grave de estos síntomas es que en aproximadamente ocho meses el individuo muere, ellos observan además que la distribución continua y homogénea de este organismo es una de las características a tener en cuenta para la propagación del posible agente causante (Cabrera & Ramírez, 2014).

Otro importante estudio fue la evaluación de microbiota rizosférica de *Espeletia spp.* de los páramos de santa Inés y de Frontino Urrao en Antioquia, Colombia, donde las investigadoras determinaron las poblaciones microbianas cultivables en el suelo rizosférico de *Espeletia spp* que tenían

importancia funcional como dinamizadores de nutrientes, encontrando hongos solubilizadores de fosfato y degradadores de celulosa (Lizarazo & Gómez, 2015).

En Nariño se han realizado también estudios de la microbiota fúngica de las hojas, tallos e inflorescencias de los frailejones con síntomas de enfermedad en el Páramo de Paja Blanca, caracterizando los morfotipos tanto morfológica como molecularmente por medio de la amplificación de la región ITS, encontrando géneros de hongos como *Clonostachys*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Diaporthe*, *Sordaria*, entre otros (Flórez et al., 2019). Por otro lado, se realizó también el estudio de hongos detectados en la entomofauna asociada a *Espeletia pycnophylla* logrando aislar hongos, como *Fusarium oxysporum*, *Botrytis* sp., *Epicoccum nigrum*, *Cladosporium* sp., a partir de estructuras de los géneros de insectos *Neomyopites* sp., *Diabrotica* sp., *Bradysia* sp. y *Dyscolus* sp. (Galindez et al., 2020).

Benítez (2018) Realizó la identificación morfológica de morfotipos aislados a partir del complejo rizosférico de *E. pycnophylla* en el páramo de Paja Blanca encontrando morfotipos los cuales se clasificaron morfológicamente en los siguientes géneros: *Fusarium*, *Phaeoacremonium*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Isaria*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Moniliella*, *Helicomyces*, y *Torula*.

Burbano y colaboradores en el 2020 liberaron el preprint de un artículo titulado: declive y muerte de los frailejones en los ecosistemas alpinos de los Andes del Norte: Modelo Conceptual Decline, en el cual se describen los problemas fitosanitarios que se han reportado en especies del género *Espeletia* en la última década y se plantea un modelo conceptual donde se organiza la información disponible planteando tres hipótesis con el fin de despertar el interés por comprender la causa o causas de estas afectaciones y desarrollar estrategias de manejo y control de los posibles patógenos involucrados (Burbano et al., 2020).

Materiales y Métodos

Identificación Molecular

Aislamiento y obtención de los hongos

Los hongos del presente estudio se obtuvieron del estudio previo de Benítez y colaboradores (2019), para lo cual se seleccionaron tres parches de frailejónal-pajonal en cada sitio y en ellos se realizó tres muestreos dirigidos de seis frailejones entre 30 cm y un metro que sufrían muerte ascendente en el páramo de Paja Blanca (tabla 1). De cada frailejón y con herramientas estériles se extrajo suelo rizosférico a 30cm de profundidad y se cortaron trozos de raíces medias, basales y apicales de partes cercanas a la superficie y se transportaron al laboratorio de genética y evolución de la Universidad de Nariño.

Tabla 1

Ubicación y condiciones de muestreo

Muestreo	coordenadas	Altitud m.s.n.m.	Temperatura	Humedad relativa %
1	N 0°57'39" W 077°34' 59,8"	3355 m.s.n.m.	16	84
2	N 0° 57' 40'' W 077°35' 5,4"	3370 m.s.n.m.	11	50
3	N 0° 57' 51,9'' W 077°35' 3,2"	3324 m.s.n.m.	17	60
4	N 0° 57' 51,9'' W 077°35' 3,2"	3433 m.s.n.m.	15	70

El aislamiento de los hongos se realizó por medio de diluciones desde 10^{-1} a 10^{-6} , inoculando en agar PDA+Rifampicina 0,1ml de las últimas cuatro disoluciones a 13 y 17°C por seis días. se separaron las distintas colonias para su identificación (Benítez et al., 2019).

Para aislar hongos endorizosféricos se cortaron de cuatro a cinco trozos de raíces basales, medias y apicales de aproximadamente 2 mm, las cuales se lavaron con agua destilada y se sumergieron en Hipoclorito de Sodio al 3,5% por 5 minutos que posteriormente se sembraron por triplicado en agar bacteriológico sin nutrientes (Pinotelli, Grixolli, & Moraga, 1996). Las muestras se almacenaron a una temperatura de 18°C durante 15 días, luego se sembró cada colonia encontrada en agar PDA con antibiótico hasta que ésta presentara estructuras reproductivas para su identificación morfológica macro y microscópica. En total se aislaron 65 morfotipos clasificados en 30 géneros y conservados en glicerol al 30% (Benítez et al., 2019; I. Oliveira et al., 2011).

Se reactivaron los aislados que se encuentran conservados en el laboratorio del grupo de investigación de genética y evolución de organismos tropicales aisladas de la rizósfera de *E. pycnophylla* por Benítez y colaboradores (2018) en agar PDA + rifampicina, adicionalmente se realizó un cuarto muestreo complementario de aislamiento siguiendo el protocolo para endorizósfera y ectorizósfera descrito por los mismos autores.

Los cultivos monospóricos se realizaron con la intención de asegurar la confiabilidad, autenticidad y pureza de los morfotipos aislados, en cuanto a la obtención de una población genéticamente homogénea. Se tomó una porción de micelio del hongo de interés en estado puro con el asa microbiológica en un tubo Eppendorf con 1000 µl de agua destilada estéril, posteriormente se agitó en vortex por 15 a 20 segundos para obtener homogeneidad, con una micropipeta se tomó 100 µl de la solución anterior y se trasvasó a un tubo Eppendorf con 900 µl de agua destilada estéril, se llevó igualmente a mezcla por vortex, de esta forma se obtuvo la dilución 10^{-2} , se realizó el mismo proceso para obtener diluciones seriadas hasta obtener una concentración de 50 a 100 esporas por mililitro. Se tomó 100 µl de la última dilución para sembrar por superficie en agar papa dextrosa (PDA) más rifampicina (50 µg/ml), se incubó a temperatura ambiente y se revisaron diariamente hasta observar el leve crecimiento de colonias individuales; cuando se notó el crecimiento de estas, se procedió a cortar y re aislar la colonia

más separada, esta se sembró bajo condiciones de esterilidad en agar PDA+RAM exponiendo el micelio con el agar (Cañedo & Ames, 2004; Mata et al., 2019).

Extracción de ADN

Se utilizaron dos protocolos de extracción de ADN, Wilson (1987) y Gómez (2008) (W y G) y Griffith y Shaw (1998) (G y S), los cuales se describen a continuación:

Método 1 Wilson (1987) y Gómez (2008) (W y G). Con un asa microbiológica estéril se tomó una cantidad de micelio del cultivo monospórico de cada morfotipo de aproximadamente 400 microgramos y se llevó a congelación a menos 20° C por 24 horas. Se añadió 750 µL de una solución tampón Tris-HCl 100mM pH 7.2; EDTA 100mM y dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%, se agitó cuidadosamente manteniendo temperaturas bajas. Posteriormente se agregaron 3 µL de una solución de proteinasa K (20mg/mL) y se agitó cuidadosamente, las muestras se incubaron a 37°C por una hora. Transcurrido este tiempo se adicionaron 100µL de NaCl 5M, posteriormente, se agregó 80µL de una solución CTAB/NaCl (CTAB al 10% en NaCl 0.7 M), se agitó en vortex y se incubaron a 65°C durante 10 min. Luego se agregaron 600 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó y centrifugó a 12000 rpm durante 10min en una centrifuga HERMLE Z233 M-2. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo al que se le incorporó 600µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) agitándolo cuidadosamente después, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo al cual se le añadieron 600 µL de isopropanol para precipitar el ADN; el cual se mantuvo por espacio de una hora en nevera a -20°C, se agitó lentamente por inversión y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Se eliminó el isopropanol y se añadieron 500 µL de etanol frío al 70%; se agitó y se centrifugó nuevamente durante 5 min a 12000 rpm, se eliminó el etanol y las muestras se secaron al vacío. Finalmente, el ADN se resuspendió en 30 µL de agua ultra pura estéril y tres microlitros (µL) de ARNasa (10 mg/ mL) dejándose durante una hora a 37°C (Gomez, 2008; Wilson, 1987).

Método 2 Griffith y Shaw (1998) (G y S). Se tomó una cantidad de aproximadamente 400 microgramos de micelio previamente congelado como se describió en el anterior método y se agregaron 800 μL de buffer CTAB (NaC 11.4 M, EDTA pH 8.0 20 mM, Tris HCl 100 mM pH 8.0, CTAB 2%), se agitó en vortex y se adicionó 1.5 μL de Proteinasa k a cada muestra, se incubó a 65°C por una hora. Se agregaron 600 μL de cloroformo agitando en vortex (10 min), se centrifugó a 12.000 rpm durante diez minutos, se rescató la fase superior y se transfirieron a un tubo nuevo adicionando 600 μL de isopropanol. Posteriormente se dejó en posición vertical a temperatura ambiente durante cinco minutos y se centrifugó a 12.000 rpm (10 min) eliminando el sobrenadante. El pellet fue lavado con un mililitro de etanol (70%), se agitó y se dejó a 65°C durante 20 minutos, luego se centrifugó a 12.000 rpm (10 min) y se dejó a temperatura ambiente durante el tiempo suficiente para remover cualquier traza de etanol. Finalmente, se resuspendió el ADN en 30 μL de agua ultrapura y se agregaron 3 μL de ARNasa (10 mg/ mL) dejándose durante una hora a 37°C (Griffith & Shaw, 1998).

Se verificó la calidad y concentración del ADN mediante lecturas en nanodrop y se almacenó a -20°C.

Amplificación por PCR de la región ITS (espaciador transcrito interno)

La región ITS del ADN de cada morfotipo se amplificó con los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') los cuales fueron sintetizados en Macrogen. La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 30 μL con 15 μL de OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer, 2 μL de ADN a una concentración de 80 a 100ng/ μL , 1 μL de cada primer ITS1 e ITS4 (10 μM) y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final. La amplificación se realizó en un termociclador MyGenie96 Thermal Block, siguiendo los ciclos de temperatura así: desnaturalización inicial a 95 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos, desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, anillamiento a 65 °C por 1 minuto, extensión inicial de 72 °C por 45 segundos y una elongación final a 72 °C por 5 minutos; Para verificar calidad y tamaño de los amplicones se usó una cámara de electroforesis con un marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp

ADN Ladder Thermo Scientific™ en un gel de agarosa al 1.2% con TBE 0.5X más GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, agregando 2µL de producto de PCR. El gel se visualizó con ayuda de un transiluminador (Martínez et al., 2014; Salazar, 2016; Vanegas et al., 2014).

Amplificación por PCR de un fragmento del gen de la β -tubulina

La región de interés se amplificó con los siguientes primers: β 2a (5'GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') y β 2b (5'-CCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') sintetizados en Macrogen; estos amplifican un fragmento del gen de la β -tubulina descritos por Garzón (2013). La reacción de PCR se realizó igualmente con un volumen final de 30µL: 15 µL de de OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer, 2 µL de ADN a una concentración de 80 a 100 ng/µL, 1 µL de cada primer β 2a y β 2b (10 µM). La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos, desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, anillamiento a 64 °C por 1 minuto, extensión de 72 °C por 45 segundos y una elongación final a 72 °C por 5 minutos. La verificación de los productos se realizó de la misma forma descrita anteriormente (Garzón, 2013; Vanegas et al., 2014).

Secuenciación y alineamiento

Los fragmentos se enviaron a CorpoGen para ser secuenciados por método de Sanger. Las secuencias obtenidas se limpiaron y cortaron con ayuda del programa BioEdit para compararse con la base de datos del GenBank mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y estos resultados a su vez se corroboraron con la base de datos moleculares de hongos UNITE. Se uso las secuencias con mayor porcentaje de similitud para cada aislado y se construyó una base de datos para soportar la identidad mediante un árbol filogenético y su respectivo valor bootstrap (NCBI, 2021; UNITE, 2021).

Análisis filogenético y determinación de homología

Para este análisis se separaron las secuencias de los aislados según la clase a la que pertenecen según el porcentaje de identidad arrojado por el BLAST, Se determinó el soporte de la homología de las

secuencias obtenidas mediante un análisis filogenético. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó con el algoritmo Clustal W en el programa Clustal X, se limpió y editó el conjunto de secuencias en AliView y la búsqueda del mejor modelo de sustitución nucleotídica en el programa JModelTest. Este proceso se realizó para cada clase (Sordariomycetes, Letiomycetes, Eurotiomycetes, Dothideomycetes, Agaricomycetes y Mortierellomycetes) (Sinha, 2014). En el paquete MEGA versión 10 se generó un árbol filogenético por método de Máxima verosimilitud (Maximum Likelihood Estimation) con 1000 réplicas de “bootstrap” usando el modelo nucleotídico específico para cada grupo de datos tanto para la región ITS como para las secuencias amplificadas para la región de la beta tubulina.

Revisión y Clasificación de los Géneros Encontrados

Para cada uno de los 23 géneros identificados se consultó datos generales de su taxonomía, ecología y relación con diversas plantas, se revisó artículos científicos, reportes, libros, monografías, fichas técnicas y demás literatura concerniente, si dentro de los géneros existen especies que se han reportado como fitopatógenas, endófitas, biocontroladoras o inocuas para plantas, reportando en general los síntomas asociados comúnmente a cada género.

Resultados y Discusión

Identificación Molecular de los 43 Aislados

Numero de muestras extraídas con cada método

Se logró extraer exitosamente el ADN de 43 aislados, 27 de la ectorrizósfera y 16 de la endorrizósfera. Las tablas 2 y 3 muestran el método de extracción empleado para cada hongo, el protocolo de Wilson (1987) modificado por Gómez (2008) mostró mayor efectividad, logrando la extracción de 30 muestras, 18 cepas aisladas de la ectorrizósfera y 12 de la endorrizósfera; en comparación con el protocolo de Griffith & Shaw (1998), el cual se logró extraer el ADN de 13 cepas 3 pertenecientes a aislados de la endorrizósfera y 10 de la ectorrizósfera. Esto puede deberse a la presencia de distintos metabolitos no identificados producidos por los hongos de diversos géneros. Esto podría explicarse parcialmente ya que con el primer método que se logró obtener el ADN de más muestras utiliza una

solución más concentrada de CTAB y que según Friar (2005) el uso de CTAB ayuda a precipitar selectivamente el ADN, en el Anexo A se profundiza como los diferentes metabolitos producidos por algunos géneros de hongos pueden interferir con la eficiencia del método de extracción (ver Anexo A) (Kang et al., 2018; Ruiz, 2012).

Tamaños de los fragmentos obtenidos de las regiones ITS y β -tubulina amplificados por PCR

Se pudo amplificar la región ITS en las 43 muestras de ADN correspondientes a las cepas aisladas del páramo de Paja blanca obteniendo tamaños entre 322 y 582 pb; con respecto a la región de la β -tubulina se obtuvieron 33 amplicones cuyo tamaño fue variable para cada cepa reportándose valores entre 78 y 598 pb. Aislados con homología a los géneros como *Hyaloscypha*, *Mortierella* y *Leohumicola* no pudieron ser amplificados (N.A) con el uso de los cebadores β 2a y β 2b como se puede ver en la siguiente tabla:

Tabla 2

Comparación de los Tamaños Obtenidos para las Regiones ITS y β -tubulina

Género	Tamaños Fragmento ITS (pb)			Tamaño Fragmentos β -tubulina (pb)		
	Tamaño Obtenido	Reporte Literatura	GenBank	Tamaño Obtenido	Reporte Literatura	GenBank
<i>Paraconiothyrium</i>	489	552	515 a 633	86	N.R	416 a 632
<i>Pezicula</i>	482 a 508	489	560 a 963	353 a 598	411	459 a 910
<i>Hyalopeziza</i>	487	716	537 a 967	377	N.R	N.R
<i>Phialocephala</i>	487 y 560	450 a 491	461 a 616	302	N.R	584 a 690
<i>Allantophomopsis</i>	427	174 a 734	544 a 596	402	N.R	N.R
<i>Pyrenochaetopsis</i>	392	N.R	505 a 712	275	N.R	292 a 669
<i>Clonostachys</i>	492 y 494	501 a 452	504 a 916	309	113	296 a 594
<i>Penicillium</i>	422 y 534	537 a 650	527 a 994	385 y 413	445 a 460	415 a 488
<i>Metapochonia</i>	346 a 480	N.R	612 a 802	181 y 246	N.R	345 a 789

Género	Tamaños Fragmento ITS (pb)			Tamaño Fragmentos β -tubulina (pb)		
	Tamaño Obtenido	Reporte Literatura	GenBank	Tamaño Obtenido	Reporte Literatura	GenBank
<i>Hyaloscypha</i>	504	500	495 a 1237	N.A	N.R	N.R
<i>Tolypocladium</i>	413 a 560	563	494 a 859	285 a 394	140 a 244	616 a 752
<i>Cladosporium</i>	450 a 650	650	509 a 899	297 a 295	408 a 412	303 a 1003
<i>Leptobacillium</i>	435	655	528 a 611	291	N.R	N.R
<i>Microdochium</i>	424	503 a 530	476 a 562	422	723 a 814	531 a 852
<i>Trichoderma</i>	427 y 539	452 a 779	533 a 1147	78 y 285	449 a 445	291 a 615
<i>Mortierella</i>	332 a 536	650	498 a 692	N.A	750	444 y 735
<i>Chloridium</i>	502	N.R	480 a 1139	415	N.R	N.R
<i>Alternaria</i>	451	370 a 560	663 a 1082	297	347 a 352	303 a 756
<i>Bjerkandera</i>	567	650	587 a 827	192	N.R	N.R
<i>Corallomycetella</i>	582	N.R	535 a 557	272	N.R	505 a 640
<i>Leohumicola</i>	522	590 a 628	489 a 590	N.A	N.R	N.R
<i>Keithomyces</i>	562	N.R	602 a 682	295	N.R	383 a 1372
<i>Pyrenochaetopsis</i>	392	394	N.R	275	N.R	352 a 669

Nota: N.R No se encontraron registros, N.A los aislados de estos géneros no amplificaron la región. A continuación se presentan las citas bibliográficas primero las de la región ITS y luego de la β -tubulina por género de la siguiente manera: *Paraconiothyrium*: (Jamali, 2020) y (Ariyawansa et al., 2020) Este último autor no registra los tamaños a pesar de usar los mismos cebadores; *Pezicula*: (De Jong et al., 2001) y (Das et al., 2020); *Hyalopeziza*: (Nakamura et al., 2018); *Phialocephala*: (Addy et al., 2000; J. B. Tanney, 2016) y (Eshel & Beeckman, 2013); *Allantophomopsis*: (Jankowiak et al., 2016); *Pyrenochaetopsis*: N.R; *Clonostachys*: (Demissie et al., 2019) y (Mamarabadi et al., 2008); *Penicillium*: (Demjanová et al., 2021; Samson & Pitt, 2000; Xia et al., 2018) y (Abastabar et al., 2016); *Metapochonia*: N.R; *Hyaloscypha*: (Baral et al., 2009) y N.R; *Tolypocladium*: (Montalva et al., 2019) y (Wang et al., 2020); *Cladosporium*:

(Islam et al., 2019) y (Behr et al., 2013); *Leptobacillium*: (Wang et al., 2020) y N.R; *Microdochium*: ambas regiones (Jewell, 2013); *Trichoderma*: (Martínez et al., 2013; Sánchez et al., 2017) y (Li et al., 2010); *Mortierella*: (Carter et al., 2000) y (Einax & Voigt, 2003); *Melanopsammella*: N.R ; *Alternaria*: (Pavón et al., 2012; Vanegas et al., 2014) y (Lawrence et al., 2013); *Bjerkandera*: (Horisawa et al., 2013) y N.R; *Corallomycetella*: N.R; *Leohumicola*: (Adeoyo et al., 2019) y N.R; *Keithomyces*: N.R y *Pyrenochaetopsis*: (Fan et al., 2020) y N.R.

En la anterior tabla los tamaños reportados para la región ITS en el presente estudio son muy variables aunque muy cercanos a los que se reportan en la literatura y el GenBank, en cuanto a géneros como *Pyrenochaetopsis*, *Metapochonia*, *Chloridium*, *Corallomycetella* y *Keithomyces* a pesar de que se pudo encontrar trabajos académicos donde se identificaron estos géneros con el mismo par de cebadores ITS1 e ITS4 no se reportó para estos los tamaños por lo que en la tabla la casilla de estos géneros se representa como N.R, sin embargo en los reportes del GenBank estos géneros reportaron numerosos registros de secuencias por lo que fue posible la comparación.

Todos los valores comparados fueron similares pero a la vez diferentes con diversidad de tamaños reportados ya que esta región es muy diversa en hongos por lo que cada cepa tiene diferencias no solo en su tamaño si no en la similitud de secuencias, lo que hace de esta región una importante herramienta taxonómica de uso mundial en muchos estudios, por lo que los micólogos la recomiendan para la identificación de especies desconocidas o muestras ambientales grandes (Crous et al., 2015; Walker et al., 2012; Yang et al., 2018). Otra de las ventajas es que al ser el marcador estándar la mayoría de organismos fúngicos se han logrado identificar con base en este fragmento génico, por lo que en el GenBank como se observó en la anterior tabla (tabla 2) reposan miles de secuencias, siendo la base de datos más completa y ampliamente usada en el campo de la micología debido a que este repositorio se encuentra enlazado al archivo europeo de nucleótidos (ENA), al banco de datos de ADN de Japón

(DDBJ) y la base de datos UNITE la cual unifica la identificación taxonómica por alineamiento y corrige anotaciones de los nombres científicos (Badotti et al., 2017).

Géneros como *Hyaloscypha*, *Mortierella* y *Leohumicola* no pudieron ser amplificados con el uso de los cebadores $\beta 2a$ y $\beta 2b$ de la región de la β -tubulina (tabla1). Con base en la consulta en el GenBank y la literatura científica no se encontró ningún registro de esta región para *Hyaloscypha* y *Leohumicola*. Por otro lado, *Mortierella* de cual se reporta su tamaño aproximado de 700 bp en el trabajo de Einax (2003) como único registro en la literatura encontrada y tan solo dos registros en el GenBank para esta región, lo cual puede estar explicando que estos géneros o especies de estos, no tengan capacidad de amplificación con los cebadores usados en este estudio, por lo que no se recomienda como marcador secundario o región candidata a ser utilizada en filogenias para estos taxas.

Las diferencias en tamaños del amplicón influyó negativamente en la realización de filogenias, ya que los tamaños de las secuencias obtenidas para las cepas ER MU1 M1 y SR MU3 M21, con homología a *Paraconiothyrium* y *Trichoderma viride* respectivamente, tuvieron tamaños de 86 y 78 pb por lo cual el programa MEGA X no podía ejecutar los análisis y generar un árbol filogenético. Finalmente, este tipo de análisis se vio afectado por la falta de registros como se puede observar en la tabla 2 y dificultó la obtención de secuencias que sirvieran para comparar y correlacionar los datos de este estudio con los datos teóricos y fortalecer la identificación molecular de los aislados.

Géneros como *Hyalopeziza*, *Allantophomopsis*, *Hyaloscypha*, *Leptobacillium*, *Chloridium*, *Bjerkandera* y *Leohumicola* no registran secuencias en el repositorio del GenBank, por lo que las obtenidas en esta investigación serían los primeros registros de esta región para dichos géneros en la base de datos mundial.

Para los géneros: *Paraconiothyrium*, *Pyrenochaetopsis*, *Metapochonia*, *Hyaloscyphaceae*, *Corallomycetella*, y *Keithomyces* no se encontraron reportes en artículos científicos de otros

investigadores que registren los tamaños de los fragmentos, por lo que en la casilla correspondiente a esta información se diligenció con las siglas N.R (Tabla 2).

La variación significativa de los fragmentos del gen de la β -tubulina, puede ser explicado por estudios de la evolución molecular y divergencia funcional de los diversos tipos de beta tubulina en la construcción del árbol de la vida en hongos demostrando que diversos mecanismos evolutivos pueden estar impulsando la diversificación funcional de los genes tanto de α como β -tubulina en diferentes linajes de hongos, ya que esta proteína al estar implicada en la forma y estructura de estos organismos se ve influenciada por la presión del ambiente y la capacidad de plasticidad de estos organismos para adaptarse a diversos medios (Hsun et al., 2009; Zhao et al., 2014).

Análisis de secuencias e identificación de Aislados

Alineamiento de secuencias de las regiones ITS y β -tubulina mediante la herramienta BLAST

Las tablas 2 y 3 muestran el nivel taxonómico y el porcentaje de identidad obtenidos para cada secuencia, se compara de igual forma los resultados reportados por medio de la caracterización morfológica donde se observa que 5 aislados coinciden con la identificación molecular basada en la región ITS, estos pertenecen a los géneros *Penicillium* (ER_MU3_M14 y SR_MU4_M1), *Clonostachys* (ER_MU3_M4 y SR_MU4_M19) (aislados de la endorizósfera, tabla 3) y *Alternaria* (SR_MU2_M16) (aislado de la ectorizósfera, tabla 4). Mientras que para la región β -tubulina 3 aislados se confirmaron tanto con la región ITS como con la identificación taxonómica a los siguientes géneros: *Penicillium* (ER_MU3_M14 y SR_MU4_M1) y *Alternaria* (SR_MU2_M16).

