



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**POTENCIAL ALELOPÁTICO DE EXTRACTOS DEL
MICELIO Y MEDIO DE CULTIVO DE UN HONGO
ENDÓFITO AISLADO DE *LONCHOCARPUS CASTILLOI*
(FABACEAE).**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

ROSA ELVIRA SÁNCHEZ FERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA
VOCAL: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ
SECRETARIO: DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA
1er. SUPLENTE: DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO
2° SUPLENTE: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG

**LABORATORIO DE ALELOPATÍA,
INSTITUTO DE ECOLOGÍA,
UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. ANA LUISA ANAYA LANG

SUSTENTANTE:

ROSA ELVIRA SÁNCHEZ FERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente trabajo a través de los proyectos 81017 (responsable, Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava) e IN230107 (responsable, Dra. Ana Luisa Anaya Lang), respectivamente.

Al Sistema Nacional de Investigadores (SEP-CONACyT), por el nombramiento de ayudante de Investigador de la Dra. Ana Luisa Anaya Lang, a quien agradezco el apoyo económico que me proporcionó.

A la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por haberme guiado en la realización de este trabajo, por su gran apoyo, amistad y comprensión.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang, por el apoyo otorgado durante mi estancia en el Laboratorio de Alelopatía y por los comentarios y sugerencias realizadas durante la revisión de este trabajo.

Agradezco especialmente a la Q.A. Blanca Estela Hernández Bautista, por su gran apoyo, sobre todo en la realización de bioensayos, su paciencia y amistad.

A la M. en C. Aurora Saucedo García, por su ayuda en la caracterización taxonómica, por sus aportaciones a la tesis, por su paciencia y amistad.

A la Biól. Carmen Loyola Blanco del Instituto de Biología UNAM, por las magníficas fotografías de los hongos en cultivos puros y en condiciones de antagonismo.

Al los Drs. Norma Angélica Macías Ruvalcaba y Manuel Jiménez Estrada de la Facultad de Química y del Instituto de Química UNAM, respectivamente, por su valiosa colaboración.

A la M. en C. Georgina Duarte de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química UNAM, por su colaboración en el análisis por CG-EM.

A Jordi Murià y Claudio Meléndez, por su apoyo, amistad y por los momentos divertidos que pasamos.

A mis compañeras de laboratorio: Verónica Hernández, Carmen Flores y Teresa Romero, por ayudarme con el análisis estadístico y por su amistad.

A Tesesa Caudillo, Paulette, Leticia y a los demás compañeros del Laboratorio de Alelopatía, y a mis amigos de la Facultad de Química, por su apoyo y amistad.

Agradezco a mi familia, por el apoyo otorgado durante toda la licenciatura.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis papás, Esperanza y Arturo, que me apoyaron incondicionalmente durante la licenciatura y que no dudaron de mi en ningún momento.

A Ernesto y Alina por su apoyo. A mis hermanos Celina y Arturo.

A mis tíos: Elvira, Memo, Humberto y Beti por su apoyo y consejos.

A mi amiga Pati por su apoyo y amistad en todo momento.

A mis amigos de la licenciatura tanto de primer semestre como a los que fui conociendo a lo largo de los semestres, en especial a: Ana Lilia, Karla, Lalo y Claudio.

Índice

	Página
Lista de Cuadros	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Gráficas	xi
Lista de Abreviaturas	xii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
1. Alelopatía	3
2. Los hongos endófitos	4
3. Competencia entre hongos	6
4. Metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos	6
5. El género <i>Fusarium</i>	7
5.1 <i>Fusarium</i> como endófito	8
6. <i>Lonchocarpus castilloi</i>	17
III. Hipótesis	18
IV. Objetivos	19
1. Objetivo general	19
2. Objetivos particulares	19
V. Materiales y Métodos	21
1. Material fúngico	21
2. Caracterización macroscópica y microscópica del hongo endófito LD1	21
3. Bioensayos de antagonismo	23
3.1 Análisis microscópicos de las hifas en la zona de interacción antagónica	25
4. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento del endófito LD1	25
4.1. Obtención de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio	26
5. Determinación del potencial antifúngico	26
6. Determinación del potencial fitotóxico	27
7. Cultivos en mediana escala del endófito LD1	28

	Página
8. Estudio químico	28
8.1. Métodos cromatográficos generales	28
8.2. Fraccionamiento químico biodirigido	29
8.2.1. Fraccionamiento primario de la parte líquida	29
8.2.2. Fraccionamiento secundario de la fracción 4 (40-70)	29
8.2.3. Fraccionamiento primario de la parte sólida	30
9. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	30
VI. Resultados y Discusión	33
1. Caracterización macroscópica y microscópica del hongo endófito LD1	33
2. Bioensayos de antagonismo directo	35
2.1. Antagonismo competitivo entre el hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y diferentes hongos endófitos	37
2.2. Antagonismo competitivo entre el hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y diferentes microorganismos fitopatógenos	42
2.3. Análisis microscópicos de las hifas en las zonas de interacción antagónica	49
3. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y evaluación del potencial aleloquímico de sus extractos orgánicos	51
4. Cultivo en mediana escala	58
5. Fraccionamiento químico biodirigido	61
5.1. Fraccionamiento primario de la parte líquida	61
5.2. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria 4 (40-70)	62
5.3. Fraccionamiento primario de la parte sólida	63
6. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos del micelio y fracciones cromatográficas utilizando CG-EM	63
VII. Conclusiones	78
VIII. Perspectivas	81
IX. Referencias	82

Lista de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de diversas especies del género <i>Fusarium</i> con actividad biológica.	10
Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo utilizados en la caracterización taxonómica y en la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento del hongo endófito LD1.	22
Cuadro 3. Tipo de interacciones entre microorganismos y valores numéricos asignados (modificado de Yuen <i>et al.</i> , 1999).	25
Cuadro 4. Fraccionamiento primario de la fase líquida del extracto del micelio del hongo LD1.	31
Cuadro 5. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria 4.	31
Cuadro 6. Fraccionamiento primario de la fase sólida del extracto del micelio del hongo LD1.	32
Cuadro 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento de los microorganismos competidores en los bioensayos de antagonismo con el hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. (LD1).	48
Cuadro 8. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> sp. (LD1) en bioensayos de antagonismo con diferentes microorganismos competidores.	48
Cuadro 9. Tipo de interacción antagónica entre <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y los microorganismos competidores en los bioensayos de antagonismo y valores numéricos asignados (modificado de Yuen <i>et al.</i> , 1999).	50
Cuadro 10. Comparación de los rendimientos obtenidos de los extractos orgánicos del hongo <i>Fusarium</i> sp. (LD1) de los cultivos en pequeña escala bajo condiciones de agitación.	53
Cuadro 11. Comparación de los rendimientos obtenidos de los extractos orgánicos del hongo <i>Fusarium</i> sp. (LD1) de los cultivos en pequeña escala bajo condiciones estáticas.	53
Cuadro 12. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos a 250 ppm de los cultivos en condiciones de agitación.	54
Cuadro 13. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos a 250 ppm de los cultivos en condiciones estáticas.	55

	Página
Cuadro 14. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos a 100 ppm de los cultivos en condiciones de agitación.	57
Cuadro 15. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos a 100 ppm de los cultivos en condiciones estáticas.	57
Cuadro 16. Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los cultivos en mediana escala.	58
Cuadro 17. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos a 250 ppm de los cultivos en mediana escala.	60
Cuadro 18. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos a 100 ppm de los cultivos en mediana escala.	60
Cuadro 19. Efecto antifúngico de las fracciones primarias a 250 ppm del micelio en CPD.	61
Cuadro 20. Porcentajes de estimulación del crecimiento radical de las fracciones primarias a 100 ppm sobre las semillas de prueba.	62
Cuadro 21. Metabolitos secundarios presentes en la fase líquida del extracto del micelio de <i>Fusarium</i> sp. (LD1) en CPD.	67
Cuadro 22. Metabolitos secundarios presentes en la fase sólida del extracto del micelio de <i>Fusarium</i> sp. (LD1) en CPD.	68
Cuadro 23. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 4 (fase líquida) del extracto del micelio de <i>Fusarium</i> sp. (LD1) en CPD.	68
Cuadro 24. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 6 (fase líquida) del extracto del micelio de <i>Fusarium</i> sp. (LD1) en CPD.	69
Cuadro 25. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 7 (fase líquida) del extracto del micelio de <i>Fusarium</i> sp. (LD1) en CPD.	70
Cuadro 26. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 8 (fase líquida) del extracto del micelio de <i>Fusarium</i> sp. (LD1) en CPD.	70
Cuadro 27. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 9 (fase líquida) del extracto del micelio de <i>Fusarium</i> sp. (LD1) en CPD.	71
Cuadro 28. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 10 (fase líquida) del extracto del micelio de <i>Fusarium</i> sp. (LD1) en CPD.	72
Cuadro 29. Metabolitos secundarios presentes en la fracción secundaria 4-I (fase líquida) del extracto del micelio de <i>Fusarium</i> sp. (LD1) en CPD.	73

Lista de Figuras

Página

Figura 1. Bioensayo de antagonismo en caja Petri entre el hongo endófito LD1 y diferentes microorganismos competidores; a y b representan los radios de cada microorganismo, ZI: zona de interacción.	24
Figura 2. <i>Fusarium</i> sp. (Aislamiento LD1) en PDA. A. A los 6 días. B. 10 días. C. 13 días. D. 22 días.	34
Figura 3. Diversas estructuras de <i>Fusarium</i> sp.(LD1). A. Macroconidia en CLA teñida con rojo congo. B. Macroconidia en AA teñida con azul de lactofenol. C. Corte de un esporoquio en AA teñido con rojo congo. D. Macroconidias en AA teñidas con rojo congo. E. Microconidias teñidas con rojo congo: conidiogénesis enteroblástica. F. Microconidia con un septo. G. Microconidias en cadena. H. Microconidia con un septo y sin septo, monofiálide. I. Microconidias en cadena, hifas verrugosas. J. Monofiálides teñidas con rojo congo, conidióforo bifurcado y trifurcado. K. Conidióforo bifurcado con monofiálides, teñido con rojo congo. L. Clamidosporas en cadena, en PDA teñidas con rojo congo 100x.	36
Figura 4. Bioensayo de antagonismo entre los hongos endófitos <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>Phoma medicaginis</i> sembrados al mismo tiempo. A. Antagonismo a los 22 días. B. Antagonismo a los 26 días.	37
Figura 5. Bioensayo de antagonismo entre <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>Phoma medicaginis</i> sembrada 9 días después que <i>Fusarium</i> sp. A. Antagonismo a los 13 días. B. Antagonismo a los 17 días.	38
Figura 6. Bioensayo de antagonismo entre los hongos endófitos <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>Xylaria</i> sp. sembrados al mismo tiempo. A. Antagonismo a los 22 días. B. Antagonismo a los 26 días. C. Antagonismo a los 78 días.	39
Figura 7. Bioensayo de antagonismo entre <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>Xylaria</i> sp. sembrada 9 días después que <i>Fusarium</i> sp. (LD1) A. Antagonismo a los 13 días. B. Antagonismo a los 17 días. C. Antagonismo a los 69 días.	40
Figura 8. A. Bioensayo de antagonismo entre <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>Guignardia mangiferae</i> a los 13 días de interacción. B. Antagonismo a los 17 días.	41

