



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**BÚSQUEDA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN HONGOS
ANTAGÓNICOS ENDÓFITOS DE PLANTAS CON POTENCIAL
ALELOQUÍMICO DE LA RESERVA ECOLÓGICA EL EDÉN,
QUINTANA ROO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. AURORA SAUCEDO GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG.

MÉXICO, D. F.

FEBRERO, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de septiembre del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental) de la alumna SAUCEDO GARCÍA AURORA, con número de cuenta 93349400 con la tesis titulada: "Búsqueda de compuestos bioactivos en hongos antagonísticos endófitos de plantas con potencial aleloquímico de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo", bajo la dirección de la Dra. Ana Luisa Anaya Lang.

Presidente:	Dr. Francisco Javier Espinosa García
Vocal:	Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor
Secretario:	Dra. Ana Luisa Anaya Lang
Suplente:	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
Suplente:	Dra. Rachel Mata Essayag

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F. a 2 de febrero del 2006


Dr. Juan Núñez-Españ
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Reconocimientos.

Agradezco el apoyo económico recibido por parte del Programa de Beca Crédito del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para estudios de Maestría en el Instituto de Ecología, UNAM.

Agradezco la asesoría de los miembros del Comité Tutoral y del Jurado:

Dra. Ana Luisa Anaya Lang, por asesorarme en todo momento, por su interés en el trabajo, por sus consejos, por su apoyo incondicional y por los innumerables gratos tiempos que compartimos.

Dra. María del Carmen A. González Villaseñor por contagiar su entusiasmo e interés por los hongos, sin duda sus comentarios fueron muy valiosos para el desarrollo del proyecto.

Dra. Rachel Mata Essayag por su interés, comentarios y revisión del trabajo.

Agradezco las sugerencias de los otros miembros del Jurado:

Dr. Francisco Espinosa García por la revisión y sus valiosas correcciones que sin duda enriquecieron el trabajo desarrollado.

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava por su interés en el trabajo, por sus acertados comentarios y por ayudarme a comprender el mundo de la química.

*A Sebastián, Esperanza
Mariana, Renata, Gabriela
Alhelí, el pequeño X
y Ariel.*

Agradecimientos.

Agradezco a la Dra. Rocío Cruz Ortega por su interés en el trabajo, por sus comentarios y por su valiosa amistad.

Gracias a la Q.A. Blanca Estela Hernández Bautista por su ayuda en el trabajo de laboratorio, por sus sabios consejos y por hacer muy agradable la estancia en el laboratorio.

Gracias a los compañeros del laboratorio Antonia, Teresa, Andrea, Mariel, Maribel, Iris, Huitzimengari, Mariano Jordi, Carmen y Mariana porque gracias a ustedes el trabajo se construye día a día. Gracias por compartir su conocimiento, inquietudes, sueños y enriquecer la vida diaria del laboratorio.

Gracias a Cristina Giménez Mariño por ayudar en la recolecta de las plantas y el aislamiento de los hongos endófitos. Gracias también por la simpatía y empatía mostrada en cada momento.

Agradezco al Ingeniero Abel Blancas por su colaboración en el cultivo del hongo endófito C.1.c. en la Planta Piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Gracias a la Dra. Olga Gómez Rodríguez del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados por donar las cepas de hongos fitopatógenos.

Gracias a todos mis profesores de la Maestría por sus interesantes clases que me cautivaron en el mundo de la biología.

Agradezco a mis padres Sebastián y Esperanza por todo, no existen palabras que describan con toda pulcritud cuanto los quiero y les agradezco en la vida. A mis hermanas Gaby, Renata y Mariana porque sus muy distintas formas de ser y hacer me conquistan y despiertan una gran admiración por ustedes. A mi pequeña y al mismo tiempo gran sobrina Alhelí por que al descubrirte nos descubrimos. A Pablo y Edgar por su ayuda incondicional en todo momento.

Gracias a mis muy queridos amigos: a Lilia y sus impresionantes encantos, a Violeta y sus anhelos, a Hugo y sus libros, a José y sus locuras, a Noé y sus historias, a Jorge y sus charlas, a Octavio y sus sueños.

Gracias Ariel porque juntos aprendemos y vamos navegando rumbo a eso que llamamos esperanza, nuestra esperanza.

Agradezco a todos aquellos que de manera directa o indirecta colaboraron en la realización de este trabajo.

Contenido

I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
2.1. Generalidades.....	3
2.2.1 Propagación de los hongos endófitos.....	6
2.2.2. Evolución de hongos endófitos.....	8
2.3.2. Metabolitos secundarios de hongos endófitos.....	15
2.4. Competencia entre hongos.....	17
2.4.1. Competencia entre hongos endófitos.	18
III. Hipótesis.....	20
IV. Objetivo General.....	21
4.1 Objetivos Particulares.....	21
V. Descripción biológica del material vegetal.....	22
5.1. <i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg. (Burseraceae).....	22
5.2. <i>Callicarpa acuminata</i> HBK. (Verbenaceae).....	23
5.3 <i>Metopium brownei</i> (Jacq.) Urban. (Anacardiaceae).....	24
5.4. <i>Sebastiania adenophora</i> Pax y Hoffm. (Euforbiaceae).....	25
5.5 <i>Zuelania guidonia</i> (Sw.) Britt. y Millsp. (Flacourtiaceae).....	26
VI. Materiales y Métodos.....	27
6.1. Zona de estudio.....	27
6.2. Recolección de material vegetal.....	27
6.3. Aislamiento de hongos endófitos.....	28
6.5. Determinación de velocidades de crecimiento.....	29
6.6. Bioensayos de antagonismo.....	30
6.6.1. Selección del método.....	30
6.6.2. Bioensayos de antagonismo entre hongos endófitos.....	30
6.6.3 Bioensayos de antagonismo entre hongos endófitos contra fitopatógenos.....	33
6.7. Selección del medio de cultivo para las fermentaciones a pequeña y mediana escala.....	34
6.7.1 Extractos de los medios de cultivo sin hongos: CPD y CHM.....	35
6.8. Fermentaciones a pequeña escala de los cuatro hongos endófitos seleccionados.....	35
6.8.1 Extractos de los hongos endófitos.....	35
6.9. Bioensayos para evaluar el efecto biológico de los extractos de los hongos endófitos sobre los organismos de prueba.....	36
6.9.1. Evaluación de los extractos de los hongos endófitos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos.....	36
6.9.2. Evaluación de los extractos orgánicos de los hongos endófitos sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba.....	37
6.10. Cultivo a mediana escala de un hongo endófito y su extracción orgánica..	

VII.Resultados.....	39
7.1 Hongos aislados.....	39
7.2. Selección del método para los bioensayos de antagonismo.....	40
7.3. Bioensayos de antagonismo.....	41
7.4. Antagonismo entre los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos.....	49
7.5. Extractos de acetato de etilo de los medios de cultivo CHM y CPD sin hongos.....	51
7.6. Extractos orgánicos de los 4 hongos endófitos seleccionados.....	52
7.7. Efecto biológico de los extractos orgánicos de los hongos endófitos sobre diversos organismos de prueba.....	53
7.7.1. Efectos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos.....	53
7.7.2. Evaluación de los efectos de los extractos orgánicos de los distintos hongos endófitos sobre el crecimiento radical de las plantas de prueba.....	56
7.8. Selección de un hongo endófito para su cultivo a mediana escala y su extracción orgánica.....	58
VIII.Discusión	59
IX.Conclusiones.....	68
X.Literatura citada.....	70

Resumen

Se aislaron 21 hongos endófitos a partir de 4 especies de plantas con potencial alelopático de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo. Con los endófitos aislados se hicieron bioensayos de antagonismo, determinándose el tipo de interacción de los distintos hongos mediante el porcentaje de inhibición en el crecimiento y los índices de antagonismo. Se seleccionaron los 4 hongos que mostraron los mayores índices de antagonismo y los menores porcentajes de inhibición en su crecimiento al interactuar con los demás; tres endófitos se aislaron de las hojas de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae): C.1.b, C.1.c y C.1.e, y uno de las hojas de *Bursera simaruba* (Burseraceae): B.1.a. Con los 4 hongos endófitos seleccionados, se hicieron bioensayos de antagonismo contra siete especies de hongos fitopatógenos, determinándose los índices de antagonismo y la inhibición del crecimiento tanto de los hongos endófitos como de los hongos fitopatógenos. Paralelamente a los bioensayos de antagonismo, los 4 hongos endófitos seleccionados se fermentaron a pequeña escala (1 L) para posteriormente obtener sus extractos orgánicos. La actividad biológica de cada extracto se evaluó sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos y el crecimiento de la raíz de plantas de jitomate, amaranto y zacate tardo. El hongo endófito C.1.c, aislado a partir de hojas de *Callicarpa acuminata*, fue el hongo que mostró los mayores índices de antagonismo y los menores porcentajes de inhibición en su crecimiento al interactuar con los hongos endófitos y fitopatógenos en los bioensayos de antagonismo. Además, el extracto orgánico de éste mismo hongo, tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos y de las plantas de prueba, por lo que se fermentó a mediana escala (30 L). El extracto orgánico, producto de su fermentación, será sometido a un fraccionamiento biodirigido para aislar e identificar los compuestos químicos responsables de la actividad biológica sobre los distintos organismos de prueba.

I. Introducción

Los productos naturales aislados a partir de plantas y microorganismos representan un valor agregado a los distintos ecosistemas. La búsqueda, caracterización y descripción de estos compuestos ha sido importante tanto para la prospección, como para entender la ecología y sistemática de los organismos que producen dichos compuestos (Espinosa-García y Delgado, 1998).

Los hongos son una fuente importante de producción de metabolitos secundarios (Bennett, 1995; Gloer, 1997). El descubrimiento de la mayoría de sus productos naturales ha sido resultado de búsquedas azarosas de metabolitos, o de estudios de alimentos contaminados por hongos (Gloer, 1995). Para optimizar la búsqueda de metabolitos secundarios en hongos se ha propuesto considerar el ambiente en el que se desarrolla el hongo, así como las posibles interacciones que establece con su entorno (Schulz *et al.*, 2002) y con los demás hongos, pues el antagonismo entre ellos podría ser un indicador de producción de metabolitos secundarios con actividad biológica (Gloer, 1995).

El grupo de los hongos endófitos representa un campo prometedor para el descubrimiento de metabolitos secundarios (Knight *et al.*, 2003). Los hongos endófitos habitan en el interior de los tejidos de las plantas hospederas sin ocasionarles síntomas de enfermedad (Wilson, 1995), y aunque aún no se ha elucidado el papel ecológico que desempeñan en la planta se ha observado que las asociaciones que establecen con sus hospederas pueden variar desde el mutualismo hasta el neutralismo, y de éste hasta el antagonismo y la patogénesis (Stone *et al.*, 2004).

El estudio de los hongos endófitos ha permitido reevaluar las estimaciones de la diversidad de hongos (Arnold *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2004), así como conocer la variedad de interacciones que una planta puede establecer con sus microorganismos asociados y la importancia de estas asociaciones en la historia de vida de la planta.

En estudios *in vitro* de competencia entre hongos endófitos se ha observado que la mayoría inhibe el crecimiento de otras especies, tanto de hongos endófitos (Espinosa-García *et al.*; 1996; Arnold *et al.*, 2003), como de hongos fitopatógenos (Yue *et al.*, 2000). Aunque aún no se ha elucidado si este tipo de relación ocurre en el interior de los tejidos, los estudios de antagonismo y producción de metabolitos secundarios que producen los hongos endófitos podrían ayudar a elucidar la complejidad, variedad e importancia de las relaciones de los endófitos con su entorno (Carroll, 1995; Arnold y Herre, 2003; Stone *et al.*, 2004).

La búsqueda de metabolitos secundarios de hongos endófitos que colonizan plantas leñosas se ha hecho principalmente en: plantas medicinales (Strobel y Hess, 1997; Strobel *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Corrado y Rodrigues, 2004); plantas halófitas (Peláez *et al.*, 1998); plantas sanas de bosques conservados (Yao y Strobel, 2001); en plantas de importancia alimenticia (Strobel *et al.*, 2001) y de importancia económica (Schulz *et al.*, 1999).

En este estudio se examinaron los hongos endófitos de 5 plantas con potencial alelopático, confirmado en un estudio previo (Anaya *et al.*, 2003a), de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo, con objeto de buscar en ellos metabolitos secundarios con actividad biológica contra algunos hongos fitopatógenos y plantas de prueba.

El propósito de este estudio es contribuir al conocimiento de la biodiversidad de hongos endófitos de las plantas de la selva y los acahuales de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo, además de mostrar que los estudios sobre la ecología química de los hongos endófitos son de gran importancia para el conocimiento de los mismos, de las interacciones biológicas que establecen y en la búsqueda de novedosos compuestos con actividad biológica y posible utilidad en el control de algunas plagas y enfermedades.

II. Antecedentes

2.1. Generalidades.

Características generales del reino Fungi: Aunque es difícil dar una descripción precisa de los hongos, se puede señalar que los hongos son organismos eucariontes que poseen diversas características que los distinguen de los demás organismos. Tienen un talo somático unicelular levaduriforme, o por lo general, un talo constituido por un sistema de células filamentosas conocidas como hifas, envueltas por una pared celular rígida formada principalmente de quitina. Las hifas presentan un crecimiento apical, es decir que se desarrollan a partir de la punta de la hifa, originando una fina red de hifas ramificadas denominada micelio. Los hongos son heterótrofos, pero a diferencia de otros organismos, se nutren por absorción. Para poder alimentarse, los hongos liberan un complejo de enzimas digestivas extracelulares al medio, las cuales desintegran las moléculas orgánicas complejas del sustrato sobre el cual viven y las transforman a moléculas más simples que pueden ser asimiladas por ellos. Estos organismos pueden reproducirse sexual y/o asexualmente formando esporas como producto final de la reproducción. En una forma muy general, el ciclo de vida de los hongos inicia a partir de la germinación de una spora de origen sexual o asexual, posteriormente pasa por un periodo de crecimiento y finalmente por un periodo de esporulación; en donde las esporas serán liberadas y dispersadas por distintos medios (Moore-Landecker, 1996; Alexopoulos *et al.*, 1996).

Diversidad. El reino de los hongos es un grupo de organismos con una alta diversidad biológica. El número estimado de especies es de 1.5 millones (Hawksworth, 1991), aunque ésta cantidad continua en discusión (May, 1991; Lodge, 1997; Fröhlich y Hyde, 1999; Hawksworth, 2001). Sin embargo, a pesar de la enorme cantidad de especies de hongos existentes, solo se ha identificado

aproximadamente el 5% de ellas; así pues, podemos afirmar que es un grupo escasamente conocido (Hawksworth, 1991).

Los hongos son vitales en la biósfera por varias razones, entre ellas por su papel como saprobios desintegrando la materia orgánica y de ésta manera asegurando el reciclaje de nutrientes en los ecosistemas. Existen también hongos parásitos y mutualistas relacionados con una gran variedad de plantas, animales y microorganismos, por lo que su papel en la naturaleza es muy versátil (Moore-Landecker, 1996; Alexopoulos *et al.*, 1996).

Clasificación. El reino de los hongos únicamente incluye a los hongos quitinosos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y los estados asexuales de Asco y Basidiomycota, agrupados artificialmente en el Phylum Deuteromycota. Mientras que a los organismos fungoides, es decir organismos con un modo de vida parecido al de los hongos, se incluyen en los reinos Stramenopila (Chromista) y Protista (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Los hongos microscópicos. A estos hongos se les llama también micromicetes, y son aquellos que tienen estructuras reproductoras de tamaño microscópico. Estos organismos se encuentran distribuidos en todos los Phyla del reino e incluyen a todos los Chytridiomycota, los Zygomycota, la mayoría de los Ascomycota y los estados conidiales de los Basidiomycota y Ascomycota (Rossman, 1997). El número estimado de hongos microscópicos es de 700 000 a 900 000 especies, de las cuales sólo se conoce del 10 al 30% (Rossman, 1994).

Relación hongo-planta. La relación de los hongos microscópicos con las plantas inició desde la colonización por éstas del ambiente terrestre, durante los periodos geológicos del Siluriano-Devoniano. Los registros fósiles de las primeras plantas colonizadoras de los ambientes terrestres muestran hongos asociados a sus raíces, dichas evidencias datan de aproximadamente 350 a 460 millones de años (Selosse y LeTacon, 1998).

Los hongos pueden establecer diversos tipos de asociaciones con las plantas vasculares, se encuentran asociados a las superficies y exudados

vegetales, asociados a las raíces de las plantas como hongos micorrizógenos, como parásitos biótrofos y necrótrofos, como colonizadores del tejido vegetal muerto, o bien viviendo dentro de los distintos órganos de una planta como hongos endófitos (Agris, 1997).

2.2. Hongos endófitos.

El término endófito describe tanto la localización como la naturaleza de la asociación de distintos organismos en la planta. Para el presente trabajo definiremos a los organismos endófitos como hongos o bacterias que viven en los tejidos internos de plantas hospederas durante todo su ciclo de vida, o gran parte de él, sin ocasionar síntomas aparentes de enfermedad en su planta hospedera (Wilson, 1995).

El primer artículo de hongos endófitos lo reportó Freeman en 1904, quien aisló endófitos a partir del ‘cominillo’ (*Lolium* sp.) (Tan y Zou, 2001), pero hasta finales de siglo XX su ubicuidad fue plenamente reconocida. Los hongos endófitos son universales, se han aislado a partir de musgos, hepáticas, helechos, gimnospermas y angiospermas (Faeth y Fagan, 2002), en una gran variedad de ambientes que van desde los bosques tropicales, templados y boreales, hasta ambientes extremos como los árticos, alpinos y desérticos (Stone *et al.*, 2004). En la mayoría de las plantas examinadas se ha encontrado al menos una especie de hongo endófito (Petrini, 1986; Faeth, 2002) por lo que, además de cosmopolitas, son extraordinariamente diversos, especialmente en las plantas leñosas. A partir de una sola planta leñosa se pueden aislar varias especies de endófitos (Petrini, 1986; Arnold *et al.*, 2001), las cuales pueden desempeñar papeles muy diferentes dentro de sus hospederos (Shulz *et al.*, 1998).

En los estudios de hongos endófitos es común encontrar especies nuevas, por lo que su estudio ha sido muy importante para evaluar la diversidad y distribución global de los hongos, sugiriendo que la diversidad de hongos es

mayor que la que en un principio se pensaba (Arnold *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2004).

2.2.1 Propagación de los hongos endófitos.

Los hongos endófitos de plantas leñosas se transmiten horizontalmente de planta a planta, a través de esporas. Generalmente, estos hongos producen esporas cuando su planta hospedera envejece o bien cuando el órgano dentro del que viven se desprende de la planta. Las esporas de los endófitos se dispersan por lluvia, viento, insectos o pequeños animales (Wilson, 2000). La lluvia es muy importante en la dispersión y colonización de los hongos endófitos, pues además de ser el principal propagador de esporas, conserva alta la humedad relativa del ambiente, lo que constituye el principal requisito para que la mayoría de los hongos puedan germinar y desarrollarse (Elamo *et al.*, 1999). La temperatura también es un factor muy importante para la germinación y colonización de los hongos endófitos dentro de las plantas hospederas. Otros factores importantes son: la distancia del inóculo al hospedero, la probabilidad de que las esporas lleguen a la superficie vegetal adecuada y las características propias del hospedero y del endófito (Wilson, 2000). Asimismo, la colonización de hospederos por los hongos endófitos depende tanto del genotipo del hospedero como del hongo (Wilson, 2000; Faeth y Fagan, 2002). Ciertas características del hospedero, como la estructura de la hoja, el área y su composición química, también pueden afectar la colonización y crecimiento del endófito (Lappalainen *et al.*, 1999).

El crecimiento de los endófitos en su hospedero involucra una serie de interacciones metabólicas entre el hongo y la planta. El hongo produce enzimas que le permiten penetrar, colonizar y establecerse en los tejidos internos de la planta sin ocasionarle síntomas de enfermedad (Schulz *et al.*, 2002). Las esporas que llegan de manera azarosa a la superficie de la planta, pueden germinar y posteriormente invadir los tejidos internos por la penetración cuticular o a

través de los estomas de las hojas (Arnold y Herre, 2003). La colonización está restringida a células epidérmicas individuales o se desarrolla de manera localizada entre las áreas epidérmicas intracelulares y sub-epidérmicas (Carroll, 1995; Schulz *et al.*; 1999; Wilson 2000), por ello podría afirmarse que la colonización es discreta y limitada, promoviendo la existencia de un mosaico de individuos dentro de la planta (Gamboa *et al.*, 2002).