Tabla 3

Comparación de la identificación morfológica y molecular mediante los marcadores ITS y β -tubulina de los aislados de la endorizósfera

Código Genpat	ID. Morfológica	ID molecular ITS		ID molecular B-tub		M.E
		Género/Especie	% ID	Género/Especie	% ID	
ER_MU1_M7	<i>Torula</i>	<i>Pezicula</i> sp	99,80	<i>Sclerotinia nivalis</i>	85	W y G
ER_MU1_M15	<i>Corynespora</i>	<i>Pezicula</i> sp	98,51	<i>Sclerotinia nivalis</i>	80,57	W y G
ER_MU1_M6	<i>Torula</i>	<i>Pezicula</i> sp	99,79	<i>Sclerotinia nivalis</i>	80,90	W y G
ER_MU1_M12	<i>Torula</i>	<i>Pezicula</i> sp	97,12	<i>Sclerotinia nivalis</i>	87,57	G y S
ER_MU1_M2	<i>Helicomyces</i>	<i>Pezicula</i> sp	100	<i>Phaeohelotium</i> sp	89,52	G y S
ER_MU4_M5	<i>Moniliaceae</i>	<i>Metapochonia suchlasporia</i>	99,42	N.A	---	W y G
ER_MU1_M17	<i>Torula</i>	<i>Mollisia</i> sp	98,96	N.A	---	W y G
ER_MU2_M22	<i>Periconia</i>	<i>Phialocephala bamuru</i>	99,14	<i>Phialocephala</i> sp	84,38	W y G
ER_MU1_M5	<i>Dematiaceae</i>	<i>Phialocephala bamuru</i>	99,57	N.A	---	G y S
ER_MU1_M4	<i>Torula</i>	<i>Hyalopeziza</i> sp	92,52	<i>Catenulifera</i> sp	87,19	W y G
ER_MU4_M14	<i>Rhizoscyphus</i>	<i>Hyaloscypha</i> sp	97,83	N A	---	W y G
ER_MU3_M14	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>	98,50	<i>Penicillium polonicum</i>	99,52	W y G
ER_MU3_M4	<i>Clonostachys</i>	<i>Clonostachys</i> sp	99,59	<i>Clonostachys pseudocholeuca</i>	97,09	W y G
ER_MU1_M13	<i>Torula</i>	<i>Allantophomopsis</i> sp	98,83	<i>Phacidiopycnis washingtonensis</i>	88,18	W y G
ER_MU1_M1	<i>Helicomyces</i>	<i>Paraconiothyrium</i> sp	97,25	<i>Paraconiothyrium</i> sp	96,66	G y S
ER_MU2_M10	<i>Torula</i>	<i>Pyrenochaetopsis leptospora</i>	100	<i>Pyrenochaetopsis leptospora</i>	97,46	W y G

Nota: N.A, se usó cuando no se logró obtener el aplicón de los aislados, (%Id) porcentaje de identidad y (M.E) método de extracción de ADN, (W y G) Wilson, 1987 y modificado por Gómez, 2008 y (G y S) Griffith & Shaw, 1998.

Tabla 4

Comparación de la identificación morfológica y molecular mediante los marcadores ITS y β -tubulina de los aislados de la ectorizósfera

Código Genpat	ID. Morfológica	ID molecular ITS		ID molecular B-tub		M.E
		Género/Especie	% ID	Género/Especie	% ID	
SR_MU1_M8	Moniliaceae	<i>Tolypocladium</i> sp	95,91	<i>Plectosphaerella</i> sp	87,04	W y G
SR_MU1_M3	Oomycete	<i>Tolypocladium</i> sp	97,39	<i>Tolypocladium</i> sp	86,71	W y G
SR_MU4_M7	<i>Cephalosporium</i>	<i>Tolypocladium</i> sp	96,65	<i>Plectosphaerella</i> sp	86,60	W y G
SR_MU1_M9	<i>Pythium</i>	<i>Trichoderma</i> sp	99,77	<i>Trichoderma</i> sp	96,14	G y S
SR_MU3_M21	<i>Geotrichum</i>	<i>Trichoderma viride</i>	99,53	<i>Trichoderma viride</i>	98,72	W y G
SR_MU1_M14	<i>Botrytis</i>	<i>Cladosporium</i> sp	100	<i>Cladosporium</i> sp	100	W y G
SR_MU3_M4	<i>Botrytis</i>	<i>Cladosporium</i> sp	99,60	<i>Cladosporium</i> sp	98,97	W y G
SR_MU3_M9	Dematiaceae	<i>Cladosporium</i> sp	98,50	NA	---	W y G
SR_MU4_M22	Dematiaceae	<i>Cladosporium halotolerans</i>	100	NA	---	W y G
SR_MU1_M10	<i>Cephalosporium</i>	<i>Metapochonia bulbilosa</i>	100	<i>Metapochonia bulbilosa</i>	85,83	W y G
SR_MU4_M2	Moniliaceae	<i>Metapochonia</i> sp	98,42	<i>Metapochonia bulbilosa</i>	84,68	W y G
SR_MU2_M1	Oomycete	<i>Mortierella basiparvispora</i>	99,10	N A	---	G y S
SR_MU1_M18	Oomycete	<i>Mortierella zonata</i>	100	N A	---	G y S
SR_MU1_M12	<i>Mucor</i>	<i>Mortierella turficola</i>	100	N A	---	G y S
SR_MU1_M11	<i>Trichoderma</i>	<i>Mortierella zonata</i>	100	N A	---	G y S
SR_MU4_M1	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	W y G
SR_MU4_M19	<i>Clonostachys</i>	<i>Clonostachys</i> sp	99,39	NA	---	G y S
SR_MU3_M10	<i>Geotrichum</i>	<i>Bjerkandera adusta</i>	99,47	No tiene Registro	---	W y G
SR_MU3_M12	<i>Isaria</i>	<i>Corallomycete</i> lla repens	98,81	<i>Stromatonectria caraganae</i>	98,51	W y G
SR_MU1_M6	<i>Fusarium</i>	<i>Leptobacillium leptobactrum</i>	98,39	<i>Verticillium</i> sp	90,48	W y G

Código Genpat	ID. Morfologica	ID molecular ITS		ID molecular B-tub		M.E
		Género/Especie	% ID	Género/Especie	% ID	
SR_MU4_M13	<i>Verticillium</i>	<i>Keithomyces carneus</i>	94,10	<i>Keithomyces flavoviride</i>	83,06	G y S
SR_MU1_M7	<i>Clonostachys</i>	<i>Microdochium sp</i>	98,36	<i>Microdochium seminicola</i>	94	W y G
SR_MU4_M20	No identificado	<i>Hyaloscyphae sp</i>	94,91	<i>Catenulifera brevicollaris</i>	81,28	W y G
SR_MU2_M16	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>	99,78	<i>Alternaria alternata</i>	99,66	G y S
SR_MU1_M17	<i>Scopulariopsis</i>	<i>Chloridium sp</i>	97,59	<i>Diaporthe citrichinensis</i>	80,75	W y G
SR_MU3_M13	Oomycete	<i>Leohumicola sp.</i>	99,11	N.A	---	W y G
SR MU4 M17	No identificado	Hongo sin clasificar	93,97	N.A	---	G y S

Nota: N.A, se usó cuando no se logró obtener el aplicón de los aislados, (%Id) porcentaje de identidad y (M.E) método de extracción de ADN, (W y G) Wilson, 1987 y modificado por Gómez, 2008 y (G y S) Griffith & Shaw, 1998.

Como parte de la explicación del porqué se presentan varias discordancias con la caracterización morfológica se plantean algunos escenarios:

Variaciones y similitudes de caracteres morfológicos claves en la identificación de los

hongos: para evaluar la morfología de las especies se utilizan tanto características macroscópicas como la tasa de crecimiento, el color, forma, elevación y textura de las colonias; como también las características microscópicas como la forma y tamaño de los conidios, hifas, fiálides cabeza de conidios, conidióforos, esporangios, esporangióforos, esporas, etc. Estas características fueron principalmente utilizadas para tratar de clasificar cada morfotipo aislado de *E. pycnophylla*, sin embargo, existen otras como la producción de pigmentos u otros metabolitos del hongo (Wingfield et al., 2012). Por tanto, existen diversos problemas en la identificación morfológica de hongos ya que los caracteres utilizados para este propósito pueden variar o verse diferentes según las condiciones ambientales y la tasa de crecimiento que a su vez influye en el estadio de desarrollo del hongo al momento de observar (Bosquez, 2018).

Estadios vitales en los hongos: uno de los mayores problemas que se ve reflejado en la caracterización fenotípica y que pudo influir bastante en la identificación errónea es el pleomorfismo presente en los ascomicetos, que se presentaron en su gran mayoría en estado asexual (anamórfico) o no se pudo identificar el estadio en el que se encontraron debido a que no se diferenciaban las estructuras a parte del micelio estos aislados fueron los más difíciles de identificar morfológicamente según los resultados de Benítez y colaboradores (2019) y que por lo tanto su homología de alineamiento con el BLAST no coincidió

No fue posible encontrar especímenes holomorfos (ambos estadios) entre los hongos aislados de la rizosfera de *Espeletia pycnophylla* y que según Wingfield y colaboradores (2012) es el estadio ideal para la identificación fenotípica de hongos, pero generalmente los ascomicetos se encuentran casi siempre en su estadio asexual y en la mayoría de casos tarda mucho o es muy difícil inducir la etapa teleomorfa de estos debido al estrés que puede producir el crecimiento en distintos medios de cultivo, temperatura e intensidad lumínica.

Condiciones de cultivo y su posible influencia en el crecimiento y desarrollo fúngico: al ser hongos aislados del páramo es muy difícil replicar las condiciones ambientales en el laboratorio, por lo que esto puede ser un motivo para que la mayor parte de aislados no desarrollaran suficientes estructuras para una adecuada identificación. Pero como se expresa en el estudio de Wingfield (2012) que dentro de los hongos en estadio asexual existe amplia diversidad de organismos fúngicos que puede tener más de un morfo (sinanamorfo) que pueden estar estrechamente relacionados a nichos ecológicos únicos dificultando de esta manera la taxonomía de estos organismos, llegando a clasificar cada morfo asexual como especies diferentes. El problema va más allá ya que cuando se aíslan con la intención de intentar resolver algún problema de fitopatogenicidad y se describen haciendo uso solamente de caracteres morfológicos pueden atribuirse enfermedades a organismos equivocados haciendo el control y tratamiento inadecuado de enfermedades (Rani, 2013).

Teniendo en cuenta que la mayoría de hongos anamorfos son los que se encuentran con más frecuencia y típicamente representan las formas que producen ciclos repetidos de esporas infecciosas que dan lugar a variedad de patologías. Las formas sexuales de muchos patógenos vegetales de ascomicetos y algunos basidiomicetos pleomórficos se encuentran muy raramente y presentan formas de hibernación más duraderas que a menudo inician nuevas infecciones en determinadas temporadas del año (Sarbu & Csutak, 2019).

Comparación entre la identificación obtenida con los dos marcadores moleculares: de los 23 géneros obtenidos mediante la amplificación de la región obtenida por los primers ITS1 e ITS4 se lograron confirmar mediante el análisis de la región de la β -tubulina 12 géneros 21 familias y 11 órdenes, principalmente porque 13 aislados no consiguieron ser amplificados mediante esta región y los que si registraron porcentajes de similitud por debajo del 90% (tablas 2 y 3). 6 géneros no reportan registros de esta región en la base de datos por lo que la herramienta BLAST los alineó a los géneros que presentaron mayor similitud con esta región, por ejemplo, el género *Pezizula* presentó homología de entre 80,57 a 87,57% de similitud con el género *Sclerotinia*. Este patrón lo presentaron los otros géneros sin registro como puede observarse en las tablas 2 y 3 a excepción del aislado SR MU3 M10 que además de no contar con ningún registro disponible en la base de datos, no tuvo homología con ningún género cercano; este aislado según la homología de la región ITS corresponde a *Bjerkandera adusta* un basidiomiceto perteneciente a la familia Phanerochaetaceae del cual se entra en detalle más adelante.

Los pocos o nulos registros de esta región en la base de datos puede deberse a que como explican Zhao y colaboradores (2014) el gen de la β -tubulina puede ser muy variable dentro de las mismas especies o géneros lo que se logró ver claramente en los tamaños reportados en este estudio. Otro problema relacionado con la relativa baja eficiencia que se logró ver en el alineamiento en el BLAST de las regiones amplificadas para la β -tubulina es que este marcador se eligió basándose en la evidencia teórica de amplificación en los géneros reportados morfológicamente, pero como se pudo observar la mayoría de géneros reportados por este método no fueron encontrados en el análisis con la región ITS y

que para los géneros que no presentan homología clara en el BLAST la literatura no recomienda el uso de β -tubulina como marcador secundario.

Relevancia de los marcadores moleculares en la identificación de hongos rizosféricos de *E.pycnophylla*: Con los resultados obtenidos con las dos regiones se ve la importancia de las herramientas de caracterización molecular que fueron y son de gran ayuda en la complementación de estudios que buscan identificar organismos ya que estas técnicas son rápidas y más precisas (Iglesias, 2019; Stielow et al., 2015).

Importancia de la región ITS como marcador molecular: Se pudo observar en las tablas 2 y 3 la efectividad de la región ITS como marcador de identidad. El uso de secuencias de ADN ha proporcionado nuevos conocimientos sobre las relaciones fúngicas y la biodiversidad, y ha desafiado las clasificaciones taxonómicas tradicionales basadas en la morfología (Sheehan, 2014). Los cebadores universales ITS1 e ITS4 cuya secuencia amplificada de ADN es conservada y se ha utilizado tanto sola como en combinación con otras regiones, como tubulina, actina, factor de elongación, etc., para identificar, caracterizar organismos y realizar análisis filogenéticos de aislados de hongos (Toledo et al., 2013).

Esta región del ARN ribosómico nuclear ha exhibido la mayor probabilidad de identificación correcta para una amplia gama de linajes fúngicos y la brecha de código de barras más claramente definida, por lo que esta zona génica ha sido aceptada como el marcador de código de barras estándar para hongos (Kumar & Shukla, 2005; Singh & Kumar, 2017). Una importante ventaja de este marcador es que la mayoría de las especies fúngicas han sido identificadas con base a esta región genómica, esto puede evidenciarse en las bases de datos mundiales como el GenBank el cual es un repositorio de secuencias ampliamente utilizado por ser completo y contar con los reportes de miles de investigadores alrededor del mundo (Badotti et al., 2017).

A pesar de que las secuencias génicas son una herramienta novedosa ampliamente usada, en el caso de secuencias de ITS de hongos disponibles públicamente en los repositorios, la confiabilidad y calidad de las técnicas varían significativamente (Bidartondo, 2003; Kõljalg et al., 2013). Otra limitante es que se estima que el 50% de las secuencias ITS que se depositan en bases de datos públicas solamente están clasificadas hasta nivel de especie (Schoch et al., 2012) y se ha estimado que cerca del 10% de estas secuencias están incorrectamente anotadas (Nilsson et al., 2006). Sin embargo, la base de datos UNITE ha sido una buena iniciativa que en colaboración con el NCBI han permitidos marcar las secuencias del GenBank con material tipo o de referencia, para minimizar los problemas anteriormente descritos (Federhen, 2015).

Importancia de la región de la β -tubulina como marcador molecular: Se puede observar en las tablas 2 y 3 que no todas las cepas pudieron ser amplificadas con los cebadores $\beta 2a$ y $\beta 2b$ y en la mayoría de registros de la base de datos del NCBI los géneros obtenidos tuvieron porcentajes de identidad menores al 90%. A pesar de que De Jong y colaboradores (2001) demostraron que el análisis de múltiples loci puede proporcionar una mayor resolución y, por lo tanto, hipótesis filogenéticas más confiables en la filogenia fúngica y recomendando el uso de marcadores que codifican proteínas, su uso no es tan generalizado para gran parte de los géneros de este estudio como se pudo observar en la tabla 2 que muchos de estos géneros no contaron con trabajos de investigación previos con el que se pudiera comparar o registros en la base de datos.

Aunque la región no tiene numerosos registros y estudios como ITS los micólogos reconocen que la principal ventaja de usar estos genes que codifican proteínas es que son copias estrictamente únicas en hongos y, por lo tanto, evitan confusiones en comparaciones parálogas, por lo que son sumamente útiles en filogenia (De Jong et al., 2001; Tang et al., 2007).

Análisis Filogenético de la Región ITS

Por medio del porcentaje de identidad de secuencias homologas a las aisladas en este estudio y el análisis filogenético de la región espaciadora transcrita interna se pudo clasificar los organismos de estudio dentro de dos supergrupos basal fungi y Dikarya, en el caso del primer supergrupo se encontraron que solo 4 cepas pertenecen a este grupo (*Mortierella*) como se detalla más adelante, mientras que Dikarya tuvo una alta diversidad con la mayor parte de individuos clasificados dentro del phylum Ascomycota y solo una cepa perteneciente al phylum Basidiomycota.

Dentro del phylum Ascomycota se pudo clasificar los individuos dentro de dos clados: Dothideomyceta y Sordariomyceta. A continuación, se presenta la filogenia de cada clado y clase junto a la respectiva clasificación de los grupos taxonómicos en su gran mayoría hasta el nivel de género.

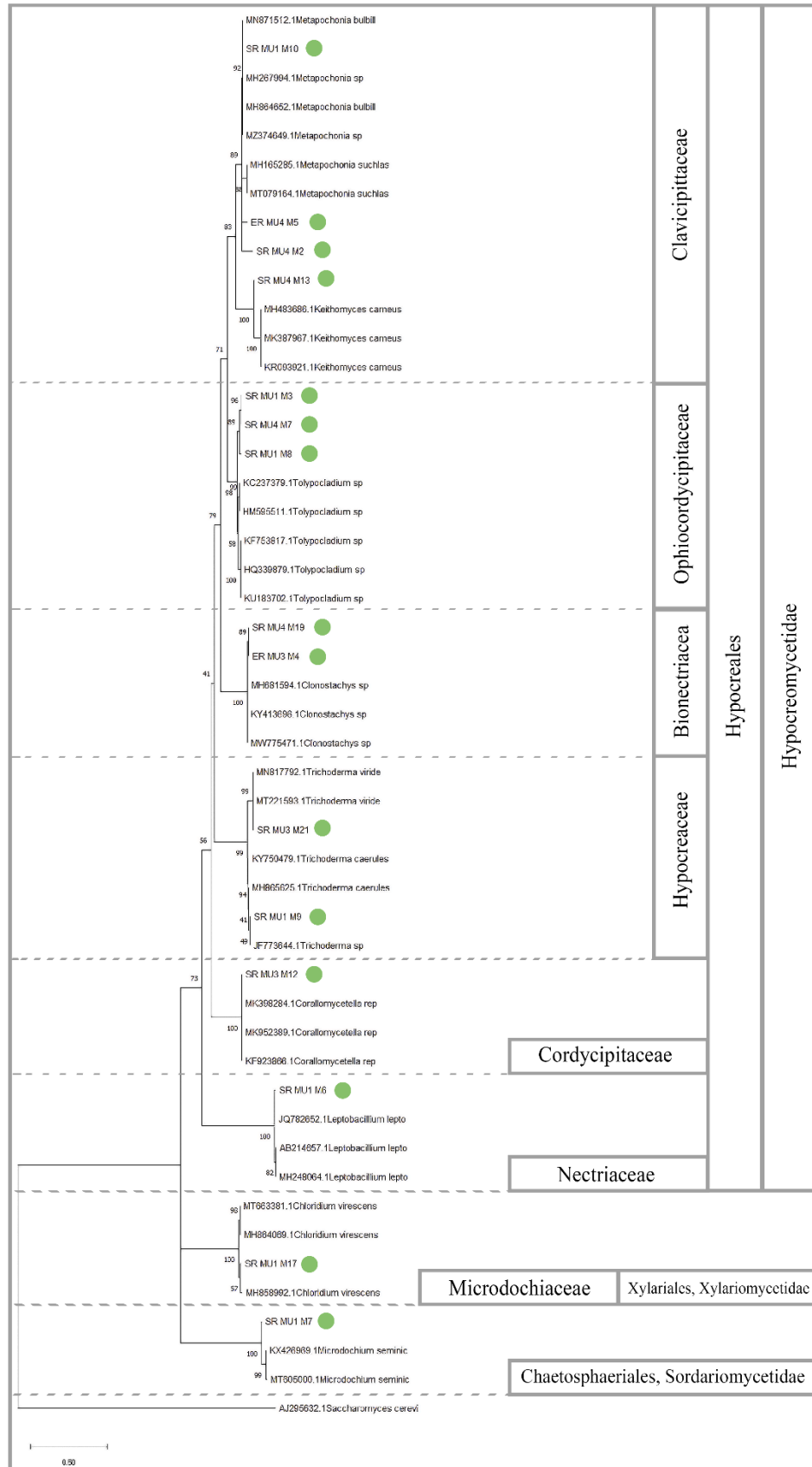
Clado Sordariomyceta

Árbol filogenético de la Clase Sordariomycetes. En cuanto a este clado se pudo determinar por medio de comparación en la herramienta BLAST y la filogenia realizada que los individuos se encuentran dentro de las clases Sordariomycetes y Leotiomycetes.

La clase Sordariomycetes tiene una amplia distribución, los organismos pertenecientes a esta clase se encuentran en ambientes terrestres, aunque se pueden encontrar varios taxones en hábitats acuáticos. Se conocen por presentar géneros patógenos de insectos, mamíferos y plantas (Maharachchikumbura et al., 2016).

Figura 4

Árbol filogenético de la clase Sordariomycetes utilizando la región ITS



Nota: El análisis filogenético se realizó por el método de máxima verosimilitud con el modelo de sustitución GTR+I+G (*S. cerevisiae* como grupo externo), valor de bootstrap para cada grupo homólogo, las cepas del presente estudio se representan por códigos y un círculo verde en frente mientras que el taxon homólogo obtenido del GenBank se representa con código de acceso y nombre.

Fuente: esta investigación

En la figura 4 se puede observar que dentro de la clase Sordariomycetes se encontraron tres subclases Hypocreomycetidae, Sordariomycetidae y Xylariomycetidae de las cuales la primera citada resultó ser la más abundante con familias como Ophiocordycipitaceae, Bionectriaceae, Nectriaceae, Cordycipitaceae, Hypocreaceae y Clavicipitaceae pertenecientes al orden Hypocreales. De las cuales se detallan los géneros y respectivos valores de bootstrap como soporte en la figura 4. Dentro de Sordariomycetidae se encontró que la cepa SR MU1 M17 tiene un excelente soporte con el género *Chloridium* de la familia Chaetosphaeriaceae del orden Chaetosphaeriales.

En el árbol filogenético se observa que las secuencias de la región ITS tuvo buenos valores de bootstrap que soportan la homología de las secuencias obtenidas en este estudio con las reportadas en la base de datos, cabe resaltar que se encuentra numerosa información acerca de esta región en el GenBank con múltiples secuencias que comparten homología lo que sugiere que este marcador es una gran herramienta molecular en el estudio de diversidad de hongos de esta clase. El complemento con el estudio filogenético ayuda mucho más a la inferencia de las secuencias obtenidas en el laboratorio comparadas con las registradas por otros investigadores, los valores fueron muy buenos en todas las cepas aisladas ya que como se observó en las tablas 2 y 3 tuvieron porcentajes altos de identidad y la identificación arrojada por la herramienta BLAST se pudo soportar con estos valores de bootstrap además de poderse observar de forma gráfica la clara distinción del grupo taxonómico al que pertenecen siendo de esta manera mucho más fácil inferir la homología a organismos conocidos y registrados.

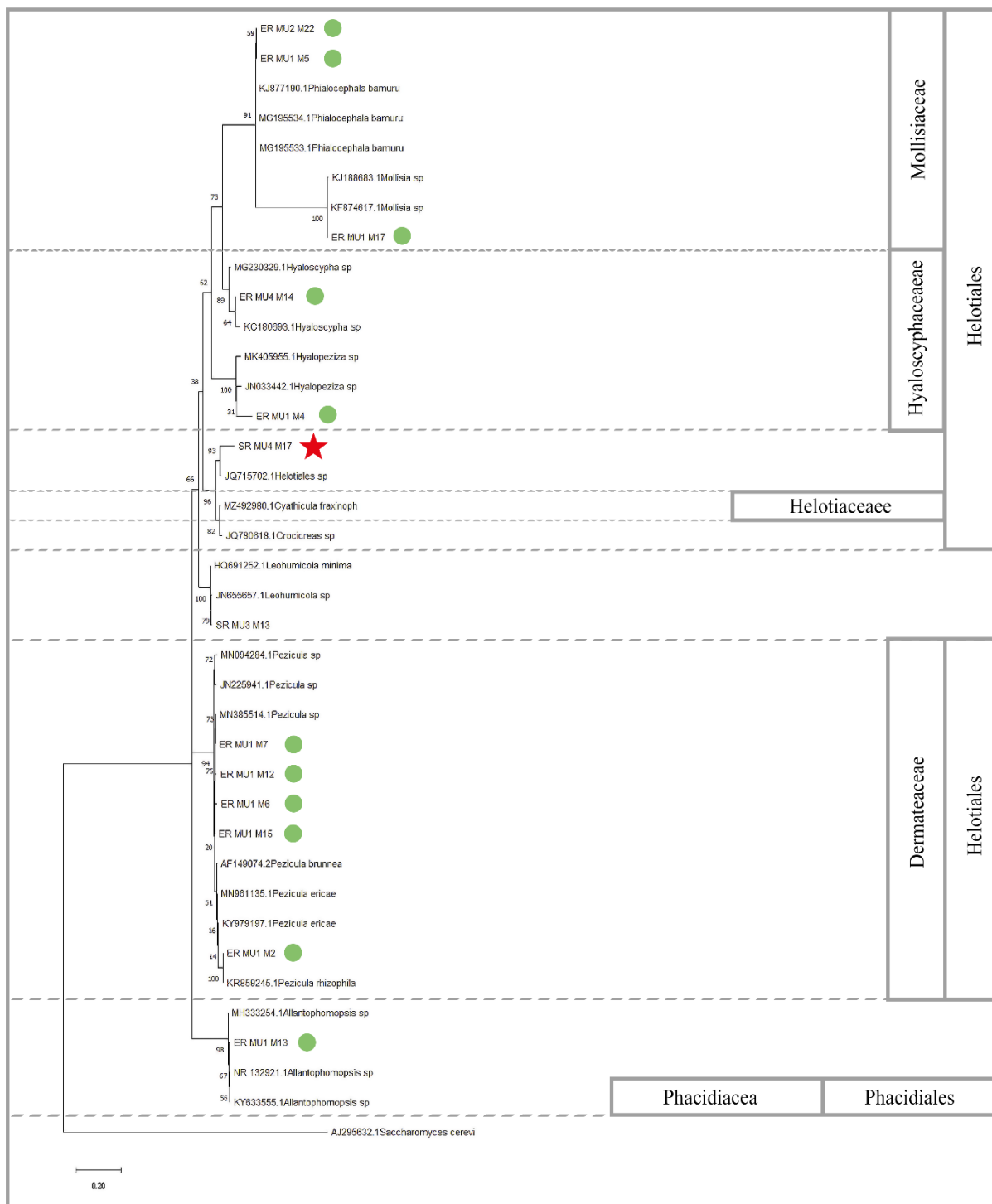
Por otro lado, también se observa que la mayoría de aislados pertenecientes a esta clase fueron aislados de la ectorizósfera y solo dos (ER MU3 M4) y (ER MU4 M5) son organismos aislados de la endorizósfera pertenecientes a los géneros *Clonostachys* y *Metapochonia* de las familias Bionectriaceae y Clavicipitaceae. En cuanto a este análisis también se puede observar una adecuada definición de los niveles taxonómicos de cada aislado desde el género (algunos casos especie) hasta clase, pasando por familia, orden y subclase.