Figura 9. A. Bioensayo de antagonismo entre <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>Phomopsis</i> sp. a los 6 días de interacción antagonica. B. Antagonismo a los 35 días.	41
Figura 10. Interacción antagonica entre <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>G. mangiferae</i> . A. Control de crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. B. Interacción antagonica: <i>Fusarium</i> sp. (flecha azul) y <i>G. mangiferae</i> (flecha roja). C. Control de crecimiento de <i>G. mangiferae</i> . Observaciones a 100x, teñidas con rojo congo.	42
Figura 11. A. Bioensayo de antagonismo entre <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>Alternaria solani</i> a los 6 días de interacción antagonica. B. Antagonismo a los 35 días.	43
Figura 12. A. Bioensayo de antagonismo entre <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>F. oxysporum</i> a los 6 días de interacción. B. Antagonismo a los 35 días.	44
Figura 13. A. Bioensayo de antagonismo entre <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>Rhizoctonia</i> sp. a los 6 días de interacción antagonica. B. Antagonismo a los 10 días. C. Antagonismo a los 22 días.	45
Figura 14. A. Bioensayo de antagonismo entre <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>P. capsici</i> a los 6 días de interacción antagonica. B. Antagonismo a los 10 días. C. Antagonismo a los 22 días.	46
Figura 15. A. Bioensayo de antagonismo entre <i>Fusarium</i> sp. (hongo endófito LD1; aislado de <i>L. castilloi</i>) y <i>Fusarium</i> sp. (hongo fitopatogeno aislado de <i>C. acuminata</i>) a los 6 días de interacción antagonica. B. Antagonismo a los 35 días.	47
Figura 16. A. Bioensayo de antagonismo entre <i>Fusarium</i> sp. (LD1) y <i>Pestalotiopsis</i> sp. a los 13 días de interacción antagonica. B. Antagonismo a los 17 días.	
Figura 17. Cromatografía en capa fina comparativa de los extractos del medio de cultivo y micelio del endófito <i>Fusarium</i> sp. (LD1), utilizando como medios de cultivo: Sabouraud, V8 y CPD. Sistema de elución: CH ₂ Cl ₂ -MeOH 95:5, revelador H ₂ SO ₄ al 10%.	59

Lista de Gráficas

Página

Gráfica 1. Crecimiento del hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) en cultivos en PDA (crecimiento en cm² vs tiempo en días)

34

Lista de abreviaturas

AA	Agar avena
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
CaCO ₃	Carbonato de calcio
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
CH ₃ OH	Metanol
CI ₈₀	Concentración inhibitoria 80
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CLA	Agar hoja de clavel
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
CPD	Caldo papa dextrosa
CP	Caldo papa
°C	Grados Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fx	Fracción
g	Gramos
hrs	Horas
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Hex	Hexano
L	Litro
m	Metro
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
mm	Milímetros
mm ²	Milímetro cuadrado
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	Nanómetro
PDA	Agar papa-dextrosa
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
R.T.	Tiempo de retención
s	Segundo
Sab	Medio Sabouraud
SNA	Spezieller Nährstoffarmer agar
TOF	Tiempo de vuelo
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación
V8	Medio de jugo de ocho verduras

I. Introducción

Las investigaciones químicas y biológicas conducidas sobre diversas plantas y microorganismos han permitido poner en evidencia que estos organismos constituyen una fuente distintiva y extremadamente rica de productos naturales con actividad biológica.

Los productos naturales aislados a partir de plantas y microorganismos representan un valor agregado de estos organismos y de los distintos ecosistemas en los que habitan. La búsqueda, la caracterización y la descripción de estos compuestos son importantes tanto para la prospección, como para entender las relaciones ecológicas complejas que se establecen entre plantas y otros organismos dentro de una comunidad o ecosistema y en las que juegan un papel fundamental los metabolitos secundarios o aleloquímicos (Duke y Abbas, 1995; Gloer, 1995; Evidente y Motta, 2001; Schulz *et al.*, 2002; Guanatilaka, 2005).

Un grupo de organismos que constituye un campo prometedor para el descubrimiento de productos naturales con bioactividad sobre diversos organismos, es el que forman los hongos endófitos. Estos hongos endófitos están representados por una amplia variedad de especies de micromicetos (hongos microscópicos) que colonizan los tejidos de su planta hospedera sin causar síntomas aparentes de enfermedad, desarrollando con ésta una relación de comensalismo o mutualismo. Los hongos endófitos encuentran un hábitat y alimento dentro de su hospedera y, a cambio, gracias a los metabolitos secundarios que producen, algunos de ellos disminuyen la probabilidad de que ésta sea atacada por microorganismos patógenos e incrementan sus defensas químicas contra competidores y factores adversos del ambiente. Asimismo, los endófitos son capaces de alterar la fisiología, la morfología y los aleloquímicos que produce su planta hospedera; por todo ello, son considerados también como parte de los mecanismos de defensa de la misma (Bacon y White, 2000; Tan y Zou, 2001; Arnold *et al.*, 2003; Strobel *et al.*, 2004; Stone *et al.*, 2004).

En este contexto, el presente proyecto de tesis tiene la finalidad de caracterizar macroscópica y microscópicamente un hongo endófito, el aislamiento LD1 obtenido de hojas sanas de *Lonchocarpus castilloi* Standley (Fabaceae), que habita en las comunidades vegetales de la reserva ecológica “El Edén”, en Quintana Roo, y estudiar su potencial antagónico frente a otros hongos, a través de bioensayos de antagonismo directo y evaluar las propiedades antifúngicas y fitotóxicas de los extractos orgánicos del

medio de cultivo y micelio del hongo endófito LD1 sobre el crecimiento de cuatro hongos endófitos, seis microorganismos fitopatógenos de importancia económica y cuatro semillas de plantas, con el fin de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones entre las plantas hospederas y los hongos endófitos, así como aportar conocimientos que conduzcan al desarrollo de nuevos agentes antifúngicos o herbicidas de origen natural que sean eficaces y biodegradables.

II. Antecedentes

1. Alelopatía

En la naturaleza los organismos están expuestos a diversos factores bióticos y abióticos con los cuales han coevolucionado. La presión de selección ejercida por estos factores ha inducido el desarrollo de numerosas rutas de biosíntesis paralelas a las del metabolismo primario. Estas rutas alternas integran el metabolismo secundario y a través de ellas los seres vivos sintetizan una gran variedad de compuestos a partir de las moléculas generadas en el metabolismo primario (Anaya *et al.*, 2001; Fischbarch y Clardy, 2007).

El interés por el estudio de los metabolitos secundarios ha crecido en las últimas décadas, debido a que se ha comprobado que desempeñan un papel ecológico substancial en las interacciones entre los organismos en su entorno natural. Un grupo de compuestos de especial importancia es el conformado por los metabolitos secundarios que median las interacciones entre organismos de diferente especie. Estos metabolitos son conocidos como aleloquímicos. Una parte de estos metabolitos participa en la multitud de relaciones químicas entre plantas y otros organismos, fenómeno que se denomina con el nombre de alelopatía (del griego *allelon* = uno al otro, y *pathos* = sufrir; efecto perjudicial o benéfico de uno sobre otro). Las interacciones alelopáticas y cualquier otra que esté mediada por metabolitos secundarios son investigados por la ciencia denominada ecología química (Anaya *et al.*, 2001; Fischbarch y Clardy, 2007).

Así pues, la alelopatía es cualquier proceso por medio del cual los metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias, y hongos (organismos donadores), influyen sobre el crecimiento y desarrollo de otros sistemas biológicos (organismos receptores) [Anaya *et al.*, 2001; Anaya, 2003]. Aunque se tiene bien documentado que muchos aleloquímicos tienen efectos benéficos a muy bajas concentraciones y, superado un umbral actúan negativamente sobre el organismo receptor, en la literatura especializada predomina el estudio de los aleloquímicos con efectos negativos.

Es importante destacar que, en los últimos años, la ecología química ha alcanzado un desarrollo notable en lo que se refiere al estudio del potencial alelopático de numerosos organismos. Diversas investigaciones han permitido comprobar el efecto inhibitor o estimulante de numerosos metabolitos secundarios sobre el crecimiento de especies vegetales. Se ha observado que estos compuestos afectan los patrones de vegetación en las comunidades, la sucesión vegetal, la preservación de semillas, las

interacciones entre especies, entre otros procesos. Asimismo, se ha propuesto que estos metabolitos podrían ser utilizados para desarrollar plaguicidas de origen natural, que serían menos perjudiciales para el hombre y para el medio ambiente que los compuestos químicos sintéticos que actualmente se utilizan en la agricultura, ya que los productos naturales pueden interactuar con blancos moleculares específicos y afectar procesos fisiológicos particulares. El estudio de la ecología química y de la alelopatía ha impulsado la utilización de sustancias activas de origen natural en la agricultura, con lo que se pretende mejorar el manejo y el aprovechamiento de los recursos naturales. Sin embargo, a nivel mundial, la práctica agrícola sustentable se realiza todavía con el uso de técnicas rudimentarias en las que no se consideran los conocimientos generados por los estudios de la ecología química y la alelopatía (Einhelling, 1995; Anaya y García, 2006).

2. Los hongos endófitos

La palabra endófito significa literalmente “dentro de la planta” (*endon*: dentro, *phyton*: planta). Un endófito es un hongo o bacteria (incluyendo los actinomicetos) que pasa una gran parte o todo su ciclo de vida colonizando inter y/o intracelularmente dentro de los tejidos sanos de la planta hospedera, sin causar síntomas de enfermedad (Tan y Zou, 2001; Strobel *et al.*, 2004). Los organismos endófitos se han encontrado virtualmente en las 300 000 especies de plantas conocidas y cada una de ellas puede hospedar a uno o más de estos microorganismos (Tan y Zou, 2001; Strobel *et al.*, 2004).

Los microorganismos endófitos aislados más comúnmente son los hongos del grupo de los deuteromicetos (Strobel *et al.*, 2004), los cuales son organismos eucariontes, heterótrofos, que se alimentan absorbiendo compuestos del medio externo, son en su mayoría aerobios, productores de esporas, se reproducen sexual y asexualmente, son filamentosos y multicelulares, formados de hifas con pared celular (Alexopoulos, 1996).

Los endófitos foliares de plantas leñosas son muy diversos, sin embargo se sabe relativamente muy poco de la naturaleza de la interacción entre las plantas leñosas y sus endófitos foliares, particularmente en regiones tropicales (Herre, *et al.*, 2007). La transmisión de los endófitos foliares generalmente es horizontal (entre hospederos). Las hojas nacen libres de endófitos y los adquieren posteriormente del hábitat en el que viven (Van Bael *et al.*, 2005). Las asociaciones de los hongos endófitos con los tejidos superiores de las plantas, se pueden dividir en dos grupos: aquellas que se establecen entre los hongos endófitos y pastos y las que existen entre los hongos endófitos y las

plantas leñosas. Los tejidos subterráneos de las plantas (raíces, rizomas y tubérculos) también contienen endófitos (Herre *et al.*, 2007; Arnold *et al.*, 2003).

Los endófitos juegan un papel importante como mutualistas potenciales, al aumentar la respuesta de defensa del hospedero contra patógenos. Hay dos clases de mecanismos potenciales por los cuales los endófitos podrían contribuir a la protección de su hospedero: 1) mecanismos indirectos, induciendo o incrementando la expresión de sistemas de defensas químicas o fisiológicas intrínsecas del hospedero y 2) mecanismos directos, produciendo defensas antipatógeno, las cuales son sintetizadas directamente por el endófito. El grado en el que cualquiera de estos mecanismos predomina tiene distintas consecuencias para la ecología y evolución de las relaciones hospedero endófito y endófito patógeno (Herre *et al.*, 2007; Arnold *et al.*, 2003).