Después de su emergencia, las hojas de una planta acumulan numerosas infecciones de endófitos. Los hongos invaden principalmente los nuevos tejidos vegetales (hojas y ramas nuevas) y una vez que emergen más hojas y ramas, los niveles de infección se incrementan conforme la planta crece (Wilson, 2000; Arnold y Herre, 2003), pero en hojas de edades muy avanzadas los niveles de infección disminuyen (Espinosa-García y Langenheim, 1990).

Los hongos endófitos que han sido aislados de plantas leñosas, generalmente son miembros de los Phyla Ascomycota y Deuteromycota (hongos anamorfos), pero también incluyen miembros de Basidiomycota y de los fungoides Oomycota (Saikkonen *et al.*, 1998; Dos Santos *et al.*, 2003). Sin embargo, es importante señalar que los métodos utilizados hasta ahora para aislar hongos endófitos, pueden estar determinando el tipo de hongos que se han aislado e identificado (Schulz *et al.*, 1993), lo que habla de la necesidad de desarrollar nuevos métodos para aislar e identificar a todos aquellos microorganismos endófitos que generalmente no se pueden aislar con medios de cultivo convencionales.

En diversos estudios de composición de especies de endófitos en plantas leñosas se ha observado que en un hospedero pueden habitar muchas especies de endófitos, la mayoría de las especies son especies raras y sólo una o muy pocas especies son las dominantes de la comunidad (Dos Santos *et al.*, 2003).

La información disponible hasta ahora sobre los hongos endófitos indica que pocos de ellos son específicos de sus hospederos, pues parece ser que la mayoría puede infectar a múltiples especies de plantas. Sin embargo, algunos

micólogos están de acuerdo en que la composición de la microbiota interna es distinta entre los distintos órganos y tejidos de la hospedera (Stone *et al.*, 2004), lo que promueve la formación de razas hospedero-específicas de endófitos (Carroll, 1995). No obstante, en otros estudios se ha observado que el patrón de colonización de los endófitos es caótico y carece de especificidad hacia los hospederos (Cannon y Simmons, 2002).

Para los endófitos cada hospedero puede funcionar como un ecosistema distinto (Dos Santos *et al.*, 2003), con una comunidad de endófitos diversa y dinámica en tiempo y espacio (Lappalainen *et al.*, 1999). Estas comunidades de hongos endófitos tienen los mismos atributos que las macro-comunidades, incluyendo la estacionalidad, la sucesión de especies, especies raras, dominantes, generalistas y especialistas (Faeth y Fagan, 2002).

2.2.2. Evolución de hongos endófitos.

Los hongos fitopatógenos y endófitos están muy relacionados entre sí aunque los nichos de ambos sean muy distintos (Ganley *et al.*, 2004). Se ha propuesto que los hongos endófitos evolucionaron a partir de hongos fitopatógenos que prolongaron sus periodos de latencia en los hospederos, o bien, que disminuyeron su virulencia en el transcurso del tiempo (Saikkonen *et al.*, 1998).

Dentro del grupo de hongos endófitos se incluyen una amplia variedad de hongos, desde patógenos y saprobios que han extendido los periodos de latencia, hasta mutualistas obligados (Saikkonen *et al.*, 1998).

Los hongos fitopatógenos en estado latente se consideran como hongos endófitos, pero cambian a fitopatógenos cuando producen síntomas de enfermedad en la planta hospedera, especialmente bajo ciertas condiciones ambientales o nutrimentales, o bien, durante los procesos de senescencia de su hospedera (Blodgett *et al.*, 2000; Photita *et al.*, 2001). En general, podemos afirmar que los hongos endófitos son ambiguos ya que pueden convertirse en fitopatógenos cuando la planta hospedera esta expuesta a condiciones adversas

que le ocasionan algún tipo de estrés (Schulz *et al.*, 1999), o cuando los tejidos vegetales o el hospedero mismo envejecen (Viret y Petrini, 1994). Esto ocasiona que la planta hospedera se debilite o estrese, lo que interrumpe el equilibrio establecido entre el hongo endófito y su hospedera, y favorece las condiciones para que el hongo infecte a la planta (Schulz *et al.*, 1999). Estas propiedades hacen que los hongos endófitos constituyan buenos modelos para estudiar la relación mutualista-antagonista entre el hongo y la planta (Petrini, 1996).

La relación de los endófitos con sus hospederos también depende de diversos factores como la filogenia y la genética de ambos, la comunidad de hongos con la que interactúa, la geografía, las condiciones abióticas (Faeth y Fagan, 2002), el estado fisiológico y la química del hospedero (Espinosa-García *et al.*, 1993; Arnold y Herre, 2003).

2.2.3. Papel ecológico de los hongos endófitos.

El papel ecológico que desempeñan los hongos endófitos con sus plantas leñosas hospederas ha sido un tema de gran discusión, debate y especulación (Kursar *et al.*, 1999).

Las interacciones endófito-hospedero son versátiles y dinámicas, lo que hace que el papel ecológico de los endófitos sea variable y pueda cambiar durante su ciclo de vida (Helander *et al.*, 1996), tanto dentro como entre las poblaciones y comunidades (Saikkonen *et al.*, 1998). Las asociaciones de los endófitos con sus plantas hospederas pueden ser un continuo de interacciones, variando desde el mutualismo hasta el neutralismo y de éste hasta el antagonismo y la patogenicidad (Stone *et al.*, 2004). Como ya se mencionó, el tipo de interacción depende tanto de las características filogenéticas como de las historias de vida de ambos organismos, de las interacciones con otras especies en la comunidad, de la geografía y de los factores abióticos (Saikkonen *et al.*, 1998). Incluso una especie de hongo endófito puede establecer

asociaciones mutualistas y patógenas en la misma planta pero a diferentes tiempos (Wilson, 1995).

Pocos han sido los estudios del efecto de los hongos endófitos en la fisiología, genealogía y bioquímica de la planta hospedera (Kursar *et al.*, 1999). Los hongos endófitos pueden inducir cambios después de la infección alterando la fisiología, morfología y compuestos aleloquímicos de sus hospederas (Saikkonen *et al.*, 1998; Faeth, 2002), y de esta manera, afectar las subsecuentes interacciones con otros endófitos, patógenos y herbívoros. También se ha propuesto que los hongos endófitos pueden inducir en los tejidos vegetales que infectan, la producción de metabolitos de defensa, creando mosaicos de tejidos favorables y no favorables para insectos herbívoros y patógenos (Espinosa-García y Langhenheim, 1990; Wilson, 1993). Los endófitos constituyen así una fuente importante de variación dentro de la planta, pues hacen al hospedero más impredecible para herbívoros y patógenos (Espinosa-García y Langhenheim, 1990; Saikkonen *et al.*, 1998).

Otros papeles ecológicos menos estudiados de los endófitos son su función en la adquisición de nutrimentos a partir de la superficie de la planta o de la lluvia, su papel en la tolerancia del hospedero a ambientes estresantes (Redman *et al.*, 2001; Arnold *et al.*, 2003) y su papel en la descomposición de la planta (Kursar *et al.*, 1999).

Los endófitos probablemente son los primeros organismos que capitalizan los nutrimentos de las hojas senescentes o caídas, pues son las primeras especies en la sucesión de hongos desintegradores (Wilson, 1993). El crecimiento activo dentro de los tejidos de la planta se inicia sólo durante la senescencia de la planta hospedera, permitiendo a los endófitos ser los primeros colonizadores del material vegetal muerto (Cannon y Simmons, 2002).

Las plantas colonizadas por hongos endófitos suelen crecer más rápido que las plantas no colonizadas, probablemente porque los endófitos producen

fitohormonas, como el ácido indolacético (IAA) y las citoquininas o bien pueden incrementar la absorción de nutrimentos de sus hospederos (Tan y Zou, 2001).

En relación a su papel mutualista, se ha propuesto que los endófitos son antagonistas de insectos herbívoros y patógenos de plantas (Helander *et al.*, 1996).

Su papel como antagonistas de insectos ha sido más estudiado quizá por la investigación realizada sobre el papel de los endófitos de pastos de importancia económica. Estos endófitos producen micotoxinas que afectan a los insectos herbívoros, disminuyen la adecuación de sus poblaciones y, de esta manera, reducen las densidades poblacionales del total de insectos (Kursar *et al.*, 1999). Sin embargo, algunos estudios en plantas leñosas sobre las interacciones de los endófitos con los insectos herbívoros, muestran una amplia variedad de efectos tanto negativos y positivos, como neutros (Faeth y Hammon, 1996).

Aunque es claro que ciertos endófitos establecen asociaciones mutualistas con sus plantas hospederas bajo ciertas condiciones (Wilson y Carroll, 1997), muchos otros no limitan ni reducen la acción de los invertebrados herbívoros sobre las plantas (Faeth, 2002) y, en conclusión, no puede generalizarse respecto al papel de los endófitos como antagonistas de insectos (Faeth y Fagan, 2002).

El papel de los endófitos como antagonistas de hongos fitopatógenos parece tener gran interés desde el punto de vista de su aplicación en el control de enfermedades de las plantas, pues se ha observado que los endófitos pueden reducir el daño y pérdida de tejidos vegetales ocasionados por patógenos (Redman *et al.*, 2001; Arnold *et al.*, 2003).

Otro aspecto importante del papel ecológico de los endófitos es que algunos de ellos, al colonizar los tejidos de una planta, promueven la resistencia de ésta al ataque por hongos patógenos, quizá por inducir la producción de aleloquímicos como fitoalexinas, fenoles, flavonoides, alcaloides u otras respuestas químicas en su hospedero, o bien, por inhibir directamente la colonización de los hongos fitopatógenos (Wilson, 1993; Saikkonen *et al.*, 1998).

Sin embargo, los mecanismos responsables de estas complejas interacciones aún no han sido dilucidados (Dingle y McGree, 2003).

Si bien es cierto que algunos endófitos estimulan el crecimiento y la habilidad competitiva de sus plantas hospederas (Espinosa-García y Langenheim, 1990), llegando inclusive a aumentar las propiedades alelopáticas de las mismas contra otras plantas vecinas (Tan y Zou, 2001), para ciertas hospederas y en determinados ambientes, los costos de tener endófitos puede exceder a los beneficios (Faeth, 2002). Esto no quiere decir que todos los endófitos son perjudiciales o benéficos para su planta hospedera (Petrini, 1996).

Tanto los hongos endófitos como las plantas hospederas pueden sintetizar metabolitos que son tóxicos para ambos (Tan y Zou, 2001). Incluso las interacciones entre el endófito y su hospedera están caracterizadas por una relación finamente equilibrada entre la virulencia del hongo y la defensa de la planta (Schulz *et al.*, 2002). Resulta de particular interés el equilibrio en la relación endófito-planta en aquellas hospederas que poseen un potencial alelopático y cuyos metabolitos secundarios forman parte de las defensas químicas que son efectivas sobre microorganismos patógenos (hongos y bacterias) y sobre otras plantas competidoras.

2.3. Metabolismo secundario.

El término ‘metabolitos secundarios’ se utilizó para describir a aquellos compuestos que no tienen un papel primordial en el metabolismo de un organismo, como lo tienen los metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos) (Bennett, 1995; Deacon, 1997).

Los metabolitos secundarios se originan a partir del metabolismo primario pero su biosíntesis está estrictamente controlada por un complejo equipo de enzimas. Los genes que codifican para el metabolismo secundario se han duplicado y triplicado, mutado y desplazado entre las distintas especies a lo

largo del tiempo. De esta manera se han producido numerosos metabolitos secundarios con gran variedad química, pues la naturaleza ha tenido millones de años para hacer esas manipulaciones genéticas relacionadas con la biosíntesis de metabolitos secundarios (Björn y Müller, 2003). La enorme diversidad química de los metabolitos secundarios comprende a los fenilpropanoides, acetogeninas, isoprenoides, alcaloides y otros grupos de compuestos; algunos de ellos tienen una distribución taxonómica restringida a ciertos grupos de plantas, animales o microorganismos, adquiriendo con ello, importancia taxonómica (Bennett, 1995). Las funciones metabólicas de los compuestos secundarios son poco conocidas, pero su función ecológica ha sido ampliamente investigada y documentada; se ha comprobado que son mediadores en la amplia gama de interacciones bióticas dentro y entre especies (infoquímicos), e intervienen también en la protección de ciertos organismos contra factores abióticos. De este modo, el término 'secundario' no refleja la enorme importancia ecológica que los metabolitos secundarios tienen (Anaya, 2003). Según Bennett (1995), el metabolismo secundario refleja la autenticidad de cada genoma y su expresión, frecuentemente, tiene como consecuencia la diferenciación morfológica que caracteriza a los distintos taxa.

2.3.1. Metabolitos secundarios en hongos.

Los hongos se caracterizan por su habilidad para producir gran variedad de metabolitos secundarios, muchos de los cuales muestran una amplia diversidad de actividades biológicas. Muchos hongos son conocidos por que producen compuestos que tienen efectos perjudiciales (carcinógenos o toxinas de mamíferos - micotoxinas). Por otro lado, muchos fármacos importantes han sido descubiertos por medio de estudios químicos de los hongos. Por lo menos 6 de los 20 fármacos más comúnmente utilizados son de origen fúngico, aunque existen muchos otros que tienen importancia agroquímica y biotecnológica; entre los

más empleados en farmacia se encuentran la penicilina y las cefalosporinas, probablemente los agentes antibacterianos más conocidos; la mevilonona, un agente que disminuye el contenido de colesterol en la sangre; la ciclosporina y los alcaloides del ergot (derivados del ácido lisérgico y alcaloides de la clavina - ergotamina, ergocriptina) (Gloer, 1997). En realidad, los metabolitos secundarios de hongos aislados y caracterizados mediante pruebas de laboratorio, no indican la utilidad o inutilidad de estos compuestos, sino más bien reflejan la categorización humana de la naturaleza (Bennett, 1995).

Los hongos establecen una estrecha comunicación con su entorno de donde provienen multitud de señales que influyen sobre la síntesis de sus metabolitos secundarios (Knight *et al.*, 2003). Entre las causas endógenas de producción de metabolitos secundarios en los hongos, se encuentra la aparición de estructuras morfológicas tales como las esporas, los esclerocios o los cuerpos fructíferos. En los cultivos de laboratorio, los hongos comúnmente inician la síntesis de metabolitos secundarios al terminar la fase de crecimiento (Bennett, 1995).

Por su importancia farmacéutica, muchos metabolitos secundarios de los hongos se producen industrialmente por medio de fermentación líquida y bajo condiciones muy distintas a las condiciones naturales en las que vive el hongo (Gloer, 1997). En realidad poco se conoce sobre la función metabólica y ecológica que, en la naturaleza, desempeñan los metabolitos secundarios sintetizados por los hongos. Las propuestas varían, algunos hablan de productos de desecho, artefactos de laboratorio, mecanismos de defensa y de señalamiento, e incluso que desempeñan funciones aun desconocidas (Bennett, 1995). La propuesta más aceptada es que los metabolitos secundarios sintetizados por los hongos desempeñan una gran diversidad de actividades biológicas que les confieren ciertas ventajas competitivas (Harborne, 1993; Gloer, 1995), sin embargo, se necesitan estudios cuidadosos para determinar si

los metabolitos sintetizados tienen un significado fisiológico y/o ecológico en las historias de vida de las especies productoras (Gloer, 1997).

Los estudios sobre las relaciones ecológicas de los hongos, por ejemplo sobre la competencia, proporcionan información muy valiosa de su biología, ecología y producción de compuestos naturales con un potencial de utilidad práctico (Gloer, 1996; Gloer, 1997).

2.3.2. Metabolitos secundarios de hongos endófitos.

A partir de los hongos endófitos se han aislado menos metabolitos secundarios que de los hongos patógenos y del suelo, probablemente por que han sido menos estudiados (Tan y Zou, 2001).

La síntesis de metabolitos secundarios de los hongos puede estar estrechamente relacionada con su nicho ecológico (Gloer, 1995; Schulz *et al.*, 2002). Incluso algunos endófitos pueden producir compuestos similares o idénticos a los producidos por su planta hospedera. Ejemplo de ellos son el ácido giberélico, los limonoides y el taxol entre otros, lo que podría indicar que la planta hospedera y los hongos endófitos tienen el mismo, o muy parecido, sistema enzimático para la biosíntesis de metabolitos secundarios (Wilson, 1993; Strobel *et al.*, 1997; Dos Santos y Filho, 2003). En estos casos existe la probabilidad de que el material genético relacionado con la síntesis de los metabolitos secundarios haya sido transferido de unos organismos a otros viviendo en estrecho contacto (Anaya, 2003).

Las interacciones metabólicas entre el endófito y su hospedera pueden incrementar la síntesis de metabolitos secundarios (Schulz *et al.*, 2002). Estos metabolitos probablemente participan en el establecimiento de las interacciones endófito-hospedera determinando el tipo de relación que se establecerá entre el hongo y la planta (Schulz *et al.*, 1999); en este sentido, como ya se mencionó, los metabolitos secundarios producidos tanto por los endófitos como por las

hospederas, pueden ser parte de los complejos mecanismos mediante los cuales se regula el equilibrio entre ambos organismos durante su estrecha interacción. Si los metabolitos secundarios del endófito incrementan la biosíntesis de metabolitos secundarios en la planta, este hecho puede beneficiar a ésta al incrementar su resistencia y/o tolerancia al estrés biótico y abiótico (Schulz *et al.*, 1993; Knight *et al.*, 2003). A pesar de las investigaciones y los hallazgos en las relaciones planta-endófito, el papel biológico-ecológico que desempeñan los metabolitos secundarios de los endófitos en la planta hospedera no ha sido del todo elucidado (Peters *et al.*, 1998).

Los metabolitos secundarios aislados a partir de los hongos han sido clasificados dependiendo de su actividad biológica y mencionando en algunos casos la probable función de dichos metabolitos dentro de la planta hospedera (Schulz *et al.*, 1999). Los metabolitos secundarios han mostrado gran actividad biológica contra diversos microorganismos (Yue *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001), contra las mismas plantas hospederas (potencial herbicida) (Peters *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 1999) e incluso contra insectos (Clay, 1991; Clay y Schardl, 2002).

Las estructuras caracterizadas de algunos metabolitos secundarios de hongos endófitos corresponden a grupos estructurales muy diversos incluyendo: esteroides, xantanos, fenoles, isocumarinas, derivados de perileno, quinonas, furandionas, terpenoides, depsipéptidos y citochalasininas (Schulz *et al.*, 1999). Por lo que se ha demostrado que los hongos endófitos representan una fuente rica de compuestos bioactivos químicamente novedosos y con un enorme potencial médico y agrícola (Tan y Zou, 2001).

2.4. Competencia entre hongos.

Las relaciones entre los hongos son importantes para determinar el modo y patrón del crecimiento de los hongos en todos los ambientes, lo que afecta la organización, composición y patrones de colonización de los hongos dentro de los ecosistemas (Gloer, 1995).

La competencia entre los hongos se ha clasificado en dos tipos: por explotación y la más común, por interferencia (Moore-Landecker, 1996). Esta clasificación podría ser artificial excepto cuando existe una continua renovación de recursos (Widden, 1997). La competencia por explotación ocurre principalmente durante la colonización primaria de un hábitat y se restringe a los primeros estados de desarrollo de la comunidad fúngica, en donde el éxito de una especie y su predominio sobre otras depende de las oportunidades de llegar y establecerse velozmente (Moore-Landecker, 1996). La competencia por interferencia puede ser física, al establecerse un contacto directo entre los hongos ya sea formando barreras (proliferación densa de hifas en el punto de contacto), creciendo las colonias de manera entremezclada y por el enrollamiento de las hifas; la competencia por interferencia también puede ser química, mediante la producción de compuestos solubles o volátiles, efectivos a distancia que previenen el crecimiento de las hifas del competidor (Widden, 1997).

En cajas de Petri inoculadas con 2 hongos separados por 2 ó 3 cm se han caracterizado un gran número de relaciones, las cuales pueden ser neutrales, competitivas o mutualistas (Shearer, 1995; Widden, 1997). Las interacciones competitivas *in vitro* se pueden clasificar como antagonismo directo e indirecto. En el antagonismo directo las hifas de una colonia crecen encima de otro hongo y lo destruyen por interacciones directas entre los micelios de los hongos. En el antagonismo indirecto, un hongo puede responder a la cercanía de otro,

construyendo barreras hifales en el sitio de unión entre los dos hongos, o bien, aumentando la producción de inhibidores metabólicos como los antibióticos (Neville y Webster, 1995).