Árbol filogenético de la Clase Letiomycetes. La clase Leotiomycetes es reconocida como una de las más diversas en el subfilo Pezizomycotina, que a su vez es uno de los grupos más diversos dentro de Ascomycota que incluyen formas ecológicamente distintas como las micorrizas, endófitos de raíces y hojas, hifomicetos acuáticos y aeroacuáticos, saprobios y patógenos de plantas. Estos hongos se detectan comúnmente en cultivos de tejido enfermo y en extracciones de ADN ambiental (Johnston et al., 2019).

A continuación, en la figura 5 podemos observar que el orden en el que se clasificaron el mayor número de aislados fue Helotiales con 12 cepas, lo que según Johnston y colaboradores (2019) explican que es común de los Letiomycetes presentar un número notablemente alto de taxones monotípicos, donde Helotiales contiene el mayor número de géneros y alrededor de la mitad de las especies descritas. El segundo orden encontrado hace referencia a Phacidiales y la familia Phacidiaceae, según lo que se puede apreciar en el árbol filogenético (Figura 5) esta familia, a pesar de pertenecer a un orden distinto se ubicó entre las familias Mollisiaceae y Dermateaceae pertenecientes al orden Helotiales, lo que puede ser un claro indicio de que la región ITS no es la más adecuada para la construcción de filogenias o la definición de niveles taxonómicos superiores, ya que al ser Phacidiales un clado hermano del orden Helotiales puede que la comparación de un solo gen no sea suficiente para definir los organismos de esta clase (Crous et al., 2014)

Figura 5

Arbol filogenético de la clase Letiomycetes utilizando la Secuencia parcial ITS



Nota: realizado por el método de Máxima verosimilitud, modelo de sustitución GTR+G (*Saccharomyces cerevisiae* como grupo externo) se muestra el valor de soporte bootstrap para cada grupo homologo, las cepas del presente estudio se representan por códigos y un círculo verde en frente mientras que el taxon homologo obtenido del GenBank se representa con código de acceso y nombre.

Fuente: esta investigación

A pesar de que este marcador no resolvió niveles superiores, se observó que se obtuvo buenos soportes de Bootstrap para definir la homología de los aislados a nivel de género y en cepas como ER MU1 M5, ER MU2 M22 (*Phialocephala bamuru*) y ER MU1 M2 (*Pezicula rhizophila*) hasta el nivel de especie con porcentajes de 80 y 99 respectivamente. Finalmente se destaca el hecho que en esta clase se clasificaron en su mayoría aislados pertenecientes a la endorizósfera (11) a diferencia de la clase Sordariomycetes donde se clasificaron mayor número de aislados de la ectorizósfera. Esto se debe a que esta clase está compuesta por numerosas familias con géneros de hongos endófitos (Ekanayaka et al., 2019).

El aislado ectorizosférico SR MU4 M17 como puede verse en la tabla 4 y el Anexo B no se pudo identificar mediante la caracterización morfológica ni tampoco molecularmente mediante ninguno de los dos marcadores, puesto que con la región ITS se alinea en su mayoría a hongos sin cultivar y sin clasificar y con porcentajes no superiores a 94%. Por otra parte, la región de la β -tubulina no pudo ser amplificada en este aislado utilizando los cebadores β 2a y β 2b. A continuación, se presenta una tabla con las cepas de mayor porcentaje de identidad que arrojó la herramienta BLAST del NCBI.

Tabla 5

Figura 1 Síntomas encontrados en *E. pycnophyllayor* similitud obtenidas de BLAST para el aislado SR MU4 M17 con el nivel taxonomico arrojado

Organismo Asociado	%Id	Código de Accesoión	Nivel Taxonómico
Hongo sin identificar	93,97	KC966005.1	---
Hongo sin cultivar	93,84	KR004903.1	---
Helotiales	93,63	JQ715702.1	Leotiomycetes
<i>Glarea</i> sin cultivar	92,58	MG707596.1	Leotiomycetes, Helotiales, Helotiaceae
<i>Hymenoscyphus monotropae</i>	92,41	KF359569.1	Leotiomycetes, Helotiales, Helotiaceae
<i>Peziza</i> sin cultivar	92,39	MK285798.1	Pezizomycotina, Pezizomycetes, Pezizales; Pezizaceae
<i>Pezizomycotina</i>	92,39	JQ272453.1	Pezizomycotina
<i>Cyathicula fraxinophila</i>	91,91	MZ492980.1	Leotiomycetes; Helotiales; Helotiaceae
<i>Crocicreas</i> sp	91,91	JQ780618.1	Leotiomycetes, Helotiales, Helotiaceae
<i>Dendrospora tenella</i>	90,03	KF730810.1	Pezizomycotina

Además, se observa que la cepa SR MU4 M17 (Anexo C) pertenece al orden Helotiales según el análisis filogenético y no se encontró registro de su clasificación a nivel de familia ya que este orden en la clase Leotiomycetes es el que tiene mayor número de géneros registrados como “incertae sedis” en el rango de familia (Jaklitsch et al., 2016; Luis Quijada et al., 2018; Wijayawardene et al., 2018). Actualmente, Helotiales incluye 26 familias, dentro de las cuales alrededor del 19 al 27% de los géneros tienen una posición incierta a nivel de familia (Jaklitsch et al., 2016).

En un segundo análisis filogenético esta vez se usaron los datos del GenBank (tabla 5) y las secuencias de este trabajo pertenecientes a la clase Letiomycetes, el aislado SR MU4 M17 se volvió a clasificar dentro del orden Helotiales agrupándose con los registros obtenidos de la base de datos. Sin embargo, en este grupo como podemos ver en el Anexo C no se logró definir la familia debido al bajo porcentaje de identidad de las secuencias, tanto de esta investigación como las secuencias obtenidas en el BLAST.

Por consiguiente y descartando que la secuencia del fragmento ITS para este aislado no está en malas condiciones, si no que por el contrario presenta un cromatograma bastante limpio y definido, se puede sugerir como un indicio para estudiar este aislado como una nueva especie, si bien esta región sola no se acepta para la descripción de nuevas especies, su falta de resolución con secuencias de bases de datos mundiales la hace susceptible de analizarse como un organismo de nivel taxonómico específico indefinido por lo que es necesario realizar un análisis molecular multilocus (Aime et al., 2021). Si aun después de este análisis el espécimen continua sin identificar entonces se dispone a realizar una descripción detallada de la especie con evidencia mínima siguiendo el Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (Código de Shenzhen) más actual disponible (Turland et al., 2018).

Información mínima requerida para la descripción de nuevas especies de hongos. a pesar de existir un código la descripción de una nueva especie es única, no existen estándares formales para la descripción e ilustración de especies, pero existen algunos requisitos formales (o "legales") para proponer nombres (Seifert & Rossman, 2010). Por tanto, se conoce que es necesaria la siguiente información: descripción detallada de la macro y micromorfología, el análisis de ADN multilocus, análisis filogenético, análisis quimiotaxonómico y finalmente información de su fisiología, ecología y biogeografía (Aime et al., 2021; Schoch et al., 2012; Seifert & Rossman, 2010; Turland et al., 2018).

Finalmente, para que una nueva especie pueda ser aceptada se debe publicar su descripción completa como artículo científico en una revista de alto impacto que tenga versión impresa, no debe tener igual epíteto de una especie del mismo género y tipo y holotipo deben conservarse en al menos dos colecciones públicas de cultivos reconocidas internacionalmente en continentes distintos.

Dicho lo anterior es entonces necesario definir estos aislados y especialmente el SR MU4 M17 con regiones recomendadas para filogenias a nivel de familia y orden las cuales son LSU y SSU. Sin

embargo, hay que tener en cuenta que la taxonomía en general y en este caso la del reino Fungi está expuesta a continua discusión a medida que nuevas herramientas se aplican (Baral et al., 2015; Johnston et al., 2019) y aun así quedan muchos problemas sin resolver dentro de la clase Leotiomycetes como que la clasificación familiar y a nivel de orden es filogenéticamente poco conocida, especialmente en el orden Helotiales, que es altamente polifilético (Wang et al., 2006).

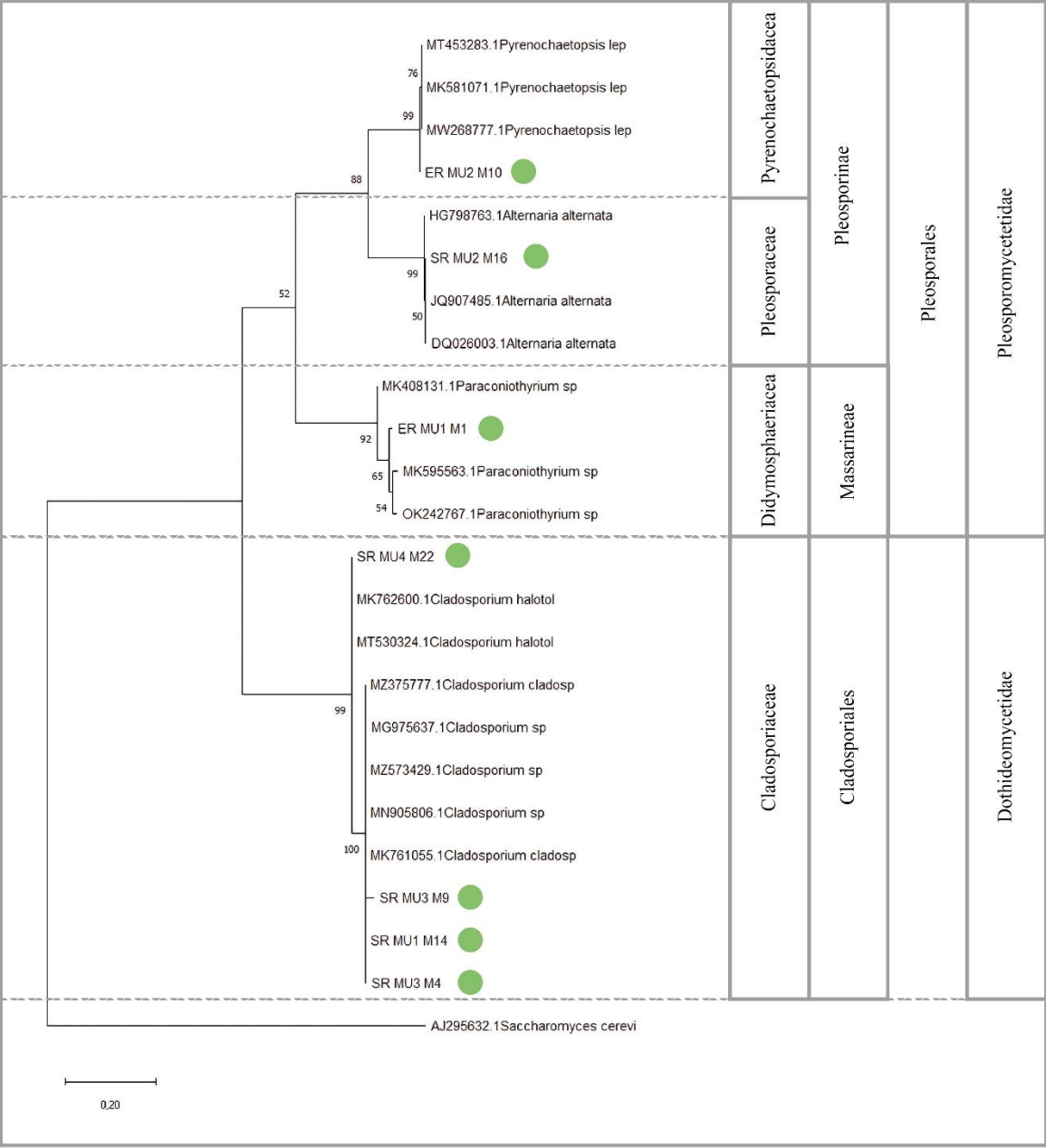
Árbol Filogenético de las Clases Dothideomycetes (Ascomycota) y Agaricomycetes

(Basidiomycota)

Con 22 órdenes, más de 100 familias, 19 000 especies y un sin número de estados sexuales en muchos casos desconocidos, los Dothideomycetes representan la clase más grande de Ascomycota y la clase con mayor número de especies de hongos fitopatógenos, además reporta endófitos o epífitos de plantas, como también saprobiontes que degradan la celulosa y otros carbohidratos complejos en materia vegetal muerta o parcialmente digerida en la hojarasca o el estiércol.

Figura 6

Árbol filogenético de las clases *Dothideomycetes* (*Ascomycota*), *Agaricomycetes* (*basidiomycota*) de la región ITS

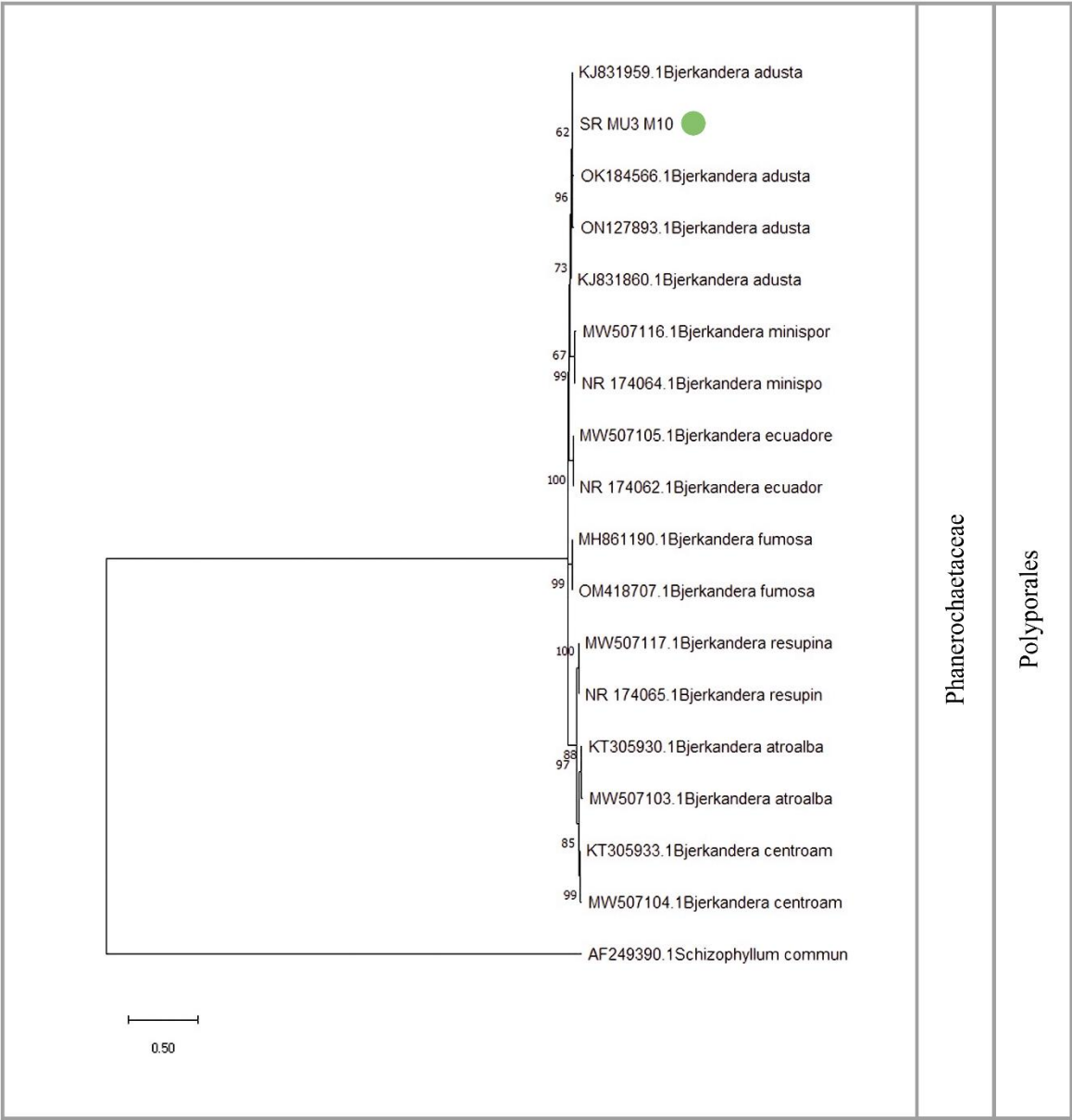


Nota: realizado por el método de Máxima verosimilitud usando el modelo de sustitución GTR+G (S. *cerevisiae* como grupo externo), se muestra el valor de soporte bootstrap para cada grupo homólogo, las cepas del presente estudio se representan por códigos y un círculo verde mientras el taxon homologo obtenido del GenBank se representa con código de accesoión y nombre.

Fuente: esta investigación

Figura 7.

Árbol filogenético de la clase Agaricomycetes utilizando la región ITS



Nota: realizado por el método de Máxima verosimilitud usando el modelo de sustitución HKY+G (*Schizophyllum commune* como grupo externo), se muestra el valor de soporte bootstrap para cada grupo homólogo, las cepas del presente estudio se representan por códigos y un círculo verde mientras el taxon homólogo obtenido del GenBank se representa con código de acceso y nombre.

Fuente: esta investigación

La clase Dothideomycetes se encuentra ampliamente distribuida alrededor del mundo con hábitat principalmente terrestre, pero se pueden encontrar de igual forma en ambientes acuáticos dulces y marinos (Crous et al., 2013). Como se pudo observar en la figura 6 los aislados pertenecientes a la clase Dothideomycetes se encuentran en las subclases Dothideomycetidae y Pleosporomycetidae, debajo de esta clase se ubica el árbol filogenético del único aislado perteneciente al filum Basidiomycota subfilo Agaricomycotina cuyo grupo forma la mayor parte de los macromicetos y representan aproximadamente el 20% de todas las especies de hongos descritas (Porter et al., 2008).

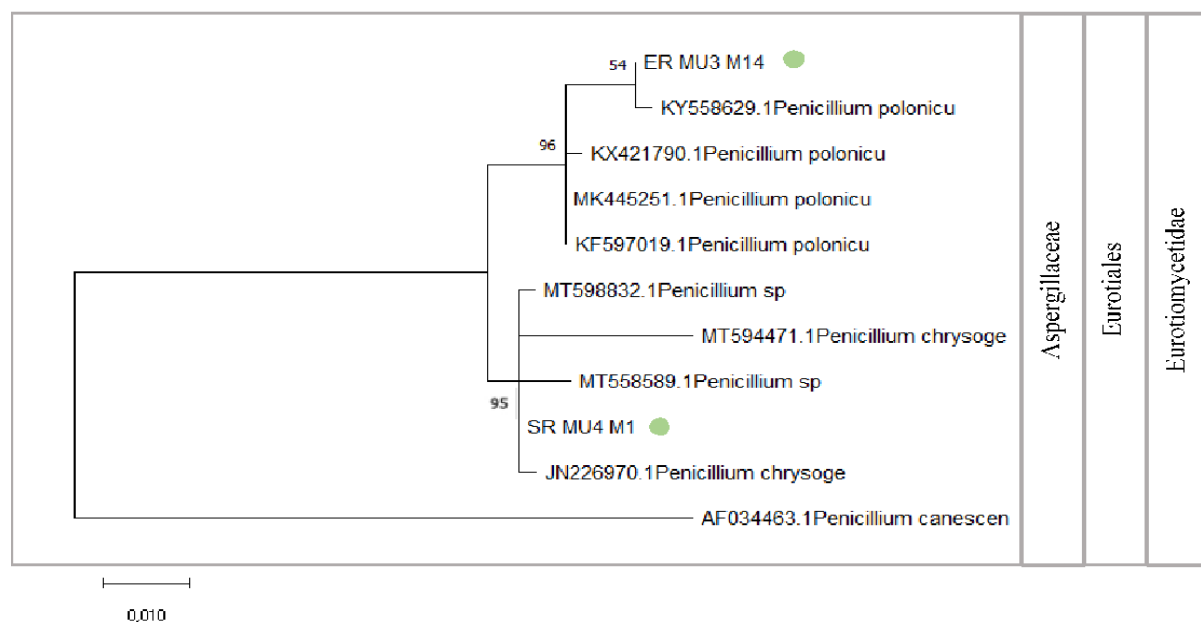
Como se mencionó anteriormente fue posible el aislamiento y secuenciación de una cepa (SR MU3 M10) homologa al phylum Basidiomycota, cabe resaltar que este es el único macrohongo de todas las cepas en estudio y el único asociado a la rizósfera de *E. pycnophylla* reportado en el páramo de Paja Blanca en Nariño.

Como se pudo observar en la figura 6 el género más recurrente fue *Cladosporium* entre la clase Dothideomycetes, seguido de *Paraconiothyrium*, *Pyrenochaetopsis* y *Alternaria*, todas estas cepas soportadas con un buen valor de bootstrap y los géneros y especies de estas dos clases se definieron claramente en el análisis filogenético lo que soportó satisfactoriamente la homología de las secuencias.

Árbol Filogenético de la clase Eurotiomycetes. La clase Eurotiomycetes (Ascomycota, Pezizomycotina) es un grupo monofilético que comprende dos subclases principales Eurotiomycetidae y Chaetothyriomycetidae, dentro de la primera encontramos a la familia Aspergillaceae de amplia distribución, entre sus géneros más reconocidos podemos citar el género *Penicillium* que actualmente contiene 354 especies aceptadas, dos cepas pertenecientes a este género pudieron ser aisladas en el presente estudio. Este importante género es un reconocido contaminante de ambientes por la alta producción y liberación de esporas, puede aislarse de muchos de hábitats como del aire, los ambientes interiores, productos alimenticios, vegetación y del suelo donde sus especies interactúan como descomponedores de materiales orgánicos y produciendo una amplia gama de micotoxinas (Alapont, 2015; Visagie et al., 2014).

Figura 8

Árbol filogenético de la clase Eurotiomycetes de la región ITS



Nota: realizado por el método de Máxima verosimilitud, modelo de sustitución GTR +G (*P. canescens* como grupo externo) se muestra el valor de soporte bootstrap para cada grupo homólogo, las cepas del presente estudio se representan por códigos y un círculo verde, el taxón homólogo obtenido del GenBank se representa con código de acceso y nombre.