Por otro lado, los hongos endófitos pueden beneficiar a su hospedero aumentando su tolerancia al estrés, resistencia a fitopatógenos y/o a herbívoros (nematodos, mamíferos e insectos). Algunos inducen un mayor potencial alelopático del hospedero sobre otras especies vegetales que crecen alrededor, que usualmente son competidores por el espacio y nutrientes (Tan y Zou, 2001). Se ha visto que en el caso de la interacción entre hongos endófitos foliares de *Theobroma cacao* y sus patógenos hay efectos directos de estos endófitos en la defensa de su hospedera (Arnold *et al.*, 2003).

Las interacciones en las que están involucrados los hongos endófitos, sus hospederas y otros organismos, son muy complejas, ya que el endófito y el hospedero producen metabolitos que son tóxicos para ambos: el hongo produce factores de virulencia, como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos, y la planta hospedera produce defensas, tanto mecánicas como bioquímicas. Por lo que no hay, aparentemente, síntomas de enfermedad o hay una colonización asintomática, es decir, existe un antagonismo balanceado entre el endófito y el hospedero. Esto depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, las cuales varían y son influenciadas por los factores ambientales y la etapa de desarrollo de los organismos, por lo que cuando se presenta la senescencia del hospedero o éste se encuentra bajo estrés, el balance se torna a favor del hongo y éste podría convertirse en patógeno, presentándose así los síntomas de enfermedad (Schulz *et al.*, 2002; Schulz y Boyle, 2005). La relación entre el endófito y su hospedero puede ir desde la simbiosis hasta la patogénesis (Tan y Zou, 2001; Strobel *et al.*, 2004).

3. Competencia entre hongos

La competencia entre hongos puede ser por explotación o por interferencia. La competencia por explotación ocurre cuando un organismo usa un recurso y reduce, en consecuencia, la disponibilidad de éste para otro microorganismo (Widden, 1997; Boddy, 2000). La competencia por interferencia ocurre cuando un microorganismo inhibe a otro frecuentemente por medio de la producción de aleloquímicos. Puede ser física, al establecerse un contacto directo entre los hongos, donde se dan interacciones entre hifas, o química: mediante la producción de compuestos solubles o volátiles, efectivos a distancia que previenen el crecimiento de las hifas del competidor (Widden, 1997; Boddy, 2000).

En los bioensayos de antagonismo en cajas de Petri, se examina y se caracteriza la zona de interacción entre las dos especies. Los tipos de interacciones hifales más comunes son: la inhibición simétrica o asimétrica del crecimiento hifal a distancia, la detención del crecimiento hifal en el punto de contacto entre dos colonias, el intercalamiento de las hifas de ambas especies con poco efecto en ambas, el crecimiento de una especie por encima de la otra, la destrucción de la hifa (interferencia hifal), el parasitismo o la estimulación del crecimiento (Shearer, 1995; Boddy, 2000).

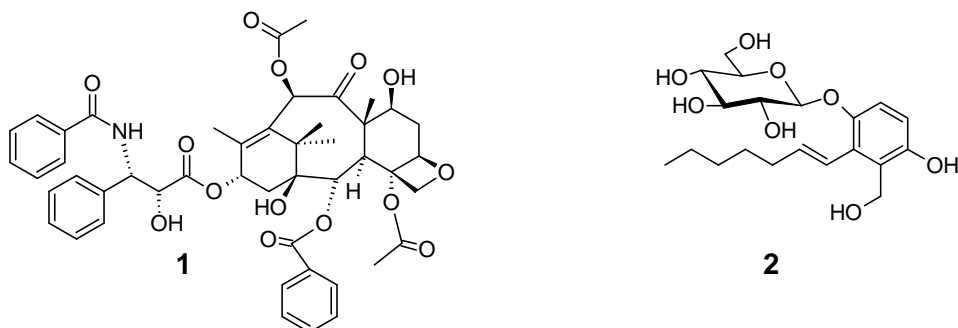
Existen informes que destacan que en algunas interacciones de competencia se encuentra involucrada la producción de antifúngicos por los hongos antagonistas. El estudio de los patrones de las interacciones puede llevar a producir estrategias efectivas para el control biológico o al descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios fúngicos (Shearer, 1995; Yuen *et al.*, 1999).

4. Metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos

Los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos, una vez aislados y caracterizados, pueden tener potencial para su uso en la medicina moderna, agricultura e industria. Los herbicidas, fungicidas, antibióticos, inmunosupresores y compuestos anticancerígenos novedosos son sólo algunos de los tipos de compuestos que han sido aislados a partir de estos microorganismos. Por ejemplo, el taxol (**1**), reconocido ampliamente por su actividad anticancerígena, fue aislado de *Taxomyces andreanae*, endófito de *Taxus brevifolia*. Otro ejemplo es el compuesto antifúngico y fitotóxico

conocido como pestalósida (**2**), obtenida del hongo *Pestalotiopsis microspora*, endófito de *Torreya taxifolia* (Strobel *et al.*, 2004; Tan y Zou, 2001).

Muchos de los compuestos producidos por los endófitos presentan propiedades aleloquímicas por lo que pueden afectar a microorganismos, plantas, algas, hongos patógenos, insectos y nemátodos, entre otros. Su modo de acción involucra la afectación de diversos procesos simultáneamente, a nivel celular, fitohormonal, membranal, en la obtención de nutrientes, apertura de los estomas, fotosíntesis, respiración, hasta la inhibición de los microorganismos del suelo (Reigosa *et al.*, 1999).



Es importante destacar que en el caso de los metabolitos secundarios con actividad herbicida y fungicida que se han obtenido de endófitos, se ha encontrado la ventaja de que son sustancias que permanecen en el ambiente por periodos de tiempo relativamente cortos, pues son biodegradables y no dejan residuos tóxicos, comparados con los sintéticos, que generalmente se encuentran halogenados (Saxena y Pandey, 2001; Strobel *et al.*, 2004).

5. El género *Fusarium*

En este proyecto se realizó la caracterización taxonómica del aislamiento LD1, un hongo endófito que habita en el interior de las hojas de *Lonchocarpus castilloi* Standley (Fabaceae) obtenidas en la reserva ecológica “El Edén”, en Quintana Roo. El estudio de sus características macroscópicas y microscópicas permitió identificarlo como una especie del género *Fusarium*.

El género *Fusarium* fue descrito por Link en 1809 y contiene especies consideradas como endófitos o patógenos con prácticamente cada familia de plantas, las especies fitopatógenas causan daños de billones de dólares debido a las pérdidas de cultivos, además de que produce metabolitos secundarios tóxicos y carcinógenos que

pueden originar infecciones oportunistas en los animales y en los humanos, especialmente a los inmunocomprometidos (Leslie y Summerell, 2006). Se ha reportado que *Fusarium* spp. tiene potencial para su uso como bioherbicida. Así por ejemplo, Ahmed y colaboradores (2001) reportan que los extractos orgánicos de *F. solani*, obtenido de plantas de *Striga*, inhiben el crecimiento de *Ipomoea* spp. y *Cucurbita texana* L.

El género *Fusarium* comprende muchas especies y su identificación es muy compleja. La principal característica para la identificación del género es la presencia de conidias hialinas, curvadas, fusiformes, septadas y con varias células, denominadas macroconidias, las cuales se forman a partir de esporodocios. Algunas especies también producen conidias más pequeñas sin septos o generalmente con un solo septo, denominadas microconidias, que pueden tener diversas formas. Las clamidosporas también son una característica importante en muchas especies. Las características secundarias que hay que tomar en cuenta para su identificación son: el color de la colonia, la velocidad de crecimiento y la producción de metabolitos secundarios y micotoxinas. Algunas cepas producen compuestos volátiles con olor característico. Los medios de cultivo que se utilizan para cultivar y caracterizar las especies de *Fusarium* son: papa dextrosa agar (PDA), agar hoja de clavel (CLA) y Spezieller Nährstoffarmer agar (SNA) [Leslie y Summerell, 2006; Soriano del Castillo *et al.*, 2007].

Las especies de *Fusarium* tienen fenotipos notoriamente variables cuando se cultivan en diferentes medios. Las características morfológicas que son comunes cuando crecen en un medio de cultivo pueden estar ausentes o alteradas cuando la misma cepa se cultiva en otro medio. Lo mismo sucede con la velocidad de crecimiento, producción de micotoxinas y metabolitos secundarios (Leslie y Summerell, 2006).

5.1 *Fusarium* como endófito

Algunos investigadores sugieren que hay interacciones positivas entre especies endófitas de *Fusarium* con plantas. Las especies endófitas de *Fusarium* incluyen aquellos hongos que ocupan el espacio intercelular de las plantas. Las infecciones intercelulares pueden ser localizadas también en las raíces. Un ejemplo es *F. verticillioides* (*F. moniliforme*), el cual infecta al maíz, pero los síntomas de enfermedad raramente aparecen (Bacon y Yates, 2006).

Las especies de *Fusarium* no son necesariamente endófitos obligados. Su fisiología nutricional, por ejemplo, parásita y saprófita, predice una naturaleza transitoria

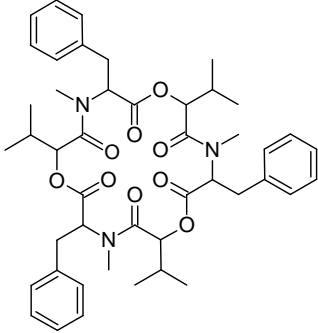
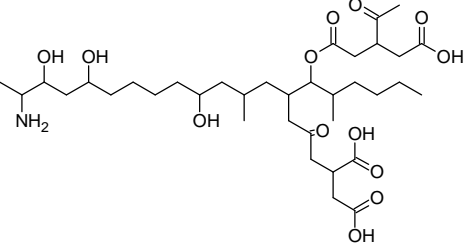
de la fase endofítica de las asociaciones de *Fusarium*. Se han reportado infecciones asintomáticas en las raíces de plantas infectadas con *Fusarium*, incluyendo las especies *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. nivale*, *F. culmorum*, *F. crookwellense* y *F. culmorum* (Bacon y Yates, 2006).

La mayoría de las especies de *Fusarium* se diseminan horizontalmente de un hospedero a otro a través de heridas causadas por insectos, desde el suelo hacia las raíces y otras partes de la planta que estén dañadas, así como por la diseminación aérea de las esporas. También se diseminan verticalmente, ya que muchas especies han sido recuperadas como endófitos de las semillas. El crecimiento y colonización del hospedero se lleva a cabo junto con la producción de metabolitos secundarios (Bacon y Yates, 2006).

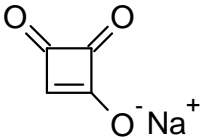
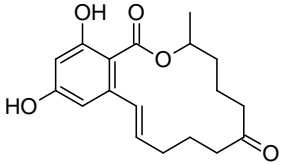
Las especies de *Fusarium* son un grupo muy exitoso en la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios, dentro de los cuales, destacan las micotoxinas, que causan diferentes efectos en los animales (Bacon y Yates, 2006). La formación de micotoxinas refleja que el hongo ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y a veces morfológica, son específicas y son compuestos ubicuos que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas (Carrillo, 2003b).

En el Cuadro 1 se muestra la gran variedad de metabolitos secundarios producidos por diversas especies de *Fusarium*, así como sus actividades biológicas.

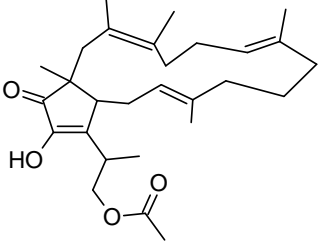
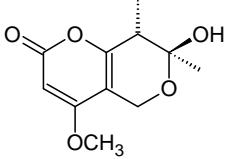
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de diversas especies del género *Fusarium* con actividad biológica.