En estudios sobre competencia entre hongos se ha reportado que los hongos que presentan una velocidad lenta en su crecimiento son más antagónicos que los hongos con un crecimiento de tipo medio y rápido (Gloer, 1995; Yuen *et al.*, 1999). Pero es importante mencionar que la competencia no sólo depende de las relaciones antagónicas entre los hongos, sino también de otros factores como los nutritivos y ambientales (Gloer, 1996).

Aunque es difícil demostrar que la competencia ocurre naturalmente tanto en sistemas experimentales como en las comunidades naturales, cualquier mecanismo (como los antibióticos) que inhiba la germinación o el crecimiento de los organismos competidores indudablemente debe permitirle al organismo productor una mejor explotación del recurso (Shearer, 1995).

Los estudios sobre el antagonismo de hongos pueden ser de gran interés para el conocimiento de la ecología de los hongos y para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica que muestren un potencial promisorio para el desarrollo de nuevos agroquímicos y fármacos (Gloer, 1996).

2.4.1. Competencia entre hongos endófitos.

Al estudiar la diversidad de los hongos endófitos es común que la presencia de un endófito se asocie con la ausencia de otro, lo que sugiere que los endófitos pueden interactuar entre ellos (Espinosa-García *et al.*, 1996; Elamo *et al.*, 1999; Kursar *et al.*, 1999).

En estudios *in vitro* de competencia entre endófitos se ha observado antagonismo entre ellos (Arnold *et al.*, 2003). Los hongos endófitos podrían competir por los espacios y los nutrimentos de su planta hospedera (Schulthess y Faeth, 1998), interactuando básicamente de dos formas: 1) mediante la producción de metabolitos secundarios o 2) por la inducción de defensas

químicas en sus plantas hospederas, inhibiendo en ambos casos la colonización por otros hongos (Saikkonen *et al.*, 1998).

Los hongos endófitos no solo interactúan entre ellos, también lo hacen con hongos fitopatógenos que coexisten en los tejidos de la plantas. En los estudios de competencia *in vitro* entre los hongos endófitos y fitopatógenos se ha encontrado una gran variedad de respuestas, desde la inhibición hasta la estimulación en el crecimiento tanto de los endófitos como de los fitopatógenos (Espinosa-García *et al.*, 1996). Los hongos endófitos que inhiben el crecimiento de los hongos fitopatógenos *in vitro* podrían beneficiar a su planta hospedera al competir o producir químicos tóxicos para los hongos fitopatógenos (Espinosa-García *et al.*, 1996; Arnold *et al.*, 2003). En algunos estudios *in vivo* de los hongos endófitos y fitopatógenos se ha observado que la colonización de un hongo endófito disminuye los daños de los hospederos por la acción de hongos fitopatógenos (Redman *et al.*, 2001; Dingle y McGree, 2003; Arnold *et al.*, 2003). Los compuestos sintetizados por los endófitos pueden tener un efecto sinérgico, al actuar junto con los metabolitos producidos por la planta, en la reducción de la colonización de los hongos fitopatógenos en los tejidos de la misma, lo que pudiera ser una ventaja de adaptación para el endófito, pues al evitar la colonización de hongos patógenos y otros microorganismos competidores asegura los recursos de su hospedero (Yue *et al.*, 2000).

En estudios del efecto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos sobre los hongos fitopatógenos se ha observado que no todos los extractos muestran actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos y que las actividades biológicas de sus extractos son muy diversas (Liu *et al.*, 2001), por lo que son necesarios estudios que ayuden a elucidar los mecanismos implicados en esas complejas relaciones (Dingle y McGree, 2003).

III. Hipótesis

Las plantas son colonizadas por un mosaico de hongos endófitos que interactúan estrechamente entre si; por ello, es probable que los hongos aislados a partir de una misma planta muestren mayores índices de antagonismo al interactuar entre si que al interactuar con los hongos endófitos aislados de otras plantas.

Los hongos de crecimiento lento son más antagónicos que los hongos de crecimiento rápido; por esta razón encontraremos una correlación negativa entre la velocidad del crecimiento y el índice de antagonismo de los hongos endófitos, y una correlación positiva entre la velocidad de crecimiento y la susceptibilidad de ser inhibidos en su crecimiento por otros hongos.

En los bioensayos de antagonismo es probable que el antagonismo entre los hongos sea causado por la acción de los metabolitos secundarios.

De acuerdo a la hipótesis del antagonismo balanceado los hongos endófitos producen compuestos que son tóxicos a sus plantas hospederas, por lo que los extractos orgánicos de los hongos endófitos también mostrarán un efecto fitotóxico sobre las plantas de prueba.

Debido a que los hongos endófitos son una fuente prometedora y poco explorada de producción de metabolitos secundarios, esperamos encontrar compuestos con actividad biológica, en los hongos endófitos de las plantas con potencial aleloquímico.

IV. Objetivo General

Aislar e identificar los hongos endófitos de algunas plantas con potencial aleloquímico de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo, y mediante bioensayos de antagonismo, seleccionar las especies más antagónicas con objeto de evaluar su actividad biológica *in vitro* contra el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos y plantas de prueba.

4.1 Objetivos Particulares

1. Recolectar diversos órganos de algunas plantas alelopáticas de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo.
2. Aislar los hongos endófitos de estos órganos.
3. Separar los distintos hongos endófitos aislados, haciendo las resiembras necesarias hasta obtener cultivos puros.
4. Determinar la velocidad de crecimiento de los hongos endófitos aislados.
5. Realizar bioensayos de antagonismo entre los hongos endófitos aislados.
6. Determinar si el antagonismo entre hongos es causado por metabolitos secundarios.
7. Seleccionar a las cuatro especies más antagónicas y realizar con ellas bioensayos de antagonismo contra hongos fitopatógenos.
8. Cultivar a pequeña escala los 4 hongos endófitos seleccionados para obtener sus extractos orgánicos y evaluar la actividad biológica de los mismos sobre los hongos fitopatógenos.
9. Probar el efecto de los extractos orgánicos de los endófitos sobre las siguientes plantas de prueba: *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae), *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) y *Echinochloa crus-galli* (Poaceae).
10. Seleccionar uno de los hongos endófitos más antagónicos y cultivarlo a mediana escala para obtener mayor cantidad de extracto orgánico e iniciar el fraccionamiento biodirigido del mismo.

V. Descripción biológica del material vegetal

5.1. *Bursera simaruba* (L.) Sarg. (Burseraceae).

Nombres comunes: Chacah, chaca, palo mulato.

Es un árbol que llega hasta los 30 m de altura, su tronco generalmente es recto con una corteza escamosa papirácea y de color verde a rojizo. Las hojas están dispuestas en espiral, son imparipinadas, miden de 15 a 30 cm. de longitud (incluyendo el pecíolo) y suelen ser caducas. Sus flores son actinomorfas con pétalos de color crema rosáceo o crema verdoso, miden de 6-7 mm y son aromáticas. Los frutos son cápsulas drupáceas que miden de 10 a 15 mm, su color es moreno rojizo y tienen una semilla dura y triangular de unos 8 mm de color rojo. Florece de mayo a agosto (Cabrera *et al.*, 1982).

Esta especie se distribuye en toda la vertiente del Golfo de México y del Océano Pacífico: desde el sur de Tamaulipas y San Luis Potosí hasta Yucatán y Quintana Roo, y desde Sinaloa hasta Chiapas, desarrollándose en una gran variedad de condiciones ecológicas. En el estado de Quintana Roo está ampliamente distribuida y constituye un elemento primario o secundario de las selvas altas y medianas subperennifolias y medianas subcaducifolias (Cabrera *et al.*, 1982).

B. simaruba es la especie más utilizada como cerca viva en todo el estado de Quintana Roo, pues las estacas vivas enterradas del árbol se regeneran muy eficientemente. La resina de este árbol es utilizada como remedio contra la irritación alérgica producida por la resina de *Metopium brownei*. También se utiliza en la fabricación de mangos para herramientas (Cabrera *et al.*, 1982).

A partir de la resina de *B. simaruba* se aislaron y caracterizaron: un novedoso triterpeno del tipo lupano lup-20(29)-en-3 β , 23-diol y los triterpenos conocidos lupeol, epilupeol, epiglutinol, α amirina y β -amirina, con actividad anti-bacterial (Peraza-Sánchez *et al.*, 1995).

5.2. *Callicarpa acuminata* HBK. (Verbenaceae).

Nombres comunes: Pukim, sakpuk'ím y xpucyim.

Es un arbusto que alcanza de 1 a 3 m de altura. Sus tallos son rectos con pocas o nulas ramificaciones y están cubiertos con abundante pelo blanquecino. Las hojas miden de 10 a 25 cm de largo, tienen forma de punta de lanza con el borde ligeramente aserrado, el haz es de color verde oscuro y el envés está cubierto por abundante pelo blanco. Las flores son pequeñas con el estambre de color blanco y se agrupan en vistosas inflorescencias llamadas cimas. Los frutos son drupas globosas de color verde, blanco o negro dependiendo de la etapa de desarrollo y con una sola semilla. Florece durante todo el año (Cabrera *et al.*, 1982).

Esta especie está ampliamente distribuida en México, se encuentra desde Tamaulipas y San Luis Potosí hasta la península de Yucatán por la vertiente del Golfo de México y en los estados de Puebla, Oaxaca y Chiapas. En Quintana Roo es una de las especies con mayor distribución y se encuentra en toda la vegetación secundaria del estado (Cabrera *et al.*, 1982).

En el laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM, y como parte de un proyecto de búsqueda de compuestos bioactivos de plantas, se estudió el potencial aleloquímico de *C. acuminata*. El fraccionamiento biodirigido de ésta especie permitió el aislamiento de 5 compuestos: el ácido isopimárico, una mezcla de 2 diterpenos (sandaracopimaradien- 19- ol y akhdarenol), α - amirina y la flavona salvigenina. Algunos de los extractos mostraron una moderada actividad biológica contra hongos fitopatógenos y plantas de prueba (Anaya *et al.*, 2003b).

5.3 *Metopium brownei* (Jacq.) Urban. (Anacardiaceae).

Nombres comunes: Chechem, boxchechem y Kabal´chechem.

Es un árbol que mide de 8 a 25 m de altura. Su tronco es recto, con las ramas ascendentes y de copa irregular, la madera es de color crema y presenta un exudado blanco-acuoso sumamente cáustico que ennegrece al contacto con el aire. Las hojas tienen de 5 a 7 folíolos que suelen estar manchados con puntos negros. Los árboles de esta especie pierden sus hojas entre abril y mayo, época en florecen. Las flores son pequeñas, inconspicuas y de color amarillo. Los frutos son drupas ovales y miden 1 cm, son de color rojo y tienen una semilla (Cabrera *et al.*, 1982).

Éste árbol únicamente se distribuye por la vertiente del Golfo de México, desde Veracruz hasta Quintana Roo, en donde es muy abundante. Se encuentra en las selvas alta y mediana subperennifolia y mediana subcaducifolia, co-dominando en los estratos superiores; también habita en suelos someros con buen drenaje y es común encontrarlo asociado a los tintales, manglares y en la asociación sak-chechem-tinto-chechem negro. Debido a que es muy resistente al fuego, crece en manchones ocasionados por las quemas (Cabrera *et al.*, 1982).

Esta especie es muy conocida por la alta toxicidad de su resina. La madera se utiliza en la fabricación de chapa, duela, piso y lambrín, aunque presenta problemas para su industrialización debido a que su resina cáustica causa daños dérmicos y respiratorios en los trabajadores de la madera. También es utilizada como planta medicinal por poseer propiedades sedativas y diaforéticas y para el tratamiento del sarampión (Cabrera *et al.*, 1982).

Los estudios fitoquímicos realizados sobre *M brownei*, han permitido el aislamiento y caracterización de un producto natural novedoso 3-(10'Z,13'E-pentadecadienyl) catecol, el 3-n-pentadec(en)ylcatecoles con propiedades antifúngicas y toxicidad sobre *Artemia salina* (Rivero-Cruz *et al.*, 1997) y flavonoides y urishioles con actividad biológica sobre plantas y hongos fitopatógenos de prueba (Anaya *et al.*, 1999).

5.4. *Sebastiania adenophora* Pax y Hoffm. (Euforbiaceae).

Nombres comunes: Chechem blanco y Sak-chechem y K' aan Chunup'.

Es un árbol o arbusto de jugo lechoso; hojas alternas, ovadas u ovaladas de 3-5 cm. de longitud; sus flores crecen en espigas (Martínez, 1979).

Se distribuye en la selva baja caducifolia, selva mediana subcaducifolia y selva mediana subperennifolia de la Península de Yucatán (Martínez, 1979) y es una especie endémica de la Zona Maya (Ibarra-Manríquez *et al.*, 1995).

La resina de ésta especie ocasiona efectos cáusticos sobre la piel (Martínez, 1979). Localmente, el látex se utiliza en dosis muy pequeña como purgante.

En el laboratorio de Aleopatía del Instituto de Ecología de la UNAM, se aislaron y caracterizaron 6 triterpenos pentacíclicos conocidos (3-*epi*- β -amirina, β -amirinona, 3-*epi*-lupeol, lupenona, taraxerol y taraxerona), que poseen actividad biológica selectiva contra diversas plantas de prueba, y dos esteroides (β -sitosterol y β -D-glucositosterol), (Macías-Rubalcava *et al.*, en prensa).

5.5 *Zuelania guidonia* (Sw.) Britt. y Millsp. (Flacourtiaceae).

Nombres comunes: Trementina, tamay, palo de piragüita, totolonche.

Es un árbol monopódico que alcanza hasta 30 m de altura y 50 cm de diámetro. El tronco es recto y el fuste largo y limpio. Su madera es de color crema amarillento a rosado, con exudado resinoso transparente y pegajoso. Sus hojas son alternas y simples, de forma oblonga a oblongo-elíptica con el margen entero. Los árboles pierden sus hojas durante los meses de marzo a mayo y florecen en los meses de marzo a junio. Las flores son actinomorfas, miden de 8 a 9 mm de diámetro, son de color crema verdoso y tienen un fuerte olor parecido al de la gardenia. Las inflorescencias se agrupan en densos fascículos terminales. El fruto es una cápsula carnosa y globosa; mide hasta 8 cm. de diámetro, es de color verde amarillento y contiene numerosas semillas de 5 mm de largo, angulosas y rodeadas de una pulpa amarillenta (Pennington y Sarukán, 1968).

Esta especie se distribuye por la vertiente del Golfo de México, desde el sur de Tamaulipas y sureste de San Luis Potosí, hasta la península de Yucatán, y desde el nivel del mar hasta los 500-700 m. Forma parte del estrato superior o medio de selvas altas perennifolias o medianas subperennifolias y caducifolias. Habita exclusivamente en suelos de origen calizo que presentan poco afloramiento de material rocoso y buen drenaje. Este árbol constituye un elemento abundante en la vegetación secundaria de las selvas altas perennifolias y medianas subperennifolias.

El tronco de *Zuelania guidonia* es comúnmente utilizado como poste en el ritual de “Los voladores de Papantla” (Pennington y Sarukán, 1968).

En el laboratorio de Aleopatía del Instituto de Ecología de la UNAM, se aislaron y caracterizaron, de las partes aéreas de *Zuelania guidonia*, dos novedosos compuestos (las Zuelasaponinas A y B), los cuales han mostrado una importante actividad biológica contra el crecimiento de hongos fitopatógenos (Anaya *et al.*, 2004).

VI. Materiales y Métodos

6.1. Zona de estudio.

La reserva ecológica “El Edén” está situada en el norte de Quintana Roo a 21° 12´ N y, 87° 11´ O, a una altitud de 5-10 m. Es una reserva privada de 1492 ha con gran variedad de condiciones ambientales en donde están representados la mayoría de los ecosistemas de la Península de Yucatán, a excepción de los sistemas de la costa. La selva mediana de El Edén contiene una alta biodiversidad y está dominada por árboles mayores de 15 m de altura, con diferentes especies de arbustos, herbáceas, plantas trepadoras, lianas y epifitas. Esta selva es el hábitat del mono araña, el jaguar, el puma y otros vertebrados importantes. Diversas comunidades vegetales de este lugar, representan estados jóvenes de la sucesión secundaria de la selva (acahuales). En ellas existe una gran riqueza de especies de plantas superiores y animales vertebrados. Otra comunidad diferente conocida como ‘tintal’, esta dominada por el árbol del tinte (*Haematoxylon campechianum*) y se trata de una selva inundable semidecidua, aunque también crecen en ella otras especies arbóreas importantes. En El Edén existe una sabana con árboles dispersos. La zona posee, asimismo, diferentes tipos de humedales, que se originan por el largo periodo de tiempo que ciertas zonas permanecen húmedas o inundadas. En estas comunidades hay especies de plantas vasculares además de cuerpos de agua permanentes. La biota de estos ecosistemas es casi desconocida; la forman diversas especies de peces, crustáceos, algas, insectos, plantas, cocodrilos, anfibios, etc. (Gómez-Pompa, 1998).

6.2. Recolecta de material vegetal.

Se seleccionaron cuatro especies de plantas de El Edén, a las cuales previamente se les determinó un potencial alelopático (Anaya *et al.*, 2003a). El material

vegetal se recolectó durante el tiempo de secas, en mayo del 2002. Se colectaron hojas, flores y/o frutos sanos de 1 ejemplar de cada una de las siguientes especies: *Bursera simaruba* (Burseraceae), *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae), *Metopium brownei* (Anacardiaceae), *Sebastiania adenophora* (Euphorbiaceae) y *Zuelania guidonia* (Flacourtiaceae). Todas las muestras de las plantas colectadas estaban sanas, sin mostrar síntomas de enfermedad.

6.3. Aislamiento de hongos endófitos.

Para el aislamiento de hongos endófitos se siguió el procedimiento reportado por Rodríguez (1994). Una vez en el laboratorio de la Reserva El Edén, el material vegetal se lavó con agua de la llave y se esterilizó superficialmente con una secuencia de soluciones de etanol al 75% por 1 min, Clorox comercial al 65% (equivalente a 3.4% NaClO) durante 10 min y etanol al 75% por 1 min. Posteriormente, el material se enjuagó con agua destilada estéril y se secó con papel absorbente estéril. Por último fue colocado en cajas de Petri estériles, mismas que fueron etiquetadas y selladas con Parafilm®. Las cajas de Petri con el material vegetal se conservaron en refrigeración para transportarlas al Laboratorio de Alelopatía, del Instituto de Ecología de la UNAM.

En el laboratorio y bajo condiciones estériles, se hizo el aislamiento de los hongos endófitos. El material vegetal se cortó en pequeños segmentos de 2 mm² con un bisturí esterilizado a la flama; los cortes se hicieron de la parte media, superior e inferior de cada muestra recolectada. Se sembraron 3 cortes en cajas de Petri con dos medios de cultivo (Cao *et al.*, 2002): agar-papa-dextrosa [APD: 200g de papa, 20 g dextrosa, 15 g de agar en 1L de agua destilada (Ulloa y Hanlin, 1978)] y agar-agua destilada [AA: 20 g agar en 1L de agua destilada (Ulloa y Hanlin, 1978)], haciéndose 2 repeticiones por medio utilizado. Las cajas se colocaron en una estufa a 25° C y en la oscuridad.

Una vez que los hongos emergieron a partir de los tejidos vegetales, se tomó una pequeña porción de micelio con una aguja de disección esterilizada a la flama y se transfirió a cajas de Petri con APD. Se hicieron tantas transferencias de micelio como fueron necesarias, con el fin de obtener cultivos de hongos puros.

6.4. Identificación de los hongos endófitos.

Con el fin de promover la formación de esporomas y esporas, estructuras indispensables para la identificación a morfo-especie para el caso de los hongos, los aislados puros se cultivaron bajo distintas condiciones. Cada hongo se sembró en distintos medios de cultivo: agar-papa-dextrosa (APD), agar-agua destilada (AA) y agar-harina de maíz (AHM - 20g harina de maíz, 20 g dextrosa, 1L de agua) (Ulloa y Hanlin, 1978)), para lo cual, en una campana de flujo laminar se tomó una pequeña porción del micelio joven de los distintos hongos con una aguja de disección esterilizada a la flama. El micelio se transfirió al centro de una caja de Petri con su respectivo medio de cultivo estéril. Los cultivos se incubaron en la oscuridad a 25°C y algunos de ellos también se trataron con luz azul o radiación UV a temperatura ambiente. Además, algunos aislamientos se colocaron en cajas con trozos de la planta seca de la que se aislaron los hongos, así como ‘carnadas’ de diversos tipos (hojas frescas y trozos pequeños de madera de *Pinus* sp.), todo esto para inducir a la esporulación.