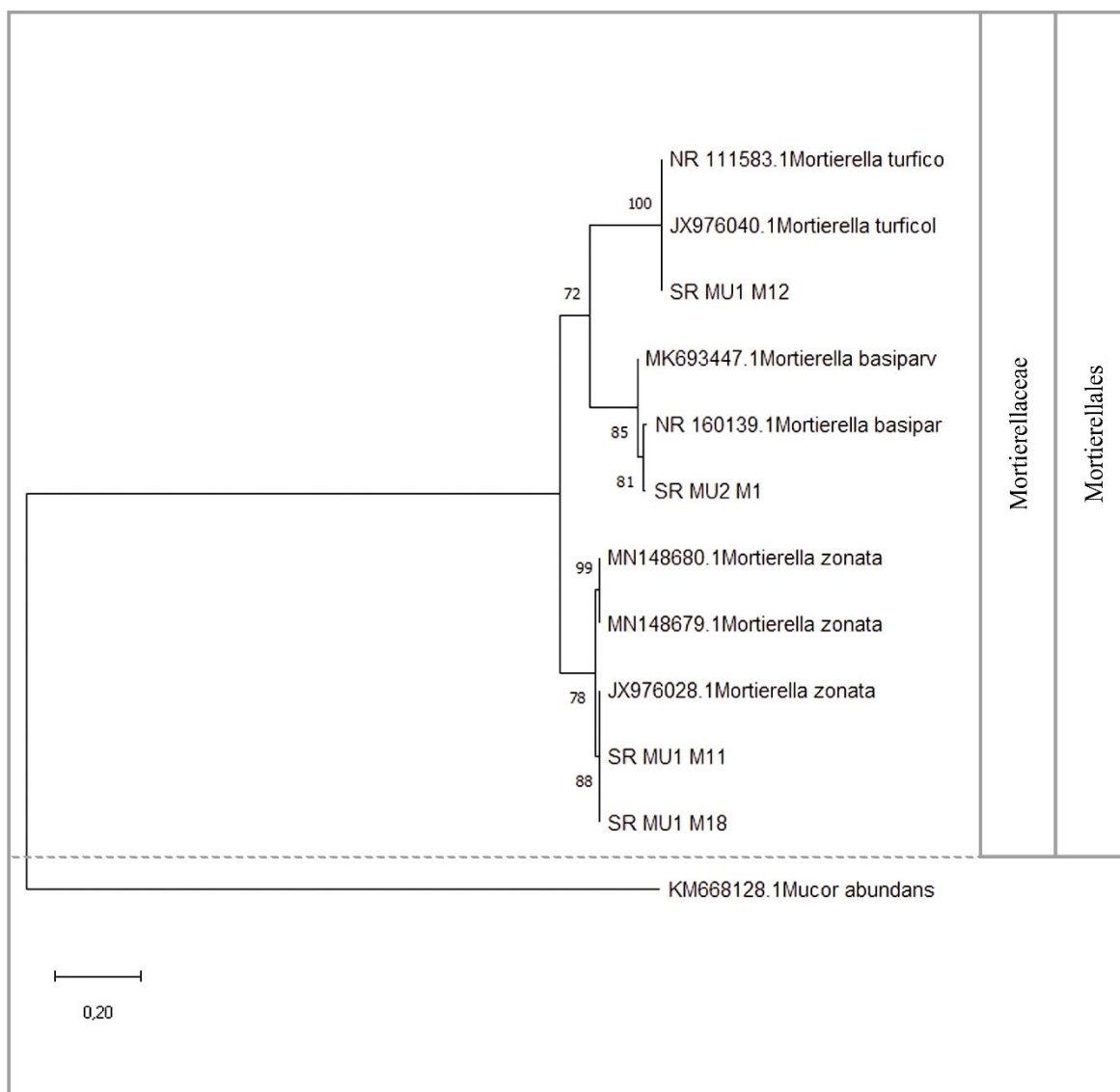
Fuente: esta investigación

En la figura 7 se puede apreciar que las cepas ER MU3 M14 y SR MU4 M1 se ubicaron dentro del género *Penicillium* presentando buenos valores de bootstrap, incluso el primer aislado tiene una homología con la especie *Penicillium polonicum* con un valor de 96 y el segundo un soporte de homología del 95 con *Penicillium chrysogenum*, como outgroup se utilizó un fragmento ITS de la cepa *P. canescens* (MT635310) usada en el trabajo de Alapont (2015). En este punto cabe aclarar que este árbol fue el único en el cual se usó un grupo externo debido a que no se contó con suficientes datos por lo que sin el outgroup no se obtenían los valores de bootstrap que soportaran la filogenia. Para el propósito de este trabajo fue más que suficiente el uso de árboles sin enraizar con grupo externo ya que estos son comúnmente usados en la filogenia molecular e informan que algunos grupos podrían ser clados o podrían ser taxones hermanos y usar esta información en taxonomía (Wilkinson et al., 2007).

Árbol Filogenético de la clase Mortierellomycetes. Esta clase consiste principalmente en hongos micorrízicos, endófitos de raíces y descomponedores de material vegetal, tiene un único orden el cual es de los más abundantes y diversos de los hongos basales y hay cerca de 100 especies descritas en 13 géneros de la única familia Mortierellaceae (Mares et al., 2017).

Figura 9

Árbol filogenético de la clase Mortierellomycetes de la secuencia parcial ITS



Nota: realizado por el método de Máxima verosimilitud, modelo de sustitución TrN+G (*M. abundans* como grupo externo), se muestra el valor de soporte bootstrap para cada grupo homólogo, las cepas del presente estudio se representan solamente por códigos y el taxon homólogo obtenido del GenBank se representa con código de acceso y nombre.

Fuente: esta investigación.

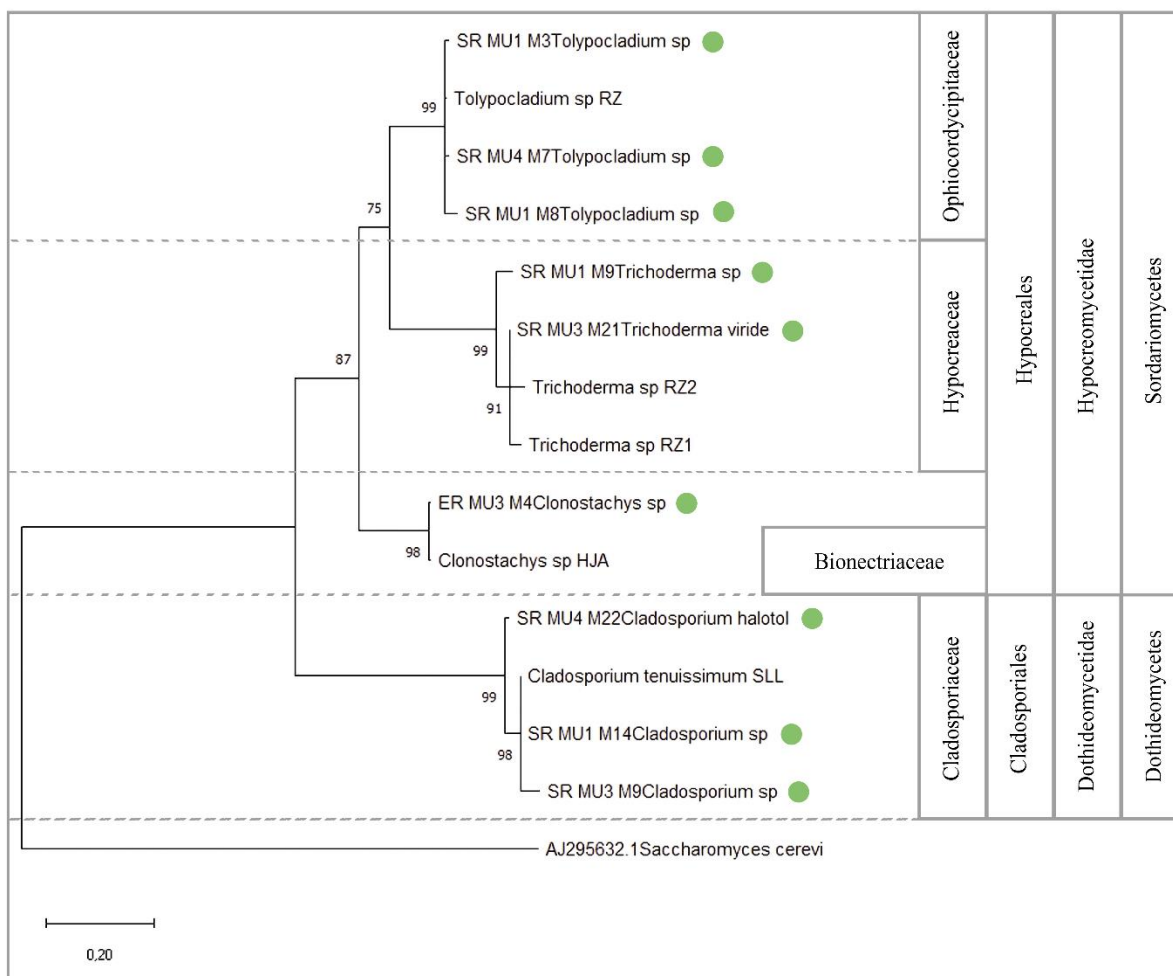
En la figura 8 se observa el soporte de cada taxon y como los cuatro aislados se resolvieron en 3 especies *Mortierella basiparvispora*, *Mortierella turficola* y *Mortierella zonata* con buenos porcentajes de bootstrap, los organismos pertenecientes a este género se aislaron del suelo ectorizósferico lo que es normal ya que son hongos comúnmente habitantes del suelo actuando como saprofitos (Spatafora et al., 2016).

Para estos aislados solamente se amplificó la región ITS como se puede observar en la tabla 4 estos no tuvieron el potencial de ser amplificados con los cebadores usados en este estudio por lo que también se recomienda el uso de otras regiones que nos permitan tener más certeza o soportar aún más la homología, para lo que las regiones como la de la actina, calmodulina o factor de elongación de la traducción pueden ayudar a dar este soporte (Roger et al., 1999; Walker et al., 2012).

Después de la revisión anterior se pudo destacar que los iniciadores ITS 1 e ITS 4 poseen buena resolución y numerosos registros reportados por investigadores a nivel mundial, lo cual es fundamental para inferir homología de secuencias obtenidas de muestras ambientales poco estudiadas (Raja et al., 2017; Rashad & Kazaz, 2015). Por consiguiente, se logró encontrar homología con tres divisiones: Ascomycota, Basidiomycota y Mucoromycota, seis clases, nueve órdenes, 20 familias, 23 géneros y 16 especies. cinco de estos géneros se encontraron en diferentes partes de *E. pycnophylla* en un trabajo previo del páramo de Paja Blanca (Flórez et al., 2019). A continuación, se presenta una comparación de los géneros en común de ambos estudios como parte de una explicación de la diversidad que alberga esta importante especie vegetal, aprovechando que se usaron los mismos marcadores moleculares para la caracterización de los aislados y que los investigadores aportaron las secuencias obtenidas para el análisis.

Figura 10

Árbol filogenético comparativo entre los géneros en común del presente estudio y el de Flórez y colaboradores (2020) de las secuencias parcial ITS



Nota: realizado por el método de Máxima verosimilitud, modelo de sustitución GTR+G (*S. cerevisiae* como grupo externo) Se muestra el valor de soporte bootstrap para cada grupo homólogo, las cepas del presente estudio se representan por códigos y un círculo verde, el taxón homólogo obtenido del NCBI se representa con código de acceso y nombre. SR (Ectorrizósfera); ER (Endorrizósfera); HJA (Hoja); INF(Inflorescencia) y SLL(Semilla).

Fuente: esta investigación

En la imagen 9 se puede observar que las cepas en común pertenecen a dos clases: Sordariomycetes y Dothideomycetes, El género *Tolypocladium* también fue encontrado únicamente en la parte ectorizosférica, lo que coincide con varios investigadores quienes reportan que este género es uno de los más frecuentes en muestras de suelo tomadas de diversos lugares y muchas de estas especies son descritas en suelos fríos, comúnmente son conocidas por ser entomopatógenas (Klingen et al., 2002; Scorsetti et al., 2012).

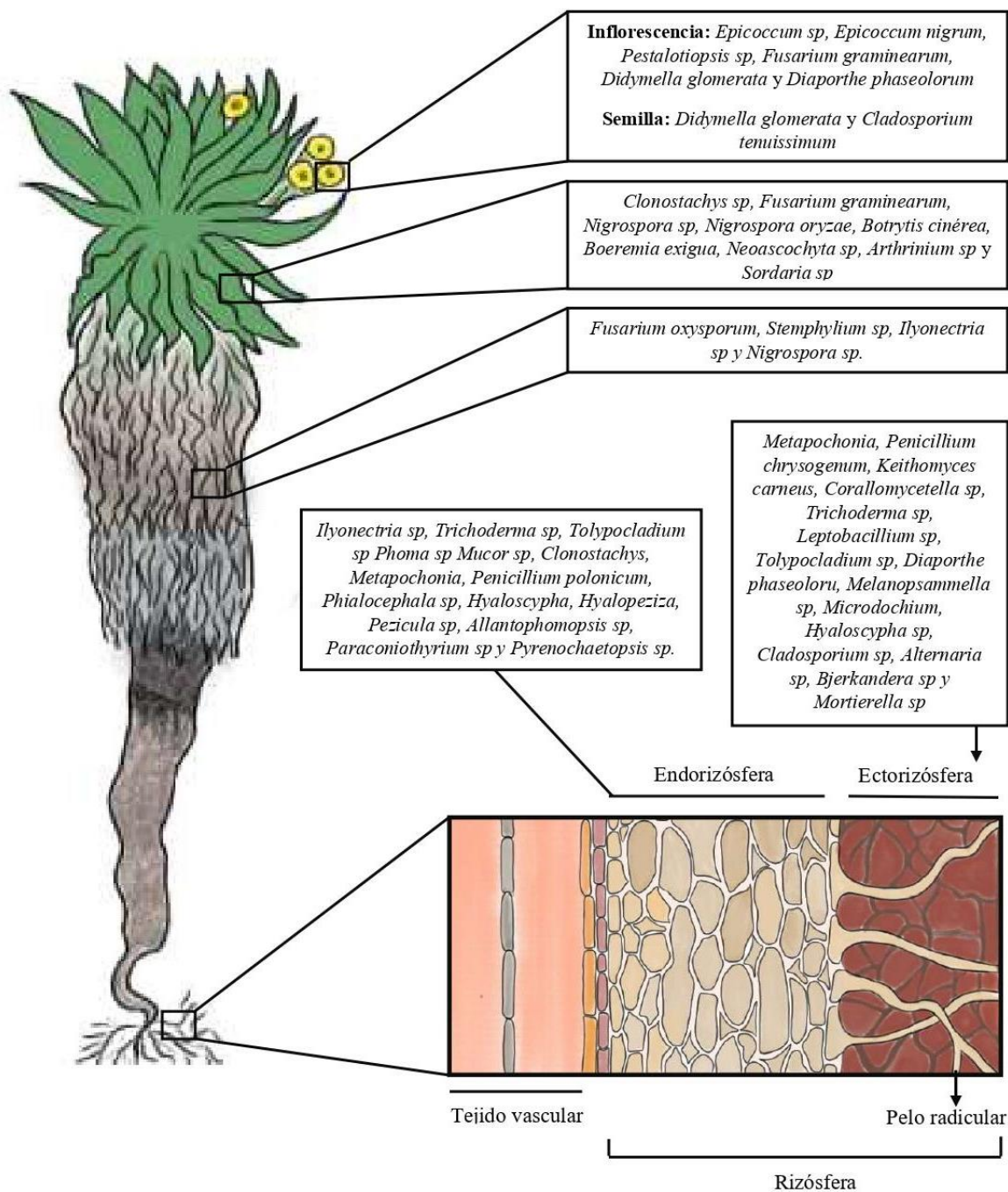
Otro género que se encontró en la raíz de *Espeletia* en ambos estudios fue *Trichoderma*, un género que se ha reportado también en el estudio de Avellaneda (2015) quien evaluó la biodiversidad de grupos funcionales de microorganismos asociados a suelos bajo cultivo de papa, ganadería y páramo en el Parque Nacional Natural de Los Nevados. Las secuencias de la región ITS de cepas aisladas en el suelo rizosférico analizadas en este trabajo presentaron homología con la secuencia de una cepa aislada de las semillas de *E. pycnophylla* por Flórez y colaboradores (2019) y estas a su vez con el género *Cladosporium*. En cuanto al género *Clonostachys* se evidenció con base a los dos estudios en discusión que este género está asociado tanto a la endorizósfera como a las hojas de *E. pycnophylla*. De los géneros en común con el estudio de Flórez y colaboradores (2019) se puede notar en la figura 9 que hay un valor importante de similitud con cepas de la rizósfera aisladas en este estudio homologas a cepas aisladas de hojas, inflorescencia y semilla del estudio de referencia.

Cabe resaltar los estudios de Arias y Piñeros (2008) quienes aislaron e identificaron hongos de los Páramos de Guasca y Cruz verde, encontrando géneros en común a los reportados en la presente investigación como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Trichoderma*. En el estudio de microhongos filamentosos en los ecosistemas páramo de Guasca y el Tablazo también existen reportes de géneros que se describen en este documento como, por ejemplo: *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mortierella*, *Alternaria* y *Cladosporium*, (Chitiva et al., 2011). Los tres primeros géneros citados se reportaron también en el estudio de la biodiversidad de grupos funcionales de microorganismos asociados a suelos bajo cultivo de

papa, ganadería y páramo en el Parque Nacional Natural de Los Nevados, Colombia (Avellaneda & Torres, 2013).

Figura 11

Diversidad de Hongos Encontrada en el Frailejón E. pycnophylla en el Páramo de Paja Blanca en el Departamento de Nariño



Fuente: esta investigación

En la anterior figura se esquematizó la información obtenida por Flórez y colaboradores (2019) como la obtenida en el presente estudio, mostrando la alta diversidad encontrada hasta ahora en el *E. pycnophylla*. Por otro lado, el estudio de Galíndez y colaboradores (2020) quienes investigaron a los insectos como vectores mecánicos de hongos y detectaron la incidencia de algunos géneros que pueden estar causando afectaciones en los frailejones tales como: *Fusarium sp*, *Botrytis sp* *Metapochonia*, *Talaromyces variabilis*, *Sarocladium strictum* y *Penicillium sp*, de los cuales los dos primeros citados han sido reportados como fitopatógenos.

Análisis filogenético de la región β -tubulina

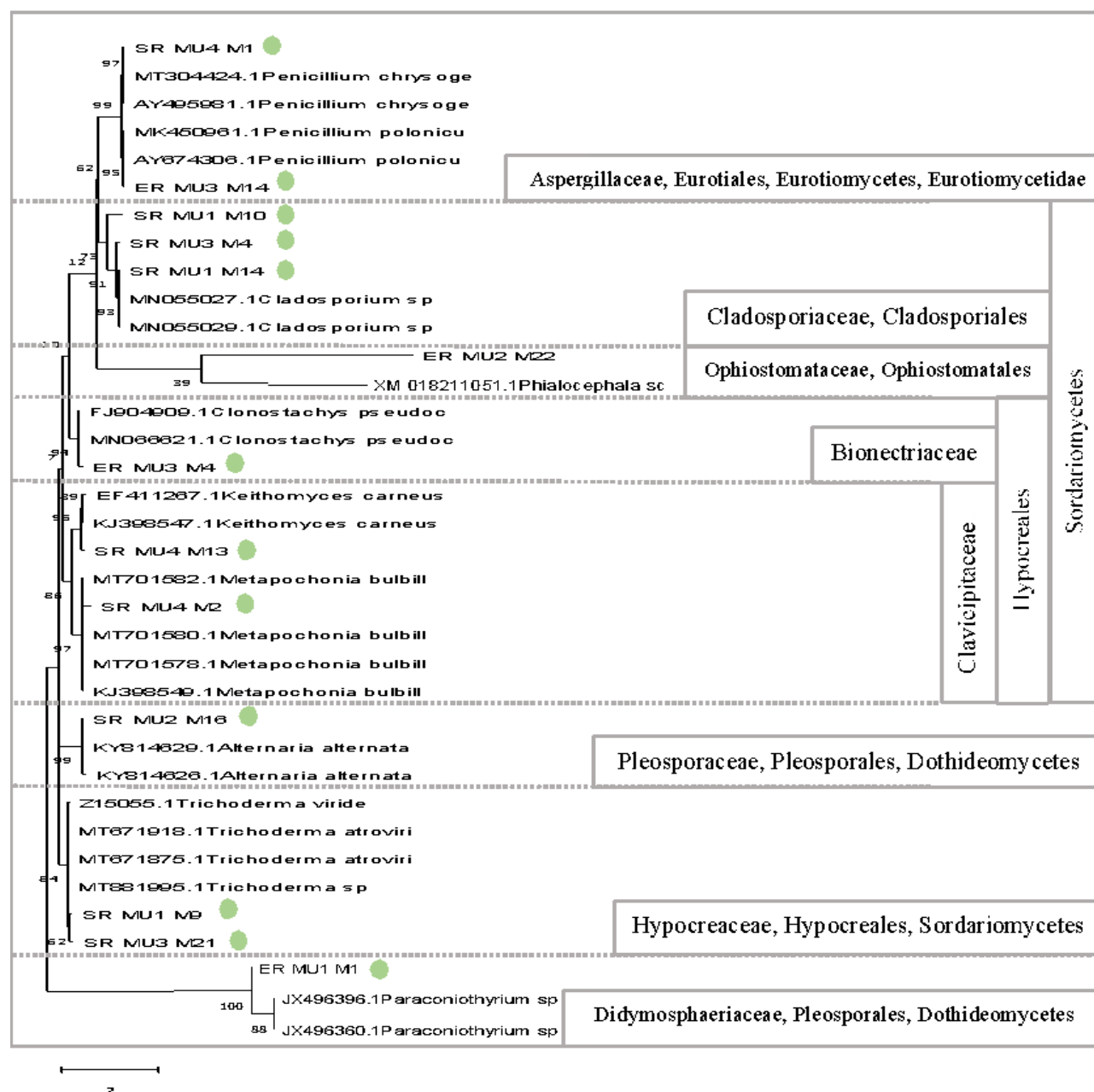
Como complemento y soporte de la caracterización molecular se evaluó un fragmento del gen que codifica para la beta tubulina, dicho gen ha sido ampliamente utilizado en grupos como: *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Alternaria* y *Phaeoacremonium* para resolver los grupos taxonómicos a nivel de especie (Basim et al., 2017; D. Silva et al., 2011; Walker et al., 2012). A diferencia de los análisis filogenéticos de la región ITS, los cuales se separaron en clases para facilitar la visualización de los datos y la discusión, en este caso al tener menor cantidad de datos por las razones ya expuestas se realizó un solo árbol con las secuencias de los aislados que fueron susceptibles de comparación (aquellos que amplificaron esta región y presentaron registros de homología en el GenBank por lo que las especies más cercanas se pueden observar en las tablas 2 y 3).

En la figura 11 se puede observar la comparación de 11 aislados tres de la endorizósfera y ocho de ectorizósfera los cuales se pudieron clasificar en grupos bien definidos con buenos soportes de Bootstrap, a excepción de la cepa ER MU M22 que según la región ITS pertenece al género *Phialocephala*, en este árbol si se definió junto a la secuencia de este género con la región de la beta tubulina. Sin embargo, el soporte Bootstrap fue de 39, esto podría deberse a que en el alineamiento de la secuencia obtenida en el presente trabajo para esta cepa la herramienta BLAST solamente arrojó un

resultado y como se dijo anteriormente en la discusión de los fragmentos obtenidos hubo muy pocos registros de esta región para el género.

Imagen 12

Árbol Filogenético de los Aislados Usando la Región β -tubulina



Nota: el análisis filogenético se realizó por el método de máxima verosimilitud (modelo de sustitución GTR+G) se muestra el valor de soporte bootstrap para cada grupo homólogo, las cepas del presente estudio se representan solamente por códigos y el taxon homólogo obtenido del GenBank se representa con código de acceso y nombre.

Fuente: esta investigación

Para los géneros *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Keithomyces*, *Metapochonia*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Paraconiothyrium* y *Penicillium* esta región demostró ser eficiente logrando reafirmar los géneros obtenidos mediante la región ITS, por lo han sido usados en varios estudios para lograr identificar organismos fúngicos (Abastabar et al., 2016; Behr et al., 2013; Lawrence et al., 2013; Mamarabadi et al., 2008; Y. Wang et al., 2020).

Para el género *Penicillium* esta región es ampliamente usada para definir los organismos hasta nivel de especie, por lo que se puede apreciar que este marcador es útil para caracterizar especies de este género como lo reporta Abastabar y colaboradores (2016), en su estudio de diversidad genética y morfología del género *Penicillium* soportan a la región beta tubulina como un marcador robusto para definir especies dentro del género y su aplicación se incrementa como excelente marcador de este grupo.

Para especies de la familia Aspergillaceae se sugiere un sistema de identificación de dos niveles, el primero basado en secuencias de ITS, y las especies se identifican en segunda instancia con base en secuencias de genes que codifican proteínas (Peterson, 2012), lo que se corroboró en este estudio puesto que con ambas regiones génicas no solamente se pudo comprobar el género obtenido por medio de la identificación morfológica si no que se logró identificar las especies pertenecientes. Por tanto, los aislados ER MU3 M14 y SR MU4 M1 corresponden a *Penicillium polonicum* y *Penicillium chrysogenum*.

Es importante resaltar también que en el anterior árbol la región beta tubulina no es efectiva para definir niveles taxonómicos superiores por lo que vemos que entre la clase Sordariomycetes se ubicaron

los aislados de la clase Dothideomycetes, a pesar de esto esta región sirvió para confirmar y aproximar a la identificación de especies como se propuso en los objetivos de este trabajo.

Aunque los géneros que se pueden ver en la figura 11 se confirmaron de forma satisfactoria, los 15 restantes a pesar de haberse resuelto en buena medida con la región ITS es importante realizar una caracterización más completa con marcadores secundarios como la región de la RNA polimerasa II (rpb2) (Liang et al., 2019; Singh & Kumar, 2017), factor de elongación de la traducción TEF1- α (Conti et al., 2019; M. Wit et al., 2020), la región que codifica para calmodulina (CAL) y la que codifica para la actina han sido capaces de resolver la taxonomía de este género y brindar respuestas a preguntas biológicas (Carvalho et al., 2003; Papizadeh et al., 2017).

Revisión y Clasificación de los Géneros Reportados

Después de realizar los análisis de secuencias se encontró que los hongos aislados del páramo de Paja Blanca tanto de la endorizósfera como de la ectorizósfera pertenecen a 3 phylum (Ascomycota, Basidiomycota y Mucoromycota), 6 clases, 10 Ordenes, 21 familias y 23 géneros, de los cuales se hace una revisión a continuación.

Revisión y Clasificación de los Géneros Pertenecientes a la Clase Sordariomycetes

Metapochonia

Dentro de este género se agruparon tres cepas de los aislados, dos de la ectorizósfera y una aislada de la endorizósfera (tablas 2 y 3), que según la región ITS y β -tubulina pertenecen a *Metapochonia bulbillosa* y *Metapochonia suchlasporia*, lo que concuerda con los estudios realizados por Heinonsalo et al., 2017 donde se logró aislar del suelo y de tejido radicular de pinos silvestres a *Metapochonia bulbillosa*, conocido por ser un agente patógeno de insectos que se ha utilizado como biocontrolador (Heinonsalo et al., 2017). Este género fue recientemente definido en el año 2014 por Kepler y colaboradores. Actualmente se reportan 10 especies *M. bulbillosa*, *M. goniodes*, *M. lutea*, *M. microbactrospora*, *M. rubescens*, *M. cordycipiticonsociata*, *M. parasitica*, *M. suchlasporia*, *M. variabilis* y *M. hahajimaensis*, esta última recientemente descrita (Kondo et al., 2020). Estas especies han sido

aisladas del suelo, raíz, rotíferos y la mayoría de las especies son nematófagas y entomopatógenas, que infectan huevos de nematodos con ayuda de proteasas capaces de digerir el componente proteico de estos, utilizándose como biocontroladoras y hasta la fecha no se ha reportado ninguna de ellas como fitopatógena (Kepler et al., 2014).