Metabolito secundario	Algunas especies productoras	Hospederos	Toxicidad	Referencia
<p>Micotoxina Ciclohexadepsipéptido</p>  <p>Beauvericina (3)</p>	<p><i>F. proliferatum</i>¹, <i>F. semitectum</i>¹, <i>F. subglutinans</i>¹, <i>F. verticillioides</i>¹, <i>F. redolens</i>², <i>F. acuminatum</i> var. <i>acuminatum</i>, <i>F. acuminatum</i> var. <i>armeniacum</i>, <i>F. anthophilum</i>, <i>F. avenaceum</i>, <i>F. beomiforme</i>, <i>F. dlamini</i>, <i>F. equiseti</i>, <i>F. longipes</i>, <i>F. poae</i>, <i>F. nygamai</i>, <i>F. oxysporum</i>, <i>F. sambucinum</i></p>	<p>¹ Entomo y fitopatógenos. En maíz y alimentos hechos de maíz infectados por <i>Fusarium</i> spp.</p> <p>² Endófito aislado de rizomas de <i>Dioscorea zingiberensis</i>.</p> <p>Fitopatógenos.</p>	<p>¹Afecta la contractilidad del músculo liso de mamíferos. Insecticida. Induce apoptosis en células de mamíferos.</p> <p>²Actividad antibacteriana contra <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Staphylococcus haemolyticus</i>, <i>Pseudomonas lachrymans</i>, <i>Agrobacterium tumefaciens</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Xanthomonas vesicatoria</i>.</p>	<p>Carrillo, 2003b. Logrieco <i>et al.</i>, 1998. Xu <i>et al.</i>, 2008a. Xu <i>et al.</i>, 2008b.</p>
<p>Micotoxina Policétido</p>  <p>Fumonisina B1 (4)</p>	<p><i>F. nygamai</i>, <i>F. proliferatum</i>, <i>F. verticillioides</i>³, <i>F. fujikuroi</i>.</p> <p>Algunas cepas de <i>F. napiforme</i>, <i>F. thapsinum</i>, <i>F. sacchari</i>, <i>F. dlamini</i>, <i>F. subglutinans</i>, <i>F. anthophilum</i> y <i>F. oxysporum</i></p>	<p>Fitopatógenos.</p> <p>³ Endófito o patógeno de maíz, y alimentos hechos de maíz infectados por <i>F. verticillioides</i>.</p>	<p>Posibles cancerígenos en humanos (cáncer de esófago), efectos tóxicos cardiovasculares. leucoencefalomalacia equina; edema pulmonar en cerdos; cáncer hepático en ratas; excreción por leche. Fitotoxina.</p>	<p>Bacon y Yates, 2006. Carrillo, 2003a. Carrillo, 2003b.</p>

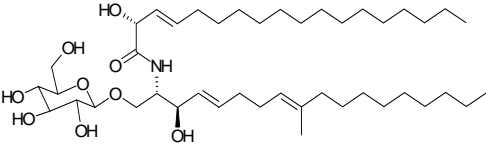
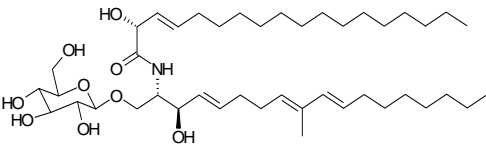
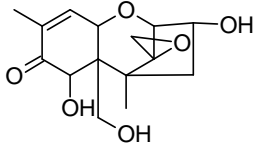
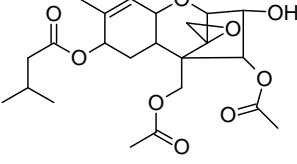
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de diversas especies del género *Fusarium* con actividad biológica (continuación).

Metabolito secundario	Algunas especies productoras	Hospederos	Toxicidad	Referencia
<p>Micotoxina Policétido</p>  <p>Moniliformina (5)</p>	<p><i>F. nygamai</i>, <i>F. equiseti</i>, <i>F. thapsinum</i>, <i>F. fujikuroi</i>, <i>F. proliferatum</i>, <i>F. subglutinans</i>, <i>F. anthophilum</i>, <i>F. beomiforme</i>, <i>F. acuminatum</i>, <i>F. avenaceum</i>, <i>F. semitectum</i>, <i>F. oxysporum</i> y algunas cepas de <i>F. verticillioides</i></p>	<p>Fitopatógenos.</p>	<p>Micotoxina débil, buena fitotoxina para hospederos específicos. Cardiotóxica.</p>	<p>Bacon y Yates, 2006. Carrillo, 2003a. Carrillo, 2003b.</p>
<p>Micotoxina Policétido</p>  <p>Zearalenona (6)</p>	<p><i>F. equiseti</i>, <i>F. graminearum</i>, <i>F. culmorum</i>, <i>F. crookwellense</i>, <i>F. heterosporum</i></p>	<p>Fitopatógenos.</p>	<p>Es hiperestrogénica, síndrome estrogénico en cerdos y ganado de cría. Fitotóxica.</p>	<p>Carrillo, 2003a. Carrillo, 2003b.</p>

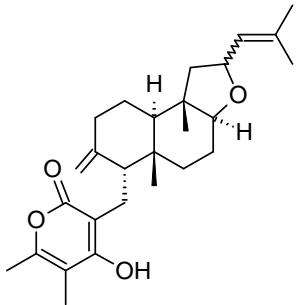
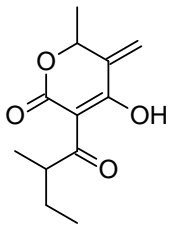
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de diversas especies del género *Fusarium* con actividad biológica (continuación).

Metabolito secundario	Algunas especies productoras	Hospederos	Toxicidad	Referencia
<p>Micotoxina Terpeno</p>  <p>Fusaproliferina (7)</p>	<p><i>F. subglutinans</i> y <i>F. proliferatum</i></p>	<p>Entomo y fitopatógenos.</p>	<p>Teratogénica en embrión de pollo y tóxica para <i>Artemia salina</i> L., células de insectos y mamíferos.</p>	<p>Carrillo, 2003b. Soriano del Castillo <i>et al.</i>, 2007.</p>
<p>Policétido</p>  <p>Clamidosporol (8)</p>	<p><i>F. chlamydosporum</i></p>	<p>Endófito de maíz.</p>	<p>Toxicidad en <i>A. salina</i> L., células HeLa, cultivo de células de ratón, fibroblastos humanos y embriones de pollo, causa pérdida de peso en ratas.</p>	<p>Solfrizzo <i>et al.</i>, 1994.</p>

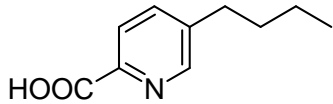
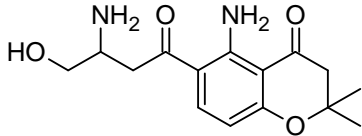
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de diversas especies del género *Fusarium* con actividad biológica (continuación).

Metabolito secundario	Algunas especies productoras	Hospederos	Toxicidad	Referencia
<p>Cerebrósidos</p>  <p>Cerebrósido (9)</p>  <p>Fusarusida (10)</p>	<p><i>Fusarium</i> sp. IFB-121</p>	<p>Endófito de <i>Quercus variabilis</i>.</p>	<p>Antibacteriano contra <i>B. subtilis</i>, <i>E. coli</i>, y <i>Pseudomonas fluorescens</i>. Inhibidor de xantina oxidasa.</p>	<p>Shu, 2004.</p>
<p>Tricotecenos: Micotoxina Terpenos</p>  <p>Desoxinivalenol: tricoteceno B (11)</p>  <p>Toxina T-2 (12)</p>	<p><i>F. graminearum</i>, <i>F. sporotrichoides</i>, <i>F. poae</i>, <i>F. sambucinum</i>, <i>F. venenatum</i>, <i>F. camptoceras</i>, <i>F. acuminatum</i>, <i>F. culmorum</i>, <i>F. crookwellense</i>, <i>F. equiseti</i>, algunas cepas de <i>F. lateritium</i>. <i>F. solani</i></p>	<p>Fitopatógenos.</p>	<p>Causan diarrea, hematuria, vómitos, anorexia, leucopenia, necrosis, y en algunos casos hemorragias múltiples letales; inmunosupresión en cerdos y otros animales.</p>	<p>Bacon y Yates, 2006. Carrillo, 2003a. Carrillo, 2003b.</p>

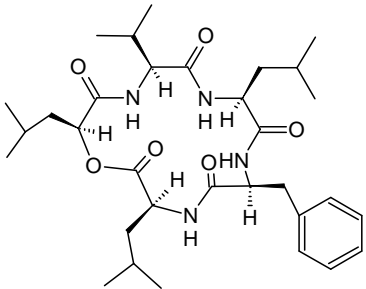
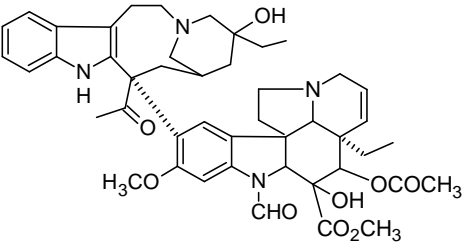
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de diversas especies del género *Fusarium* con actividad biológica (continuación).

Metabolito secundario	Algunas especies productoras	Hospederos	Toxicidad	Referencia
<p>Diterpenos</p>  <p>Subglutinol. A: 12S (13) y B: 12R (14)</p>	<p><i>F. subglutinans</i></p>	<p>Endófito de <i>Tripterygium wilfordii</i>.</p>	<p>Inmunosupresor.</p>	<p>Tan y Zou, 2001.</p>
 <p>Pentacétido CR377 (15)</p>	<p><i>Fusarium</i> sp.</p>	<p>Endófito de <i>Selaginella pallescens</i>.</p>	<p>Antifúngico: inhibe a <i>Candida albicans</i>.</p>	<p>Tan y Zou, 2001.</p>

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de diversas especies del género *Fusarium* con actividad biológica (continuación).

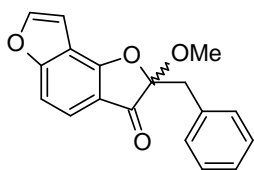
Metabolito secundario	Algunas especies productoras	Hospederos	Toxicidad	Referencia
<p>Micotoxina</p>  <p>Ácido fusárico (16)</p>	<p><i>Fusarium</i> spp.⁴ <i>F. oxysporum</i>⁵ <i>F. verticillioides</i>⁶</p>	<p>⁴Fitopatógenos. ⁵Fitopatógeno. ⁶Endófito del maíz.</p>	<p>⁴Antibacteriano: bacterias grampositivas y gramnegativas. Moderada toxicidad en mamíferos. ⁵Herbicida contra malezas. ⁶Antibacteriano: <i>Bacillus mojavensis</i>.</p>	<p>⁴ Bacon y Yates, 2006. ⁵ Saxena y Pandey, 2001. ⁶Bacon <i>et al.</i>, 2004. Carrillo, 2003a.</p>
<p>Micotoxina</p>  <p>Fusarocromanona (17)</p>	<p><i>F. equiseti</i></p>	<p>Fitopatógeno.</p>	<p>Formación anormal del cartílago en aves, afecta la función inmunológica</p>	<p>Carrillo, 2003a.</p>

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de diversas especies del género *Fusarium* con actividad biológica (continuación).