6.5. Determinación de velocidades de crecimiento.

Los distintos aislamientos de hongos endófitos se cultivaron en APD a 25° C y 30°C por triplicado. El crecimiento de los hongos se midió a los 3, 5 y 10 días, y de acuerdo con sus velocidades de crecimiento, éste se clasificó como: rápido, moderado y lento.

6.6. Bioensayos de antagonismo.

6.6.1. Selección del método.

Para seleccionar el método que permitiera la mejor observación de las interacciones entre los hongos se hicieron distintas pruebas. Como se muestra en la Figura 1, se colocaron 2, 3 ó 4 cortes equidistantes del micelio de los distintos aislamientos, pero de velocidades de crecimiento similares, en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con APD estéril. Los cortes del micelio de los hongos se hicieron con tubos de vidrio estériles de 9 mm de diámetro. Todos los bioensayos se realizaron en una estufa a 25° C.

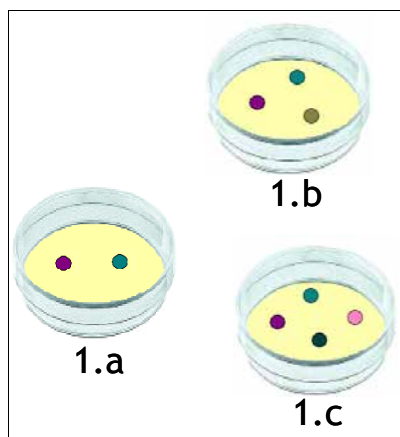


Figura 1. Esquema de los bioensayos preliminares de antagonismo con 2 (1.a), 3 (1.b) y 4 cortes (1.c) de distintos hongos en cada caja de Petri.

Con base en los resultados de estos bioensayos preliminares, se decidió llevar a cabo los bioensayos de antagonismo, con únicamente dos hongos por caja (Figura 1.a).

6.6.2. Bioensayos de antagonismo entre hongos endófitos.

Para los bioensayos de antagonismo, los hongos endófitos se sembraron de acuerdo a sus velocidades de crecimiento. De esta manera, al hacer los

bioensayos de antagonismo de los hongos de crecimiento lento vs los de crecimiento medio, primero se sembraron los de crecimiento lento y 3 días después se sembraron los de crecimiento medio. En los bioensayos de antagonismo de los hongos de crecimiento lento vs los de crecimiento rápido, primero se sembraron los de crecimiento lento y 7 días después los de crecimiento rápido. Para las pruebas de hongos de crecimiento medio vs los de crecimiento rápido, primero se sembraron los hongos de crecimiento medio y 2 días después los de crecimiento rápido. Finalmente los hongos con la misma categoría de crecimiento se sembraron al mismo tiempo. Los bioensayos de antagonismo se hicieron por triplicado.

Los resultados de crecimiento e interacción entre los hongos endófitos, se registraron e interpretaron después de 10 días para los hongos de crecimiento lento, 7 días para los hongos de crecimiento medio y 5 días para los hongos de crecimiento rápido.

El porcentaje de inhibición del crecimiento de cada hongo endófito durante las distintas interacciones, se determinó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Crecimiento control}-\text{Crecimiento en bioensayo}}{\text{Crecimiento control}} \times 100$$

Se sumó el porcentaje de inhibición de cada hongo al crecer frente a los demás y los datos se analizaron mediante un análisis unilateral de la variancia por jerarquías de Kruskal-Wallis para determinar si los porcentajes de inhibición diferían entre los endófitos. Para analizar la correlación entre la velocidad y la inhibición del crecimiento, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman con el programa STATISTICA 6.0.

Para determinar el porcentaje de inhibición de los endófitos por “comunidad” (considerando como “comunidad” a todos los hongos aislados de una especie de planta), se sumaron los porcentajes de inhibición de todos los


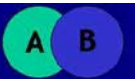
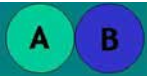
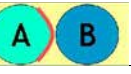


endófitos de una “comunidad” y se analizaron con una prueba no paramétrica de variancia por jerarquías de Kruskal-Wallis.

A cada hongo endófito se le asignó un valor numérico de acuerdo al tipo de interacción con los otros endófitos en las pruebas de antagonismo y al puntaje alcanzado que muestra la Tabla 1. Con este valor se calculó el índice de antagonismo de cada hongo endófito de la siguiente manera:

$$IA = (A1n \times -1) + (A2n \times 0) + (Bn \times 1) + (Cn \times 2) + (Dn \times 3) + (En \times 4)$$

Donde n es el número de veces que el hongo presentó la categoría de antagonismo correspondiente (A, B, C, D o E) y con base en ello se le asignó un valor arbitrario (Puntos) (Tabla 1).

Tabla 1. Tipo de interacciones entre hongos endófitos y valores numéricos asignados (modificado de Yuen *et al.*, 1999).

Categorías	Tipos de Interacción	Puntos
A1 	El crecimiento de A es inhibido por la especie B.	-1
A2 	El crecimiento de A se entremezcla con el de B, sin que exista reducción en el crecimiento de alguna de ellas.	0
B 	La especie A crece en contacto con B y cesa el crecimiento de ambas especies.	1
C 	La especie A forma un halo oscuro al estar en contacto con B.	2
D 	La especie A crece encima de la especie B reduciendo el crecimiento de B.	3
E 	La especie A inhibe a distancia a la especie B.	4

Con los valores de los índices de antagonismo por endófito se caracterizó y comparó su habilidad para inhibir a los demás hongos durante las distintas interacciones. Los índices de antagonismo se examinaron usando un análisis unilateral de la variancia por jerarquías de Kruskal-Wallis, para determinar si los índices de antagonismo diferían entre los hongos endófitos.

Para caracterizar el índice de antagonismo “por comunidad” se analizaron los índices de antagonismo de la “comunidad” de endófitos por planta con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Para determinar la correlación de Spearman entre la velocidad de crecimiento y el índice de antagonismo se utilizó el programa STATISTICA 6.0 .

También se hizo un análisis de correlación de Spearman para determinar si existía una relación entre el porcentaje de inhibición del crecimiento con los índices de antagonismo de los endófitos en los bioensayos de antagonismo.

6.6.3 Bioensayos de antagonismo entre hongos endófitos contra fitopatógenos.

A partir de los resultados de los bioensayos de antagonismo entre los endófitos se seleccionaron los cuatro 4 endófitos que mostraron los mayores índices de antagonismo y los menores porcentajes de inhibición en su crecimiento al interactuar con los demás endófitos.

Con los 4 hongos endófitos seleccionados se hicieron, por triplicado, bioensayos de antagonismo contra siete especies de hongos fitopatógenos (Tabla 2).

Tabla 2. Hongos endófitos y fitopatógenos utilizados para los bioensayos de antagonismo.

	HONGOS	PLANTA HOSPEDERA	CLAVE
Hongos fitopatógenos.	<i>Colletotrichum fragaria</i>	<i>Fragaria vesca</i> L. (Fresa)	Cfra
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill (Jitomate)	Foxy
	<i>Glomerella</i> sp.	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Jamaica)	Glom
	<i>Helminthosporium turcicum</i>	<i>Triticum</i> sp. (Trigo)	Htur
	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Jamaica)	Pho
	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Capsicum</i> sp. (Chile)	Pcap
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Allium cepa</i> (Cebolla)	Srol
Hongos endófitos	Ascomyceto	<i>Bursera simaruba</i>	B.1.a
	C.1.b	<i>Callicarpa acuminata</i>	C.1.b
	C.1.c	<i>Callicarpa acuminata</i>	C.1.c
	C.1.e	<i>Callicarpa acuminata</i>	C.1.e

Los bioensayos de antagonismo se realizaron siguiendo el método descrito en el punto 6.6.2. El porcentaje de inhibición del crecimiento y el índice de antagonismo se evaluaron e interpretaron después de diez días de iniciado el bioensayo.

6.7. Selección del medio de cultivo para las fermentaciones a pequeña y mediana escala.

Para la elección del caldo de cultivo que se utilizó en las fermentaciones de los hongos, primero se hicieron las extracciones orgánicas únicamente de los medios, sin el cultivo de hongos. Los medios de cultivo evaluados fueron el caldo de harina de maíz (CHM) y el caldo de papa dextrosa (CPD).

En matraces Erlenmeyer de 1 L se vaciaron 500 ml de caldo de cultivo CPD o CHM. Los medios, libres de hongos, se mantuvieron con agitación constante a 130 rpm, a temperatura ambiente durante 10 días. Después de este tiempo, se realizaron preparaciones microscópicas del caldo para descartar la contaminación por algún microorganismo. Los medios de cultivo se filtraron bajo presión reducida.

6.7.1 Extractos de los medios de cultivo sin hongos: CPD y CHM.

Los extractos de los medios de cultivo, se obtuvieron por sucesivas particiones con acetato de etilo (AcOEt). La fase orgánica del acetato de etilo se colectó y se llevó a sequedad al vacío.

6.8. Fermentaciones a pequeña escala de los cuatro hongos endófitos seleccionados.

Quinientos ml de caldo de papa dextrosa (CPD) se vaciaron a matraces Erlenmeyer de 1 L. Cada matraz se inoculó con 3 cortes circulares de 9 mm de diámetro del hongo endófito correspondiente. Se fermentaron cuatro matraces por especie: dos de ellos con agitación constante (150 rpm); los otros dos en condiciones estáticas, todos ellos a temperatura ambiente. Los cultivos estáticos no se continuaron trabajando ya que los hongos crecieron muy poco bajo estas condiciones. Con los hongos cultivados con agitación se realizaron preparaciones microscópicas de los productos de la fermentación para descartar que estuvieran contaminados con otros microorganismos. Las cosechas de los hongos se llevaron a cabo después de 2 semanas de cultivo con los hongos C.1.c y C.1.e, que mostraron un crecimiento más rápido; y después de 3 semanas de cultivo para los hongos C.1.b y B.1.a, los cuales crecieron más lento. Todos los cultivos se filtraron a través de una capa de manta estéril con el fin de separar el micelio del medio de cultivo.

6.8.1 Extractos de los hongos endófitos.

El micelio obtenido durante la fermentación se sometió a un proceso de maceración, primero con diclorometano (CH_2Cl_2) y después con acetato de etilo (AcOEt). Con cada uno de los disolventes se hicieron tres extracciones con un volumen de 1 L cada una, cambiando el solvente cada dos días. Posteriormente,

se colectó la fase orgánica y se llevó a sequedad bajo presión reducida, utilizando un rotavapor.

Los extractos de los medios se obtuvieron por particiones sucesivas, primero con CH₂Cl₂ y después con AcOEt; las fases orgánicas se colectaron y se llevaron a sequedad al vacío.

Los diversos extractos orgánicos (micelio y medio de cultivo) de los cuatro hongos endófitos se analizaron por cromatografía en capa delgada.

6.9. Bioensayos para evaluar el efecto biológico de los extractos de los hongos endófitos sobre los organismos de prueba.

Para evaluar el efecto biológico de los extractos de los hongos endófitos se hicieron los siguientes bioensayos:

1. Efecto sobre el crecimiento radial de los hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* (Nectriaceae), *Phytophthora capsici* (Pythiaceae), *Colletotrichum fragaria* (Phyllachoraceae) y *S. rolfsii* (Atheliaceae).
2. Efecto sobre el crecimiento de la raíz de *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae), *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) y *Echinochloa crus-galli* (Poaceae).

6.9.1. Evaluación de los extractos de los hongos endófitos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos.

El efecto de los diversos extractos de los hongos endófitos sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos, se probó a una concentración de 250 ppm, concentración en la que se puede apreciar el efecto de los extractos sobre el crecimiento de los hongos (Anaya *et al.*, 1999). De cada extracto se tomaron 15 mg, mismos que fueron diluidos primero en metanol (\pm 0.1 ml) y llevados después a un volumen de 30 ml con agua destilada estéril (solución patrón). A cada caja de Petri de 5 cm de diámetro se le añadieron 3 ml de la solución

patrón y 3 ml de APD estéril con el fin de obtener una concentración final de 250 ppm. Se utilizaron dos tipos de controles: el de agua (APD + 3 ml de agua) y el del disolvente (APD + 0.1 ml de metanol).

Los hongos fitopatógenos de prueba se tomaron de cultivos puros en APD de 10 días de crecimiento. Las cajas de Petri fueron inoculadas con un corte circular de 5 mm de diámetro del respectivo hongo fitopatógeno colocado en el centro; se hicieron 5 repeticiones por tratamiento. El crecimiento de los hongos fitopatógenos se midió a los 3 y 6 días. Los datos de crecimiento de *F. oxysporum* fueron analizados por medio de un análisis de varianza de una vía, (ANOVA) modelo I ($\alpha=0.05$) y las medias se compararon con una prueba de Tukey HSD; mientras que los datos de crecimiento de *P. capsici*, *C. fragaria* y *S. rolfsii* se analizaron con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis debido a la variancia en el crecimiento de estos hongos (Dawson-Saunders y Trapp, 1997; Daniel, 2002).

6.9.2. Evaluación de los extractos orgánicos de los hongos endófitos sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba.

Para examinar el efecto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba, se utilizó una concentración de 100 ppm (Anaya *et al.*, 1999). Las soluciones se obtuvieron tomando 2 mg de cada extracto y diluyéndolos en 20 ml de disolvente (mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH). A cada caja de Petri (5 cm de diámetro) se le colocó papel filtro Whatman No. 42 y se le añadieron 1.5 ml de la solución extracto respectivo. Una vez evaporado el disolvente, se añadieron 1.5 ml de agua. Se utilizaron dos controles, uno con papel filtro + agua destilada (control de agua) y otro con papel filtro + la mezcla de disolventes (la cual se evaporó a sequedad) + agua destilada (control del disolvente). Diez semillas de cada especie de prueba se colocaron directamente sobre el papel filtro de cada caja de Petri y se sellaron con Parafilm® para evitar la evaporación del agua. Se hicieron 4 repeticiones por tratamiento. Las semillas

se incubaron en una estufa de crecimiento a 27° C y en la oscuridad. Después de 24 h se midió la longitud de la raíz de las plántulas de *A. hypochondriacus*; las de *E. crus-galli* se midieron a las 48 h y las de *L. esculentum*, a las 72 h. Los datos de crecimiento radical de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* fueron analizados por medio de un ANOVA de una vía, modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD, mientras que los datos de *L. esculentum* se analizaron con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis debido a la variancia en su crecimiento radical (Dawson-Saunders y Trapp, 1997; Daniel, 2002).

6.10. Cultivo a mediana escala de un hongo endófito y su extracción orgánica.

El hongo endófito seleccionado por su alto potencial antagónico fue el C.1.c; su fermentación se llevó a cabo en la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. El cultivo del hongo se hizo en 3 fermentadores de 15 L de capacidad, y a cada fermentador se le adicionaron 9 L del medio de cultivo CPD y como inóculo, 1 L de cultivo de C.1.c de 10 días de crecimiento. Las fermentaciones se mantuvieron a 25 °C con agitación de 150 rpm. Cada fermentación (10 L) se incubó de 2 a 3 semanas y una vez concluido el proceso se separó el micelio del medio de cultivo por centrifugación.

Los extractos orgánicos del hongo se hicieron de la manera explicada en el punto 6.8.1.

VII. Resultados

7.1 Hongos aislados.

En la Tabla 3 se muestran los hongos aislados a partir de las plantas recolectadas. Se puede observar que la planta con el mayor número de aislados fue *Metopium brownei*, seguida de *Bursera simaruba*. La planta de la que se obtuvo el menor número de hongos fue *Zuelania guidonia* (2 endófitos).

En el presente trabajo, además de los hongos aislados de las plantas de la colecta mencionada, se incluyeron 2 hongos más, 1 asociado a *M. brownei* (hongo 1) y el otro asociado a *Piper* sp. (hongo 2), los cuales se aislaron y seleccionaron en un estudio previo (Saucedo-García, 2002) por sus propiedades antagonicas.

Tabla 3. Hongos endófitos aislados a partir de las distintas plantas con potencial aleloquímico, más los dos hongos seleccionados en el estudio previo (H1 y H2).

PLANTA	ÓRGANO	CLAVE Y GÉNERO.
<i>Bursera simaruba</i> (Burseraceae)	Hojas	B.1.a Ascomycota
	Flores	B.2.a <i>Alternaria</i> sp. B.2.b ND
	Frutos	B.3.a <i>Cladosporium</i> sp B.3.b. <i>Fusarium</i> sp.
<i>Callicarpa acuminata</i> (Verbenaceae)	Hojas	C.1.a ND C.1.b ND C.1.c ND C.1.e ND
<i>Metopium brownei</i> (Anacardiaceae)	Hojas	M.1.a <i>Fusarium</i> sp. M.1.b <i>Pestalotia</i> sp. M.1.c <i>Gillmaniella</i> sp. M.1.d <i>Alternaria</i> sp. H2 <i>Pestalotia</i> sp.
	Frutos	M.3.a <i>Alternaria</i> sp. M.3.b <i>Alternaria</i> sp. M.3.c <i>Cladosporium</i> sp.
<i>Sebastiania adenophora</i> (Euphorbiaceae)	Hojas	S.1.a ND S.1.b ND S.1.c Ascomycota

<i>Zuelania guidonia</i> (Flacourtiaceae)	Hojas	Z.1.a <i>Cytosporina</i> sp.
	Frutos	Z.2.a ND
<i>Piper</i> sp. (Piperaceae)	Hoja	H1 <i>Fusarium</i> sp.

7.2. Selección del método para los bioensayos de antagonismo.

Antes de realizar los bioensayos de antagonismo entre los hongos endófitos seleccionados, se caracterizó primero su velocidad de crecimiento (lento, medio y rápido) a 25 °C. En la Tabla 4 se muestran las claves de los endófitos seleccionados con su velocidad y categoría de crecimiento.

Tabla 4. Categorías de velocidad de crecimiento de los hongos endófitos.

Hongo	Velocidad de crecimiento (cm/día)	Categoría de crecimiento
B.1.a	0.35	Lento
B.2.a.	0.67	Medio
B.2.b	0.69	Medio
B.3.a.	0.56	Medio
B.3.b	0.71	Medio
C.1.a	0.71	Medio
C.1.b	0.20	Lento
C.1.c	0.30	Lento
C.1.e	0.43	Lento
M.1.a.	0.70	Medio
M.1.b.	0.69	Medio
M.1.c.	0.71	Medio
M.1.d.	1.00	Rápido
H2	0.69	Medio
M.3.a.	0.64	Medio
M.3.b.	0.67	Medio
M.3.c.	0.32	Lento
S.1.a	0.69	Medio
S.1.b	0.70	Medio
S.1.c	0.59	Medio
Z.1.a.	0.69	Medio
Z.2.a	0.66	Medio
H1	0.70	Medio

Los bioensayos de antagonismo entre los hongos endófitos de la Tabla 4 se realizaron enfrentando solamente a dos aislamientos por caja de Petri (Figura 2), por triplicado. De esta manera se pudo observar con más claridad el tipo de interacción que mostraron los distintos hongos endófitos. El porcentaje de inhibición y el índice de antagonismo de los endófitos se calcularon según fórmulas descritas en el inciso 6.6.2.

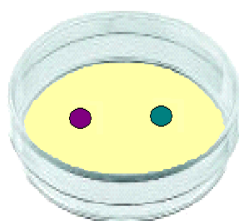


Figura 2. Modelo para los bioensayos de antagonismo entre los hongos endófitos.

7.3. Bioensayos de antagonismo.

7.3.1. Bioensayos entre hongos endófitos.

El análisis de los porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los distintos hongos mostró que existen diferencias significativas ($p = 0.0001$) entre las medianas de los porcentajes de inhibición de los hongos endófitos. Los hongos M.1.c, M.3.c, B.2.b, H2 y M.1.b (Figura 3) fueron los más inhibidos en su crecimiento; la mayoría de estos hongos fueron aislados de *M. brownei* (M.1.b, M.1.c, M.3.c y H2), uno de *B. simaruba* (B.2.b). Por el contrario, los endófitos con los menores porcentajes de inhibición en su crecimiento fueron C.1.b, C.1.c, C1.d, C.1.e y H1, la mayoría de éstos endófitos fueron aislados de *C. acuminata* (C.1.b, C.1.c, C.1.d, C1.e) y uno de *Piper sp* (H1).