Keithomyces

El aislado SR_MU4_M13 perteneciente a este género se aisló de la ectorizósfera de *E. pycnophylla*, lo que concuerda con el estudio de Zimmermann (2007) que aisló hongos de este género tanto en suelo ectorizosférico como en insectos hospedadores que son específicas de Coleóptera, Orthóptera y Hemíptera. Este género se distribuye mundialmente desde el ártico hasta los trópicos, comprende especies aisladas principalmente del suelo y solo se conocen los morfos asexuales, se caracterizan por ser entomopatógenos usados ampliamente para el control biológico de insectos plaga, donde compañías como Lbu (formerly Eric Schweizer Seeds) realizan productos biocontroladores a partir de cepas de este género (Mongkolsamrit et al., 2020; Zimmermann, 2007).

Corallomycetella

El aislado SR MU3 M12 se logró aislar de la ectorizósfera de *E. pycnopjylla*. Este género del orden Hypocreales de la familia Nectriaceae, posee organismos conocidos por ser hongos rojos asociados con rizomorfos, estructuras parecidas a las raíces de las plantas en forma y función, pueden encontrarse de forma silvestre y en cultivos. Se distribuyen en diversos ambientes y lugares del mundo (Herrera et al., 2013), pero se encuentran con más frecuencia en suelos de regiones tropicales. Se reconoce este género por causar algunas enfermedades en plantas tales como la enfermedad de la raíz apesada en varias plantas leñosas, la pudrición de la raíz violeta en *Theobroma cacao* y pudrición de raíz en *Carica papaya* y caucho (*Hevea brasiliensis*) (Hood, 2006),

Trichoderma

En la presente investigación se logró secuenciar dos cepas SR MU1 M9 y SR MU3 M21 de la ectorizófera de los frailejones del Páramo de Paja Blanca cuya homología fue *Trichoderma sp* y *T. viride* respectivamente que también han sido aisladas por otros autores de los suelos en agar PDA y evaluaron su capacidad de agente biocontrolador, encontrando que además de ser un buen fungicida también es inofensivo para los demás microorganismos beneficiosos, aumentado la fertilidad de los suelos (Saba, 2012). Además, al ser simbioses vegetales avirulentos y endofíticos, las cepas de *Trichoderma* penetran en las plantas a través de las raíces desencadenando activación de la inmunidad innata de la planta y haciendo más eficiente la absorción de nutrientes (Saravanakumar & Wang, 2020).

Los hongos del género *Trichoderma* están ampliamente distribuidos en la naturaleza presentes en una amplia gama de ubicaciones geográficas, pueden aislarse de diversas fuentes ecológicas, incluido el suelo, el agua, y varias partes de las plantas (Saravanakumar & Wang, 2020). Este grupo se caracteriza por un crecimiento rápido, por ser simbioses de plantas y micoparásitos, produciendo enzimas y nanopartículas inorgánicas bioactivas para atacar o inhibir otros hongos. Contiene especies de gran importancia económica debido a su producción de enzimas industriales como celulosa y hemicelulosa (Chakraborty et al., 2010). Entre las más de 300 especies registradas se encuentran *T. viride*, *T. álbum*, *T. amazonicum*, *T. caesareum*, *T. glaucum*, *T. solani* *T. leguminosarum*, *T. pubescens* y cientos más, de las cuales más de 25 de ellas han demostrado potencial de biocontrol para distintas enfermedades. Como ejemplo, el manejo del complejo de pudrición de la corona postcosecha del banano causado por una variedad de patógenos fúngicos, incluidos *Colletotrichum musae*, *Fusarium verticillioides* y *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, también se ha evaluado su acción en especies de los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Sclerotinia* y *Verticillium*, que se han identificado como los géneros fitopatógenos comunmente abundantes ya que posee propiedades micoparasíticas (Martínez et al., 2013; Reino et al., 2008).

Leptobacillium

El aislado de la ectorrizósfera de *E. pycnophylla* (SR MU1 M6) tuvo homología con la especie *L. leptobactrum* de este género que es considerada la especie tipo del género con la cual se pudo describir e introducir a la clasificación taxonómica. Este género fue introducido por Zare y Gams (2016) para clasificar hifomicetos fialídicos saprotróficos y fúngicos (Phookamsak et al., 2019), se caracteriza por agrupar hongos endófitos que son importantes inhibidores tripanosómicos, de insectos y de plagas por lo que la producción de enzimas y metabolitos bioactivos tripanocidas son de importancia biotecnológica. Entre las especies de este género se encuentran *L. chinense*, *L. symbioticum*, *L. coffeanum*, *L. filiforme*, *L. muralicola* y *L. leptobactrum*. Dentro de este género no se han reportado especies fitopatógenas, pero hay que tener en cuenta que la descripción se realizó en el año 2016 y entre 2020 y 2021 se describieron cuatro especies de las seis conocidas, por lo que aún no se conoce la verdadera relación del género con las plantas (Azevedo, 2020; Okane et al., 2020; Zare & Gams, 2016).

Clonostachys

La secuencia con código SR MU4 M19 mostró homología con la especie *C. byssicola*, un hongo filamentoso con potencial biotecnológico para la producción de holocelulasas para la degradación de materiales ricos en polisacáridos (Sun et al., 2020). Este género está muy extendido en todo el mundo y frecuente hábitats de todo tipo, con mayor incidencia en el suelo. Actualmente reporta cerca de 50 especies de ascomicetos endofíticas, reconocidas por su propiedad de promoción del desarrollo de las plantas y por proteger el rendimiento de la contaminación por patógenos y micotoxinas (Abreu et al., 2014). Dos cepas aisladas en América del Norte están disponibles comercialmente, llamadas 88-710 y J1446 (*C. rosea*) están patentadas como bioestimulantes y / o agentes de biocontrol contra enfermedades fúngicas foliares (Mamarabadi et al., 2008; Sun et al., 2020).

Algunas especies de este género son parásitos destructivos inespecíficos y antagonistas de varios hongos y oomicetos, incluidos importantes patógenos vegetales como *Botrytis cinérea*, *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora palmivora* y *Pythium ultimum* (Abreu et al., 2014). Además, han sido reportadas como biocontroladoras de nemátodos e insectos, por medio de la secreción de enzimas que degradan las paredes celulares, producción de metabolitos secundarios antifúngicos y la activación de mecanismos de defensa que poseen algunas plantas. No se encontró reporte de especies fitopatógenas para este estado anamorfo, ni tampoco para el teleomorfo *Bionectria* (Li et al., 2020).

Tolypocladium

En este estudio se identificaron tres aislados ectorrizosféricos (SR MU1 M8, SR MU1 M3 y SR MU4 M7), lo que concuerda con Gazis y colaboradores (2016) que reportan a este género como un grupo frecuentemente encontrado en muchos tipos de suelos próximos a las raíces y con Xu y colaboradores (2019) quienes reportan que es usual aislarlo de zonas altas con suelos fríos. Se han aislado especies en Sur America (Brasil), Norte América, Europa, Nepal y Nueva Zelanda, actualmente el género cuenta con 29 especies registradas entre las que se encuentran *T. geodes*, *T. nubicola*, *T. album* y *T. inflatum* entre otras, se caracteriza por servir de control ante algunos insectos, ácaros, rotíferos y hongos fitopatógenos, esta última es un patógeno de las larvas de escarabajo y es mejor conocida como productora de la ciclosporina un fármaco inmunosupresor clave para prevenir el rechazo de órganos trasplantados, así como para tratar enfermedades autoinmunes (Bushley et al., 2013; Gazis et al., 2014). Se ha visto también que *Tolypocladium spp* poseen la capacidad de producir efraeptinas (tipos C a G) las cuales son péptidos lineales que tienen un efecto general sobre la inhibición de la ATPasa mitocondrial, mostrando efectos contra varias especies de artrópodos tales como ácaros, escarabajos de la patata, gusanos de los cogollos del tabaco y polillas del diamante y también presentan actividad antifúngica y antibacteriana limitada (Strasser et al., 2000). Adicionalmente a la fecha, se han descubierto un gran número de metabolitos secundarios estructuralmente interesantes con un amplio espectro de actividades biológicas producidas

por este género, tales como 1- alanineclamidocina y tolipoalbina con actividad adipogénica (Xu et al., 2019).

Microdochium

A este género se infirió la homología de las secuencias de las regiones ITS y β -tubulina del aislado SR MU1 M7. Las especies de este género se encuentran distribuidas en todo el mundo en regiones frías y templadas, son hongos patógenos de plantas que causan enfermedades por temperaturas frías en pastos y cereales (Ej *Hordeum vulgare* y *L. Triticum spp.*), dos especies *Microdochium nivale* y *M. majus* han sido relacionadas como causales de estas afectaciones (Jewell, 2013).

M. nivale también puede causar una enfermedad en los pastos conocida como parche de *Fusarium*, también llamado parche de *Microdochium*. Esta enfermedad se caracteriza por manchas irregulares blanqueadas o de color marrón anaranjado de hasta 5 cm de diámetro y *M. bolleyi* produce necrosis de las raíces y descomposición de las gramíneas (Iriki et al., 2014).

Chloridium

Actualmente en Index Fungorum (2021) se reportan 71 especies de género que han sido reportadas en su mayoría como endófitas sin causar síntomas de enfermedad y descritas como morfos asexuales, se reporta también que este género podría proporcionar simbióticamente protección a su hospedero al inhibir a patógenos potenciales gracias a la producción de la javanicina un compuesto biológicamente activo con propiedades antimicrobianas eficientes contra *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp*, *Fusarium oxysporum* y *Candida albicans* (Kharwar et al., 2009; Wei et al., 2018).

Revisión y Clasificación de los Géneros Pertenecientes a la Clase Letiomycetes

Pezicula

Cinco aislados endorizosféricos (ER_MU1_M7, ER_MU1_M15, ER_MU1_M6, ER_MU1_M12, ER_MU1_M2) lograron ser identificados dentro de este género por medio del marcador ITS ya que con la región de la β -tubulina no se encontraron registros al usar la herramienta BLAST. Las especies clasificadas dentro de este género son por lo general de distribución cosmopolita. Sin embargo, se han logrado aislar mayormente en la corteza, tallo y raíz (Yue et al., 2018). Se conoce este género por producir podredumbre en tallos y frutos de pera, incluso de la enfermedad del cancro del tallo de árboles de manzana. Se reporta también que muchas especies del género son patógenos débiles y solo pueden infectar una planta cuando estas están frágiles, en condición de estrés fisiológico o con heridas graves en sus estructuras (Das et al., 2020). Por otro lado, especies endófitas dentro de este género tienen especial interés biotecnológico debido a la producción de antibióticos como melleína, micorrizina, criptosporiopsina, criptocandina y criptocina (Das et al., 2020; Marin et al., 2017).

Allantophomopsis

En la tabla 3 se puede observar que el aislado ER_MU1_M13 tuvo homología con este género mediante la región ITS ya que con el uso de BLAST del NCBI no se pudo obtener resultados con el segundo marcador. Este género pertenece a la familia Phacidiaceae y cuenta con nueve especies registradas en Index Fungorum (2021). *A. lycopodina* es un organismo endófito del cual se logró extraer un nuevo compuesto llamado allantopirona A, demostrando ser un fuerte citotóxico en células HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells). Existen escasos registros donde se reporta la cepa *Allantophomopsis* sp como patógeno de las raíces de coníferas produciendo la enfermedad conocida como pudrición negra del arándano en *Vaccinium macrocarpon* (Crous et al., 2015; Shiono et al., 2010; Uzma et al., 2018).

Leohumicola

El aislado SR_MU3_M13 perteneciente a este género según la región ITS, no pudo ser confirmada con el segundo marcador ya que para los primers de la segunda región este hongo no tuvo especificidad a esta. Se registran siete especies para este género en la base de datos Index Fungorum (2021), los primeros registros son de las especies *Leohumicola terminalis*, *L. verrucosa*, *L. lenta* y *L. minima* en el año 2005 y las últimas descripciones de especies del género son de *L. atra*, *L. incrustata* y *L. levissima* del año 2008. Estas son frecuentemente aisladas del suelo y se encuentran entre los miembros prominentes de los hongos micorrízicos, crecen lentamente en agar papa dextrosa (PDA), agar extracto de malta (MEA) y medios Melin-Norkrans modificados (MMN) y se encuentran naturalmente en el suelo, particularmente, en la raíz de las plantas ericáceas. *Leohumicola* es un género resistente al calor que pertenece a la clase Leotiomycetes (Adeoyo et al., 2019; Hambleton et al., 2005).

Hyalopeziza

En este trabajo se encontró un hongo perteneciente a este género aislado de la endorrizósfera de *Espeletia* (ER MU1 M4), concordando con Zhang et al 2013 quien lo describe como un endófito. Este género parte de la familia Hyaloscyphaceae, un grupo de hongos saprófitos que también pueden ser endófitos, algunas especies tienen la capacidad de formar micorrizas ericoides, ectomicorrizas y crecer en rizoides de hepáticas, aparecen en ecosistemas ubicados a gran altura creciendo sobre madera y se ha registrado como un taxón europeo (Kosonen et al., 2021; Quijada & Beltran, 2019). Actualmente el género cuenta con 53 especies descritas y registradas (*Index Fungorum*, 2021). No se encontró registros de especies con potencial fitopatógeno.

Hyaloscypha

En el presente estudio se aisló una cepa del suelo aledaño a las raíces de *E. pycnophylla* perteneciente a este género (ER MU4 M14), a una altitud entre los 3324 y 3433 m.s.n.m lo que concuerda con los estudios de Quijada y colaboradores (2019), quienes reportan que las especies de este género aparecen en ecosistemas ubicados a gran altura.

Con 160 especies registradas y distribuidas en todo el mundo principalmente en el hemisferio norte y sur en países como: Australia, Argentina, Chile, Nueva Zelanda, Filipinas, Georgia del Sur y Tristan da Cunha, este género comúnmente se encuentran en el agua y también son habitantes comunes del suelo en estadio amorfo (Quijada & Beltran, 2019)

Sus especies son de importancia ecológica e incluyen hongos que viven en relaciones simbióticas con las raíces de las plantas, ya sea como endófitos o simbiontes micorrízicos de Ericaceae y Fagaceae, pero se conocen también por ser saprobios de madera y hojarasca (Hosoya & Huhtinen, 2002; Mrnka et al., 2020).

Mollisia

Solo un hongo de este estudio pertenece a este género el asilado ER_MU1_M17 obtenido de la endorizósfera de los frailejones estudiados en Paja Blanca e identificado mediante la región ITS ya que como se observó en la tabla 3 no tuvo capacidad de ser amplificado con el segundo marcador. Este género de la familia Mollisiaceae del orden Helotiales es de distribución cosmopolita y comprende 106 especies entre saprófitos y endófitos de raíces y hojas, generalmente descritas en estado anamorfo que generalmente se observan formando apotecios grisáceos a azulados de 1 a 3 mm de diámetro en tejidos vegetales en descomposición, especialmente madera, tallos y hojas de gramíneas (*Index Fungorum*, 2021; Tanney & Seifert, 2020). Este género ha tenido una importante relevancia en la producción de ingredientes activos anticancerígenos como el ácido zaragozico D3 8-metilester (Dai et al., 2020). Por

otra parte, se ha reportado que *Mollisia asteliae* está implicada con la producción de manchas foliares en *Astelia chathamica* (Lanza plateada) (Crous et al., 2020).

Phialocephala

La información obtenida en el presente estudio sugiere que dos hongos aislados de la endorrizósfera de *E. pycnophylla* (ER MU2 M22 y ER MU1 M5) tienen homología con este género y a la especie *P. bamuru*, según los análisis de la región ITS y β -tubulina. El género comprende actualmente 58 especies de amplia distribución, encontrándose en diversos sustratos principalmente asociados a material vegetal en descomposición y plantas vivas como coníferas comúnmente aisladas como endófitos, son potenciales promotores de la sanidad vegetal y productores de metabolitos secundarios de importancia industrial (*Index Fungorum*, 2021; Wong et al., 2015). Algunos estudios sugieren que varias de estas especies pueden beneficiar a las plantas a través de otras interacciones complejas que dan resultados potencialmente beneficiosos mediante la producción de metabolitos secundarios antipatógenos (Terhonen et al., 2014). Un ejemplo de esta interacción es la especie *P. scopiformis* aislada como endófito de *Picea glauca* que produce rugulosina, un metabolito secundario insecticida (Sumarah et al., 2008). En general, las especies de *Phialocephala* son endófitos no patógenos de las raíces y partes aéreas de las plantas leñosas; sin embargo, se reporta a *P. bamuru* como causante de pudrición radicular en dos especies de la familia Poaceae (*Cynodon dactylon* y *Pennisetum clandestinum*) (Wong et al., 2015).

Pyrenochaetopsis

20 especies se han descrito comúnmente como saprófitas, aisladas de varios nichos incluidos humanos, animales, suelo, agua, estiércol, aire y plantas (Spetik et al., 2021); por ejemplo, *Pyrenochaetopsis decipens* se aisló de un quiste del nemátodo *Globodera pallida* (Chi et al., 2019; Papizadeh et al., 2017). Además, los miembros de este género han sido detectados repetidamente como

endófitos en varios grupos de plantas gramíneas en muestras de tallos, raíces, hojas o rizósfera (Gruyter et al., 2010; Wijayawardene et al., 2014). En el año 2020 se logró aislar a partir de la cepa *Pyrenochaetopsis* sp tres compuestos anticancerígenos llamados Pirenosetinas A, C y D, los cuales mostraron una actividad notable contra las células cancerosas del melanoma maligno humano (A-375) (Fan, Dewapriya, Li, Grauso, et al., 2020). No se encontró ningún estudio donde se reporten estas especies como patógenos de plantas.

Alternaria

La cepa SR MU2 M16 tuvo homología con *Alternaria alternata* con las dos regiones usadas como marcadores moleculares, un patógeno fúngico que puede causar enfermedades en muchos cultivos, es el agente causal del tizón foliar del pistacho y el tizón temprano de la papa, que se caracterizan por presentar síntomas como: lesiones en las hojas y caída foliar que pueden llevar al deceso de la hoja o de la planta. También causa graves pérdidas en las especies de *Nicotiana* por infección de hojas maduras (Sun et al., 2014; Yang et al., 2019). Es un género de hongos cosmopolita que se distribuye ampliamente en el suelo, atmósfera, hojarasca, materia orgánica y plantas vivas. Incluye especies saprófitas, endofíticas y patógenas (Nishikawa & Nakashima, 2020), fue descrito por primera vez por Nees von Esenbeck en 1816 con *A. tenuis* como el espécimen tipo (Lawrence et al., 2013). A menudo, son alergénicas y pueden causar micosis en humanos e insectos, la mayoría de las especies son fitopatógenas en plantas ornamentales y ocasionan manchas en las hojas y flores; el estadio sexual es el de mayor importancia económica (Yang et al., 2019).

Paraconiothyrium

El morfotipo aislado de la endorizósfera con el código ER_MU1_M1 tuvo homología en este género con el alineamiento de las dos regiones usadas. Los organismos de este género son habitantes

comunes del suelo, humedales, superficies de frutos como melocotones y ciruelas, aguas superficiales y materia en descomposición principalmente madera, incluso se han aislado como endófitos de *Ginkgo biloba* (Tian et al., 2014). Dos especies *P. brasiliense* y *P. hawaiiense* son productoras naturales de compuestos estructuralmente diversos y biológicamente activos, incluidas las brasilamidas, las cuales se han estudiado demostrando efectos inhibidores sobre la replicación del VIH-1 en las células C8166 (Liu et al., 2010) y las hawaiinólidas con una citotoxicidad significativa contra cinco líneas de células tumorales humanas, A549, T24, HeLa, HCT116 y MCF-7 (Chen et al., 2014; C. Zhao et al., 2018). Las especies *P. parasiticum* y *P. cyclothyrioides* son consideradas de importancia médica ya que se reconocen como patógenos oportunistas de humanos cuando han sido sometidos a trasplantes de órganos (Colombier et al., 2015). Se encontró registro de que estas especies actúan como antagonistas de algunos patógenos, por ejemplo, las especies *P. minitans* y *P. variable* demostraron la capacidad de producir Beauvericina una micotoxina que inhibe a *F. oxysporum* (Combès et al., 2012). Finalmente, se ha asociado a la enfermedad del cancro en rosa híbrida con *Paraconiothyrium fuckelii* provocando lesiones necróticas marrones en los tallos, color amarillento y marchitamiento del follaje y a *Paraconiothyrium camelliae* por producir lesiones foliares grises, expandidas e irregulares que se desarrollan desde el borde hasta la mitad de las hojas en *Camellia sinensis* (Ariyawansa et al., 2020).

Cladosporium

Entre los hongos obtenidos a partir de aislamientos ectorizosféricos cuatro de estos reportaron homología a este género perteneciente a la familia Cladosporiaceae (tabla 4). Este género tiene aproximadamente 166 especies reportadas en Index Fungorum actualmente (2021), se caracterizan por ser aisladas como endófitos y tener una distribución cosmopolita, se encuentran comúnmente en todo tipo de plantas, hongos y otros desechos orgánicos (Salvatore et al., 2021). Se aíslan con frecuencia del suelo, alimentos, pinturas, textiles y otras materias orgánicas o como invasores secundarios de lesiones foliares causadas por hongos patógenos de plantas (Bensch et al., 2018).

Las especies de este género son de especial interés biotecnológico debido a una larga lista de metabolitos secundarios que son capaces de producir 244 compuestos químicamente definidos, pertenecientes a diferentes clases de metabolitos secundarios, tales como azafilonas, benzofluorantenonas, cumarinas e isocumarinas, lactonas, naftalenonas, macrólidos, perilenquinonas, esteroides y otros. Dos sustancias características de este género son la cladosporina y la isocladosporina moléculas con actividad antifúngica (Salvatore et al., 2021).

Muchas de las especies de este género han sido reportadas fitopatógenas como *Cladosporium lupiniphilum*, *C. pisicola*, *C. rutae*, *C. fulvum* y *C. vigneae* causantes de manchas foliares y otras lesiones, provocando enfermedades como las del mosaico, enfermedad del moho gris del tomate, síntomas de pardeamiento de las raíces y decoloración del tallo en *Cannabis sativa* (Punja et al., 2019; P. Wit et al., 2012).

Revisión y Clasificación de los Géneros Pertenecientes a la Clase Eurotiomycetes

Penicillium

En el presente trabajo se pudo analizar las secuencias de dos cepas aisladas del páramo, una del suelo aledaño a la raíz de *Espeletia* (SR MU4 M1) identificada como *P. chrysogenum* y la otra de la endorrizósfera (ER MU3 M14) identificada como *P. polinocum*, de las dos cepas fue posible obtener las secuencias tanto de la región ITS como de la región de la beta tubulina como se discutió en el en las figuras 7 y 11 donde se logró definir la identidad de estos aislados hasta el nivel de especie con ayuda de estas dos regiones. Este es uno de los géneros con mayor importancia económica en diversos sectores, ya que son capaces de producir numerosos compuestos como enzimas, antibióticos, micotoxinas y otros bioactivos como glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos (Park et al., 2019; Peterson et al., 2015). Su mayor impacto y reclamo de fama es la producción de penicilina, que revolucionó los enfoques médicos para el tratamiento de enfermedades bacterianas (Visagie et al., 2014). A continuación, se presenta una revisión teórica de las dos especies reportadas.

Penicillium polonicum

Este hongo se reporta tanto en ambientes externos e internos, suelo, cuerpos de agua y de raíces como endófito. Se ha registrado como agente de pudrición postcosecha de los frutos de la tuna (Faedda et al., 2015) y también en tubérculos de alcachofa por su capacidad multilítica facilitada por varias enzimas capaces de destruir severamente los componentes del tubérculo (Al-Askar et al., 2021). Sin embargo, existe un reporte donde se estudia la capacidad de *P. polonicum* como antagonico del importante fitopatógeno *Fusarium oxysporum* por acción de sus metabolitos volátiles, además es usado ampliamente como un organismo biorremediador por la alta eficiencia en la eliminación de plomo de aguas contaminadas por actividad minera (Kharwar et al., 2014).

Endófitos como *P. polonicum* se encuentran en interacción con las plantas promoviendo el crecimiento por medio de su capacidad para producir fitohormonas como el ácido indol acético y el ácido giberélico, sideróforo, amoníaco y otros compuestos bioactivos que pueden modular el crecimiento y desarrollo de la planta. (Wakelin et al., 2007).

Penicillium chrysogenum

Es un hongo filamentoso encontrado en muchos ambientes naturales e interiores, crece fácilmente sobre alimentos y es reconocido por su capacidad de sintetizar penicilina y antibióticos β -lactámicos relacionados, además de varios otros metabolitos secundarios como enzimas, agentes antifúngicos y prebióticos (Jami et al., 2010; Martín, 2020). Es un contaminante postcosecha de muchos frutos y tubérculos. Sin embargo, tiene la capacidad de sintetizar y secretar la enzima PAF o proteína antifúngica de *Penicillium* que inhibe el crecimiento de una variedad de hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* y *Fusarium sambucinum* (Kaiserer et al., 2003).