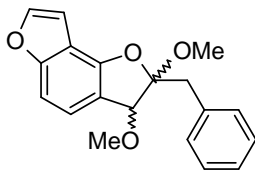
Metabolito secundario	Algunas especies productoras	Hospederos	Toxicidad	Referencia
<p>Ciclodepsipéptido</p>  <p>Sansalvamida (18)</p>	<p><i>Fusarium</i> sp.</p>	<p>Asociado a la hierba marina <i>Halodule wrightii</i>.</p>	<p>Citotóxico en líneas celulares tumorales de humanos.</p>	<p>Cueto, <i>et al.</i>, 2000.</p>
<p>Terpeno</p>  <p>Vincristina (19)</p>	<p><i>F. oxysporum</i> cepa 97CG3</p>	<p>Endófito de <i>Catharanthus roseus</i>.</p>	<p>Anticancerígeno.</p>	<p>Gunatilaka, 2006.</p>

6. *Lonchocarpus castilloi*

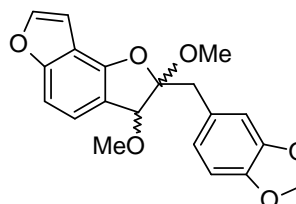
Lonchocarpus castilloi Standley (Fabaceae), conocido en México como “machiche”, “balche”, “chahté”, “kanazin” o “matachiche”, es un árbol maderable que está distribuido ampliamente en México y Centro América. La madera obtenida es muy resistente al ataque de insectos y de hongos, ya que *L. castilloi* es una especie rica en metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas e insecticidas. Entre estos compuestos se encuentran los castillenos A (**20**), B (**21**), C (**22**), D (**23**), E (**24**), los cuales presentan actividad antifúngica contra *Lenzites trabea* y actividad antitermítica contra *Cryptotermes brevis* (castillenos D y E). La corteza también contiene 4-hidroxibenzofurano (**25**), β -sitosterol (**26**) y pongaglabrona (**27**) [Gómez Garibay *et al.*, 1990; Reyes-Chilpa *et al.*, 1995; Silva y Richter, 2006].



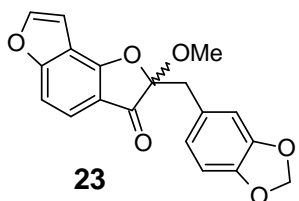
20



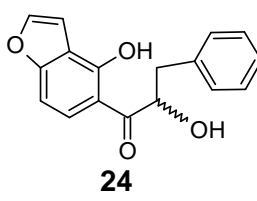
21



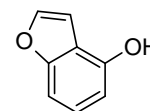
22



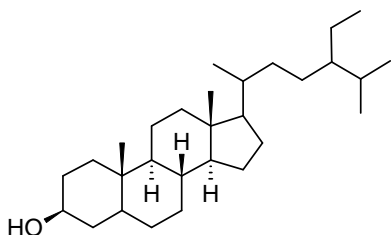
23



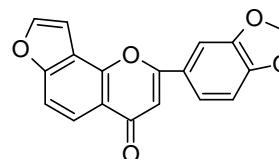
24



25



26



27

III. Hipótesis

Las plantas son colonizadas por un mosaico de hongos endófitos que interactúan estrechamente entre si; por ello es probable que los metabolitos secundarios que biosintetizan los hongos, determinen el potencial antagónico que algunos de ellos muestran frente a otros hongos y plantas. Por esta razón, el hongo endófito LD1 aislado de *Lonchocarpus castilloi* constituye una fuente novedosa de metabolitos secundarios que poseen actividad antifúngica y fitotóxica, entre otras.

IV. Objetivos

1. Objetivo general

Caracterizar macroscópica y microscópicamente al hongo endófito LD1, obtenido de hojas sanas de *Lonchocarpus castilloi* Standley (Fabaceae), y estudiar su potencial antagónico, a través de bioensayos de antagonismo directo y de la evaluación de las propiedades aleloquímicas de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, sobre el crecimiento de cuatro hongos endófitos, seis microorganismos fitopatógenos y cuatro especies vegetales, con el fin de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones entre las plantas hospederas y los hongos endófitos, así como aportar conocimientos que conduzcan al desarrollo de nuevos agentes antifúngicos o herbicidas de origen natural que sean eficaces y biodegradables.

2. Objetivos particulares

- Caracterizar taxonómicamente al hongo endófito LD1, con base en su morfología y en las características de sus esporas, mediante la utilización de diferentes medios y condiciones de cultivo.
- Determinar el potencial antagónico del hongo endófito LD1, mediante la realización de bioensayos de antagonismo *in vitro* utilizando cuatro hongos endófitos: *Phoma medicaginis*, *Xylaria* sp., *Guignardia mangiferae* y *Phomopsis* sp.; y seis microorganismos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* (fungoide), *Alternaria solani*, *Fusarium* sp. y *Pestalotiopsis* sp.
- Establecer las condiciones óptimas de crecimiento *in vitro* del aislamiento LD1, mediante la realización de cultivos en pequeña escala (1 L), verificando a la vez su desarrollo en cuatro diferentes medios de cultivo al incubarlo en condiciones de agitación y estáticamente.
- Obtener los extractos orgánicos a partir del medio de cultivo (partición) y del micelio (maceración) del aislamiento LD1.

- Evaluar el potencial antifúngico de los extractos orgánicos del hongo endófito LD1 sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* (fungoide) y *Alternaria solani*.
- Evaluar el efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del endófito LD1 sobre la longitud de la raíz de cuatro plantas modelo: *Amaranthus hypochondriacus*, *Lycopersicon esculentum*, *Lolium multiflorum* y *Echinochloa crus-galli*.
- Realizar cultivos en mediana escala y obtener los extractos orgánicos correspondientes. Verificar la actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos orgánicos resultantes.
- Realizar el fraccionamiento químico biodirigido de al menos uno de los extractos derivados del cultivo en mediana escala.
- Realizar la identificación preliminar de los componentes presentes en los extractos y fracciones activas utilizando CG-EM.
- Determinar cuantitativamente el potencial aleloquímico de las mezclas de compuestos presentes en las fracciones activas, sobre el crecimiento de los microorganismos y plantas de prueba.

V. Materiales y métodos

1. Material fúngico

El endófito LD1 fue aislado en el Laboratorio de Alelopatía, del Instituto de Ecología, UNAM, en 2004 a partir de hojas sanas de *Lonchocarpus castilloi* Standley (Fabaceae), obtenidas de la reserva ecológica “El Edén” situada al noroeste de Quintana Roo. Este es un hongo microscópico filamentosos, hialino y su micelio está constituido por hifas septadas y de pared delgada.

2. Caracterización macroscópica y microscópica del hongo endófito LD1

La identificación taxonómica del hongo endófito LD1 se realizó utilizando tres diferentes medios de cultivo: agar papa dextrosa (PDA), agar hoja de clavel (CLA) y avena agar (AA). En el Cuadro 2 se presenta la composición de los medios de cultivo empleados.

El hongo endófito LD1 se sembró en cajas de Petri de 6 o 9 cm de diámetro, utilizando inóculos de 5 mm de diámetro de un cultivo de LD1, previamente incubado por 10 días en PDA y utilizando 6 cajas por medio de cultivo. Las cajas de Petri se incubaron de dos en dos de acuerdo con las siguientes condiciones: 1) a temperatura ambiente con luz natural (luz fluorescente), 2) en ausencia de luz, y 3) con luz oscura, aproximadamente 400 nm, durante 2 meses (Leslie y Summerell, 2006).

Las características macroscópicas del hongo endófito LD1 se establecieron en los cultivos en PDA incubados con luz natural, realizando observaciones en el microscopio estereoscópico cada dos días, hasta que el crecimiento del endófito LD1 llegó al límite de las cajas (16 días). En cada observación y de acuerdo a la clave Munsell®, se registraron las características del micelio: tipo de crecimiento, textura, consistencia, superficie y color del micelio en la parte superior y posterior. También se verificó la producción de exudado, así como la difusión de metabolitos secundarios coloridos en el medio de cultivo (Leslie y Summerell, 2006). Además, se determinó el área de crecimiento del micelio (cm²), midiendo el crecimiento radial cada dos días, durante 16 días, utilizando un escáner CI-202 (Área Meter). Con esta información se obtuvo la gráfica de crecimiento del hongo endófito LD1 (crecimiento del endófito LD1 en cm² vs días de crecimiento). Por último, se obtuvieron fotografías del endófito LD1 a los diferentes tiempos de crecimiento.

Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo utilizados en la caracterización taxonómica y en la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento del hongo endófito LD1

Medio de cultivo*	Composición
Papa Dextrosa Agar (PDA)	200 g de papas, 20 g de dextrosa, 15 g de agar en 1000 mL de agua destilada. Hervir durante 20 minutos la papa fresca previamente pelada y cortada cubos, posteriormente, la infusión de papa se filtró a través gasa y se le agregó la dextrosa y el agar, por último, se añadió agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL (Ulloa y Hanlin, 1978).
Agar hoja de clavel (CLA: Carnation Leaf-piece Agar)	Cortar hojas frescas de clavel libre de fungicidas o residuos de insecticidas y cortar en segmentos de 3-5 mm ² , secar en estufa a aprox. a 70° C por 3-4 h para que no se quiebren. Las hojas se colocan en cajas de Petri con agar al 2 % (20 g de agar en un litro de agua destilada). Usualmente, un segmento de hoja de clavel se añade por cada 2 mL de medio. En cajas de 6 cm, se colocaron de 5 a 6 segmentos (Leslie y Summerell, 2006).
Avena Agar (AA)	20 g de avena Quaker®, 30 g de agar y 500 mg de cloranfenicol en 1000 mL de agua destilada. Hervir la avena con la menor cantidad posible de agua destilada durante 10 min, adicionar el agar, el cloranfenicol y agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL (Ulloa y Hanlin, 1978).
Medio V8 (V8)	180 mL de Jugo V8 Herdez®, 2 g de CaCO ₃ , en 1000 mL de agua destilada (Murià, 2007).
Caldo Sabouraud Dextrosa (Sab). Bioxon®	Pesar 30 g de caldo Sabouraud dextrosa por cada 1000 mL de agua destilada. pH = 5.7 ± 0.2. 30 g de caldo Sabouraud contienen: 20 g de dextrosa, 5 g de peptona de carne y 5 g de peptona de caseína (Murià, 2007).
Caldo Papa Dextrosa (CPD)	200 g de papas, 20 g de dextrosa en 1000 mL agua destilada. Hervir durante 20 minutos la papa fresca pelada y cortada cubos, posteriormente, la infusión de papa se filtró a través gasa y se le agregó la dextrosa, por último, se añadió agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL (Leslie y Summerell, 2006).
Caldo Papa (CP)	Caldo de 200 g de papas. Agua destilada 1000 mL (Murià, 2007).

*Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min.

Las características microscópicas del hongo endófito LD1 se registraron cada semana, mediante la obtención y el análisis de preparaciones del micelio del endófito LD1 crecido en CLA y AA. Las muestras de micelio en CLA se tomaron del micelio que creció sobre los segmentos de hoja de clavel y se tiñeron con rojo congo y azul de lactofenol.

Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico a 100x (modelo Axioskop 40) y se tomaron diversas fotografías. El registro de sus características microscópicas se obtuvo mediante la medición de cada una de las estructuras observadas, utilizando el programa Axiovision (v 4.6.3.0) [Leslie y Summerell, 2006].