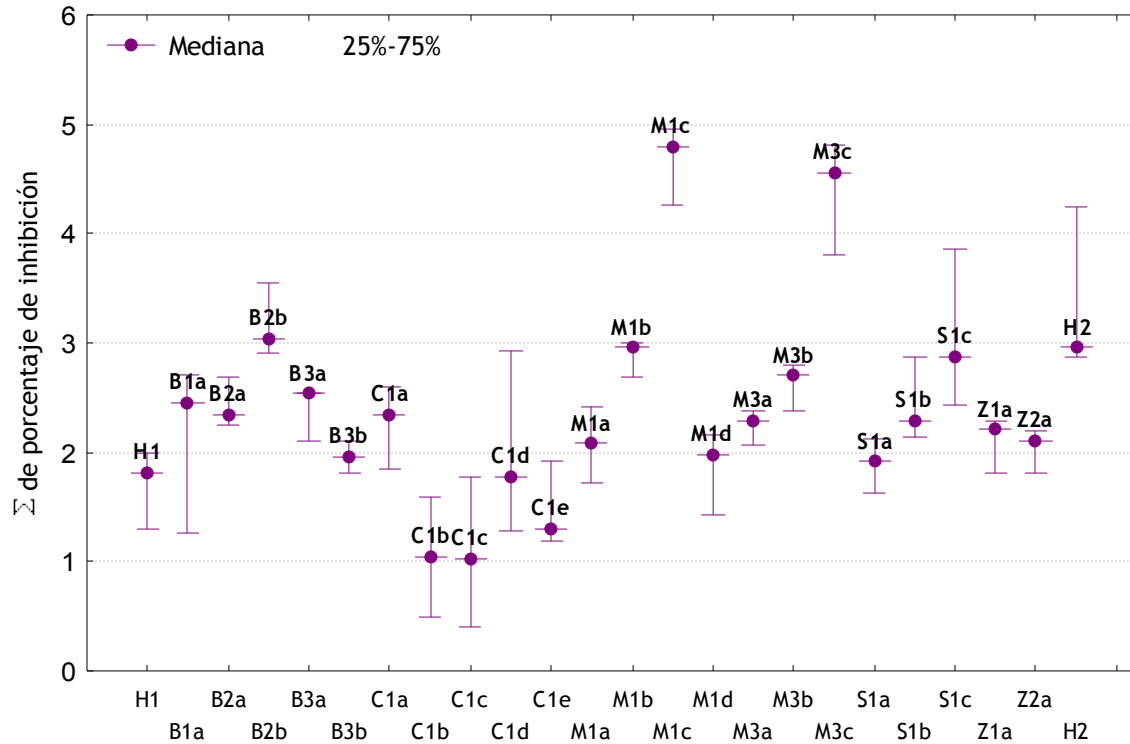


Figura 3. Mediana de la sumatoria de inhibición del crecimiento radial de los hongos endófitos en los bioensayos de antagonismo ($p = 0.0001$).

En el análisis no paramétrico Kuskal-Wallis de los índices de antagonismo se observó que existen diferencias significativas ($p = 0.0005$) entre los índices de antagonismo de los distintos hongos. En la Figura 4 se observa que los hongos que mostraron los mayores índices de antagonismo fueron: C.1.c, C.1.b, C.1.d, C.1.e, B.1.a y C.1.a, la mayoría aislados a partir de hojas de *C. acuminata* y uno aislado de *B. simaruba*. Por otra parte los hongos que mostraron los menores índices de antagonismo fueron M.3.b, M.3.a, M.1.c, Z.2.a y B.2.b; tres de ellos aislados de *M. brownei*, uno de *B. simaruba* y otro de *Z. guidonia*.

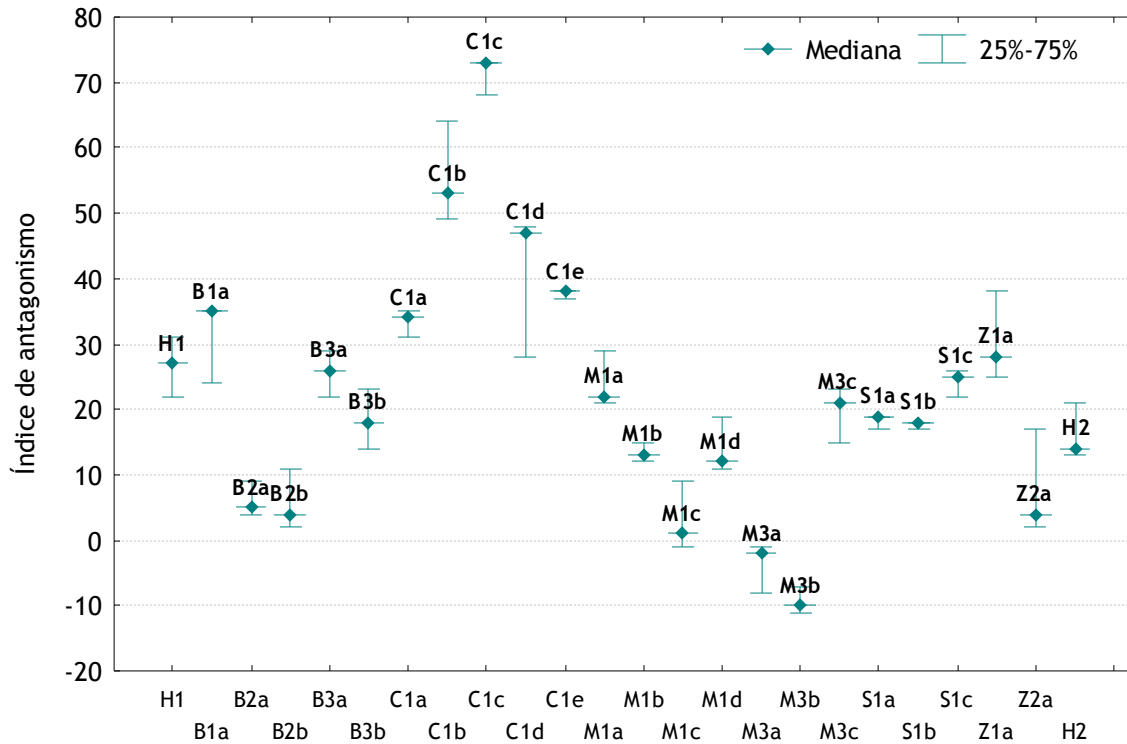


Figura 4. Medianas de índices de antagonismo (IA) de cada aislamiento.

El mayor índice de antagonismo que presentaron los hongos C.1.c, C.1.b, C.1.d y C.1.e coincidió con los menores porcentajes de inhibición en su crecimiento. Por el contrario, los aislamientos M.1.c, B.2.b, H2, M.1.b. y M.3.c que presentaron altos porcentajes de inhibición en su crecimiento, tuvieron índices de antagonismo bajos y medianamente bajos. Con base en estos resultados podemos afirmar que, en general, el índice de antagonismo que presentaron los hongos endófitos es inversamente proporcional a la inhibición de su crecimiento causada por los otros endófitos.

7.3.2. Análisis de los bioensayos de antagonismo por comunidad.

Por otro lado, con el fin de examinar las interacciones entre las distintas “comunidades” de hongos endófitos entre si (considerando como “comunidad” al total de hongos aislados de una misma planta), se analizaron los índices de

antagonismo y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de la comunidad de hongos endófitos de una especie de planta al interactuar con cada una de las otras comunidades de hongos endófitos.

La comunidad de hongos endófitos de *B. simaruba* mostró diferencias significativas en las medianas del porcentaje de inhibición ($p = 0.007$) y el índice de antagonismo ($p = 0.009$). La comunidad de *B. simaruba* mostró bajos porcentajes de inhibición de su crecimiento al interactuar con la comunidad de hongos endófitos de *M. brownei* y al hacerlo con los de su propia comunidad (Figura 5.a). Por el contrario, la mayor inhibición del crecimiento de esta comunidad de *B. simaruba* se presentó al crecer frente a los hongos de *C. acuminata* y *S. adenophora*. En cuanto a los índices de antagonismo (Figura 5.b), la comunidad de hongos endófitos de *B. simaruba* mostró el mayor índice al crecer frente a la comunidad de endófitos de *M. brownei*, mientras que el menor índice de antagonismo lo manifestó frente a los hongos de *C. acuminata*.

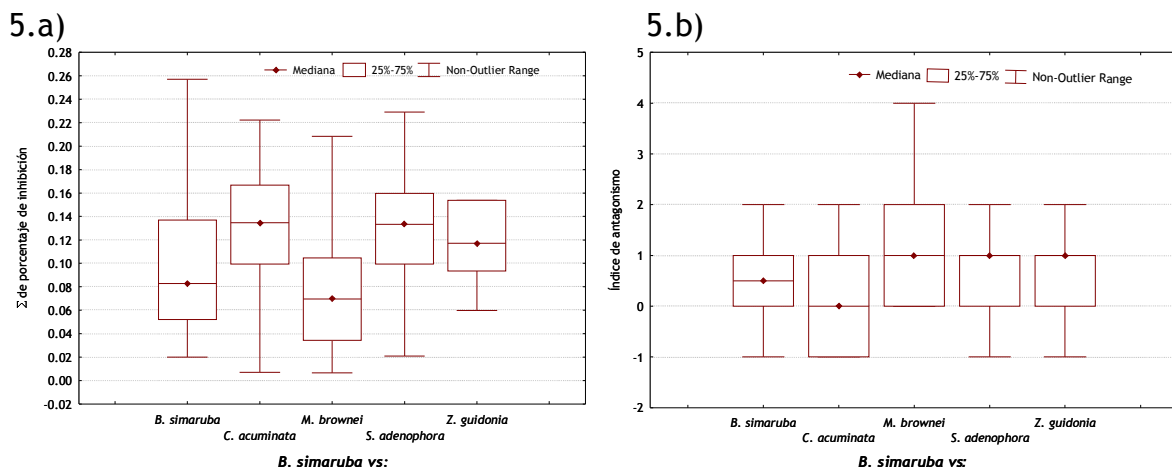
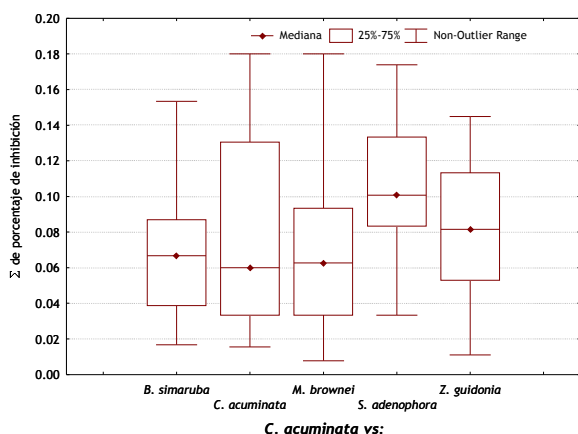


Figura 5 (a y b). Σ del porcentaje de inhibición (a) y el índice de antagonismo (b) de la comunidad de hongos endófitos de *B. simaruba* al crecer frente a las demás comunidades de hongos endófitos.

La comunidad de hongos endófitos de *C. acuminata* no mostró diferencias significativas en las medianas de los porcentajes de inhibición ni de los índices

de antagonismo al interactuar con las comunidades de hongos de las demás plantas (Figura 6.a y 6.b). En los porcentajes de inhibición (Figura 6.a), se aprecia que las relaciones entre su misma comunidad fueron muy variables. Con las demás comunidades, la mayor inhibición de su crecimiento la tuvo al crecer frente a los endófitos de *S. adenophora* y el menor porcentaje de inhibición al crecer frente a la comunidad de *M. brownei* y de *B. simaruba*. Los endófitos de *C. acuminata* mostraron los menores índices de antagonismo (Figura 6.b) al crecer frente a su propia comunidad y presentaron altos índices de antagonismo al interactuar con los endófitos de las demás comunidades.

6.a)



6.b)

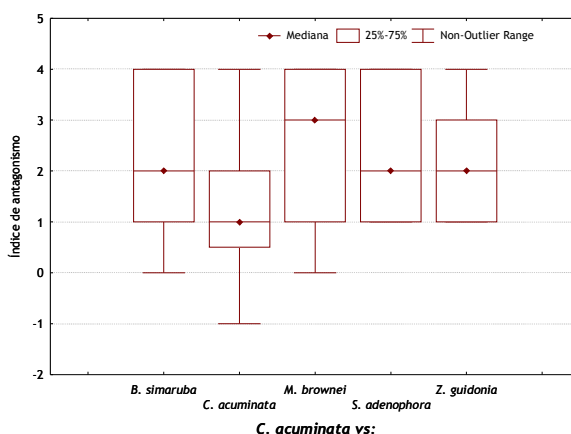
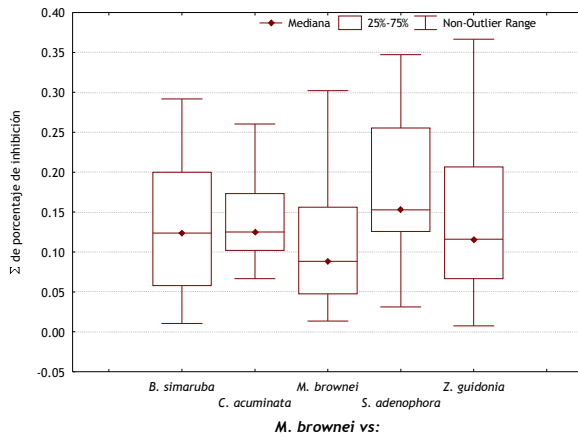


Figura 6 (a y b). Σ del porcentaje de inhibición (a) y el índice de antagonismo (b) de la comunidad de hongos endófitos de *C. acuminata* al crecer frente a las demás comunidades de hongos endófitos.

La comunidad de endófitos de *M. brownei* no mostró diferencias significativas en las medianas de los porcentajes de inhibición ni en los índices de antagonismo al interactuar con las comunidades de hongos de las demás plantas (Figura 7.a y 7.b). De manera general se observa que el menor porcentaje de inhibición de su crecimiento lo mostró al crecer frente a su propia comunidad y, por el contrario, la mayor inhibición la presentó al interactuar con

la comunidad de *S. adenophora*. Los endófitos de *M. brownei* tuvieron bajos índices de antagonismo, mostrando los menores índices de antagonismo frente a la comunidad de *C. acuminata*.

7.a)



7.b)

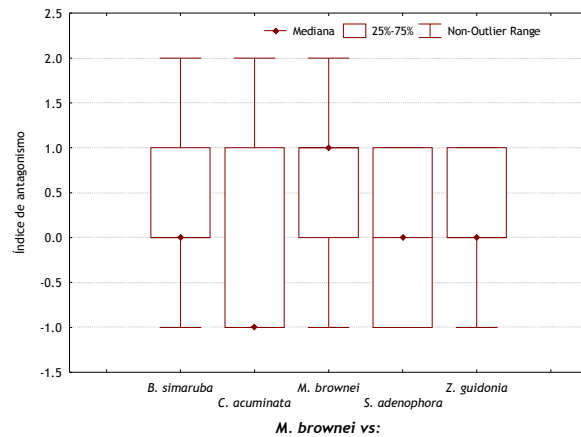


Figura 7 (a y b). Σ del porcentaje de inhibición (a) y el índice de antagonismo (b) de la comunidad de hongos endófitos de *M. brownei* al crecer frente a las demás comunidades de hongos endófitos.

La comunidad de hongos endófitos de *S. adenophora* no mostró diferencias significativas en las medianas del porcentaje de inhibición de su crecimiento al interactuar con las comunidades de hongos de las demás plantas (Figura 8.a). Los endófitos de *S. adenophora* mostraron el menor porcentaje de inhibición de su crecimiento al crecer frente a la comunidad de *M. brownei*; mientras que la mayor inhibición de su crecimiento la mostraron al crecer frente a los endófitos de *C. acuminata*. Por otro lado, la mediana del índice de antagonismo de la comunidad de endófitos de *S. adenophora* resultó significativamente mayor al crecer frente a la comunidad de *M. brownei*, presentando los valores más altos al interactuar con dicha comunidad (Figura 8.b).

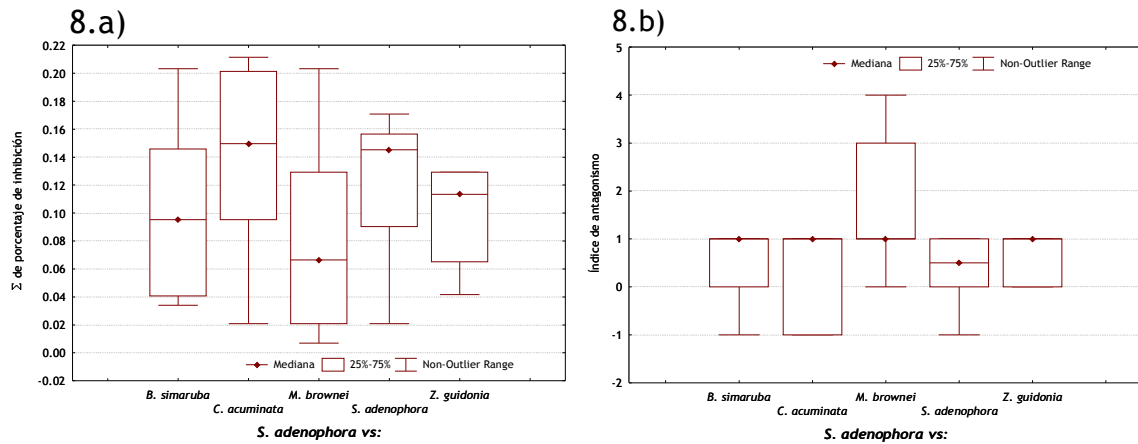


Figura 8 (a y b). Σ del porcentaje de inhibición (a) y el índice de antagonismo (b) de la comunidad de endófitos de *S. adenophora* al crecer frente a las demás comunidades de hongos.

La comunidad de hongos endófitos de *Z. guidonia* no mostró diferencias significativas en las medianas de los porcentajes de inhibición de su micelio ni de los índices de antagonismo, al crecer frente a las demás comunidades de endófitos (Figura 9.a y 9.b). De manera general se observa que el mayor porcentaje de inhibición de su crecimiento lo presentó al crecer frente a los endófitos de *C. acuminata*, y que al crecer frente a todas las comunidades de hongos endófitos mostró bajos índices de antagonismo.

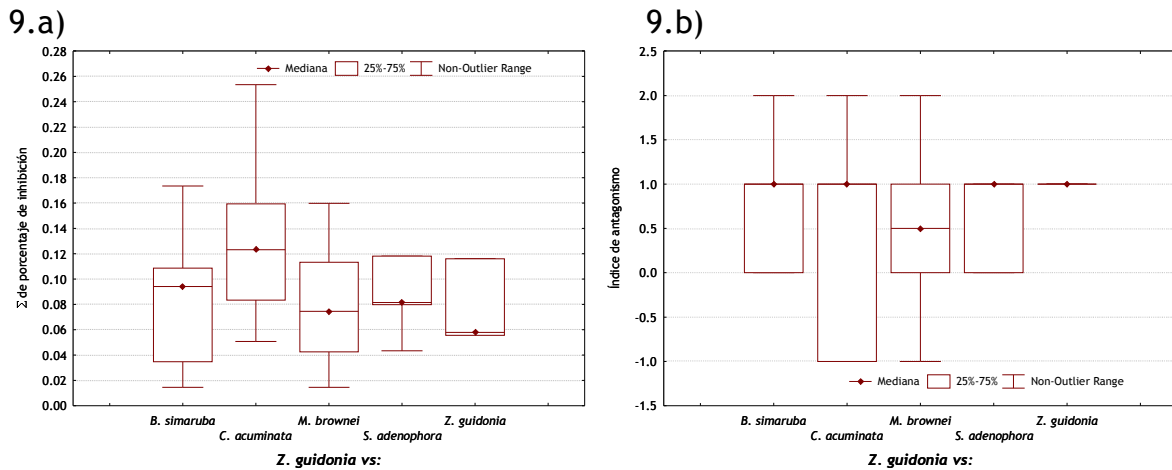


Figura 9 (a y b). Σ del porcentaje de inhibición (a) y el índice de antagonismo (b) de la comunidad de endófitos de *Z. guidonia* al crecer frente a las demás comunidades de hongos.

Los análisis de las comunidades de endófitos mostraron que los porcentajes de inhibición del crecimiento y los índices de antagonismo no fueron significativamente distintos al compararlos entre las comunidades.