Revisión y Clasificación del Género Pertenecientes a la Clase Agaricomycetes

Bjerkandera

Se logró aislar una cepa (SR MU3 M10) con homología al presente género perteneciente a la ectorizósfera de los frailejones del páramo de Paja Blanca. Este género de la familia Phanerochaetaceae fue descrito por Karsten (1879) por primera vez y actualmente se registran 60 especies (*Index Fungorum*, 2021) que tienen una distribución mundial y se caracterizan por ser patógenos afectando las raíces de las plantas, siendo un organismo de importancia económica. Este género cumple un papel importante en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzopireno, un compuesto conocido por causar cáncer y ser un contaminante de algunos sustratos (Motato et al., 2020). Además tiene un gran potencial de aplicación biotecnológica debido a su alta calidad nutritiva y organoléptica, como también la facilidad de crecer sobre subproductos agroindustriales y producir nanopartículas de plata recubiertas por residuos proteicos distribuidos en la superficie del micelio o por grupos carbonilo adsorbentes remanentes en los espacios intersticiales del micelio fúngico generando biopelículas de CS-CMC-AgNPs (quitosano y carboximetilcelulosa) que poseen actividad antimicrobiana contra la bacteria Gram negativa *E. coli* (Osorio, 2020).

Bjerkandera adusta es un basidiomiceto conocido por descomponer madera y ser el hongo responsable de la pudrición blanca, es de los degradadores de lignina más eficaces de la naturaleza y también pueden oxidar compuestos xenobióticos, incluidos algunos contaminantes ambientales y desvanece tintes sintéticos gracias a la secreción de peroxidasas (Baik et al., 2021; Bouacem et al., 2018). Se documenta también que los extractos macrofúngicos como el metanol producido por esta especie es un agente antifúngico potencialmente eficiente, y puede por tanto ser la base de preparados utilizados en el biocontrol frente a hongos fitopatógenos (Spremo et al., 2017).

Revisión y clasificación de los géneros pertenecientes a la clase Mortierellomycetes

Mortierella

Cuatro aislados determinados por homología con la región ITS (ver tabla 4) pertenecientes a la ectorizósfera de *E. pynophylla* pudieron clasificarse dentro de este género mediante la región ITS. Mientras que con β -tubulina no fue posible obtener amplicones para analizarse. En cuanto a este género se han reportado 126 especies en Index Fungorum (2021) distribuidas por todo el mundo, caracterizándose por ser hongos filamentosos, saprotróficos en varios ambientes de baja temperatura como el suelo, ríos y lagos (Ozimek et al., 2018). Son promotores del crecimiento en plantas, ya que han demostrado la capacidad de producir ácido indolacético y ácido giberélico (Ozimek et al., 2018; Xu et al., 2021) y son responsables de mejorar el acceso a las formas biodisponibles de fósforo (P) y hierro (Fe) en los suelos áridos o ambientes hostiles, finalmente se ha documentado que también ofrecen protección a las plantas contra patógenos (Ozimek & Hanaka, 2021).

Después de la revisión teórica de los 23 géneros se encontró que los siguientes reportan especies fitopatógenas *Corallomycetella*, *Microdochium*, *Pezicula*, *Mollisia*, *Phialocephala*, *Alternaria*, *Paraconiothyrium*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Bjerkandera*, por lo que es necesario realizar pruebas de patogenicidad con los aislados pertenecientes a estos, siguiendo los postulados de Koch que en resumen determinan: 1) El organismo implicado en la enfermedad no debe encontrarse en plantas sanas pero si en las enfermas, por esta razón se recomienda realizar un estudio de diversidad fúngica en plantas saludables de *E. pynophylla*. 2) El patógeno aislado debe crecer en un cultivo puro, 3) Al inocularlo en plantas sanas se deben generar los mismos síntomas de una planta enferma y finalmente 4) aislar el agente con las mismas características del original en un cultivo puro axénico (Kavanagh, 2017).

Aunque las pruebas de patogenicidad basadas en los postulados de Koch son de amplio uso para inferir agentes causales de enfermedad en plantas, se ha demostrado que son inadecuados ya que a menudo no se adaptan a las características de complejidad causal como en casos de enfermedades con

causas polimicrobianas (Schneider & Collmer, 2010), por lo que Bhunjun y colaboradores (2021) recomiendan pruebas de patogenicidad basadas en la implementación de los postulados de Koch modificados por los nueve criterios de Bradford Hill (2021).

El primero es el criterio de especificidad el cual sugiere que la exposición causa sólo una enfermedad, el criterio de temporalidad sugiere que la exposición al agente debe preceder al inicio de la enfermedad, el gradiente biológico se refiere a que la presencia de una relación dosis-respuesta apoya la asociación causal entre la exposición y el efecto, los criterios de plausibilidad y coherencia se cumplen cuando la relación es coherente con los conocimientos actuales sobre la etiología y el mecanismo de la enfermedad, los criterios de experimento y analogía explican que se debe aportar evidencia de una relación causal entre un agente particular y una enfermedad específica (Bhunjun et al., 2021).

Por otra parte, se encontró que 19 géneros reportan especies capaces de sintetizar sustancias biológicas activas como micotoxinas, fitotoxinas, enzimas y sustancias anticancerígenas y dentro de estos géneros siete reportan especies biocontroladoras de insectos, bacterias y otros hongos, en el Anexo D se puede observar una tabla resumen de esta información (Kharwar et al., 2014).

Conclusiones

En este trabajo se identificó 43 hongos aislados a partir de la rizósfera de *E. pycnophylla* con muerte ascendente mediante secuenciación y análisis de regiones específicas de ADN como ITS y β -tubulina.

La región ITS fue eficiente para la describir la diversidad fúngica asociada a la rizósfera de *Espeletia pycnophylla*, ya que mediante su análisis se pudo determinar que los 43 hongos aislados pertenecen a los phylum Ascomycota, Basidiomycota y Mucoromycota, 6 clases (Sordariomycetes, Letiomycetes, Euromycetes, Dothideomycetes, Agaricomycetes y Mortierellomycetes), 9 órdenes, 20 familias y 23 géneros.

El fragmento de la región de la β -tubulina amplificado mediante los cebadores β 2a y β 2b no resultó eficiente para resolver taxonómicamente los aislados pertenecientes a los géneros *Pezicula*, *Tolypocladium*, *Mollisia*, *Hyalopeziza*, *Hyaloscypha*, *Mortierella*, *Bjerkandera*, *Corallomycetella*, *Leptobacillium*, *Hyaloscypha*, *Chloridium* y *Leohumicola*.

De acuerdo al alineamiento en la herramienta BLAST y a los análisis filogenéticos, el aislado SR MU4 M17 solamente se pudo identificar hasta el nivel de clase (Letiomyces) con el marcador ITS, por lo que es pertinente una caracterización más completa.

Se determinó en los hongos identificados la condición de fitopatógenos e inócuos con base en la literatura reportada, ya que de la revisión de los 23 géneros descritos siete reportan especies fitopatógenas, estos son *Corallomycetella*, *Microdochium*, *Pezicula*, *Mollisia*, , *Alternaria*, *Paraconiothyrium*, y *Bjerkandera*; ocho reportan especies biocontroladoras (*Metapochonia*, *Keithomyces*,

Trichoderma, *Leptobacillium*, *Clonostachys*, *Tolypocladium*, *Allantophomopsis* y *Chloridium*), tres géneros reportan especies patógenas y biocontroladoras *Phialocephala*, *Penicillium* y *Cladosporium* y para los cinco restantes no se encontró literatura que sustente su actividad.

Recomendaciones

Se recomienda la amplificación y el análisis multilocus de regiones como: la subunidad grande de la ATP citrato liasa (*acl1*), la subunidades grande y pequeña del RNA polimerasa, la región que codifica para histona H3 (*his3*) y el factor de elongación de traducción 1-alfa (*tef1*) para los aislados de los géneros que no pudieron resolverse con la región de la β -tubulina, con el fin de dilucidar los aislados hasta nivel de especie.

Amplificar las regiones que codifican para LSU y SSU del aislado SR MU4 M17 para definir niveles superiores de taxonomía y poder continuar con los análisis correspondientes para la descripción hasta nivel específico para lograr la descripción detallada de este nuevo aislamiento.

Desarrollar estudios de la diversidad fúngica asociada a individuos sanos de *E. pycnophylla* en el páramo de Paja Blanca, para definir cuáles son susceptibles de ser evaluados en pruebas de patogenicidad, ya que según los postulados de Koch los hongos patógenos presuntamente implicados en la enfermedad no deben estar presentes en las plantas sanas.

Referencias Bibliográficas

- Ab Majid, A. H., Zahran, Z., Abd Rahim, A. H., Ismail, N. A., Abdul Rahman, W., Mohammad Zubairi, K. S., Dieng, H., & Satho, T. (2015). Morphological and molecular characterization of fungus isolated from tropical bed bugs in Northern Peninsular Malaysia, *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(9), 707–713.
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.04.012>
- Abastabar, M., Mirhendi, H., Hedayati, M. T., Shokohi, T., Rezaei-Matehkolaei, A., Mohammadi, R., Badali, H., Moazeni, M., Haghani, I., Ghoghghi, A., & Akhtari, J. (2016). Genetic and morphological diversity of the genus *penicillium* from mazandaran and tehran provinces, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.5812/jjm.28280>
- Abreu, L. M., Moreira, G. M., Ferreira, D., Rodrigues-Filho, E., & Pfenning, L. H. (2014). Diversity of *Clonostachys* species assessed by molecular phylogenetics and MALDI-TOF mass spectrometry. *Fungal Biology*, 118(12), 1004–1012. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.10.001>
- Addy, H. D., Hambleton, S., & Currah, R. S. (2000). Distribution and molecular characterization of the root endophyte *Phialocephala fortinii* along an environmental gradient in the boreal forest of Alberta. *Mycological Research*, 104(10), 1213–1221. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002896>
- Adeoyo, O. R., Pletschke, B. I., & Dames, J. F. (2019). Molecular identification and antibacterial properties of an ericoid associated mycorrhizal fungus. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1555-y>
- Agrios, G. (2005). Plant pathology: Fifth edition. In *Plant Pathology: Fifth Edition* (Vol. 9780080473).
<https://doi.org/10.1016/C2009-0-02037-6>
- Aime, M. C., Miller, A. N., Aoki, T., Bensch, K., Cai, L., Crous, P. W., Hawksworth, D. L., Hyde, K. D., Kirk, P. M., Lücking, R., May, T. W., Malosso, E., Redhead, S. A., Rossman, A. Y., Stadler, M., Thines, M., Yurkov, A. M., Zhang, N., & Schoch, C. L. (2021). How to publish a new fungal

species, or name, version 3.0. *IMA Fungus*, 12(1), 1–15. [https://doi.org/10.1186/s43008-021-00063-](https://doi.org/10.1186/s43008-021-00063-1)

1

Alapont, C. (2015). Caracterización enzimática, toxigénica y molecular de hongos filamentosos aislados en jamón D.O.P. *Departamento de Producción Sanidad y Tecnología de Alimentos*.

Andrade, A., Guzmán, M., Tosse, O., Gnecco, M., & Fajardo, Z. (2002). Paramos: Programa para el manejo sostenible y restauración de ecosistemas de alta montaña colombiana. *The Journal of Rural Health*, 11(3), 177–184. <https://doi.org/10.1111/j.1748-0361.1995.tb00413.x>

Angarita, M., Torres, M. I., & Díaz, A. K. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(5), 796–807.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000500012

Ariyawansa, H. A., Tsai, I., Thambugala, K. M., Chuang, W. Y., Lin, S. R., Hozzein, W. N., & Cheewangkoon, R. (2020). Species diversity of Pleosporalean taxa associated with *Camellia sinensis* (L.) Kuntze in Taiwan. *Scientific Reports*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69718-0>

Avellaneda, L., & Torres, E. (2013). *Biodiversidad de grupos funcionales de microorganismos asociados a suelos bajo cultivo de papa, ganadería y páramo en el Parque Nacional Natural de Los Nevados, Colombia*. 1(Fabricius 1787), 208–216.

<http://revistas.humboldt.org.co/index.php/biota/article/view/369/367>

Badotti, F., De Oliveira, F. S., Garcia, C. F., Vaz, A. B. M., Fonseca, P. L. C., Nahum, L. A., Oliveira, G., & Góes-Neto, A. (2017). Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiology*, 17(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s12866-017-0958-x>

Baik, J., Purkayastha, A., Park, K. H., & Kang, T. J. (2021). Functional characterization of melanin

decolorizing extracellular peroxidase of *bjerkandera adusta*. *Journal of Fungi*, 7(9).

<https://doi.org/10.3390/jof7090762>

Baral, H.-O., De Sloover, J., Huhtinen, S., Laukka, T., & Stenroos, S. (2009). An emendation of the genus *Hyaloscypha* to include *Fuscoscypha* (Hyaloscyphaceae, Helotiales, Ascomycotina). *Karstenia*, 49(1), 1–17. <https://doi.org/10.29203/ka.2009.430>

Baral, H., Haelewaters, D., Blaihofstr, K. P., Herbarium, F., Avenue, D., & Sciences, E. (2015). *A new attempt to classify the families of the Helotiales*. April, 1–2.

Barea, J. a, Pardini, M. I. M. C., & Gushiken, T. (2004). Extração de DNA de Materiais de Arquivo e Fontes Escassas: Revisão e Apontamentos Sobre as Possíveis Aplicações. *NewsLab*, 63(4), 96–114. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842004000400008>

Basım, E., Basım, H., Abdulai, M., Baki, D., & Öztürk, N. (2017). Identification and characterization of *Alternaria alternata* causing leaf spot of olive tree (*Olea europaea*) in Turkey. In *Crop Protection* (Vol. 92, pp. 79–88). <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.013>

Behr, M., Legay, S., & Evers, D. (2013). Molecular identification of *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp. and *Cladosporium* spp. in Luxembourg. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, 47(4), 239–247.

Benavides, I., Burbano, D., Urbano-, S., & Solarte, M. (2007). *Efecto del gradiente altitudinal sobre aspectos eutoecologicos de Espeletia pycnophylla en el paramo el infierillo (Nariño-Colombia)*. May 2014.

Benitez, A., Salazar, C., & Lagos, L. (2019). *Estudio micológico de la rizósfera de frailejones (Espeletia pycnophylla) en los Páramos de Paja Blanca y Morasurco – Nariño*. Universidad de Nariño, facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología.

Bensch, K., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Dijksterhuis, J., Jurjević, Andersen, B., Houbroken, J., Crous,

- P. W., & Samson, R. A. (2018). Cladosporium species in indoor environments. *Studies in Mycology*, 89, 177–301. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.03.002>
- Bhunjun, C. S., Phillips, A. J. L., Jayawardena, R. S., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021). Importance of molecular data to identify fungal plant pathogens and guidelines for pathogenicity testing based on Koch'S postulates. *Pathogens*, 10(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091096>
- Bosquez, C. (2018). *Caracterización morfológica y molecular de Alternaria alternata hongo fitopatígeno causante del secamiento descendente del cáliz, en frutos de Physalis peruviana en la Sierra centro-norte del Ecuador*. <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>
- Bouacem, K., Rekik, H., Jaouadi, N. Z., Zenati, B., Kourdali, S., El Hattab, M., Badis, A., Annane, R., Bejar, S., Hacene, H., Bouanane-Darenfed, A., & Jaouadi, B. (2018). Purification and characterization of two novel peroxidases from the dye-decolorizing fungus Bjerkandera adusta strain CX-9. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 636–646. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.061>
- Burbano, O., Galindez, E., Benitez, A., Alvarezl, A., Florez, C., Betancourth, C., Salazar, C., David, A., & Lagos, L. E. (2020). *Declive y muerte de los frailejones en los ecosistemas alpinos de los Andes del Norte: Modelo Conceptual*. June, 0–26. <https://doi.org/10.31219/osf.io/9mkp6>
- Cabrera, M., & Ramírez, W. (2014). Restauración ecológica de los Páramos de Colombia. Transformación y herramientas para su conservación. In *Restauración ecológica de los páramos de colombia: Transformación y herramientas para su conservación*.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Conteo de conidias en el hematocímetro o cámara de Neubauer. In *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. www.cipotato.org
- Carris, L., Little, C., & Stiles, C. (2007). Introduction to Fungi. *Kew Bulletin*, 28(1), 166. <https://doi.org/10.2307/4117096>

- Carter, A. T., Mackenzie, D. A., Pearson, B. M., & Archer, D. B. (2000). PCR fingerprinting with a consensus tRNA primer enables strain identification of *Mortierella alpina*. *Mycological Research*, 104(7), 794–799. <https://doi.org/10.1017/S0953756299002105>
- Carvalho, M., Amorim, R., Daher, B., Silva, I., Freitas, S., Soares, C., & Felipe, S. (2003). *Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis*. 39, 204–210. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(03\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(03)00044-6)
- Castañeda, A., & Montes, C. (2018). Carbono almacenado en páramo andino. *Entramado*, 13(1), 210–221. <https://doi.org/10.18041/entramado.2017v13n1.25112>
- Chen, S., Zhang, Y., Zhao, C., Ren, F., Liu, X., & Che, Y. (2014). Hawaiiinolides E-G, cytotoxic cassane and cleistanthane diterpenoids from the entomogenous fungus *Paraconiothyrium hawaiiense*. *Fitoterapia*, 99(1), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.09.021>
- Cheng, W., & Gershenson, A. (2007). Carbon Fluxes in the Rhizosphere. In *The Rhizosphere*. <https://doi.org/10.1016/B978-012088775-0/50004-5>
- Chi, W. C., Chen, W., He, C. C., Guo, S. Y., Cha, H. J., Tsang, L. M., Ho, T. W., & Pang, K. L. (2019). A highly diverse fungal community associated with leaves of the mangrove plant *Acanthus ilicifolius* var. *xiamenensis* revealed by isolation and metabarcoding analyses. *PeerJ*, 2019(7). <https://doi.org/10.7717/peerj.7293>
- Chitiva, A., Torrenegra, R., Cabrera, C., Díaz, N., & Victoria, P. (2011). Contribución Al Estudio De Microhongos Filamentosos En Los Ecosistemas Páramo De Guasca Y El Tablazo. *Pontificia Universidad Javeriana*, 10.
- Colombier, M. A., Alanio, A., Denis, B., Melica, G., Garcia-Hermoso, D., Levy, B., Peraldi, M. N., Glotz, D., Bretagne, S., & Galliena, S. (2015). Dual invasive infection with *Phaeoacremonium parasiticum* and *Paraconiothyrium cyclothyrioides* in a renal transplant recipient: Case report and

- comprehensive review of the literature of *Phaeoacremonium phaeohyphomycosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(7), 2084–2094. <https://doi.org/10.1128/JCM.00295-15>
- Conti, M., Cinget, B., Vivancos, J., Oudemans, P., & Bélanger, R. R. (2019). A molecular assay allows the simultaneous detection of 12 fungi causing fruit rot in cranberry. *Plant Disease*, 103(11), 2843–2850. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0531-RE>
- Corponariño. (2010). *Declaratoria del parque natural regional páramo de Paja Blanca, territorio sagrado del pueblo de los Pastos. Nariño: Corponariño*.
- Cotes, A. M., Consultant, I. S., Bettiol, W., Mondino, P., & Montealegre, J. R. (2010). *Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe. April*, 405.
- Crous, P., Cowan, D., Yilmaz, N., Larsson, E., Angelini, C., Brandrud, T., Dearnaley, J., Dima, B., Dovana, F., Fechner, N., García, D., Gené, J., Halling, R., Houbraken, J., & Leonard, P. (2020). Fungal Planet description sheets. *Persoonia*, 45, 251–409. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.45.10>
- Crous, P. W., Carris, L. M., Giraldo, A., Groenewald, J. Z., Hawksworth, D. L., Hernández-Restrepo, M., Jaklitsch, W. M., Lebrun, M. H., Schumacher, R. K., Benjamin Stielow, J., Van Der Linde, E. J. E. J., Vilcane, J., Voglmayr, H., & Wood, A. R. (2015). The genera of fungi-fixing the application of the type species of generic names-G 2: Allantophomopsis, Latorua, Macrodiplodiopsis, Macrohilum, Milospium, Protostegia, Pyricularia, Robillarda, Rotula, Septoriella, Torula, and Wojnowicia. *IMA Fungus*, 6(1), 163–198. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.01.11>
- Crous, P. W., Quaedvlieg, W., Hansen, K., Hawksworth, D. L., & Groenewald, J. Z. (2014). Phacidium and ceuthospora (Phacidiaceae) are congeneric: Taxonomic and nomenclatural implications. *IMA Fungus*, 5(2), 173–193. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2014.05.02.02>
- Crous, P. W., Verkley, G. J. M., & Groenewald, J. Z. (2013). Phytopathogenic Dothideomycetes. In

- Studies in Mycology* (Vol. 75, Issue June). [https://doi.org/10.1016/s0166-0616\(14\)60012-9](https://doi.org/10.1016/s0166-0616(14)60012-9)
- Cuevas, J. (2016). Los Hongos: Héroes Y Villanos De La Prosperidad Humana. *Uam*, 17(1607–6079), 9. <http://www.revista.unam.mx/vol.17/num9/art69/>
- Dai, X., Sun, Y., Zhang, T., Ming, Y., & Hongwei, G. (2020). An overview on natural farnesyltransferase inhibitors for efficient cancer therapy. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 1027–1044. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1732366>
- Das, K., Lee, S. Y., Choi, H. W., Eom, A. H., Cho, Y. J., & Jung, H. Y. (2020). Taxonomy of *Arthrinium minutisporum* sp. nov., *Pezicula neosporulosa*, and *Acrocallymma pterocarpi*: New Records from Soil in Korea. *Mycobiology*, 48(6), 450–463. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1830741>
- Datta, R., Swaroop, R., Shamina, M., Pathan, I., & Teresa, M. (2020). Carbon and Nitrogen Cycling in Soil. In *Carbon and Nitrogen Cycling in Soil*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7264-3>
- Dawkins, K., & Esiobu, N. (2017). Arbuscular and ectomycorrhizal fungi associated with the invasive Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*) and two native plants in South Florida. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00665>
- De Jong, S. N., Lévesque, C. A., Verkley, G. J. M., Abeln, E. C. A., Rahe, J. E., & Braun, P. G. (2001). Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. *Mycological Research*, 105(6), 658–669. <https://doi.org/10.1017/S0953756201003926>
- Delgado, A., Zambrano, J., Ramos, M., Arteaga, J., Casanova, M., Narváez, G., Calderon, J., David, M., & Pantoja, Y. (2010). *Declaratoria del “parque natural regional Páramo de Paja Blanca, del pueblo de los Pastos”, Nariño - Colombia Propuesta Técnica*.
- Demissie, Z. A., Brown, W. G., & Loewen, M. C. (2019). A universally primed-polymerase chain reaction (UP-PCR) marker to discriminate *clonostachys rosea* ACM941 from related strains.

- Journal of Fungi*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/jof5020039>
- Demjanová, S., Jevinová, P., Pipová, M., & Regecová, I. (2021). Identification of *penicillium verrucosum*, *penicillium commune*, and *penicillium crustosum* isolated from chicken eggs. *Processes*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pr9010053>
- Dentinger, B. T. M., Didukh, M. Y., & Moncalvo, J. M. (2011). Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina). *PLoS ONE*, 6(9), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025081>
- Dias, M., Nascimento, D., Coutinho, H., Imbeloni, T., Batista, J., Silva, V., & Freire, M. (2015). *Fungos da rizosfera de plantas de restinga com potencial para a promoção do crescimento de mudas*. 68–69. http://www.seer.perspectivasonline.com.br/index.php/biologicas_e_saude/article/view/788
- Diazgranados, M. (2012). A nomenclator for the frailejones (Espeletiinae Cuatrec., Asteraceae). *PhytoKeys*, 16(0), 1–52. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.16.3186>
- Diazgranados, M., & Barber, J. C. (2017). *Geography shapes the phylogeny of frailejones (Espeletiinae Cuatrec ., Asteraceae): a remarkable example of recent rapid radiation in sky islands*. 1–35. <https://doi.org/10.7717/peerj.2968>
- Einax, E., & Voigt, K. (2003). Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum fungi. *Organisms Diversity and Evolution*, 3(3), 185–194. <https://doi.org/10.1078/1439-6092-00069>
- Ekanayaka, A. H., Hyde, K. D., Gentekaki, E., McKenzie, E. H. C., Zhao, Q., Bulgakov, T. S., & Camporesi, E. (2019). Preliminary classification of Leotiomyces. *Mycosphere*, 10(1), 310–489. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/10/1/7>
- Eshel, A., & Beeckman, T. (2013). *Plant Roots: The Hidden Half*.
- Fan, B., Dewapriya, P., Li, F., Blümel, M., & Tasdemir, D. (2020). Pyrenosetins A-C, new

- decalinoylspirotetramic acid derivatives isolated by bioactivity-based molecular networking from the seaweed-derived fungus *Pyrenochaetopsis* sp. FVE-001. *Marine Drugs*, 18(1).
<https://doi.org/10.3390/md18010047>
- Fan, B., Dewapriya, P., Li, F., Grauso, L., Blümel, M., Mangoni, A., & Tasdemir, D. (2020). Pyrenosetin d, a new pentacyclic decalinoyltetramic acid derivative from the algicolous fungus *pyrenochaetopsis* sp. FVE-087. *Marine Drugs*, 18(6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/md18060281>
- Flórez, C. A., Lagos, L. E., Betancourth, C., & Salazar, C. (2019). *Caracterización de hongos aislados de frailejón (Espeletia pycnophylla: Asteraceae) del Páramo de Paja Blanca, Departamento de Nariño, Colombia. Revista Fitopatología Colombiana*, 43(2) <https://ascolfi.org/publicaciones/#>
- Gaitán, M. (2018). *Identificación de hongos asociados a lesiones de frailejones (Espeletia spp.) en Parámos de Cundinamarca*. [Pontificia Universidad Javeriana].
[https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/39200/Trabajo de grado dic 5 2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/39200/Trabajo%20de%20grado%20dic%205%202018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Galindez, E., Lagos, L. E., Castillo, G., Salazar, C., & Betancourth, C. (2020). Hongos detectados en la entomofauna asociada a *Espeletia pycnophylla*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 23(2). <https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n2.2020.1497>
- García, I., Vázquez, S., Penna, C., & Cassán, F. (2013). *Rizosfera, biodiversidad y agricultura sustentable*.
- García, N. (2007). *Libro rojo de plantas de Colombia*.
- Garzón, N. (2013). *Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los Páramos de Guasca y Cruz verde, Cundinamarca - Colombia*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Gomez, E. (2008). *Caracterización de cepas toxigenicas del genero Fusarium mediante tecnicas de biología molecular*. [Universidad politécnica de Valencia].