3. Bioensayos de antagonismo

Los bioensayos de antagonismo se realizaron entre el hongo endófito LD1 y los siguientes microorganismos de prueba: 1) cuatro hongos endófitos: *Phoma medicaginis*, *Xylaria* sp., *Guignardia mangiferae* y *Phomopsis* sp. aislados de las hojas de *Callicarpa acuminata* Humb *et al.* (Verbenaceae) colectadas en la reserva ecológica "El Edén"; 2) dos hongos fitopatógenos aislados de la superficie de las hojas de *C. acuminata*: *Fusarium* sp. y *Pestalotiopsis* sp.; y 3) cuatro especies de microorganismos fitopatógenos con importancia económica: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora capsici* (fungoide), donados por la Dra. Olga Gómez, del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

Los microorganismos se inocularon de acuerdo a sus velocidades de crecimiento en cajas de Petri estériles de 9 cm que contenían 20 mL de PDA. El hongo endófito LD1 crece muy lento por lo que se sembró 7 días antes que sus competidores de crecimiento lento: *Phoma medicaginis*, *Xylaria* sp., *Pestalotiopsis* sp. y *Guignardia mangiferae*. Los competidores de crecimiento medio se inocularon 9 días después que el endófito LD1: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Fusarium* sp. y *Phomopsis* sp. y por último, los competidores de crecimiento rápido se sembraron 11 días después que el hongo LD1: *Phytophthora capsici*, y *Rhizoctonia* sp. De manera adicional, se realizó un bioensayo de antagonismo entre el hongo endófito LD1 y los hongos endófitos *Phoma medicaginis* y *Xylaria* sp. inoculándolos al mismo tiempo. Cada microorganismo competidor se sembró utilizando inóculos de 5 mm de diámetro de los micelios de los microorganismos previamente incubados en PDA por 10 días.

Los inóculos se colocaron equidistantes ocupando sólo un extremo de la caja Petri como se muestra en la Figura 1. Las cajas de Petri se incubaron a 28 °C con fotoperiodo luz-oscuridad naturales (12:12 hrs). Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Todo el procedimiento experimental se efectuó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar.

Los resultados de crecimiento e interacción macroscópica y microscópica entre los microorganismos competidores, se registró e interpretó después de 8 días para los bioensayos entre el hongo endófito LD1 y los microorganismos de crecimiento lento, después de 7 días para los bioensayos entre LD1 y los microorganismos de crecimiento medio y después de 4 días para los bioensayos entre el hongo LD1 con los competidores de crecimiento rápido. Los resultados de crecimiento se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento de los diferentes competidores, comparando su crecimiento con respecto a los controles de crecimiento de acuerdo con la siguiente fórmula:

$(a-b/b) \times 100$, donde a y b son los radios de LD1 y de los diferentes competidores.

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD (utilizando el programa STATISTICA versión 6.0) [Shearer, 1995; Yuen *et al.* 1999; Saucedo, 2006; Macías-Rubalcava *et al.* 2008].

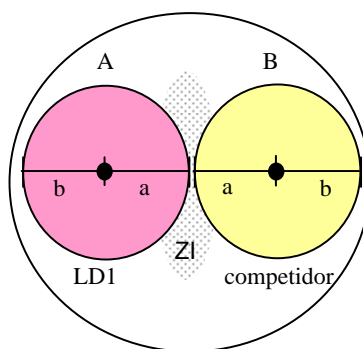


Figura 1. Bioensayo de antagonismo en caja de Petri entre el hongo endófito LD1 y diferentes microorganismos competidores; a y b representan los radios de cada microorganismo. ZI: zona de interacción.

El tipo de interacción entre el hongo endófito LD1 y sus competidores se realizó de acuerdo con los valores numéricos señalados en el Cuadro 3. Una vez asignado un valor se calculó el índice de antagonismo del hongo endófito LD1 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 (A1, A2, B, C, D o E) [Saucedo, 2006].

Cuadro 3. Tipo de interacciones entre microorganismos 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

3.1 Análisis microscópicos de las hifas en la zona de interacción antagónica

La posible interacción entre las hifas de los hongos en los bioensayos de antagonismo directo, se realizó mediante un análisis microscópico de los micelios en las zonas más cercanas a la interacción antagónica (ZI) [Figura 1]. Las preparaciones se obtuvieron tomando pequeñas muestras de los micelios y extendiéndolas con ayuda de una aguja de disección y de un microscopio estereoscópico dentro de una gota de rojo congo sobre un portaobjetos. Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico a 100x y se registraron las medidas del grosor de las hifas y formación de vacuolas, utilizando el programa AxioVision (v 4.6.3.0) y se compararon con las obtenidas a partir de los micelios de los controles de crecimiento de cada microorganismo (colonias puras).

4. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento del endófito LD1

Las condiciones óptimas de crecimiento se establecieron realizando cultivos en pequeña escala (1L) del hongo endófito LD1, utilizando cuatro medios de cultivo: caldo papa dextrosa (CPD), caldo papa (CP), medio de jugo de ocho verduras (V8) y medio Sabouraud (Sab), incubando el hongo LD1 en condiciones de agitación (200 rpm) y estáticas, a 28 °C con un fotoperiodo de 12:12 hrs, luz fluorescente-oscuridad. En el Cuadro 2 se presenta la composición y modo de preparación de los medios de cultivo empleados.

Los cultivos en condiciones de agitación se realizaron en matraces Erlenmeyer de 1000 mL conteniendo 500 mL de medio de cultivo. Los matraces se incubaron durante

dos periodos de incubación, 15 días y 30 días, utilizando un agitador orbital (Shaker orbital, Lab Line modelo 1250). Para realizar los cultivos en condiciones estáticas se utilizaron matraces Fernbach de 2800 mL con 1000 mL de medio de cultivo, incubándolos por un periodo de 90 días. En ambos casos, el inóculo consistió en cinco cortes circulares del micelio del hongo LD1 realizados con un sacabocado estéril de 10 mm de diámetro, los inóculos se tomaron de un micelio cultivado en PDA durante 8 días (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

4.1. Obtención de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio

Una vez transcurrido el periodo de incubación se realizaron preparaciones para verificar la pureza de los cultivos. Posteriormente, se separó el medio de cultivo del micelio, mediante una filtración utilizando gasa. El micelio húmedo obtenido se sometió a un proceso de maceración con CH_2Cl_2 (500 mL x 3). Inmediatamente después y con el mismo procedimiento se realizaron extracciones con AcOEt (500 ml x 3). Los extractos del medio de cultivo se obtuvieron realizando particiones sucesivas empleando también CH_2Cl_2 y AcOEt como disolventes de extracción. La fase orgánica resultante se filtró y secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío con un rotavapor.

Cada uno de los extractos obtenidos a partir del micelio y del medio de cultivo generados de los distintos cultivos se analizó por cromatografía en capa delgada, para determinar su similitud cromatográfica y se registró el rendimiento. Por último, se evaluó el potencial aleloquímico de los mismos (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

5. Determinación del potencial antifúngico

La determinación cuantitativa de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos del medio de cultivo, del micelio y de las fracciones cromatográficas del hongo endófito LD1, se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba: *F. oxysporum*, *P. capsici*, *A. solani* y *Rhizoctonia* sp.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar la muestras se pesaron 20 mg de cada extracto o fracción y se disolvieron en 0.1-0.3 mL de metanol, posteriormente, se adicionaron 40 mL de agua destilada estéril y 40 mL de

PDA al 2 %, para obtener una concentración final de 250 ppm. En cada caja de Petri se colocaron 5 mL de la disolución y se dejaron solidificar ($\approx 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), enseguida, se colocó en el centro de cada caja un inóculo de 0.5 cm de diámetro del microorganismo de prueba. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las cajas se incubaron de 3 a 4 días, dependiendo del microorganismo de prueba, a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ con fotoperiodo luz-oscuridad (12:12 hrs) con luz fluorescente. Como controles negativos se utilizaron PDA (1 %) y PDA 1 %/metanol (0.1-0.3 mL). Al final del bioensayo se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro del micelio de cada repetición y de cada especie de hongo de prueba. Los promedios se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD (utilizando el programa STATISTICA versión 6.0) [Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008].

6. Determinación del potencial fitotóxico

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos y fracciones cromatográficas se llevó a cabo mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y la longitud de la raíz de cuatro plantas modelo: *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae), *Lolium multiflorum* (Poaceae), *Echinochloa crus-galli* (Poaceae) y *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae), utilizando el método en caja de Petri (Macías *et al.*, 2008a, 2007; Anaya, *et al.*, 2005). Las semillas de *A. hypochondriacus* (amaranto) y las de *L. multiflorum* (zacate italiano), se obtuvieron en el Mercado de Tulyehualco, México, D.F; las de *L. esculentum* (jitomate) se compraron en “Semillas Berentsen”, Celaya, Guanajuato, México y las de *E. crus-galli* (zacate tardo) se obtuvieron de plantas cultivadas en el invernadero del Instituto de Ecología (UNAM). Estas especies representan a los dos grandes grupos de plantas superiores, dicotiledóneas y monocotiledóneas.

Los bioensayos de fitotoxicidad se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar las muestras se pesaron 7 mg de extracto o fracción y se disolvieron en 0.1-0.3 mL de metanol. Posteriormente, se agregaron 35 mL de agua destilada y 35 mL de agar al 2 %, para obtener una concentración final de 100 ppm. Posteriormente, 5 mL de las disoluciones se vertieron en las cajas de Petri y se dejaron solidificar por completo ($\approx 40\text{ }^{\circ}\text{C}$). A continuación, se sembraron 10 semillas por caja, de cada una de las especies modelo. Las cajas de Petri se incubaron en la oscuridad a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$

y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las raíces después de 24 hrs para el caso de amaranto, 48 hrs para el zacate tardo y zacate italiano, y 72 hrs para el jitomate. Paralelamente, se evaluaron los controles negativos: agar-agua al 1 % y agar-agua al 1 %/metanol (0.1-0.3 mL). Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado bajo un diseño completamente al azar. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía, (ANOVA) modelo I ($\alpha=0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD [Mead *et al.*, 2002].

7. Cultivos en mediana escala del endófito LD1

El cultivo en mediana escala del hongo endófito LD1, se realizó en condiciones estáticas utilizando garrafones de vidrio con capacidad para 18 L y como medio de cultivo CPD (20 L), Sabouraud (5 L) y V8 (10 L). En cada garrafón se adicionaron 5 litros del medio de cultivo y se taparon con un tapón de gasa. En condiciones estériles, cada garrafón se inoculó con cinco cortes del micelio del hongo endófito LD1 realizados con un sacabocados estéril de 10 mm de diámetro. El cultivo se dejó estáticamente a una temperatura de 28 °C durante un periodo de 6 meses, con fotoperiodo luz-oscuridad (12:12 hrs) con luz fluorescente (Muriá, 2007). Al término de la incubación se obtuvieron los extractos orgánicos y se verificó su potencial aleloquímico siguiendo los procedimientos experimentales descritos en los incisos 5 y 6.

8. Estudio químico

8.1. Métodos cromatográficos generales

El extracto orgánico del micelio de LD1, cultivado en CPD se fraccionó mediante cromatografía de adsorción en columna abierta, empleando como adsorbente gel de sílice (Sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230). Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Sílica Gel 60 GF₂₅₄ Merck de 0.25 mm de espesor), varios sistemas de eluyentes (Hex-CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, y CH₂Cl₂-CH₃OH en diversas proporciones) y como agentes cromogénicos se emplearon sulfato cérico (12.0 g sulfato cérico, 22.2 mL ácido sulfúrico concentrado y 350.0 g hielo) y ácido sulfúrico al 10 %. Para obtener el desarrollo del color fue necesario calentar cada

cromatoplaça por dos minutos aproximadamente a 110 °C (Ghisalberti, 1993). La cromatografía preparativa en capa delgada se realizó empleando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF₂₅₄ Merck de 20 x 20 cm y de 0.25 y 2.0 mm de espesor aplicando en cada cromatoplaça aproximadamente 10 y 100 mg de muestra, respectivamente.