De manera general se aprecia que las comunidades de endófitos que más inhibieron el crecimiento de las otras comunidades fueron las de *C. acuminta* y *S. adenophora* y, por el contrario, la comunidad de *M. brownei* fue la que menos inhibió el crecimiento de las demás comunidades. En cuanto al índice de antagonismo se aprecia que la mayoría de las comunidades mostraron bajos índices de antagonismo al interactuar con la comunidad de *C. acuminata*, y por otro lado, mostraron mayores índices de antagonismo al crecer frente a la comunidad de *M. brownei*.

7.3.3. Análisis de correlación.

En estos análisis no se encontró una correlación entre la velocidad de crecimiento de los hongos endófitos y el porcentaje de inhibición del crecimiento de los mismos; en cambio, si hubo una correlación negativa entre la velocidad de crecimiento y el índice de antagonismo con un coeficiente de correlación (r_s) de -0.41 y un coeficiente de determinación (r^2) de 0.17 (Figura 10).

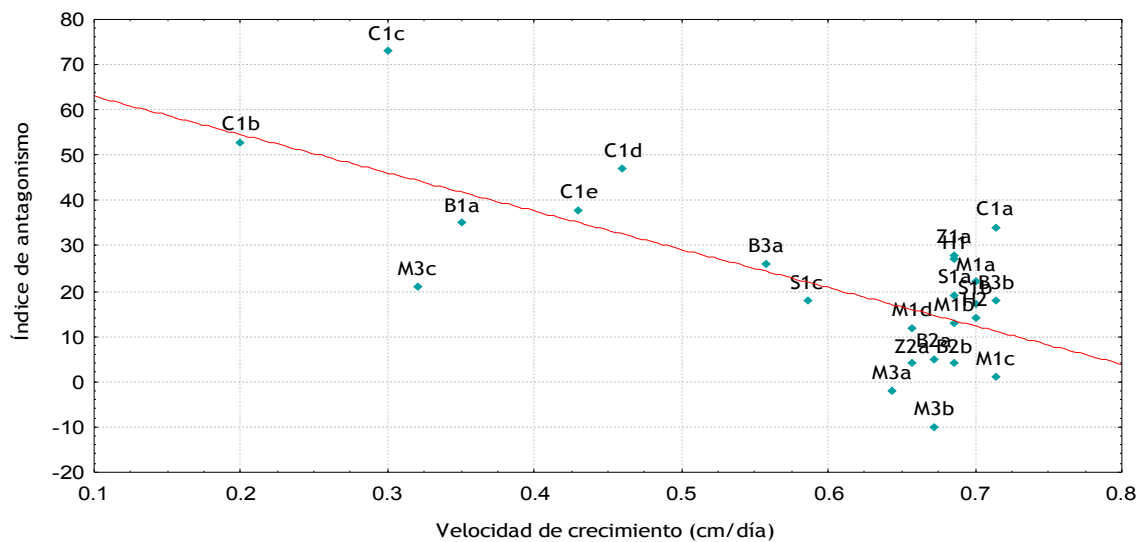


Figura 10. Correlación entre el índice de antagonismo y la velocidad de crecimiento de los hongos endófitos ($p = 0.04$).

En el análisis de correlación entre los porcentajes de inhibición del crecimiento y los índices de antagonismo también hubo una correlación significativa ($p = 0.003$) con un $r_s = -0.58$ y un $r^2 = 0.34$ (Figura 11).

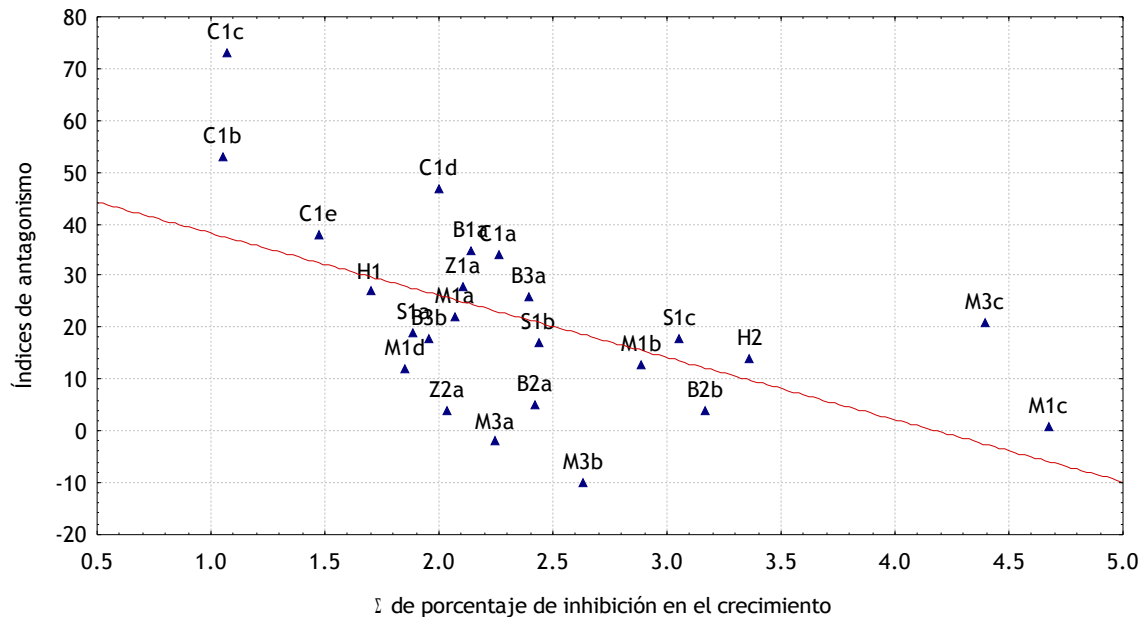


Figura 11. Correlación entre el porcentaje de inhibición del crecimiento y los índices de antagonismo.

7.4. Antagonismo entre los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos.

Se seleccionaron cuatro hongos endófitos: C.1.c, C.1.b, C.1.e y B.1.a., por que mostraron altos índices de antagonismo y bajos porcentajes de inhibición de su crecimiento al interactuar con los demás, con el objeto de probar su potencial de antagonismo contra hongos fitopatógenos.

En el análisis no paramétrico Kuskal-Wallis de los índices de antagonismo se observó que existen diferencias significativas ($p = 0.0018$) entre las medianas de los índices de antagonismo de ambos tipos de hongos. En la Figura 12, se observa que los hongos que mostraron los mayores índices de antagonismo fueron

los endófitos C.1.c, C.1.b y C.1.e. Por otra parte los hongos que mostraron los menores índices de antagonismo fueron los hongos fitopatógenos *Helminthosporium turcicum* (Htur), *Sclerotium rolfsii* (Srol) y *Colletotrichum fragaria* (Cfra).

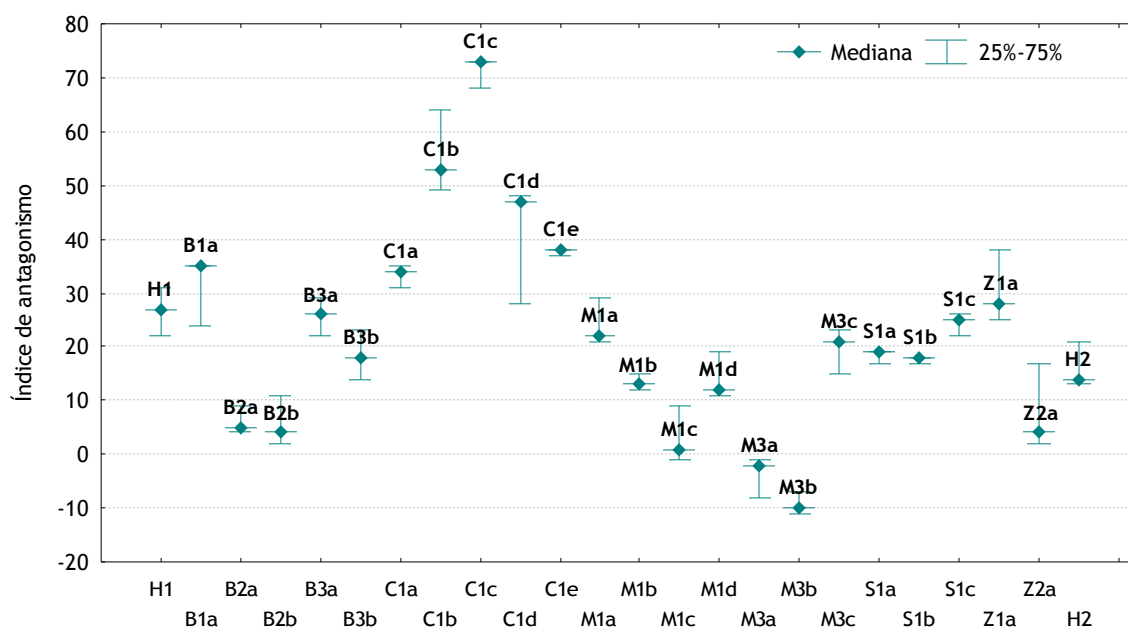


Figura 12. Índices de antagonismo (IA) de los hongos endófitos y fitopatógenos, determinado a partir del tipo de interacción que mostraron en los bioensayos de antagonismo. Cfra= *Colletotrichum fragaria*; Foxy= *Fusarium oxysporum*; Glom= *Glomerella* sp.; Htur= *Helminthosporium turcicum*; Pho= *Phomopsis* sp.; Pcap= *Phytophthora capsici*; Srol= *Sclerotium rolfsii*

El porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos no mostró una diferencia marcada entre el grupo de los endófitos y el de los fitopatógenos, como ocurrió con los índices de antagonismo. El análisis de los porcentajes de inhibición del crecimiento de los dos tipos de hongos, mostró que existen diferencias significativas ($p = 0.0222$) entre las medianas de los porcentajes de inhibición de los hongos. En la Figura 13 se observa que los hongos con la mayor inhibición de su crecimiento fueron el fitopatógenos *H. turcicum* y el endófito

C.1.e, mientras que las inhibiciones del crecimiento de los demás endófitos y fitopatógenos fueron muy similares.

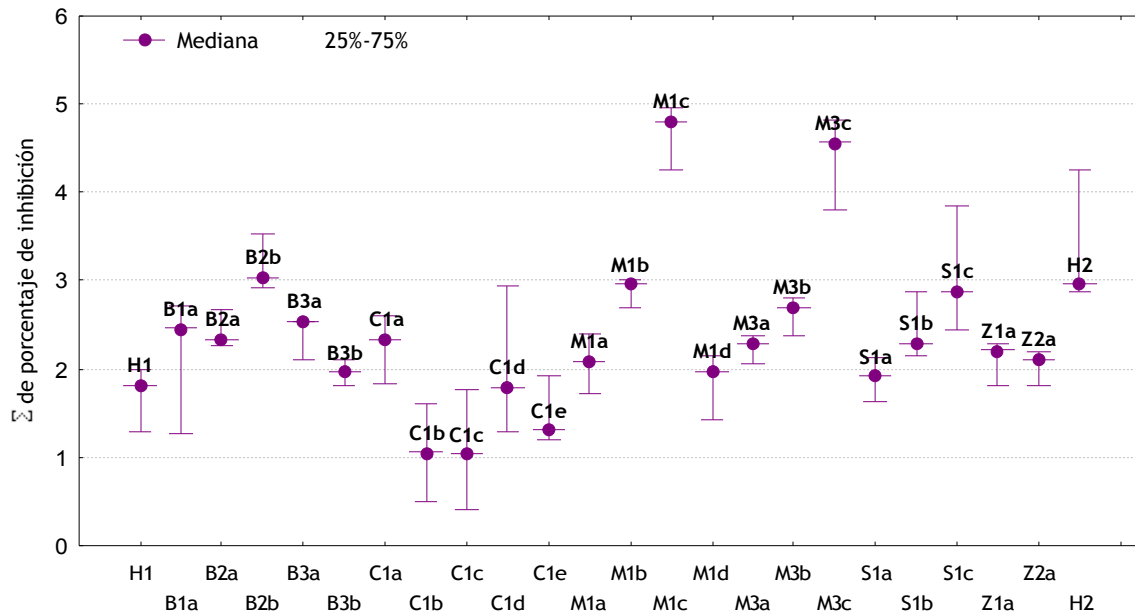


Figura 13. Sumatoria de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógenos al interactuar entre ellos en los bioensayos de antagonismo. (Véanse las claves en la Figura 12).

7.5. Extractos de acetato de etilo de los medios de cultivo CHM y CPD sin hongos.

Para poder realizar las fermentaciones de los hongos a pequeña y mediana escala se decidió utilizar dos medios distintos: el medio de harina de maíz (HM) y el medio de papa dextrosa (PD).

La elección del medio de cultivo se basó en dos aspectos: la velocidad de crecimiento de los hongos en cada medio y la cantidad de extracto orgánico obtenido a partir de los medios de cultivo fermentados sin hongos.

Todos los endófitos crecieron más rápido en el medio APD, en comparación con el AHM, en donde el crecimiento fue lento. En cuanto a las

extracciones orgánicas de los medios de cultivo sin hongos, se obtuvieron 258 mg/L de extracto orgánico del caldo-harina de maíz (CHM), mientras que del caldo-papa-dextrosa (CPD) se obtuvieron sólo 20 mg/L. Por esta razón, se decidió utilizar el medio CPD, ya que en éste los hongos endófitos crecieron mejor y se obtuvieron pocos miligramos de extracto orgánico sin el cultivo de hongos.

7.6. Extractos orgánicos de los 4 hongos endófitos seleccionados.

Las cromatografías en capa delgada de los extractos de CH₂Cl₂ y AcOEt de cada hongo endófito resultaron similares, por lo que se decidió mezclar ambos extractos de cada uno de los hongos endófitos para finalmente tener extractos orgánicos del micelio y del medio de cultivo de cada hongo endófito.

En la Tabla 5 se muestran los rendimientos por cada litro de cultivo de los hongos endófitos.

Tabla 5. Rendimientos por cada litro de cultivo de los distintos hongos endófitos.

Hongos		Extracto (mg)
B.1.a	Extracto micelio	209
	Extracto medio	128
C.1.b	Extracto micelio	91
	Extracto medio	191
C.1.c	Extracto micelio	321
	Extracto medio	169
C.1.e	Extracto micelio	56
	Extracto medio	38

7.7. Efecto biológico de los extractos orgánicos de los hongos endófitos sobre diversos organismos de prueba.

7.7.1. Efectos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos.

En la Tabla 6 se muestra el porcentaje de crecimiento radial, con respecto al control, de los hongos fitopatógenos de prueba expuestos a los extractos orgánicos (250 ppm) tanto del medio de cultivo como del micelio del endófito B.1.a.

Tabla 6. Porcentaje de crecimiento radial, con respecto al control de agua destilada, a los 3 y 6 días, de los hongos fitopatógenos de prueba expuestos al extracto del medio de cultivo y del micelio (250 ppm) del hongo endófito B.1.a.

T	<i>Colletotrichum fragaria</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Phytophthora capsici</i>		<i>Sclerotium rolfsii</i>	
	3 días	6 días	3 días	6 días	3 días	6 días	3 días	6 días
A	100±1.4	100±0	100±2.7	100±0	100±2.1	100±0	100±38.7	100±0
S	100±3.8	100±0	104.6±4	100±0	103.3±1.7	100±0	75.3±13.6	100±0
E1	75.4±1.4*	88.4±1.5*	90.7±1.8*	100±0	101.4±3.3	100±0	72.8±7.6	100±0
E2	77.0±0.9*	90.2±3.3*	89.7±2.3*	100±0	98.9±8.5	100±0	82.1±6.2	100±0

T = tratamientos; A = control agua; S = control disolvente; E1 = extracto medio; E2 = extracto micelio; *= diferencia significativa en el crecimiento con respecto al control agua ($p < 0.05$).

A los 3 días del bioensayo, los extractos del medio de cultivo y del micelio del hongo endófito B.1.a inhibieron significativamente y de manera similar el crecimiento de *C. fragariae* (24.6% E1 y 23% E2) y *F. oxysporum* (9.3% y 10.3% respectivamente). A los 6 días del bioensayo, la inhibición de los extractos disminuyó y sólo fue significativa sobre el crecimiento de *C. fragariae* (11.6% con E1 y 9.8% con E2).

En la Tabla 7 se muestra la respuesta de crecimiento de los hongos fitopatógenos de prueba frente a los extractos orgánicos (250 ppm) del medio de cultivo y micelio del endófito C.1.b.

Tabla 7. Porcentaje de crecimiento radial con respecto al control de agua destilada de los hongos de prueba expuestos al extracto del medio y del micelio (250 ppm) del hongo endófito C.1.b, a los 3 y 6 días del bioensayo.

T	<i>Colletotrichum fragaria</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Phytophthora capsici</i>		<i>Sclerotium rolfsii</i>	
	3 días	6 días	3 días	6 días	3 días	6 días	3 días	6 días
A	100±1.4	100±0	100±2.7	100±0	100±2.1	100±0	100±38.7	100±0
S	100±3.8	100±0	104.6±4	100±0	103.3±1.7	100±0	75.3±13.6	100±0
E1	67.3±1.8*	84.8±3.4*	81.1±3.7*	96.4±3.4	28.4±10*	64.8±8*	54.6±13.5	100±0
E2	60.5±2.4*	75±3.4*	74.4±3.3*	87.6±2.3*	44.1±4.4*	71.8±8.1*	58.9±6.3	100±0

T = tratamientos; A = control agua; S = contro disolvente; E1 = extracto medio; E2 = extracto micelio; *= diferencia significativa en el crecimiento con respecto al control agua ($p < 0.05$).

A los 3 días, ambos extractos del endófito C.1.b inhibieron significativamente el crecimiento de la mayoría de los hongos fitopatógenos de prueba. *C. fragariae* fue inhibida 32.7% por el extracto del medio (E1) y 39.5% por el del micelio (E2). El crecimiento de *F. oxysporum* fue inhibido 18.9% por E1 y 25.6% por E2. Por último, E1 inhibió el crecimiento de *P. capsici* un 71.6% y E2 un 55.9%.

A los 6 días, la inhibición por los extractos del endófito C.1.b sobre los fitopatógenos también disminuyó. El fitopatógeno *P. capsici* fue el más inhibido en su crecimiento con 35.2% por el extracto del medio y 28.2% por el extracto del micelio, seguido por *C. fragariae* el cual fue inhibido 15.2% y 25% respectivamente. El crecimiento de *F. oxysporum* se inhibió 12.4% sólo con el extracto del micelio.

En la siguiente Tabla se presenta el porcentaje de crecimiento de los hongos fitopatógenos de prueba expuestos a los extractos orgánicos (250 ppm) del medio de cultivo y del micelio del hongo endófito C.1.c (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de crecimiento radial con respecto al control de agua destilada de los hongos fitopatógenos de prueba expuestos al extracto del medio y del micelio (250 ppm) del hongo endófito C.1.c, a los 3 y 6 días del bioensayo.

T	<i>Colletotrichum fragaria</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Phytophthora capsici</i>		<i>Sclerotium rolfsii</i>	
	3 días	6 días	3 días	6 días	3 días	6 días	3 días	6 días
A	100±1.4	100±0	100±2.7	100±0	100±2.1	100±0	100±38.9	100±0
S	100±3.8	100±0	104.6±4	100±0	103.3±1.7	100±0	75.3±13.6	100±0
E1	42.6±5.2*	64.0±19.8*	56.4±2.6*	73.8±2.2*	36.1±3.1*	71±4*	125±26.7	100±0
E2	28.4±4.5*	44.1±3.7*	42.5±2.2*	60.6±1.5*	25.8±3.7*	47±8.7*	61.8±35.4	95.4±10.3

T = tratamientos; A = control agua; S = contro disolvente; E1 = extracto medio; E2 = extracto micelio; *= diferencia significativa en el crecimiento con respecto al control agua (p < 0.05).

Los extractos tanto del medio como del micelio del hongo C.1.c inhibieron el crecimiento de *C. fragariae*, *F. oxysporum* y *P. capsici* a los 3 y 6 días de iniciado el bioensayo. A los 3 días, el hongo más inhibido fue *P. capsici* con 63.9% (E1) y 74.2% (E2), seguido de *C. fragariae* con 57.4% (E1) y 71.6% (E2) de inhibición, y de *F. oxysporum* con 43.6% (E1) y 57.5% (E2). El extracto del micelio del endófito C.1.c inhibió 38% a *S. rolfsii*, aunque esta diferencia no fue significativa en el análisis no paramétrico.