<http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12380/TESIS DE MASTER FINAL 08.pdf?sequence=1>

- González, D. (2012). *Estudio preliminar de la composición de hongos endófitos en Espeletia argentea (Bonpl.) en la cuenca de la quebrada calostros (PNN Chingaza)*. 1–26.
- Griffith, G. W., & Shaw, D. S. (1998). Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 4007–4014.
<https://doi.org/10.1128/aem.64.10.4007-4014.1998>
- Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Aveskamp, M. M., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2010). Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. *Mycologia*, 102(5), 1066–1081. <https://doi.org/10.3852/09-240>
- Gunjal, A., & Shinde, S. (2021). *Microbial Diversity and Ecology in Hotspots*.
- Hambleton, S., Nickerson, N. L., & Seifert, K. A. (2005). *Leohumicola*, a new genus of heat-resistant hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 53(1985), 29–52. <https://doi.org/10.3114/sim.53.1.29>
- Heinonsalo, J., Buée, M., & Vaario, L. M. (2017). Root-endophytic fungi cause morphological and functional differences in scots pine roots in contrast to ectomycorrhizal fungi. *Botany*, 95(2), 203–210. <https://doi.org/10.1139/cjb-2016-0161>
- Herrera, C. ., Rossman, A. Y., Samuels, G. J., Lechat, C., & Chaverri, P. (2013). Revision of the genus *Corallomycetella* with *Corallonectria* gen. nov. for *C. jatrophae* (Nectriaceae, Hypocreales). *Mycosytema*, 32(May), 518–544. <http://www.mycology.umd.edu/PDFs/Corallomycetella.pdf>
- Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., & Vásquez, A. (2014). *Los Páramos Andinos ¿Que sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema Páramo*.
- Hood, I. A. (2006). The mycology of the Basidiomycetes. *Heart*, 124, 7–9.

- Horisawa, S., Sakuma, Y., & Doi, S. (2013). Identification and species-typing of wood rotting fungi using melting curve analysis. *Journal of Wood Science*, 59(5), 432–441. <https://doi.org/10.1007/s10086-013-1349-z>
- Hosoya, T., & Huhtinen, S. (2002). Hyaloscyphaceae in Japan (7): *Hyaloscypha albohyalina* var. *monodictys* var. nov. *Mycoscience*, 43(5), 405–409. <https://doi.org/10.1007/s102670200059>
- Hsun, C., Ling, F., & Chun, T. (2009). *The b -tubulin gene as a molecular phylogenetic marker for classification and discrimination of the Saccharomyces sensu stricto complex*. 135–142. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9296-1>
- IAvH. (2013). *Nueva cartografía de los páramos de Colombia, Escala 1:100.000*. 38. <http://www.humboldt.org.co/images/pdf/CartografiaParamos/1-Mapa General-Horizontal.pdf>
- Iglesias, G. (2019). *Técnicas de Biología Molecular*. <https://genmolecular.com/tecnicas-de-biologia-molecular/>
- Index Fungorum*. (2021). www.indexfungorum.org
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt- Universidad de Nariño. (2015). *Estudios técnicos, económicos, sociales y ambientales complejos de Páramos la Cocha – Patascoy*. (Vol. 014, Issue 13).
- Iriki, E. N., Gaudet, D. A., Tronsmo, A. M., Matsumoto, N., & Yoshida, M. (2014). *Low temperature diseases caused by Microdochium nivale Chapter 7 from “ Low Temperature Plant Microbe Interactions Under Snow ”. and A . Nishimune . Published by the Hokkaido National Agricultural Experiment Station , January 2001 . Low temperature diseas. September.*
- Islam, T., Gupta, D. R., Surovy, M. Z., Mahmud, N. U., Mazlan, N., & Islam, T. (2019). Identification and application of a fungal biocontrol agent *Cladosporium cladosporioides* against *Bemisia tabaci*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1), 1698–1705.

<https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1695541>

Jaklitsch, W., Baral, H.-O., Lücking, R., Lumbsch, T., & Wolfgang, F. (2016). *Syllabus of Plant Families - A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien Part 1/2: Ascomycota* (13. editio).

Jamali, S. (2020). First report of *Paraconiothyrium fuckelii* (Didymosphaeriaceae, Pleosporales), causing stem canker of *Rosa hybrida*, from Iran. *Czech Mycology*, 72(1), 71–82.

<https://doi.org/10.33585/cmy.72105>

Jamiołkowska, A., Księżniak, A., Hetman, B., Kopacki, M., Skwaryło-Bednarz, B., Gałązka, A., & Thanoon, A. H. (2017). Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with plants and soil microflora. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 16(5), 89–95.

<https://doi.org/10.24326/asphc.2017.5.9>

Jankowiak, R., Bilański, P., Paluch, J., & Kołodziej, Z. (2016). Fungi associated with dieback of *Abies alba* seedlings in naturally regenerating forest ecosystems. *Fungal Ecology*, 24, 61–69.

<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.08.013>

Jewell, L. (2013). *Genetic and Pathogenic Differences Between Microdochium nivale and Microdochium majus*.

Johnston, P. R., Quijada, L., Smith, C. A., Baral, H. O., Hosoya, T., Baschien, C., Pärtel, K., Zhuang, W. Y., Haelewaters, D., Park, D., Carl, S., López-Giráldez, F., Wang, Z., & Townsend, J. P. (2019). A multigene phylogeny toward a new phylogenetic classification of Leotiomycetes. *IMA Fungus*, 10(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0002-x>

Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase Chain Reaction : Methods , Pr. *Int J Biomed Res*, 1(5), 81–97. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>

Kang, X., Kirui, A., Muszyński, A., Widanage, M. C. D., Chen, A., Azadi, P., Wang, P., Mentink-Vigier, F., & Wang, T. (2018). Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR.

Nature Communications, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05199-0>

Kaoping, Z., Adams, J., Shi, Y., Teng, Y., Ruibo, S., Dan, H., Yingying, N., & Chu, H. (2017).

Environment and geographic distance differ in relative importance for determining fungal community of rhizosphere and bulk soil. *Environmental Microbiology*, 26 (243).

<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13865>

Kavanagh, K. (2017). *Fungi: Biology and Applications*.

Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F., & Rehner, S. A. (2014). Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106(4), 811–829. <https://doi.org/10.3852/13-319>

Kharwar, R. N., Verma, V. C., Kumar, A., Gond, S. K., Harper, J. K., Hess, W. M., Lobkovosky, E., Ma, C., Ren, Y., & Strobel, G. A. (2009). Javanicin, an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of neem, *chloridium* sp. *Current Microbiology*, 58(3), 233–238.

<https://doi.org/10.1007/s00284-008-9313-7>

Kharwar, R., Upadhyay, R., Dubey, N., & Raghuwanshi, R. (2014). Microbial diversity and biotechnology in food security. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*, 1–610. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2>

Klingen, I., Eilenberg, J., & Meadow, R. (2002). Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 91(1–3), 191–198. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00227-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00227-4)

Kondo, N., Tokiwa, T., Sato, K., Ōmura, S., & Nonaka, K. (2020). *Metapochonia hahajimaensis* (Clavicipitaceae, Hypocreales), a new species from soil in Hahajima Island, Tokyo, Japan. *Mycoscience*, 61(6), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2020.06.001>

Kosonen, T., Huhtinen, S., & Hansen, K. (2021). Taxonomy and systematics of hyaloscyphaceae and

- arachnopezizaceae. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 46, 26–62.
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.02>
- Kreebs, J., Elliott, G., & Stepehen, K. (2014). *Lewin's Genes: Vol. XI*.
- Lan, B., Yang, Y., Guo, L., Li, X., & Huo, G. (2020). Among-Population Genetic Diversity of Rice Blast Fungus Based on Fingerprinting of Virulence-related genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 112(June), 101554. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101554>
- Lawrence, D. P., Gannibal, P. B., Peever, T. L., & Pryor, B. M. (2013). The sections of alternaria: Formalizing species-group concepts. *Mycologia*, 105(3), 530–546. <https://doi.org/10.3852/12-249>
- Li, M., Yang, Q., & Song, J. (2010). Three tubulin genes of *Trichoderma harzianum*: Alpha, beta and gamma. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(4), 811–816.
<https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000400009>
- Liang, J., Li, G., Zhao, M., & Cai, L. (2019). A new leaf blight disease of turfgrasses caused by *Microdochium poae*, sp. nov. *Mycologia*, 111(2), 265–273.
<https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1569417>
- Lines, K. (2005). *The rhizosphere Soil biology basics*.
http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0004/42259/Rhizosphere.pdf
- Liu, L., Gao, H., Chen, X., Cai, X., Yang, L., Guo, L., Yao, X., & Che, Y. (2010). Brasilamides A-D: Sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *paraconiothyrium brasiliense*. *European Journal of Organic Chemistry*, 10(17), 3302–3306. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201000284>
- Liu, Y. J., Hodson, M. C., & Hall, B. D. (2006). Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: Phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-74>
- Lizarazo-Medina, P. X., & Gómez-Vásquez, D. (2015). Microbiota rizosférica de *Espeletia* spp. de los

- páramos de Santa Inés y de Frontino-Urrao en Antioquia, Colombia. *Acta Biologica Colombiana*, 20(1), 175–182. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.42827>
- Lizarazo, X., & Gómez, D. (2015). Rizospheric microbiota of *Espeletia* spp. from Santa Inés and Frontino-Urrao paramos in Antioquia, Colombia [Microbiota rizosférica de *Espeletia* spp. de los páramos de Santa Inés y de Frontino-Urrao en Antioquia, Colombia]. *Acta Biologica Colombiana*, 20(1), 175–182. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.42827>
- Maharachchikumbura, S., Hyde, K. D., Jones, E. B. G., McKenzie, E. H. C., Bhat, J. D., Dayarathne, M. C., Huang, S. K., Norphanphoun, C., Senanayake, I. C., Perera, R. H., Shang, Q. J., Xiao, Y., D'souza, M. J., Hongsanan, S., Jayawardena, R. S., Daranagama, D. A., Konta, S., Goonasekara, I. D., Zhuang, W. Y., ... Wijayawardene, N. N. (2016). Families of Sordariomycetes. In *Fungal Diversity* (Vol. 79, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s13225-016-0369-6>
- Mamarabadi, M., Jensen, B., Jensen, D. F., & Lübeck, M. (2008). Real-time RT-PCR expression analysis of chitinase and endoglucanase genes in the three-way interaction between the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726, *Botrytis cinerea* and strawberry. *FEMS Microbiology Letters*, 285(1), 101–110. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01228.x>
- Marcial, N., Fagbola, O., Costa, R., Rumjanek, N. G., Buchner, A., Mendonça, L., & Smalla, K. (2003). Erratum: Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics (Applied and Environmental Microbiology (2003) 69:7 (3758-3766)). *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5737. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5736.2003>
- Mares, Y., Ruíz, M., Pérez, D., Ornelas, J., Acosta, C., Berlanga, D., & Velasco, C. (2017). Identificación morfológica y molecular de especies de *Mortierella*.pdf. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol.36 no. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1710-2>
- Martínez, B., InfanteI, D., & ReyesII, Y. (2013). *Trichoderma* spp. and their role in the control of crop pests. *Rev. Protección Veg*, 28(1), 1–11.

- Martínez, L., Vanegas, K., Salazar, M., Gutiérrez, P., & Marín, M. (2014). Detección y cuantificación por qPCR de *colletotrichum lindemuthianum* en tejidos y semillas de frijol en Antioquia, Colombia. *Bioagro*, 26(1), 13–20.
- Mata, G., Medel, R., & Salmones, D. (2019). *Culture of Pleurotus ostreatus in pine shavings : isolation of strains and evaluation*. 25. <https://doi.org/10.21829/myb.2019.2521715>
- McNear, D. (2013). The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. In *Nature Education Knowledge* (Vol. 4, Issue 3, p. 1).
- Medina, M. (2009). *Estado de avance en la investigación de las comunidades de frailejón que están siendo afectadas por insectos plaga y hongos fitopatógenos en el páramo de Chingaza, Primer reporte de afectación*.
- Miao, C. ping, Mi, Q. L., Qiao, X. G., Zheng, Y. K., Chen, Y. W., Xu, L. H., Guan, H. L., & Zhao, L. X. (2015). *Rhizospheric fungi of Panax notoginseng: diversity and antagonism to host phytopathogens*. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.06.004>.This
- Mongkolsamrit, S., Khonsanit, A., Thanakitpipattana, D., Tasanathai, K., Noisriboom, W., Lamlerthton, S., Himaman, W., Houbraken, J., Samson, R. A., & Luangsa-ard, J. (2020). Revisiting *Metarhizium* and the description of new species from Thailand. *Studies in Mycology*, 95, 171–251. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.04.001>
- Montalva, C., Silva, J. J., Rocha, L. F. N., Luz, C., & Humber, R. A. (2019). Characterization of *Tolypocladium cylindrosporum* (Hypocreales, Ophiocordycipitaceae) isolates from Brazil and their efficacy against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 266–276. <https://doi.org/10.1111/jam.14093>
- Montes, B., Restrepo, A., & McEwen, J. (2003). Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. *Biomédica*, 23(2), 213. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v23i2.1214>

- Morales, J., & Estévez, J. (2006). El Páramo: ¿Ecosistema en vía de extinción? 22, 22, 39–51.
- Motato, V., Gugliotta, A., Rajchenberg, M., Catania, M., Urcelay, C., & Robledo, G. (2020). New insights on Bjerkandera (Phanerochaetaceae, polyporales) in the neotropics with description of Bjerkandera albocinerea based on morphological and molecular evidence. *Plant Ecology and Evolution*, 153(2), 229–245. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2020.1667>
- Mrnka, L., Koukol, O., Hrabal, R., & Novák, F. (2020). Interactions of saprotrophic and root symbiotic fungi control the transformation of humic substances and phosphorus in Norway spruce needle litter. *Soil Biology and Biochemistry*, 149(July). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107919>
- Muñoz, D. (2017). Transformaciones y prospectiva del paisaje en el Páramo de Paja Blanca, Nariño, Colombia. *Perspectiva Geográfica*, 22(2), 47–66. <https://doi.org/10.19053/01233769.7598>
- Na, X., Ma, C., Ma, S., Ma, X., Zhu, X., Xu, P., Zhu, H., Cao, X., & Liang, W. (2019). Monocropping decouples plant–bacteria interaction and strengthens phytopathogenic fungi colonization in the rhizosphere of a perennial plant species. *Plant and Soil*, 445(1–2), 549–564. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04311-7>
- Nakamura, N., Hosoya, T., Tanaka, C., & Takeuchi-Kaneko, Y. (2018). Detection of a root-associated group of Hyaloscyphaceae (Helotiales) species that commonly colonizes Fagaceae roots and description of three new species in genus Glutinomycetes. *Mycoscience*, 59(5), 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.02.010>
- Nath, A., Mishra, S., Singh, S., & Gupta, A. (2019). *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives*. 3(October), 73–100. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1>
- NCBI, N. C. for B. I. (2021). *BLAST tool*. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Nishikawa, J., & Nakashima, C. (2020). Japanese species of Alternaria and their species boundaries

based on host range . *Fungal Systematics and Evolution*, 5(1), 197–282.

<https://doi.org/10.3114/fuse.2020.05.13>

O'Donnell, K., Sutton, D., Rinaldi, M., Sarver, B., Balajee, A., Schroers, H., Summerbell, R., Robert, V., Crous, P., Zhang, N., & Aoki, T. (2010). Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3708–3718.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00989-10>

Oliveira, I., Pereira, J. A., Bento, A., & Baptista, P. (2011). Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. *Annals of Microbiology*, 61(2), 339–344.
<https://doi.org/10.1007/s13213-010-0147-8>

Oliveira, M. C. D. S., Regitano, L. C. D. A., Roese, A. D., Anthonisen, D. G., Patocínio, E., Parma, M. M., Scagliusi, S. M. M., Timóteo, W. H. B., & Jardim, S. N. (2007). Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. *Embrapa Pecuária Sudeste*, 43.
<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>

Osorio, J. (2020). *Mejoramiento de la Síntesis de Nanopartículas de Plata a partir del Hongo Ligninolítico Anamorfo R1 de Bjerkandera sp y su Evaluación para Aplicación en Apósitos.*

Ozimek, E., & Hanaka, A. (2021). *Mortierella* species as the plant growth-promoting fungi present in the agricultural soils. *Agriculture (Switzerland)*, 11(1), 1–18.
<https://doi.org/10.3390/agriculture11010007>

Ozimek, E., Jaroszuk-ściseł, J., Bohacz, J., Korniłowicz-Kowalska, T., Tyśkiewicz, R., Słomka, A., Nowak, A., & Hanaka, A. (2018). Synthesis of indoleacetic acid, gibberellic acid and acc-deaminase by *Mortierella* strains promote winter wheat seedlings growth under different conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms19103218>

- Papizadeh, M., Soudi, M. R., Amini, L., Wijayawardene, N. N., & Hyde, K. D. (2017). *Pyrenochaetopsis tabarestanensis* (Cucurbitariaceae, pleosporales), a new species isolated from rice farms in north Iran. *Phytotaxa*, 297(1), 15–28. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.297.1.2>
- Park, M. S., Oh, S. Y., Fong, J. J., Houbraeken, J., & Lim, Y. W. (2019). The diversity and ecological roles of *Penicillium* in intertidal zones. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49966-5>
- Pavón, M. ángel, González, I., Martín, R., & García Lacarra, T. (2012). ITS-based detection and quantification of *Alternaria* spp. in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR. *Food Microbiology*, 32(1), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.05.006>
- Pedraza, R., Teixeira, K.-R. S., Scavino, A. F., De Salamone, I. G., Baca, B., Azcón, R., Baldani, V., & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155–164. https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num2_art:206
- Peña, J., Ramírez, G., & Barrera, B. (2013). Los metodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: Historia, fundamentos y perspectivas. *Educacion Quimica*, 24(2), 237–246. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)72468-6](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)72468-6)
- Peña, J., Ramírez, O., & Figueroa, B. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: Historia, fundamentos y perspectivas. *Educacion Quimica*, 24(2), 237–246. [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(13\)72468-6](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(13)72468-6)
- Peterson, S. W. (2012). *Aspergillus* and *Penicillium* identification using DNA sequences: Barcode or MLST? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(2), 339–344. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4165-2>
- Peterson, S. W., Jurjević, Ž., & Frisvad, J. C. (2015). Expanding the species and chemical diversity of

penicillium section cinnamopurpurea. *PLoS ONE*, 10(4).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121987>

Porter, T. M., Skillman, J. E., & Moncalvo, J. M. (2008). Fruiting body and soil rDNA sampling detects complementary assemblage of Agaricomycotina (Basidiomycota, Fungi) in a hemlock-dominated forest plot in southern Ontario. *Molecular Ecology*, 17(13), 3037–3050.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03813.x>

Pouchon, C., Fernández, A., Nassar, J., Boyer, F., Aubert, S., Lavergne, S., & Mavárez, J. (2018).

Phylogenomic Analysis of the Explosive Adaptive Radiation of the Espeletia Complex (Asteraceae) in the Tropical Andes *Phylogenomic Analysis of the Explosive Adaptive Radiation of the Espeletia Complex (Asteraceae) in the Tropical Andes*. November. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy022>

Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 13(1), 63–77.

<https://doi.org/10.1007/s11157-013-9317-z>

Punja, Z. K., Collyer, D., Scott, C., Lung, S., Holmes, J., & Sutton, D. (2019). Pathogens and Molds Affecting Production and Quality of Cannabis sativa L. *Frontiers in Plant Science*, 10(October), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01120>

Quijada, L., & Beltran, E. (2019). Discovering unrecorded genera of Helotiales in the Canary Islands. *Ascomycete.Org*, 11(2), 48–54.

Quijada, Luis, Huhtinen, S., Negrín, R., & Beltrán, E. (2017). *Studies in Hyaloscyphaceae associated with major vegetation types in the Canary Islands II: a revision of Hyaloscypha*. 47(1), 31–42.

<https://doi.org/doi.org/10.3372/wi.47.47104>

Quijada, Luis, Johnston, P. R., Cooper, J. A., & Pfister, D. H. (2018). Overview of Phacidiales, including Aotearoamyces gen. nov. on Nothofagus. *IMA Fungus*, 9(2), 371–382.

<https://doi.org/10.5598/ima fungus.2018.09.02.08>

- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rangel, J. O. (2015). *La biodiversidad de Colombia : significado y distribución regional*. 39(151), 176–200.
- Rani, C. (2013). *Introduction to mycology*.
- Rashad, F., & Kazaz, A. (2015). Molecular Markers: an Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9(3), 118–130. <https://doi.org/10.13187/ejmb.2015.9.118>
- Ribeiro, R., & Danuza, G. (2006). Fungos Principais Grupos E Aplicações Biotecnológicas. *INSTITUTO DE BOTÂNICA – IBt*, 20.
- Rincón, C. (2014). *Modelo de evaluación para resolver problemas de filogenia molecular en el género Fusarium, basado en los análisis de microsecuencias de ADN de multilocus conservados*. 179.
- Rodriguez, R., Tigmasa, N., García, K., Pazmiño, R., & Caamaño, R. (2017). *Espeletia pycnophylla subsp. angelensis, el ángel del norte*. 272–276.
- Roger, A. J., Sandblom, O., Doolittle, W. F., & Philippe, H. (1999). An evaluation of elongation factor 1 α as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 16(2), 218–233. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026104>
- Romero, L. (2011). *Propagacion, adaptacion y crecimiento del Frailejon Espeletia conglomerata en vivero*.
- Ruiz, J. (2012). Fungal Cell Wall. In *Fungal Cell Wall*. <https://doi.org/10.1201/b11873>
- Saba, H. (2012). Trichoderma – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere*,

3(4), 524–531. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/3/4/14>

Salazar, C. (2016). *Caracterización molecular y morfológica de aislamientos de Fusarium spp.*

productores de micotoxinas [Universidad Nacional de Colombia].

<http://www.bdigital.unal.edu.co/53757/>

Salvatore, M. M., Andolfi, A., & Nicoletti, R. (2021). The genus cladosporium: A rich source of diverse and bioactive natural compounds. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 13).

<https://doi.org/10.3390/molecules26133959>

Samson, R., & Pitt, J. (2000). *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification.*

Sánchez-García, B. M., Espinosa-Huerta, E., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R., & Mora-Avilés, M. A. (2017). Trichoderma spp. native strains molecular identification and in vitro antagonistic evaluation of root phitopathogenic fungus of the common bean (Phaseolus vulgaris L.) cv. montcalm. *Agrociencia*, 51(1), 63–79.

Santos, E., Da Silva, L., Souto, A., & Valério, H. M. (2007). Avaliação da eficiência dos métodos de extração de DNA de fungos para maximizar a detecção de fungos endofíticos. *Ensino, Pesquisa, Extensão, Gestão, Cct* 1252.

Saravanakumar, K., & Wang, M. H. (2020). Isolation and molecular identification of Trichoderma species from wetland soil and their antagonistic activity against phytopathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 109(December 2019), 101458.

<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101458>

Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The microbiology of cocoa fermentation. In *Caffeinated and Cocoa Based Beverages: Volume 8. The Science of Beverages*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1>

- Schneider, D. J., & Collmer, A. (2010). Studying plant-pathogen interactions in the genomics era: Beyond molecular Koch's postulates to systems biology. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 457–479. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114411>
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Vincent, R., Spouge, J. a, Levesque, A., & Chen, W. (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>
- Scorsetti, A. C., Elíades, L. A., Stenglein, S. A., Cabello, M. N., Pelizza, S. A., & Saparrat, M. C. N. (2012). Pathogenic and enzyme activities of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum* (Ascomycota: Hypocreales) from Tierra del Fuego, Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 60(2), 833–841. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i2.4006>
- Seifert, K. A., & Rossman, A. Y. (2010). How to describe a new fungal species. *IMA Fungus*, 1(2), 109–116. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2010.01.02.02>
- Serna, M., Andradel, G., Arredondo, H. ., & Gallou, A. (2018). Two efficient methods for isolation of high-quality genomic DNA from entomopathogenic fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 148, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.03.012>
- Sheehan, S. (2014). *Mycology*.
- Shiono, Y., Yokoi, M., Koseki, T., Murayama, T., Aburai, N., & Kimura, K. I. (2010). Allantopyrone A, a new α -pyrone metabolite with potent cytotoxicity from an endophytic fungus, *Allantophomopsis lycopodina* KS-97. *Journal of Antibiotics*, 63(5), 251–253. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.18>
- Silva, D., Batista, L., Rezende, E., Fungaro, M., Sartori, D., & Alves, E. (2011). Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 761–773. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200044>

- Silva, J., Pereira, A., & Bezerra, V. (2009). *Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera*. *Las interacciones entre los grupos de microorganismos en la rizosfera*. 2, 213–218.
- Simoni, J., & Almeida, L. (2003). 2. *Extração De Dna*. 3–8.
- Singh, B., & Kumar, V. (2017). *Molecular markers in mycology Diagnostics and marker developments*.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-34106-4_15
- Sinha, P. P. (2014). *Bioinformatics with R Cookbook*. In *Packt Publishing*.
- Solarte, M., Narváez, G., Rivas, G., Bacca, A., Muñoz, D., Calderón, J., Torres, C., Figueroa, V.,
 Rengifo, J., Martínez, P., Dávila, M., Cepeda, B., & Castillo, G. (2007). *Proyecto estado del arte de la información biofisica y socioeconomica de los Páramos de Nariño*.
<http://corponarino.gov.co/expedientes/intervencion/biodiversidad/tomo01introduccion.pdf>
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., & Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046.
<https://doi.org/10.3852/16-042>
- Spetik, Mi., Berraf, A., Pokluda, R., & Eichmeier, A. (2021). *Pyrenochaetopsis kuksensis* (Pyrenochaetopsidaceae), a new species associated with an ornamental boxwood in the Czech Republic. *Phytotaxa*, 498(3), 177–185. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.498.3.3>
- Spremo, N., Tesanovic, K., Rakic, M., Janjusevic, L., Ignjatov, M., Bjelic, D., & Karaman, M. (2017). Antifungal activity of macrofungi extracts on phytopathogenic fungal strains of genera *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 133, 231–240.
<https://doi.org/10.2298/zmspn1733231s>
- Stielow, J. B., Lévesque, C. A., Seifert, K. A., Meyer, W., Irinyi, L., Smits, D., Renfurm, R., Verkley, G.