8.2. Fraccionamiento químico biodirigido

El extracto orgánico del micelio de LD1 obtenido de cultivos en CPD en condiciones estáticas (17.74 g) se separó mediante filtración en dos partes, obteniéndose 14.57 g de una fase líquida de apariencia oleosa de color amarillo claro y 3.17 g de una fase sólida de color de color café rojizo.

8.2.1. Fraccionamiento primario de la parte líquida

La fase líquida del extracto activo del micelio (11.8 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta, utilizando 629 g de gel de sílice, obteniéndose un total de 186 fracciones de 200 mL cada una. Aquellas fracciones que presentaron características cromatográficas similares se combinaron para generar 11 fracciones primarias (1-11).

En el Cuadro 4 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas. La actividad antifúngica y fitotóxica de las fracciones primarias se concentró en los grupos de fracciones 4 y 6-10 de acuerdo con los resultados de los bioensayos utilizando el método de dilución en agar.

8.2.2. Fraccionamiento secundario de la fracción 4 (40-70)

El análisis mediante cromatografía en capa fina de la fracción primaria activa 4 demostró que se trataba de una mezcla compleja. La separación de los productos naturales se realizó mediante una cromatografía preparativa en capa delgada empleando como eluyente Hex-CH₂Cl₂ (2:8). Como resultado del procedimiento anterior, se obtuvieron cinco fracciones secundarias (Cuadro 5).

8.2.3. Fraccionamiento primario de la parte sólida

El extracto activo del micelio (2.45 g) del cultivo de LD1 obtenido en CPD en condiciones estáticas se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta sobre 216.2 g de gel de sílice, obteniéndose un total de 191 fracciones de 80 mL cada una, mismas que por similitud cromatográfica en capa fina se reunieron en 12 grupos de fracciones primarias. En el Cuadro 6 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas.

9. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

La caracterización de los constituyentes presentes en los extractos orgánicos y fracciones activas del micelio en CPD de LD1 se efectuó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) en su modalidad impacto electrónico, utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a un detector selectivo de masas (5973 Agilent Technologies 5973 con inyector split/splitless). Se utilizó una columna capilar de 10 m de longitud, diámetro interno 0.18 mm, espesor de película de 0.18 μm ; fase DB-5MS (5% Fenil-metilsilicón) y un Espectrómetro de Masas marca LECO, modelo Pegasus 4D, analizador másico TOF (tiempo de vuelo).

Las condiciones de análisis para los extractos y las fracciones primarias 4, 6, 7, 8, 9 y 10 fueron: temperatura del horno inicial de 40 °C y calentamiento de 20 °C por min hasta alcanzar una temperatura final de 300 °C, con un tiempo final de 10 min. Para la fracción secundaria 4-I, la temperatura inicial del horno fue de 50 °C con un incremento de 40 °C por min hasta alcanzar una temperatura final de 300 °C, con un tiempo final de 15 min. Asimismo, se realizó el análisis del extracto del medio CPD incubado bajo las mismas condiciones que el cultivo en mediana escala, sin la presencia del endófito LD1 (*Fusarium* sp.). Este análisis permitió descartar los metabolitos producto de la degradación del CPD presentes en los extractos y fracciones estudiadas.

Los espectros de masas obtenidos se compararon con la base de datos del NIST (National Institute of Standards and Technology) para obtener la composición de los posibles metabolitos secundarios presentes en los extractos y fracciones cromatográficas.

Los análisis se llevaron a cabo en La Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de Facultad de Química, UNAM.

Cuadro 4. Fraccionamiento primario de la fase líquida del extracto de micelio del hongo LD1.

Fracción (Fx)	Sistema de elución	Proporción	Fracciones	Peso (mg)
1	Hex	100	1-29	32.6
	Hex - CH ₂ Cl ₂	90:10		
	Hex - CH ₂ Cl ₂	80:20		
2	Hex - CH ₂ Cl ₂	80:20	30-35	176.9
	Hex - CH ₂ Cl ₂	1:1		
3	Hex - CH ₂ Cl ₂	1:1	36-39	242.8
4**	Hex - CH ₂ Cl ₂	1:1	40-70	8818.1
	Hex - CH ₂ Cl ₂	40:60		
	Hex - CH ₂ Cl ₂	30:70		
5	Hex - CH ₂ Cl ₂	30:70	71-95	110.2
	Hex - CH ₂ Cl ₂	20:80		
	Hex - CH ₂ Cl ₂	10:90		
	CH ₂ Cl ₂	100		
6**	CH ₂ Cl ₂	100	96-124	679.0
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	99:1		
7**	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	98:2	125-128	776.7
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	97:3	133-137	
8**	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	98:2	129-132	1309.1
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	97:3	138-150	
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	96:4		
9**	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	96:4	151-164	570.9
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	95:5		
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	90:10		
10**	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	90:10	165-175	202.1
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	80:20		
11	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	80:20	176-186	59.9
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	70:30		
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	1:1		

** Fracciones activas.

Cuadro 5. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria 4.

Fx	Peso (mg)
I**	73.6
II	5.2
III	5.8
IV	1.0
V	0.9

** Fracciones activas.

Cuadro 6. Fraccionamiento primario de la fase sólida del extracto de micelio del hongo LD1.

Fracción (Fx)	Sistema de elución	Proporción	Fracciones	Peso (mg)
1	Hex	100	1-60	63.3
	Hex - CH ₂ Cl ₂	90:10		
	Hex - CH ₂ Cl ₂	80:20		
	Hex - CH ₂ Cl ₂	70:30		
	Hex - CH ₂ Cl ₂	60:40		
2	Hex - CH ₂ Cl ₂	1:1	61-72	1412.2
	Hex - CH ₂ Cl ₂	40:60		
3	Hex - CH ₂ Cl ₂	30:70	73-105	31.2
	Hex - CH ₂ Cl ₂	20:80		
	Hex - CH ₂ Cl ₂	10:90		
	CH ₂ Cl ₂	100		
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	99:1		
4	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	98:2	106-110	361.6
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	98:2		
5	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	97:3	111-157	85.9
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	96:4		
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	95:5		
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	95:5		
6	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	90:10	158-170	36.2
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	80:20		
7	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	80:20	171-173	116.9
8	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	80:20	174-177	13.1
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	70:30		
9	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	70:30	178	15.1
10	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	70:30	179-181	202.3
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	60:40		
11	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	60:40	182-189	66.9
	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	1:1		
12	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	1:1	190-191	ND
	MeOH	100		

VI. Resultados y Discusión

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de caracterizar taxonómicamente al hongo endófito LD1 (*Fusarium* sp.) y determinar su potencial antagónico sobre diferentes microorganismos (endófitos y fitopatógenos), así como estudiar el potencial aleloquímico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1), sobre el crecimiento de microorganismos endófitos, fitopatógenos y diferentes plantas de prueba, con el fin de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones que se establecen entre las plantas hospederas y los hongos endófitos. Los resultados obtenidos se dividen en cinco partes: 1) Proceso de caracterización morfológica y fisiológica del hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) 2) Determinación de su potencial antagónico sobre diferentes microorganismos blanco. 3) Determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento del hongo en estudio y la evaluación del potencial alelopático (actividad antifúngica y fitotóxica) de los extractos del medio de cultivo y micelio. 4) Fraccionamiento primario del extracto activo del micelio del hongo *Fusarium* sp. (LD1) en mediana escala en CPD y al análisis cualitativo de los metabolitos secundarios presentes en el extracto total y fracciones activas utilizando CG-EM. 5) Evaluación biológica de la mezcla de metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas mediante la determinación de su efecto sobre plantas y microorganismos modelo.

1. Caracterización macroscópica y microscópica del hongo endófito LD1

La identificación taxonómica del hongo endófito LD1 aislado de las hojas de *Lonchocarpus castilloi*, se realizó utilizando tres diferentes medios de cultivo: papa dextrosa agar (PDA), agar hoja de clavel (CLA) y avena agar (AA), incubando al hongo en tres condiciones: 1) a temperatura ambiente con luz natural, 2) en ausencia de luz y 3) con luz oscura (aproximadamente 400 nm) [Leslie y Summerell, 2006]. A continuación se describen las características macroscópicas y microscópicas más importantes para su caracterización taxonómica.

El hongo endófito LD1, forma un micelio aéreo, umbonado, blando, algodonoso, flocoso y zonado. Inicialmente, es de color amarillo pálido (Figura 2 **A**), pero a medida que crece van apareciendo zonas con distintos colores; al centro es de color rosa, la periferia es amarilla y rosa, en la orilla es de color rojo violáceo con micelio aéreo blanco y produce

un exudado incoloro. En la parte posterior, inicialmente el micelio es de color rojo claro al centro y amarillo pálido alrededor, posteriormente el micelio cambia a un color violeta oscuro (Figura 2 **B, C, D**) [clave Munsell®]. Su crecimiento es radial y los bordes del cultivo son ligeramente lobulados.

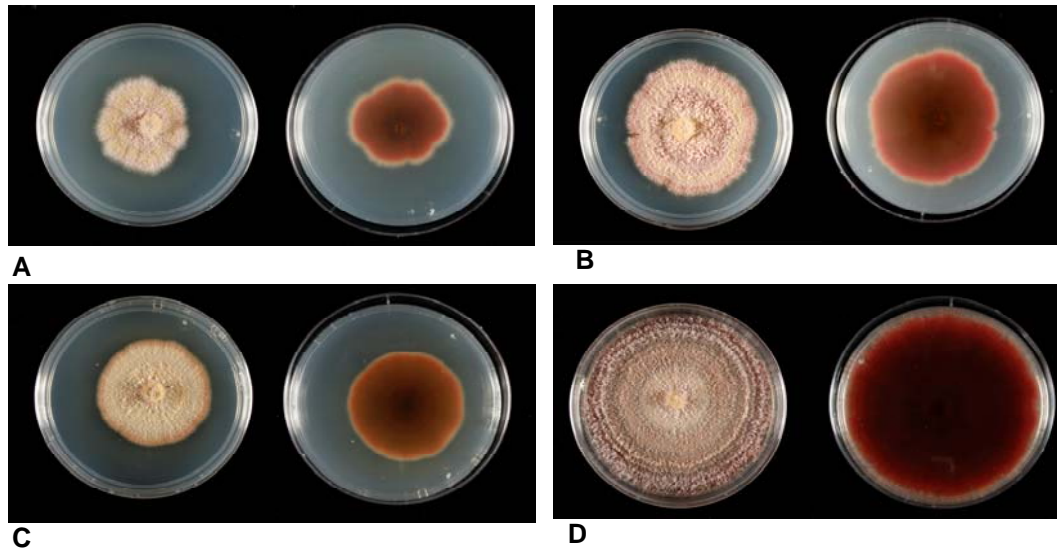
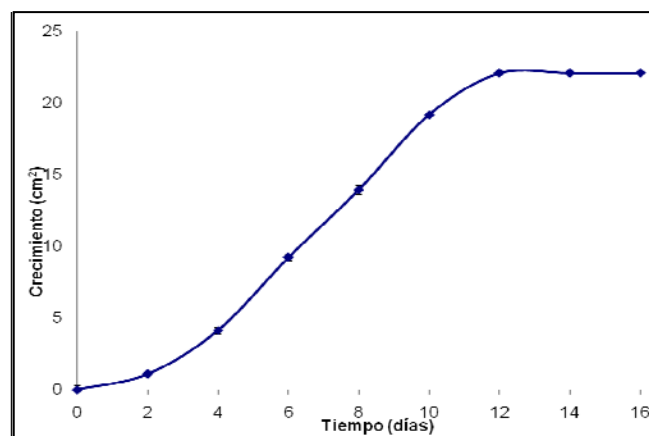


Figura 2. El endófito LD1, *Fusarium* sp., en PDA. **A.** A los 6 días. **B.** 10 días. **C.** 13 días. **D.** 22 días.