Como en los casos anteriores, la inhibición causada por C.1.c disminuyó a los 6 días del bioensayo. *C. fragariae* fue el más inhibido en su crecimiento con 36% (E1) y 55.9% (E2), seguido por *P. capsici* con 29% (E1) y 53% (E2) de inhibición, y finalmente por *F. oxysporum* con 26.2% (E1) y 39.4% (E2). *S. rolfsii* no fue afectado por ninguno de los dos extractos a los 6 días.

En la Tabla 9 se observan los resultados de crecimiento de los hongos fitopatógenos de prueba, con respecto al control de agua destilada, tratados con los extractos orgánicos del hongo endófito C.1.e a 250 ppm.

Tabla 9. Porcentaje de crecimiento radial con respecto al control de agua destilada de los hongos fitopatógenos de prueba expuestos al extracto del medio y del micelio (250 ppm) del endófito C.1.e a los 3 y 6 días del bioensayo.

T	<i>Colletotrichum fragaria</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Phytophthora capsici</i>		<i>Sclerotium rolfsii</i>	
	3 días	6 días	3 días	6 días	3 días	6 días	3 días	6 días
A	100±1.4	100±0	100±2.7	100±0	100±2.1	100±0	100±38.7	100±0
S	100±3.8	100±0	104.6±4	100±0	103.3±1.7	100±0	75.3±3.6	100±0
E1	60.9±3.6*	67.6±3.3*	67.8±3*	87±3*	47.7±1.8*	90.2±1.8	127.2±37	99.4±1
E2	41.2±11*	53.5±6*	55.8±2.3*	70.5±2.5*	42.1±2.1*	72.7±12.5*	98.1±18.5	100±0

T = tratamientos; A = control agua; S = control disolvente; E1 = extracto medio; E2 = extracto micelio; *= diferencia significativa en el crecimiento con respecto al control agua.

A los tres días del bioensayo, el crecimiento de *P. capsici*, el más inhibido, disminuyó 52.3% por efecto de E1 y 57.9% por E2. El crecimiento de *C. fragariae* fue inhibido 39.1% (E1) y 58.8% (E2) y *F. oxysporum* tuvo una inhibición de 32.2% (E1) y 44.2% (E2).

Por otra parte, a los 6 días, el efecto inhibitorio de los extractos disminuyó. *C. fragariae* fue el más inhibido, con 32.4% por efecto de E1 y 46.5% por E2, el de *F. oxysporum*, 13% (E1) y 29.5% (E2), y el de *P. capsici* únicamente fue inhibido por E2 un 27.3%. *S. rolfsii* no fue afectado por ninguno de los extractos.

7.7.2. Evaluación de los efectos de los extractos orgánicos de los distintos hongos endófitos sobre el crecimiento radical de las plantas de prueba.

En la Tabla 10 se muestran los resultados de los bioensayos donde se probaron los efectos de los extractos orgánicos de los hongos endófitos sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba: *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto), *Lycopersicon esculentum* (jitomate) y *Echinochloa crus-galli* (zacate tardo).

Tabla 10. Porcentaje de crecimiento de la raíz, con respecto al control de agua destilada, de *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto), *Lycopersicon esculentum*

(jitomate) y *Echinochloa crus-galli* (zacate tardo) expuestas a los distintos extractos (100 ppm) de los hongos endófitos.

Tratamientos	Amaranto	Zacate tardo	Jitomate
Agua	100±13.76	100±14.77	100±25.59
Disolvente	101.97±7.01	93.22±19.56	87.69±20.29
B.1.a medio	40.76±8.39*	83.25±17.47	54.29±55.89
B.1.a micelio	53.61±15.02*	71.77±20.33	82.03±33.32
C.1.b medio	46.37±13.62*	77.68±9.23	43.18±2.27*
C.1.b micelio	25.91±3.33*	41.15±5.99*	24.20±9.91*
C.1.c medio	72.68±8.84*	80.12±3.63	53.68±4.16*
C.1.c micelio	48.93±13.54*	66.79±14.54	48.33±8.18*
C.1.e medio	42.86±5.38*	53.86±13.43*	45.59±15.68*
C.1.e micelio	54.29±12.73*	65.98±2.44	55.85±16.67*

*= diferencia significativa en el crecimiento con respecto al control agua ($p < 0.05$).

En general, las especies más inhibidas fueron el amaranto y el jitomate, aunque cada una de las tres plantas respondió de manera distinta a los tratamientos. El extracto que más inhibió el crecimiento radical del amaranto fue el extracto del micelio del endófito C.1.b (74.1%), seguido por el extracto del medio de B.1.a (59.2%), el extracto del medio de C.1.e (57.1%), el extracto del medio de C.1.b (53.6%) y el extracto del micelio de C.1.c (51.1%).

La respuesta de crecimiento de la raíz del jitomate presentó altas variancias, por lo que se hicieron análisis no paramétricos para determinar diferencias entre los distintos tratamientos. La mayor inhibición del crecimiento de la raíz del jitomate fue causada por el extracto del micelio del hongo C.1.b (75.8%), seguida por la de los extractos del medio de C.1.b (56.8%), la del medio de C.1.e. (54.4%), y las del micelio y medio de C.1.c (51.7% y 46.3% respectivamente).

Por otra parte, el crecimiento radical del zacate tardo solo fue inhibido significativamente por el extracto del micelio del hongo C.1.b (58.9%) y por el del medio de C.1.e (46.1%).

7.8. Selección de un hongo endófito para su cultivo a mediana escala y su extracción orgánica.

Considerando los resultados de los todos los bioensayos de antagonismo, los de los hongos endófitos entre si, y los de los endófitos vs los hongos fitopatógenos, además de los resultados de la actividad biológica de los extractos sobre el crecimiento de los organismos de prueba, se seleccionó el hongo endófito C.1.c. Este hongo presentó los mayores índices de antagonismo, inhibiendo en alto grado el crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógenos durante los bioensayos de antagonismo; de igual modo, sus extractos orgánicos tuvieron la mayor actividad biológica sobre los distintos organismos de prueba. Es importante resaltar que este hongo se aisló de las hojas de *Callicarpa acuminata* pero aun falta identificarlo taxonómicamente ya que hasta la fecha no se ha logrado que forme estructuras reproductivas, a pesar de que se han utilizado varias técnicas para dicho fin.

El hongo C.1.c se fermentó a mediana escala en la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

A partir de la extracción orgánica de 30 L de cultivo de éste hongo, se obtuvieron 21.83 g de extracto del micelio y 1.81 g del extracto del medio.

Con los extractos orgánicos del hongo C.1.c. se realizará, en un posterior estudio, un fraccionamiento biodirigido con el fin de aislar y caracterizar los compuestos químicos responsables de la actividad biológica sobre los distintos organismos de prueba.

VIII. Discusión

En el presente trabajo se utilizó un individuo de cada especie de planta estudiada con el fin de aislar los hongos endófitos de las mismas. El plan de trabajo consistió en llevar a cabo un estudio de tipo exploratorio a partir del cual hemos obtenido resultados que abren nuevos campos de investigación y permiten la sugerencia de hipótesis para estudios posteriores.

Las plantas a partir de las cuales se aislaron los hongos endófitos, fueron seleccionadas porque en estudios previos mostraron un potencial aleloquímico con actividades biológicas relevantes, entre las más importantes, la inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos de importancia económica (Anaya *et al.*, 2003a).

En la búsqueda bibliográfica relacionada con el tema, no se encontraron reportes de hongos endófitos aislados a partir de estas especies de plantas, por lo que este trabajo constituye el primero que describe a los hongos endófitos que viven dentro de los tejidos de estas plantas de Quintana Roo y, por lo tanto, es una importante contribución al conocimiento de la diversidad de estos organismos y de las relaciones que establecen con las especies de plantas tropicales dentro de las cuales viven.

Para el aislamiento de hongos endófitos se ha reportado una gran diversidad de técnicas (Schulz *et al.*, 1993), lo que podría representar un problema al tratar de comparar listas de especies de hongos endófitos aislados por distintos métodos, pues dada la diferencia entre éstos, los resultados no podrían ser comparables (Arnold *et al.*, 2003). Para el presente estudio se eligió la técnica propuesta por Rodrigues (1994), por ser la más apropiada, dadas las pocas condiciones asépticas que se tenían en el campo.

La mayoría de los hongos aislados no se lograron determinar taxonómicamente. En la micología básica, la identificación de los hongos se basa

principalmente en la morfología y en la formación de estructuras reproductoras y de esporas de tipo asexual para hongos anamorfos, y sexual para los hongos teleomorfos. Otras técnicas, como son la producción de ciertos metabolitos secundarios y la comparación de las secuencias de ácidos nucleicos, también se utilizan para la identificación, principalmente de aquellos hongos que no se reproducen en condiciones de laboratorio, aunque estas técnicas suelen ser largas y caras, y algunas resultan poco prácticas para la identificación (Moore-Landeker, 1996). En el caso de los cultivos de hongos endófitos es común que los hongos no produzcan esporas *in vitro*, aun cuando se trate de inducir la esporulación por métodos diversos (Stone *et al.*, 2004). En el presente trabajo, muchos endófitos aislados no formaron estructuras reproductoras por lo que su identificación no ha sido posible aun.

Los géneros de hongos que se lograron determinar son cosmopolitas (*Alternaria*, *Cladosporium* y *Fusarium*) y se han reportado prácticamente en todos los ambientes, incluso como endófitos de una gran variedad de plantas (Saikkonen *et al.*, 1998 y Dos Santos *et al.*, 2003). Estos hongos no se consideran endófitos en un sentido estricto, pues varios de ellos, bajo cualquier cambio ambiental o fisiológico de la planta, pueden transformarse en patógenos y/o saprobios (Stone *et al.*, 2004).

Todas las especies de plantas muestreadas son especies sub-caducifolias, es decir que pierden muchas de sus hojas anualmente, lo que de cierta manera pudiera explicar los pocos hongos endófitos encontrados. Por otro lado, si la dispersión y colonización de los hongos endófitos en las plantas se favorece por la lluvia (Elamo *et al.*, 1999), lo cual determina un mosaico de endófitos a lo largo del tiempo, se debe considerar que la colecta del material vegetal del presente trabajo se hizo en época de secas cuando, probablemente, la variedad de hongos podría ser baja; pero ninguna de estas suposiciones se puede afirmar de manera definitiva.

Los hongos endófitos aislados se cultivaron a distintas temperaturas (25 y 30°C) para determinar cuál de ellas era la óptima para su crecimiento. Alexopoulos y colaboradores (1996) reportaron que dentro de este intervalo, en general, ocurre un buen crecimiento de los hongos. Además, como la colecta se hizo en época de secas con una temperatura ambiental superior a los 30°C, se decidió hacer la prueba a esta temperatura para determinar la óptima de crecimiento en los bioensayos de antagonismo; sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que todos los hongos aislados presentaron un mayor crecimiento a 25°C, temperatura a la cual se realizaron los bioensayos.

En relación a la enorme variedad de las relaciones que los hongos endófitos pudieran establecer entre ellos en condiciones naturales, la experiencia mostrada hasta la fecha en distintos estudios demuestra que existen múltiples dificultades para investigarlas con las técnicas hasta ahora desarrolladas. Al realizar pruebas de competencia o antagonismo *in vitro*, podría no reflejarse la verdadera relación que existe entre los hongos en el medio natural en el que habitan (Iakovlev y Stenlid, 2000). A pesar de ello, los estudios que se hacen en el laboratorio son importantes, siempre y cuando se aclare que los resultados pudieran no ser los mismos que en la naturaleza, aunque se ha demostrado que algunos de ellos coinciden (Shearer, 1995).

El método de evaluación con únicamente dos hongos por caja de Petri, ha sido ampliamente reportado debido a su sencillez y a la claridad de los resultados (Shearer, 1995, Yuen *et al.*, 1999; Iakovlev y Stenlid, 2000). Los parámetros que se determinaron en los bioensayos de antagonismo fueron el porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos al crecer frente a los demás y los índices de antagonismo.

El que un hongo posea un alto índice de antagonismo, puede indicar una habilidad para competir y dominar sobre otros hongos; por el contrario, si tiene un bajo índice de antagonismo, estaría mostrando que inhibe poco el crecimiento de las otras especies de hongos en ese ambiente en particular (Yuen

et al., 1999). Por otra parte, si un hongo es poco inhibido durante los bioensayos frente a otros hongos, puede ser prueba de que es un buen competidor en ese ambiente particular. Los resultados de los índices de antagonismo y los porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos obtenidos en el presente estudio, no indican que los hongos con los mayores índices de antagonismo y los menores porcentajes de inhibición de su crecimiento sean “mejores” competidores que los hongos con bajos índices de antagonismo y altos porcentajes de inhibición de su crecimiento en las condiciones en las que se realizó el experimento. Los bioensayos de antagonismo fueron pruebas *in vitro* realizadas en cajas de Petri con APD, lo que representa un ambiente totalmente distinto al natural, donde habitan los hongos endófitos y, por lo tanto, no es posible extrapolar los resultados obtenidos en estos bioensayos a la realidad que ocurre dentro de las plantas hospederas.

En los bioensayos *in vitro* se determinaron los índices de antagonismo y los porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos endófitos, para seleccionar, a partir de un conjunto de ellos, a los más antagónicos y, posteriormente, poder hacer estudios de prospección con base en los resultados.

Aunque no sabemos si los hongos aislados de las plantas estudiadas interactúan entre ellos en el medio natural, podemos esperar que los hongos de una misma comunidad (aquellos que viven dentro de los tejidos de una misma especie vegetal) pudieran mostrar mayores índices de antagonismo y mayores porcentajes de inhibición de su crecimiento al convivir entre ellos que al crecer frente a hongos endófitos de otras comunidades, pues son hongos que en determinado momento compiten entre si al desarrollarse en los tejidos de su planta hospedera. En los análisis estadísticos realizados a los resultados de las pruebas por comunidades de endófitos, no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición del crecimiento, ni entre los índices de antagonismo de las distintas comunidades. Con base en estos resultados no podemos aceptar la hipótesis planteada, ya que no se observó una

mayor o menor competencia entre las distintas comunidades. Sin embargo, pudimos observar que el crecimiento de la mayoría de las comunidades se inhibió al interactuar con los hongos de *C. acuminata* y *S. adenophora*, pero se afectó poco o nada al crecer frente a la comunidad de *M. brownei*. A su vez, la mayoría de las comunidades de hongos endófitos mostraron un mayor índice de antagonismo al crecer frente a la comunidad de *M. brownei* y bajos índices de antagonismo al crecer frente a *C. acuminata*. Las pruebas de antagonismo mostraron que los endófitos de *C. acuminata* tuvieron una alta habilidad competitiva y de dominancia sobre las comunidades aisladas de las otras plantas en los bioensayos *in vitro*. Por el contrario, la comunidad de hongos endófitos de *M. brownei* fue la que menos inhibió el crecimiento de la mayoría de los otros endófitos y, al mismo tiempo, fue la comunidad que presentó los menores índices de antagonismo.

Si consideramos la velocidad de crecimiento de los endófitos aislados de *C. acuminata* y *M. brownei*, encontramos que la comunidad de este último presentó una velocidad de crecimiento media y rápida, en cambio los hongos endófitos de *C. acuminata* la presentaron lenta (Tabla 4). En otros estudios se ha reportado que los hongos que presentan una velocidad lenta en su crecimiento son más antagónicos que los hongos con un crecimiento de tipo medio y rápido (Yuen *et al.*, 1999).

Para evaluar la hipótesis de que los hongos endófitos de crecimiento lento presentaban mayores índices de antagonismo y menores porcentajes de inhibición de su crecimiento que aquellos de crecimiento medio y rápido, se hicieron los análisis de correlación de Spearman entre el porcentaje de inhibición del crecimiento y el índice de antagonismo, con la velocidad del crecimiento. En estos análisis no se observó una correlación entre la velocidad de crecimiento y los porcentajes de inhibición del mismo. Por el contrario, se encontró una correlación negativa ($r_s = -0.41$) entre la velocidad de crecimiento y los índices de antagonismo, lo que indicaría que, aproximadamente, tendríamos

una probabilidad de 17 % de pronosticar el índice de antagonismo conociendo la velocidad de crecimiento de un hongo. Sin embargo, estos resultados no nos permiten aceptar la hipótesis planteada, pues la velocidad de crecimiento *per se* no explica los resultados del índice de antagonismo ni de los porcentajes de inhibición del crecimiento.

En aquellos análisis donde se observó una mayor correlación, fue al comparar el porcentaje de inhibición del crecimiento con el índice de antagonismo ($r_s = -0.58$). De esta manera, un hongo con un índice de antagonismo alto mostrará un bajo porcentaje de inhibición de su crecimiento al interactuar con otros hongos y, por el contrario, un hongo con un índice de antagonismo bajo presentará altos porcentajes de inhibición de su crecimiento.

Los resultados de los bioensayos de antagonismo permitieron seleccionar a los cuatro hongos endófitos con altos índices de antagonismo y bajos porcentajes de inhibición de su crecimiento. Los endófitos elegidos fueron C.1.c, C.1.b, C.1.e, aislados de hojas de *C. acuminata*, y B.1.a aislado de hojas de *B. simaruba*. Todos estos endófitos presentaron una velocidad de crecimiento lento.

Con estos cuatro hongos endófitos se hicieron bioensayos de antagonismo pero esta vez contra hongos fitopatógenos (Tabla 2). Se decidió hacer este tipo de bioensayos con el fin de seleccionar a los hongos endófitos que pudieran inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos de cultivos de importancia económica. Los hongos fitopatógenos utilizados en los bioensayos se aislaron a partir de varios cultivos de importancia agrícola enfermos (Tabla 2). Los resultados de estos bioensayos, mostraron que, *in vitro*, los hongos endófitos tuvieron mayores habilidades competitivas o fueron más antagónicos que los fitopatógenos, lo que no indica necesariamente que los hongos endófitos sean mejores competidores que los fitopatógenos. Los endófitos presentaron un crecimiento de tipo lento mientras que los fitopatógenos un crecimiento de tipo medio y, como se mencionó, los hongos de crecimiento lento suelen ser más

antagónicos, probablemente porque producen metabolitos bioactivos más tóxicos que podrían inhibir el crecimiento de otros organismos que habitan en el mismo sustrato.

Para determinar si el antagonismo entre los hongos es causado por los metabolitos secundarios, se compararon los resultados de los bioensayos de antagonismo con los resultados de las pruebas de evaluación biológica de los extractos orgánicos de los hongos endófitos sobre los hongos fitopatógenos. En los bioensayos de antagonismo, el crecimiento de *S. rolfsii* casi no fue inhibido por ningún hongo endófito, y del mismo modo, ningún extracto de los hongos endófitos inhibió su crecimiento a los 6 días del ensayo, lo que demuestra que es un hongo muy resistente. El endófito C.1.c mostró los mayores índices de antagonismo y causó las mayores inhibiciones sobre el crecimiento de la mayoría de los hongos fitopatógenos; además, sus extractos orgánicos fueron justamente los que inhibieron significativamente el crecimiento de los hongos fitopatógenos de prueba. Por otra parte, el endófito C.1.b mostró mayor especificidad en los bioensayos de antagonismo que el C.1.c, pues tuvo altos índices de antagonismo frente a *P. capsici*, y sus extractos causaron una considerable inhibición en el crecimiento de este fitopatógeno, en cambio, casi no inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* en las pruebas de antagonismo, ni sus extractos orgánicos afectaron a éste. Lo anterior acepta la hipótesis planteada y se sugiere que los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos están desempeñando un papel trascendente en el potencial antagónico de los hongos.

Los resultados de los bioensayos de antagonismo y de las pruebas de actividad biológica con los extractos orgánicos, confirman que los estudios sobre las relaciones entre los hongos pueden ser de gran interés para el conocimiento de las interacciones bióticas y la ecología de los mismos y para el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad biológica (Gloer, 1996). Así, empleando métodos más sencillos y económicos, y que además, implican menor inversión de

tiempo, como son los bioensayos de antagonismo, se pueden llegar a resultados muy cercanos a los que podrían obtenerse con las pruebas químicas.

Los estudios de Schulz y colaboradores (1999, 2002) han revelado que los hongos endófitos pueden producir compuestos que son tóxicos para sus mismas plantas hospederas, por los que se decidió evaluar si los hongos endófitos son capaces de sintetizar compuestos fitotóxicos sobre el crecimiento de la raíz de plantas de prueba. Esto se hizo para evaluar únicamente el potencial fitotóxico de los extractos y no para determinar el tipo de interacción que pudiera establecer el endófito con su planta hospedera. A través de los resultados se observó que la mayoría de los extractos orgánicos de los endófitos tienen una significativa actividad fitotóxica, lo que reconoce la hipótesis planteada. La actividad fitotóxica de los hongos endófitos pudiera estar relacionada con la capacidad de los mismos para penetrar, colonizar, establecerse y permanecer en los tejidos internos de sus plantas hospederas.