- J. M., Groenewald, M., Chaduli, D., Lomascolo, A., Welti, S., Lesage-Meessen, L., Favel, A., Al-Hatmi, A. M. S., Damm, U., Yilmaz, N., Houbaken, J., Lombard, L., ... Robert, V. (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35(1), 242–263. <https://doi.org/10.3767/003158515X689135>
- Strasser, H., Vey, A., & Butt, T. M. (2000). Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 717–735. <https://doi.org/10.1080/09583150020011690>
- Sumarah, M. W., Adams, G. W., Berghout, J., Slack, G. J., Wilson, A. M., & Miller, J. D. (2008). Spread and persistence of a rugulosin-producing endophyte in *Picea glauca* seedlings. *Mycological Research*, 112(6), 731–736. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.007>
- Sun, H., Wang, L., Zhang, B., Ma, J., Hettenhausen, C., Cao, G., Sun, G., Wu, J., & Wu, J. (2014). Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(15), 4305–4315. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru203>
- Sun, Z., Li, S., Ren, Q., Xu, J., Lu, X., & Sun, M. (2020). Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of Applied Microbiology*, 129(3), 486–495. <https://doi.org/10.1111/jam.14625>
- Tang, A. M. C., Jeewon, R., & Hyde, K. D. (2007). Phylogenetic utility of protein (RPB2, β -tubulin) and ribosomal (LSU, SSU) gene sequences in the systematics of Sordariomycetes (Ascomycota, Fungi). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 91(4), 327–349. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9120-8>
- Tanney, J. B. (2016). *No Title*.
- Tanney, J., & Seifert, K. (2020). Mollisiaceae: An overlooked lineage of diverse endophytes. *Studies in*

- Mycology*, 95, 293–380. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.02.005>
- Taylor, J. W., & Fisher, M. C. (2003). Fungal multilocus sequence typing - It's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 351–356. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00088-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00088-2)
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N., Wijesundera, R., Villarreal, L., Vasco, A., Quang, P., Suija, A., Smith, M., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., & Abarenkov, K. (2014). Ecology. Disentangling global soil fungal diversity. *Global Diversity and Geography of Soil Fungi. Science.*, 346(6213), 1052–1053. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1185>
- Terhonen, E., Keriö, S., Sun, H., & Asiegbu, F. O. (2014). Endophytic fungi of Norway spruce roots in boreal pristine mire, drained peatland and mineral soil and their inhibitory effect on *Heterobasidion parviporum* in vitro. *Fungal Ecology*, 9(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.01.003>
- Townsend, J. P. (2007). Profiling phylogenetic informativeness. *Systematic Biology*, 56(2), 222–231. <https://doi.org/10.1080/10635150701311362>
- Turland, N., Wiersema, J., Fred, B., Werner, G., Hawksworth, D., Herendeen, P., Knapp, S., Kusber, W., Li, D.-Z., Marhold, K., May, T., McNeill, J., Monroe, A., Prado, J., Price, M., & Smith, G. (2018). *Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (Código de Shenzhen)*. <http://www.koeltz.com/product.aspx?pid=212180>
- UNITE. (2021). *UNITE data base*. <https://unite.ut.ee/index.php>
- Uzma, F., Mohan, C. D., Hashem, A., Konappa, N. M., Rangappa, S., Kamath, P. V., Singh, B. P., Mudili, V., Gupta, V. K., Siddaiah, C. N., Chowdappa, S., Alqarawi, A. A., & Abd-Allah, E. F. (2018). Endophytic fungi-alternative sources of cytotoxic compounds: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 9(APR), 1–37. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00309>
- Van Der Linde, S., Suz, L. M., Orme, C. D. L., Cox, F., Andreae, H., Asi, E., Atkinson, B., Benham, S., Carroll, C., Cools, N., De Vos, B., Dietrich, H. P., Eichhorn, J., Gehrmann, J., Grebenc, T., Gweon,

- H. S., Hansen, K., Jacob, F., Kristöfel, F., ... Bidartondo, M. I. (2018). Environment and host as large scale controls of ectomycorrhizal fungi. *Nature*, 558(7709), 243–248.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0189-9>
- Vanegas, K., Gutiérrez, P., & Marín, M. (2014). Molecular Identification of Fungi Isolated from Bean Tissues with Anthracnose Symptoms. *Acta Biológica Colombiana*, 19(2), 143.
<https://doi.org/10.15446/abc.v19n2.39154>
- Vargas, O. (2016). *Distribución altitudinal, papel en los ecosistemas y amenazas de las poblaciones el género Espeletia (Asteraceae) en Colombia*. (Issue May). UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN.
- Vásquez, A., & Buitrago, A. (2011). *El gran libro de los páramos*.
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(1), 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Wakelin, S. A., Gupta, V. V. S. R., Harvey, P. R., & Ryder, M. H. (2007). The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern Australia. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(1), 106–115. <https://doi.org/10.1139/W06-109>
- Walker, D. M., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., & White, J. F. (2012). New molecular markers for fungal phylogenetics: Two genes for species-level systematics in the Sordariomycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(3), 500–512.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.005>
- Wang, G., Cheng, H., Li, M., Zhang, C., Deng, W., & Li, T. (2020). Selection and validation of reliable reference genes for *Tolypocladium guangdongense* gene expression analysis under differentially developmental stages and temperature stresses. *Gene*, 734(September 2019), 144380.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144380>

- Wang, Y., Wang, Y., Fan, Q., Duan, D., Zhang, G., Dai, R., Dai, Y., Zeng, W., Chen, Z., Li, D., Tang, D. X., Xu, Z. H., Sun, T., Nguyen, T. T., Tran, N. L., Dao, V. M., Zhang, C. M., Huang, L. D., Liu, Y. J., ... Yu, H. (2020). Multigene phylogeny of the family Cordycipitaceae (Hypocreales): new taxa and the new systematic position of the Chinese cordycipitoid fungus *Paecilomyces hepiali*. In *Fungal Diversity* (Vol. 103, Issue 1). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00457-3>
- Wang, Z., Binder, M., Schoch, C. L., Johnston, P. R., Spatafora, J. W., & Hibbett, D. S. (2006). Evolution of helotialean fungi (Leotiomycetes, Pezizomycotina): A nuclear rDNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(2), 295–312. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.031>
- Wei, M. J., Zhang, H., Dong, W., Boonmee, S., & Zhang, D. (2018). Introducing dictyochaeta aquatica sp. nov. and two new species of chloridium (chaetosphaeriaceae, sordariomycetes) from aquatic habitats. *Phytotaxa*, 362(2), 187–199. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.362.2.5>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *PCR Protocols and Guides*. http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/laboratory_and_safety/information_and_protocols_B2Cl/PCR_protocols_Merck17052012.pdf
- Wijayawardene, N. N., Crous, P. W., Kirk, P. M., Hawksworth, D. L., Boonmee, S., Braun, U., Dai, D. Q., D'souza, M. J., Diederich, P., Dissanayake, A., Doilom, M., Hongsanan, S., Jones, E. B. G., Groenewald, J. Z., Jayawardena, R., Lawrey, J. D., Liu, J. K., Lücking, R., Madrid, H., ... Hyde, K. D. (2014). Naming and outline of Dothideomycetes–2014 including proposals for the protection or suppression of generic names. *Fungal Diversity*, 69(1), 1–55. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0309-2>
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Lumbsch, H. T., Liu, J. K., Maharachchikumbura, S. S. N., Ekanayaka, A. H., Tian, Q., & Phookamsak, R. (2018). Outline of Ascomycota: 2017. In *Fungal*

- Diversity* (Vol. 88, Issue 1). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0394-8>
- Wilkinson, M., McInerney, J. O., Hirt, R. P., Foster, P. G., & Embley, T. M. (2007). Of clades and clans: terms for phylogenetic relationships in unrooted trees. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 114–115. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.01.002>
- Wilson, K. (1987). Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 143–151). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00011-2>
- Wingfield, M. J., De Beer, Z. W., Slippers, B., Wingfield, B. D., Groenewald, J. Z., Lombard, L., & Crous, P. W. (2012). One fungus, one name promotes progressive plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 604–613. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00768.x>
- Wit, M., Sierota, Z., Zólciak, A., Mirzwa-Mróz, E., Jablonska, E., & Wakulinski, W. (2020). Phylogenetic relationships between phlebiopsis gigantea and selected basidiomycota species inferred from partial DNA sequence of elongation factor 1-alpha gene. *Forests*, 11(5), 1–10. <https://doi.org/10.3390/F11050592>
- Wit, P., van der Burgt, A., Ökmen, B., Stergiopoulos, I., Abd-Elsalam, K. A., Aerts, A. L., Bahkali, A. H., Beenen, H. G., Chettri, P., Cox, M. P., Datema, E., de Vries, R. P., Dhillon, B., Ganley, A. R., Griffiths, S. A., Guo, Y., Hamelin, R. C., Henrissat, B., Kabir, M. S., ... Bradshaw, R. E. (2012). The Genomes of the Fungal Plant Pathogens Cladosporium fulvum and Dothistroma septosporum Reveal Adaptation to Different Hosts and Lifestyles But Also Signatures of Common Ancestry. *PLoS Genetics*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003088>
- Wong, P. T. W., Dong, C., Martin, P. M., & Sharp, P. J. (2015). Fairway patch - a serious emerging disease of couch (syn. bermudagrass) [Cynodon dactylon] and kikuyu (Pennisetum clandestinum) turf in Australia caused by Phialocephala bamuru P.T.W. Wong & C. Dong sp. nov. *Australasian Plant Pathology*, 44(5), 545–555. <https://doi.org/10.1007/s13313-015-0369-0>

- Xia, M. C., Bao, P., Liu, A. J., Zhang, S. S., Peng, T. J., Shen, L., Yu, R. L., Wu, X. L., Li, J. K., Liu, Y. D., Chen, M., Qiu, G. Z., & Zeng, W. M. (2018). Isolation and identification of *Penicillium chrysogenum* strain Y5 and its copper extraction characterization from waste printed circuit boards. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(1), 78–87.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.001>
- Xu, L. –L, Pang, X. J., Shi, Q., Xian, P. J., Tao, Y. D., & Yang, X. L. (2019). Two New Prenylated Indole Diterpenoids from *Tolypocladium* sp. and Their Antimicrobial Activities. *Chemistry and Biodiversity*, 16(6). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900116>
- Xu, T., Jiang, W., Qin, D., Liu, T., Zhang, J., Chen, W., & Gao, L. (2021). Characterization of the microbial communities in wheat tissues and rhizosphere soil caused by dwarf bunt of wheat. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85281-8>
- Yang, L., He, M., Ouyang, H., Zhu, W., Pan, Z., Sui, Q., Shang, L., & Zhan, J. (2019). *Cross-resistance of the pathogenic fungus Alternaria alternata to fungicides with different modes of action*. 1–10.
<https://doi.org/10.21203/rs.2.9711/v1>
- Yang, R. H., Su, J. H., Shang, J. J., Wu, Y. Y., Li, Y., Bao, D. P., & Yao, Y. J. (2018). Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLoS ONE*, 13(10), 1–17.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206428>
- Yue, Q., Li, Y., Chen, L., Zhang, X., Liu, X., An, Z., & Bills, G. F. (2018). Genomics-driven discovery of a novel self-resistance mechanism in the echinocandin-producing fungus *Pezicula radicola*. *Environmental Microbiology*, 20(9), 3154–3167. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14089>
- Zhao, C., Fu, P., Zhang, Y., Liu, X., Ren, F., & Che, Y. (2018). Sporulosol, a New Ketal from the Fungus *Paraconiothyrium sporulosum*. *Molecules*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/molecules23061263>

- Zhao, Z., Liu, H., Luo, Y., Zhou, S., An, L., Wang, C., Jin, Q., Zhou, M., & Xu, J. R. (2014). Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. *Scientific Reports*, 4, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep06746>
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879–920. <https://doi.org/10.1080/09583150701593963>

Anexo A

Metabolitos secundarios producidos por los hongos pueden afectar el proceso de extracción de ADN.

Los metabolitos secundarios producidos por los hongos pueden afectar la extracción cuando están presentes en altas concentraciones. Estos compuestos pueden interferir con la extracción y purificación del ADN provocando un rendimiento más bajo y una notable decaída en la calidad del mismo. Por ejemplo, el exceso de polisacáridos disponibles en la muestra de micelio durante el proceso de extracción puede ocasionar que la fase acuosa sea demasiado viscosa para poder separar eficientemente el material genético, incluso estos pueden adherirse firmemente a los fragmentos del ADN al igual que los polifenoles dando como resultado el oscurecimiento del precipitado obtenido (Galliano et al., 2021; Zeilinger et al., 2015). Al haber sustancias interferentes en la muestra es más probable que endonucleasas estén presentes haciendo que la acción de la taq polimerasa se inhiba como también la actividad de enzimas de restricción usadas para otros procedimientos moleculares (Friar, 2005; Galliano et al., 2021).

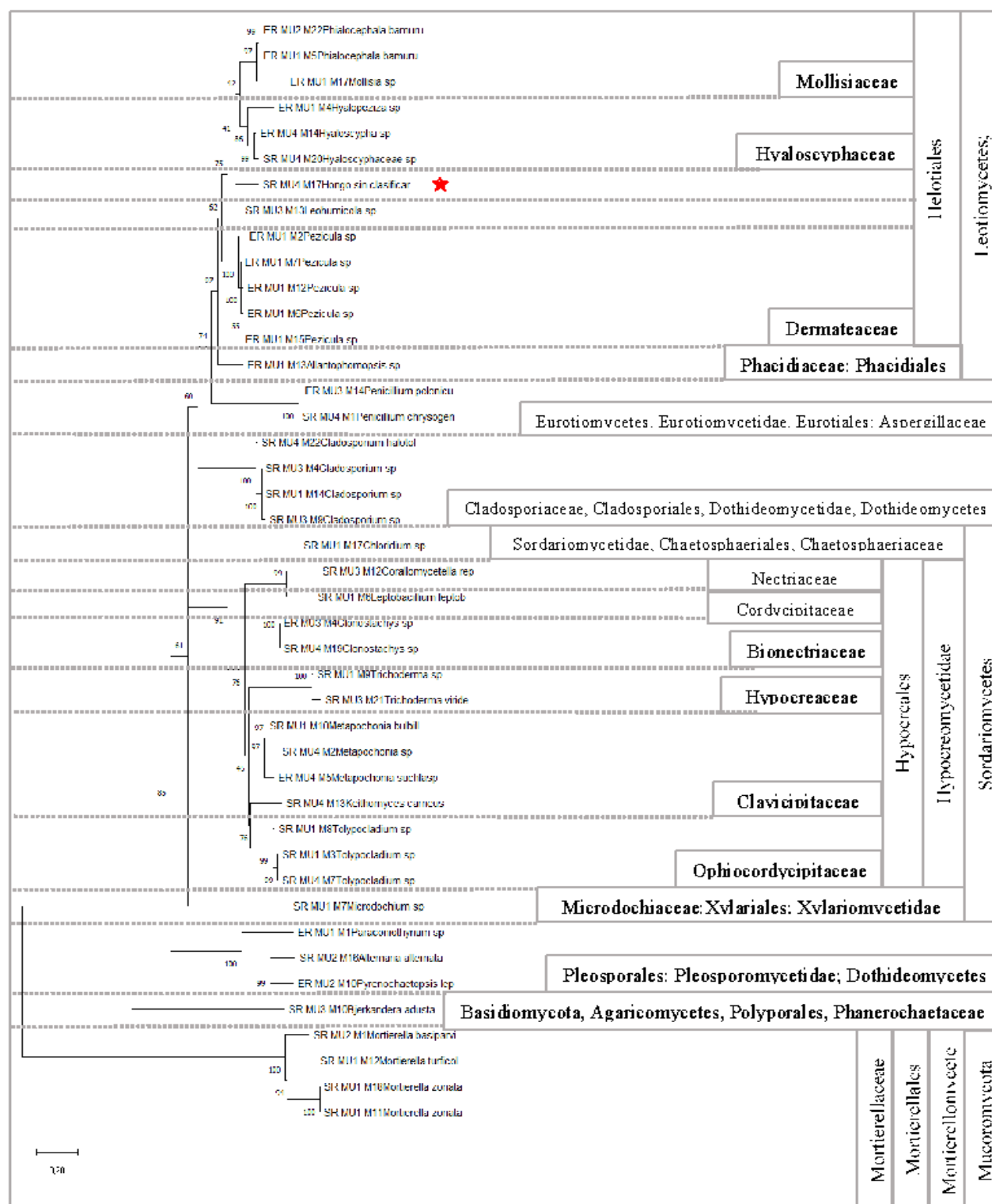
Entre los géneros de hongos con la capacidad de producir metabolitos secundarios de forma significativa están: *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Pezicula*, *Diaporthe*, *Penicillium*, *Phialocephala*, los cuales según las tablas 2 y 3 son de los que se logró obtener el ADN con el primer método de Wilson (1987) modificado por Gómez (2008) que a diferencia del método de Griffith y Shaw (1998) utiliza una solución extra de NaCl/CTAB y que según Friar (2005) el uso de CTAB ayuda a precipitar selectivamente el ADN, eliminando principalmente polisacáridos posibles causantes de la interferencia a la hora de la extracción con el segundo método descrito y referenciado. Sin embargo, los autores recomiendan que para disminuir la concentración de polifenoles en caso de detectarse en las muestras es necesario la adición de polivinilpirrolidona (PVP) o polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Heikrujam et al., 2020).

Por otra parte podemos observar en las tablas 2 y 3 que los aislados del mismo género como *Pezicula*, *Tolypocladium*, *Clonostachys* y *Mortierella* lograron amplificar con ambos métodos, lo que si se explica desde el punto de vista de las sustancias químicas interferentes como los metabolitos secundarios esto puede deberse a que los genes implicados en la producción de metabolitos secundarios en hongos son diversos y que incluso las cepas de la misma especie pueden presentar diferencias en la producción de metabolitos (Olarie et al., 2019).

Sn embargo no es posible inferir las diferencias en los métodos de extracción a la presencia de metabolitos secundarios sin antes extraer e identificar estos ya sea por medio de métodos como: elucidación en placas de sílica gel, en un fusiómetro por punto de fusión, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, espectrometría de rayos infrarrojos y resonancia magnética nuclear

Anexo B

Árbol Filogenético del aislado SR MU4 M17 comparado con los todos los géneros del presente estudio

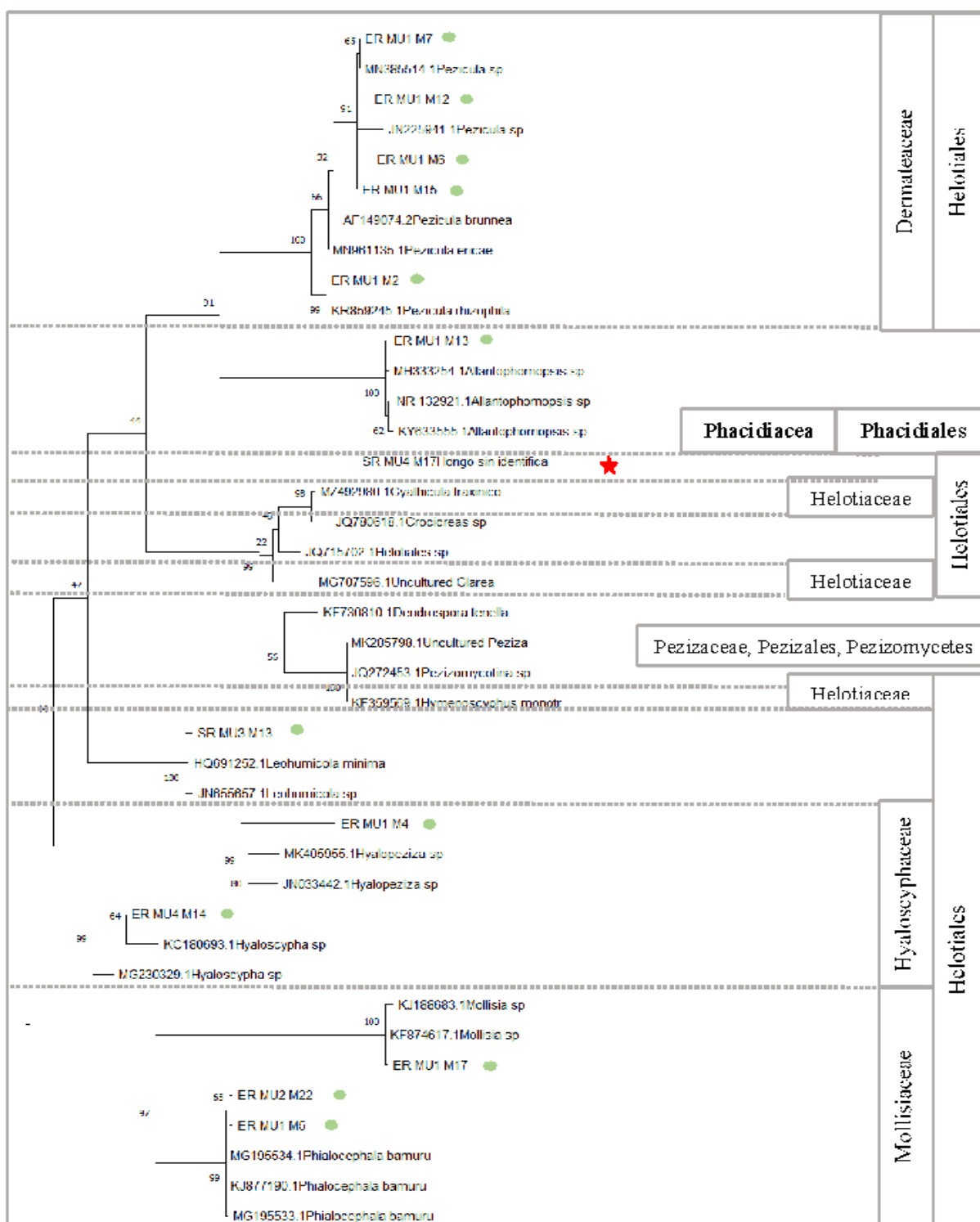


Nota: el análisis filogenético se realizó por el metodo de maxima verosimilitud (modelo de sustitución GTR+G), se muestra el valor de soporte bootstrap para cada grupo homólogo, las cepas del presente estudio se representan por códigos y nombre científico obtenido mediante el análisis de la región ITS y las cepas obtenidas del GenBank con código de accesoión y nombre científico.

Fuente: esta investigación

Anexo C

Filogenia del aislado SR MU4 M17 comparado con los géneros de la clase Letiomycetes y las secuencias similares del GenBank.



Nota: el análisis filogenético se realizó por el método de máxima verosimilitud (modelo de sustitución GTR+G), se muestra el valor de soporte bootstrap para cada grupo homólogo, las cepas del presente estudio se representan por códigos, círculos verdes y nombre científico obtenido mediante el análisis de la región ITS y las cepas obtenidas del GenBank con código de acceso y nombre científico.

Fuente: esta investigación

Anexo D

Tabla resumen de las características de los géneros reportados

Género	Reporta especies		Síntomas asociados	Sustancias producidas
	Biocontroladoras	Fitopatógenas		
Clase: Sordariomycetes				
Metapochonia	Si			
Keithomyces	Si			
Corallomycetella		Si	Pudrición de raíz	
Trichoderma	Si			Celulasa, celobiohidrolasa, pectina liasa, xilanasa, exoglucanasa, amilasa, lipasa.
Leptobacillium	N.R	N.R		
Clonostachys	Si			Holocelulasas y enzimas degradantes de pared celular.
Tolypocladium	Si			Ciclosporina, efraeptinas 1-alanineclamidocina y tolipoalbina
Microdochium		Si	Manchas foliares irregulares blanqueadas o de color marrón anaranjado y necrosis de la raíz	
Chloridium	Si			Javanicina
Clase Letiomycetes				
Pezicula		Si		Melleína, micorrizina, criptosporiopsina
Allantophomopsis	Si			Allantopirona A y allantofuranona
Leohumicola	N.R	N.R		
Hyalopeziza	N.R	N.R		
Hyaloscypha	N.R	N.R		

<i>Mollisia</i>		Si	Manchas foliares	Ácido zaragozico D3 8-metilester
<i>Phialocephala</i>	Si	Si	Pudrición radicular	Rugulosina
Clase: Dothideomycetes				
<i>Pyrenochaetopsis</i>	N.R	N.R		Pirenosetina D
<i>Alternaria</i>		Si	Caída foliar	Fitotoxinas
<i>Paraconiothyrium</i>		Si	Marchitez foliar y lesiones necróticas marrones en tallos	Brasilamidas y hawaiinólidas y beauvericina
<i>Cladosporium</i>	Si	Si	Pardeamiento de las raíces y decoloración del tallo	Cladosporina, azafilonas, benzofluorantenonas, cumarinas y más de 200 compuestos
Clase: Eurotiomycetes				
<i>Penicillium</i>	Si	Si	Pudrición de frutos	Fitohormonas, enzimas, gentes antifúngicos y prebióticos
Clase: Agaricomycetes				
<i>Bjerkandera</i>		Si	Lesiones en raíz	
Clase: Mortierellomycetes				
<i>Mortierella</i>	Si			