Los estudios como el presente, considerando la actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos orgánicos de los hongos endófitos, son muy importantes y prometedores dadas las necesidades de controlar las numerosas plagas y enfermedades en las plantas de importancia agrícola.

Con base en los resultados de las pruebas de bioactividad y de los bioensayos de antagonismo, se seleccionó al hongo endófito C.1.c para la siguiente etapa de la investigación. Como se pudo observar a lo largo del presente trabajo, este hongo mostró altos índices de antagonismo y bajos porcentajes de inhibición de su crecimiento al interactuar con los demás hongos en los bioensayos de antagonismo. Además, durante la extracción orgánica tuvo un buen rendimiento y sus extractos orgánicos tuvieron una fuerte actividad inhibitoria sobre los hongos fitopatógenos y las plantas de prueba.

El hongo endófito C.1.c cumple con los aspectos fundamentales preliminares de los procesos biotecnológicos (Bu'lock, 1991): 1) fue seleccionado a partir de un gran conjunto de endófitos; 2) a partir de su fermentación a

mediana escala, se obtuvo un buen rendimiento del extracto orgánico del medio en el que se cultivó y de su micelio, y 3) sus extractos orgánicos inhibieron significativamente el crecimiento de los hongos y plantas de prueba.

El presente estudio representa sólo la primera etapa de una serie de investigaciones cuyas metas son muy amplias; entre ellas: 1) conocer las relaciones que las plantas, particularmente aquellas con potencial alelopático, de las selvas secas de Quintana Roo, establecen con sus hongos endófitos; 2) aislar y caracterizar los aleloquímicos más importantes producidos por los hongos endófitos que pueden ser parte de los mecanismos químicos de defensa de los mismos; 3) investigar el papel ecológico que los aleloquímicos desempeñan en el equilibrio que los hongos endófitos mantienen con sus plantas hospederas; 4) buscar metabolitos bioactivos novedosos que pudieran ser precursores de productos de origen natural con actividad biológica sobre algunas plagas, lo que crearía más y mejores alternativas para el desarrollo de nuevos agroquímicos (incluso fármacos) que tengan menor impacto sobre el ambiente, e inclusive, que presenten mecanismos de acción fisiológica novedosos. Estos estudios también son importantes porque no son búsquedas aleatorias de compuestos químicos con actividad biológica, sino que están basados en la ecología y biología de las especies, y son un complemento muy valioso para el conocimiento tanto de algunas interacciones bióticas como de la biodiversidad.

IX. Conclusiones

- ⌘ En el presente estudio, las cinco especies de plantas con potencial alelopático muestreadas, poseen hongos endófitos; de estas plantas se pudieron aislar, con la metodología empleada, 21 hongos endófitos.
- ⌘ Los análisis de las relaciones entre las comunidades de hongos endófitos de las cinco especies de plantas revelaron que no existía una diferencia significativa en las relaciones entre comunidades. Sin embargo, la comunidad de hongos endófitos de *Callicarpa acuminata* mostró los mayores índices de antagonismo y los menores porcentajes de inhibición de su crecimiento. Por el contrario, la comunidad de endófitos de *Metopium brownei* presentó los menores índices de antagonismo y los mayores porcentajes de inhibición de su crecimiento.
- ⌘ No hubo correlación entre la velocidad de crecimiento de los hongos endófitos y el porcentaje de inhibición de su crecimiento; por el contrario, hubo una correlación negativa entre la velocidad de crecimiento de los endófitos y su índice de antagonismo; y también entre el índice de antagonismo y el porcentaje de inhibición del crecimiento de los endófitos al interactuar con los demás.
- ⌘ En los bioensayos de antagonismo realizados con los cuatro hongos endófitos más antagónicos (B.1.a, C.1.b, C.1.c y C.1.e) frente a los hongos fitopatógenos, se observó que los endófitos tuvieron mayores índices de antagonismo; a su vez, la velocidad de crecimiento de los endófitos fue más lenta que la de los fitopatógenos.
- ⌘ Los resultados de los bioensayos de antagonismo entre los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos concuerdan, en general, con los resultados de la actividad biológica presentada por los extractos orgánicos de los endófitos sobre los mismos hongos fitopatógenos.

- ⌘ Los extractos orgánicos de los hongos endófitos tuvieron mayor o menor bioactividad sobre los hongos fitopatógenos y las plantas de prueba, mostrando tanto actividad fungistática como fitotóxica.
- ⌘ El hongo seleccionado para la futura etapa de investigación fue el endófito C.1.c, aislado a partir de las hojas de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae), pues mostró los mayores índices de antagonismo y el menor porcentaje de inhibición de su crecimiento durante los bioensayos entre los endófitos y los fitopatógenos; además, su extracto orgánico fue el que tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre hongos y plantas de prueba.
- ⌘ El presente estudio constituye una importante contribución al conocimiento de la biodiversidad de hongos endófitos de las plantas de la selva y los acahuales de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo, además de mostrar que los estudios sobre la ecología química de los hongos endófitos son de gran importancia para el conocimiento de los mismos, de las interacciones biológicas que establecen y en la búsqueda de novedosos compuestos con actividad biológica y posible utilidad en el control de algunas plagas y enfermedades.

X. Literatura citada

Agrios, G.N. 1997. *Plant Pathology*. 4ª edición. Academic Press. Estados Unidos de América. 635p.

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W y M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*. 4ª edición. John Wiley and Sons, Inc. Estados Unidos de América. 869p.

Anaya, A.L. 2003. *Ecología química*. Plaza y Valdés Editores. México. 349p.

Anaya, A.L.; Cruz-Ortega, R.; Macias-Rubalcava, M.; Jiménez, M.; Hernández-Bautista, B.E. y A. Saucedo-García. 2004. Estudio Fitoquímico de *Zuelania guidonia*. XXXIX Congreso Mexicano de Química. 3-7 Octubre 2004. Mérida, Yucatán.

Anaya, A.L.; Mata, R.; Rivero-Cruz, F.; Hernández-Bautista, B.E.; Chávez-Velasco, D. y A. Gómez-Pompa. 1999. Allelochemical potential of *Metopium brownei* (Jacq) Urban (Anacardiaceae). *Journal of Chemical Ecology*. 25: 141: 156.

Anaya, A.L.; Mata, R.; Sims, J.J.; González-Coloma, A.; Cruz-Ortega, R.; Guadaño, A.; Hernández-Bautista, B.E.; Midland, S.L.; Ríos, G. y A. Gómez-Pompa. 2003a. Allelochemical potential of *Callicarpa acuminata*. *Journal of Chemical Ecology*. 29: 2761-2775.

- Anaya, A.L.; Torres-Barragán, A.; Hernández-Bautista, B.E.; Cruz-Ortega, R.; Saucedo-García, A.; Flores-Carmona, C. y A. Gómez-Pompa. 2003b. Bioprospection studies at El Eden: From plants to fungi. En: Gómez-Pompa, A.; Allen, M.F.; Fedick, S.L. y J.J. Jiménez-Osornio (editores). *The Lowland Maya Area: Three millennia at the human-wildland interface*. Food Products Press, The Haworth Press, Inc. Nueva York. Pp. 447-460.
- Arnold, A.E y E.A. Herre. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*. 95: 388-398.
- Arnold, A.E.; Maynard, Z. y G.S. Gilbert. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research*. 105: 1502-1507.
- Arnold, A.E.; Maynard, Z.; Gilbert, G.S.; Coley, P.D. y T.A. Kursar. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. *Ecology Letters*. 3: 267-274.
- Arnold, A.E.; Mejia L.C.; Kylo, D.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Robbins, N. y E.A. Herre. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*. 100:15649-15654.
- Bennett, J.W. 1995. From molecular genetics and secondary metabolism to molecular metabolites and secondary genetics. *Canadian Journal of Botany*. 73: S917-S924.
- Björn, B.H. y R. Müller. 2003. Possibility of bacterial recruitment of plant genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites. *Plant Physiology*. 132:1153-1161.

- Blodgett, J.T.; Swart, W.J.; Louwn, S.V. y W.J. Weeks. 2000. Species composition of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* leaves, petioles, stems, and roots. *Mycologia*. 92: 853-859.
- Bu'lock, J.D., 1991. Introducción a la biotecnología básica. En Bu'lock J.D. y K. Bjorn (editores). *Biotecnología básica*. Acribia S.A. España. Pp. 3-10.
- Cabrera, C.E.; Sousa, M. y O. Téllez. 1982. *Imágenes de la Flora Quintanarroense*. Centro de Investigaciones de Quintana Roo, A.C. México. 224pp.
- Cannon, P.F. y C.M. Simmons. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia*. 94: 210-220.
- Cao, L.X.; You J.L. y S.N. Zhou. 2002. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in south China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 169-171.
- Carroll, G. 1995. Forest endophytes: pattern and process. *Canadian Journal of Botany*. 73: S1316-S1324.
- Clay, K. 1991. Endophytes as antagonists of plant pests. En Andrews, J.H. y S.S. Hirano (editores). *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag. Nueva Cork. Pp. 331-357.
- Clay, K. y C. Schardl. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*. 160: 99-127.

- Corrado, A. y K. Rodrigues. 2004. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *J. Basic Microbiol.* 44: 157-160.
- Daniel W.W. 2002. *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud.* 4ª edición. Limusa Wiley. México. 755p.
- Dawson-Saunders, B y R.G. Trapo. 1997. *Bioestadística médica.* 2ª edición. El Manual Moderno S.A. de C.V. México. 403p.
- Deacon, J.W. 1997. *Modern mycology.* Blackwell Science. Gran Bretaña.
- Dingle J. y P. A. Mcgee. 2003. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. *Mycological Research.* 107: 310-316.
- Dos Santos, R.M. y E. Rodrigues-Filho. 2003. Structures of Meroterpenes produced by *Penicillium* sp, an endophytic fungus found associated with *Melia azedarach.* *Brazilian Journal of Chemical Society.* 14: 722-727.
- Dos Santos, R.M.; Rodrigues-Fo, E.; Rocha, W.C. y M.F. Simas Teixeira. 2003. Endophytic fungi from *Melia azedarach.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 19: 767-770.
- Elamo P.; Helander, M.L.; Saloniemi, I. y S. Neuvonen. 1999. Birch family and environmental conditions affect endophytic fungi in leaves. *Oecologia.* 118:151-156.

- Espinosa-García, F.J. y G. Delgado. 1998. Relationship between ecology of plant defense and the prospection of secondary metabolites with potential medicinal or agricultural application. *Rev. Latinoamer. Quim.* 26: 13-29.
- Espinosa-García, F.J. y J.H. Langenheim. 1990. The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population - diversity and spatial patterns. *New Phytologist.* 116: 89-97.
- Espinosa-García, F.J.; Saldívar-García, P. y J. Langenheim. 1993. Dose-dependent effects *in vitro* of essential oils on the growth of two endophytic fungi in coastal redwood leaves. *Biochemical Systematics and Ecology.* 21:185-194.
- Espinosa-García, F., Rollinger, J., y J. Langenheim. 1996. Coastal redwood leaf endophytes: their occurrence, interactions and response to host volatile terpenoids. En Redlin, S.C y L.M. Carris (editores). *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematic, ecology and evolution.* The American Phytopathological Society Press. Estados Unidos de América. Pp. 101-120.
- Faeth, S.H. 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualist?. *Oikos*, 98: 25-36.
- Faeth, S.H y W.F. Fagan. 2002. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and comparative biology.* 42:360-368.
- Faeth, S.H. y K.E. Hammon. 1996. Fungal endophytes and phytochemistry of oak foliage determinants of ovoposition preference of leafminers?. *Oecologia*, 108: 728-736.
- Fröhlich, J. y K.D Hyde. 1999. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic?. *Biodiversity and Conservation.* 8: 977-1004.

- Gamboa, M.; Laureano, S. y P. Bayman. 2002. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter?. *Mycopathologia*, 156: 41-45.
- Ganley, R.J.; Brunsfeld, S.J. y G. Newcombe. 2004. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *PNAS*. 101: 10107-10112.
- Gloer, J. B. 1995. The chemistry of fungal antagonism and defense. *Canadian Journal of Botany*, 73: S1265-S1274.
- Gloer, J. B. 1996. New antifungal and antiinsectian natural products from fungi: an ecology-based approach. *Revista Latinoamericana de Química*. 24: 191-208.
- Gloer, J.B. 1997. Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. 1997. En Wicklow y Söderström (editores) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag. Berlin. Pp 249-268.
- Gómez-Pompa A. 1998. La vegetación en la zona Maya. En Schmidt, P., de la Garza M., y E. Nalda (editores). *Los Mayas*. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes/Instituto Nacional de Antropología e Historia. México. Pp 39-51.
- Harborne, J.B. 1993. *Introduction to ecological biochemistry*. Academic Press. Londres.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity; magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*, 95: 641-655.
- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 105: 1422-1432.

- Helander, M.L.; Neuvonen, S. y H. Ranta. 1996. Natural variation and effects of anthropogenic environmental changes on endophytic fungi in trees. En Redlin, S.C y L.M. Carris (editores). *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology and evolution*. The American Phytopathological Society Press. Estados Unidos de América. Pp. 197-207.
- Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z., y W. Su. 2001. Antitumoral and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 21: 163-167.
- Iakovlev, A. y J. Stenlind. 2000. Spatiotemporal patterns of laccase activity in interacting mycelia of wood-decaying basidiomycete fungi. *Microbial Ecology*. 39: 236-245.
- Ibarra-Manríquez, G., Villaseñor, J.L. y R. Durán. 1995. Riqueza de especies y endemismo del componente arbóreo de la Península de Yucatán, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 57: 49-77.
- Knight V.; Sanglier, J-J.; Di Tullio, D.; Braccili, S.; Bonner, P.; Waters, J.; Hughes, D. y L. Zhang. 2003. Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62:446-458.
- Kursar, T.A.; Capson, T.L.; Coley, P.D.; Corley, D.G.; Gupta, M.B.; Harrison, L.A.; Ortega-Barría, E. y D. Windsor. 1999. Ecologically guided bioprospecting in Panama. *Pharmaceutical Biology*. 37: 114-126.

- Lappalainen J.H.; Koricheva, J.; Helander, M.L. y E. Haukioja. 1999. Densities of endophytic fungi and performance of leafminers (Lepidoptera: Eriocraniidae) on birch along a pollution gradient. *Environmental Pollution* 104: 99-105.
- Liu, C.H.; Zou, W.X.; Lu, H. y R. X. Tan. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*, 88: 277-282.
- Lodge, D.J. 1997. Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. *Biodiversity and Conservation* 6: 681-688.
- Macías-Rubalcava, M.; Hernández-Bautista, B.E.; Jiménez-Estrada, M. y A.L. Anaya. 2005. Allelochemicals with selective phytotoxicity from *Sebastiania adenophora* (Euphorbiaceae). En prensa.
- Martínez, M. 1979. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de la Cultura Económica. México. 1220p.
- May, R. M. 1991. A fondness for fungi. *Nature* 352: 475-476.
- Moore-Landecker, E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. 4ª edición. Prentice Hall. Estados Unidos de América. 574p.
- Neville J. y J. Webster. 1995. *Fungal ecology*. Chapman and Hall. Gran Bretaña.

- Peláez, F., Collado, J., Arenal, F., Basilio, A., Cabello, A., Déz-Matas, M.T., García J.B., González Del Val, A., González, V., Gorrochategui, J., Hernández P., Martín, I., Platas, G. y F. Vicente. 1998. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Mycological Research*. 102: 755-761.
- Pennington, T.D. y J. Sarukhán. 1968. *Árboles tropicales de México: manual para la identificación de las principales especies*. 2ª edición. Instituto de Ecología, UNAM y Fondo de la Cultura Económica. México. 521p.
- Peraza-Sánchez, S.R., Salazar-Aguilar, N.E. y L.M. Peña-Rodríguez. 1995. A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*. 58: 271-274.
- Peters, S.; Draeger, S.; Aust, A-J. y B. Schulz. 1998. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. *Mycologia*. 90: 360-367.
- Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. En Fokkema N,J. y J. van den Hueval (editores). *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press. Inglaterra. Pp. 175-187.
- Petrini, O. 1996. Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi. En Redlin S.C. y L.M. Carris (editores). *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematic, ecology and evolution*. The American Phytopathological Society Press. Estados Unidos de América. Pp. 87-99.
- Photita, W.; Lumyong, S.; Lumyong, P. y K.D. Hyde. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research*. 105: 1508-1513.

- Redman, R. S.; Dunigan, D. D. y R. J. Rodríguez. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?. *The New Phytologist*. 151: 705-716.
- Rivero-Cruz, J.F.; Chavez, D.; Hernandez-Bautista, B.E.; Anaya, A.L. y R. Mata. 1997. Separation and characterization of *Metopium brownei* urushiol components. *Phytochemistry*. 45:1003-1008.
- Rodríguez, K.F. 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*. 86: 376-385.
- Rossmann, A.Y. 1994. Strategy for an all-taxa inventory for fungal biodiversity. *Bull. Bot. Inst. Acad. Sinica*. 14: 169-194.
- Rossmann, A.Y. 1997. Biodiversity of tropical microfungi. En Hyde, K. (editor). *Biodiversity of tropical microfungi*. Hong Kong University Press. Hong Kong. Pp 1-10.
- Saikkonen, K.; Faeth, S.H.; Helander, M. y T.J. Sullivan. 1998. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 29: 319-343.
- Saucedo-García, A. 2002. Relación entre el potencial antagónico y el potencial aleloquímico de algunos hongos asociados a plantas de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis Licenciatura.

- Schulthess, M. F. y S. F. Faeth. 1998. Distribution, abundances, and associations of the endophytic fungal community of Arizona fescue (*Festuca arizonica*). *Mycologia*. 90: 569-578.
- Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Römmert, A-K. y K. Krohn. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*. 106: 996-1004.
- Schulz, B.; Guske, S.; Damman, U. y C. Boyle. 1998. Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis*. 25: 213-227.
- Schulz, B.; Römmert, A-K.; Dammann, U.; Aust, H-J. y D. Strack. 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. *Mycological Research*. 103:1275-1283.
- Schulz, B.; Wanke, U.; Draeger, S. y H.-L. Aust. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 97: 1447-1450.
- Selosse, M.A. y F. Le Tacon. 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership?. *TREE*. 13: 15-20.
- Shearer, C.A. 1995. Fungal competition. *Canadian Journal of Botany*. 73: S1259-S1264.
- Stone, J. K.; Polishook, J. D y White, J.F. 2004. Endophytic fungi. En Mueller, G.M., Bills G.F. y M.S. Foster (editores). *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press. China. Pp. 241-270.

- Strobel, G.A., Dirkse, E., Sears J. y C. Markworth. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodora alba* a novel endophytic fungus. *Microbiology*. 147: 2943-2950.
- Strobel, G.A. y W.M Hess. 1997. Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity. *Chemistry and Biology*. 4: 529-536.
- Strobel G.A.; Torczynski, R. y A. Bollon. 1997. *Acremonium* sp. - a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science*. 128: 97-108.
- Tan, R.X y W.X. Zou. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Products Reports*, 18: 448-459.
- Ulloa, M y R. Hanlin. 1978. *Atlas de Micología Básica*. Editorial Concepto S.A. México. 158p.
- Viret, O. y O. Petrini. 1994. Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonia errabunda*). *Mycological Research*. 98: 423-432.
- Widden, P. 1997. Competition and the fungal community. En Wicklow D. y B. Sönderström (editors). *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlang. Alemania. Pp. 135-147.
- Wilson, D. 1993. Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind. *Oikos*. 68: 379-384.

- Wilson, D. 1995. Endophyte -the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73: 274-276.
- Wilson D. 2000. Ecology of woody plant endophytes. En Bacon, C.W. y J.F. White (editores). *Microbial endophytes*. M. Dekker. Nueva York. 389-421 pp.
- Wilson D. y G. C. Carroll. 1997. Avoidance of high-endophyte space by gall-forming insects. *Ecology*. 78: 2153-2163.
- Yao, J. y G.A. Strobel. 2001. Jesyterone and hydroxyl-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry*. 57: 261-265.
- Yue Q.; Miller, C. J.; White, J.F. y M.D. Richardson. 2000. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epicloë festucae*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 4687-4692.
- Yuen. T.K.; Hyde, K.D. e I.J. Hodgkiss. 1999. Interespecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microbial Ecology*. 37: 257-262.✿