En la Gráfica 1 se presenta la velocidad de crecimiento del hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) en cultivos en PDA, observándose que este microorganismo es de crecimiento lento, crece 2.5 cm²/día.

Gráfica 1. Crecimiento del hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) en cultivos en PDA (crecimiento en cm² vs tiempo en días)



En los cultivos en AA en luz oscura a los 14 días de cultivo, y en cultivos de PDA de aproximadamente en 2 meses, se produjeron esporodoquios de color beige.

Las hifas son hialinas, septadas y de pared celular delgada. Las macroconidias se forman en el esporodoquio (Figura 3 C), tienen de 4-8 septos, pero el más común es de 7, son fusiformes, lisas y de pared celular delgada miden (66.0) 70.1–77.7 (83.3) μm x (5.6) 6.0-7.2 μm , con la célula basal papilada o en forma de pie, la célula apical tiene forma de gancho (Figura 3 A, B, D). Los conidióforos son septados, bifurcados y trifurcados, miden (61.4) 71.0-115.94 (>186.6) x 2.3–3.5 (4.1) μm (Figura 3 J, K). Las células conidiógenas son monofialides cilíndricas (Figura 3 H, J, K), miden (13.8) 25.5-38.6 (59.7) x 2.0-3.2 μm , escasas polifialides. La conidiogénesis es enteroblástica, con conidios catenulados (hileras de 8 -13 microconidios), ovaladas, con el ápice redondeado, lisas, gutuladas, con y sin septos (Figura 3 E, G, I). Las microconidias son muy abundantes en el micelio y también en el esporodoquio. Las microconidias sin septos son las más abundantes y miden (4.8) 8.5-10.5 (14.6) x 2.5-4.0 (5.5) μm , las microconidias con un septo miden (9.4) 12.4-13.9 (16.8) x 3.1-4.5 μm y rara vez se observaron con dos septos (Figura 3 E-I). Las clamidosporas, son catenuladas y verrugosas miden (3.6) 5.8-7.1 (9.0) x 3.0-4.0 (5.2) μm y sólo se observaron en PDA (Figura 3 L).

Con base en las características macroscópicas y microscópicas mencionadas se caracterizó al hongo endófito LD1 como una especie del género *Fusarium*. La asignación de la especie se realizará posteriormente, mediante el análisis de la secuencia de su DNA.

2. Bioensayos de antagonismo directo

El potencial antagónico del hongo endófito *Fusarium* sp. (aislamiento LD1) se determinó mediante bioensayos de antagonismo entre éste y cuatro hongos endófitos aislados de *C. acuminata*: *P. medicaginis*, *Xylaria* sp., *G. mangiferae* y *Phomopsis* sp., dos hongos fitopatógenos: *Fusarium* sp. y *Pestalotiopsis* sp. aislados también de *C. acuminata* y cuatro especies de microorganismos fitopatógenos con importancia económica: *F. oxysporum*, *A. solani*, *Rhizoctonia* sp. y *P. capsici*.

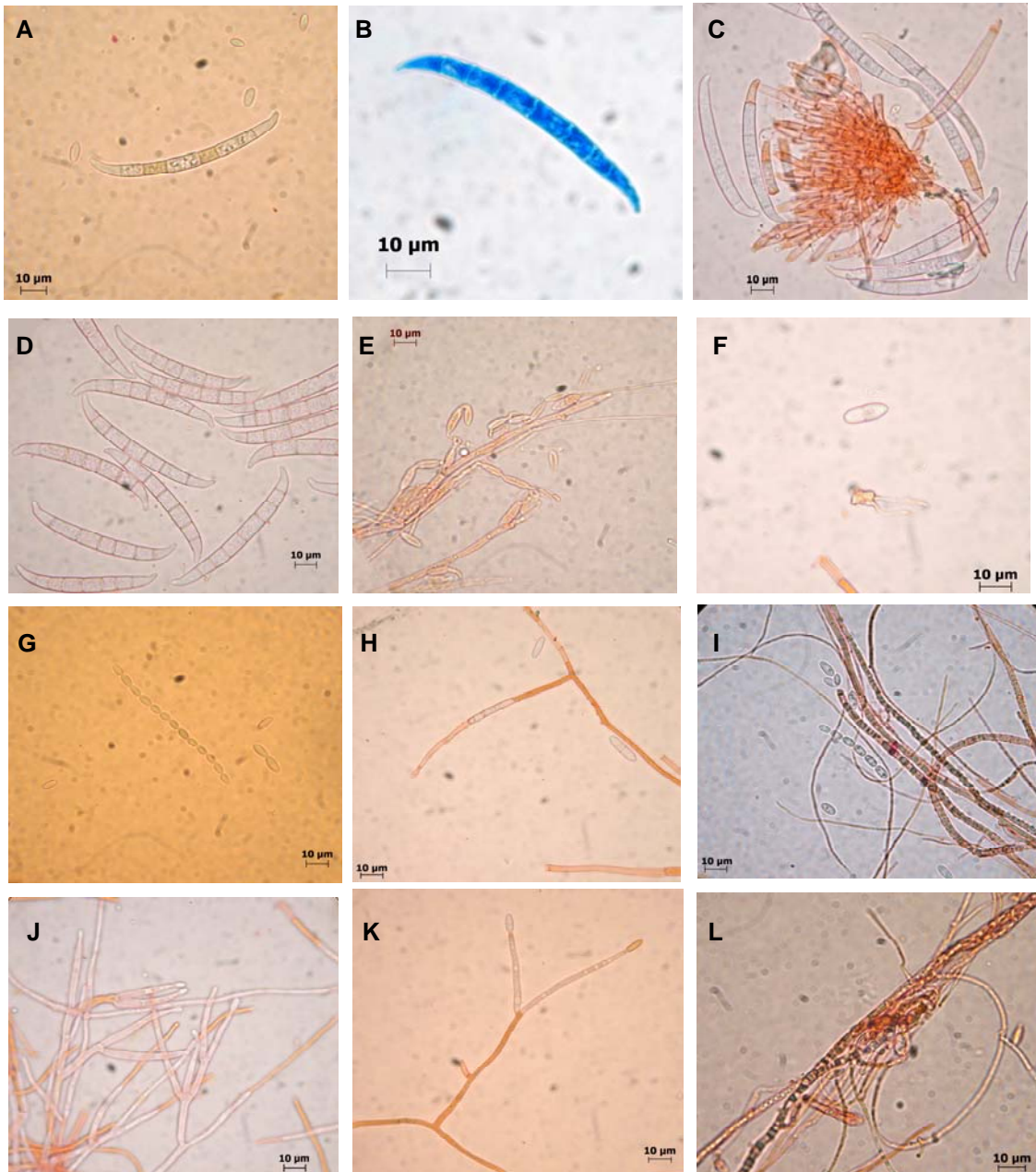


Figura 3. Diversas estructuras de *Fusarium* sp. (LD1). **A.** Macroconidia en CLA teñida con rojo congo. **B.** Macroconidia en AA teñida con azul de lactofenol. **C.** Corte de un esporoquio en AA teñido con rojo congo. **D.** Macroconidias en AA teñidas con rojo congo. **E.** Microconidias teñidas con rojo congo: conidiogénesis enteroblástica. **F.** Microconidia con un septo. **G.** Microconidias en cadena. **H.** Microconidia con un septo y sin septo, monofíalide. **I.** Microconidias en cadena, hifas verrugosas. **J.** Monofíalides teñidas con rojo congo, conidióforo bifurcado y trifurcado. **K.** Conidióforo bifurcado con monofíalides, teñido con rojo congo. **L.** Cladidiosporas en cadena, en PDA teñidas con rojo congo. 100x.

2.1 Antagonismo competitivo entre el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) y diferentes hongos endófitos

Antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Phoma medicaginis*

En la Figura 4 **A** se presenta el antagonismo entre los hongos *Phoma medicaginis* y *Fusarium* sp. (LD1) a los 22 días de interacción antagónica, inoculados en las cajas de Petri al mismo tiempo. Los micelios de las dos especies endófitas crecen hasta hacer contacto entre ellos, *P. medicaginis* inhibe el crecimiento de *Fusarium* sp. (LD1) en un 37 % y forma una barrera de hifas de color blanca. Por su parte, *Fusarium* sp. (LD1) inhibe el crecimiento de *P. medicaginis* en un 24.5 %.

En la Figura 4 **B** se muestra la interacción antagónica a los 26 días, *P. medicaginis* continúa extendiendo su barrera de hifas e inhibe el crecimiento de *Fusarium* sp. (LD1) en un 44.4 %.

En la Figura 5 **A**, se observa el antagonismo a los 13 días de interacción entre *Fusarium* sp. (LD1) y *P. medicaginis*, esta última sembrada 9 días después que *Fusarium* sp. (LD1). En este caso, *Fusarium* sp. crece encima de *P. medicaginis* e inhibe su crecimiento en un 40 %.

En la Figura 5 **B**, se muestra el antagonismo a los 17 días. Los micelios de ambos hongos endófitos crecen entremezclados y *Fusarium* sp. (LD1) inhibe en un 35 % el crecimiento de su competidor.

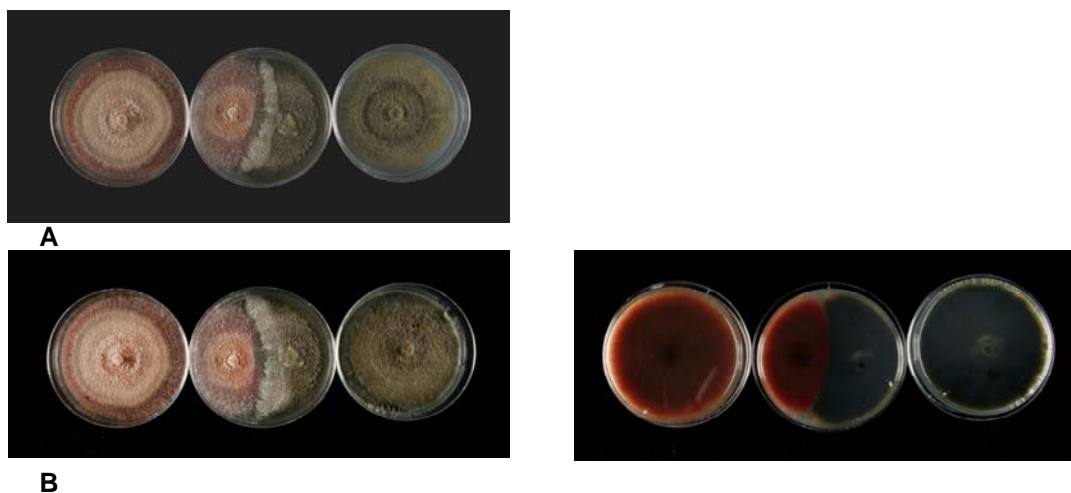


Figura 4. Bioensayo de antagonismo entre los hongos endófitos *Fusarium* sp. (LD1) y *Phoma medicaginis* sembrados al mismo tiempo. **A.** Antagonismo a los 22 días. **B.** Antagonismo a los 26 días.

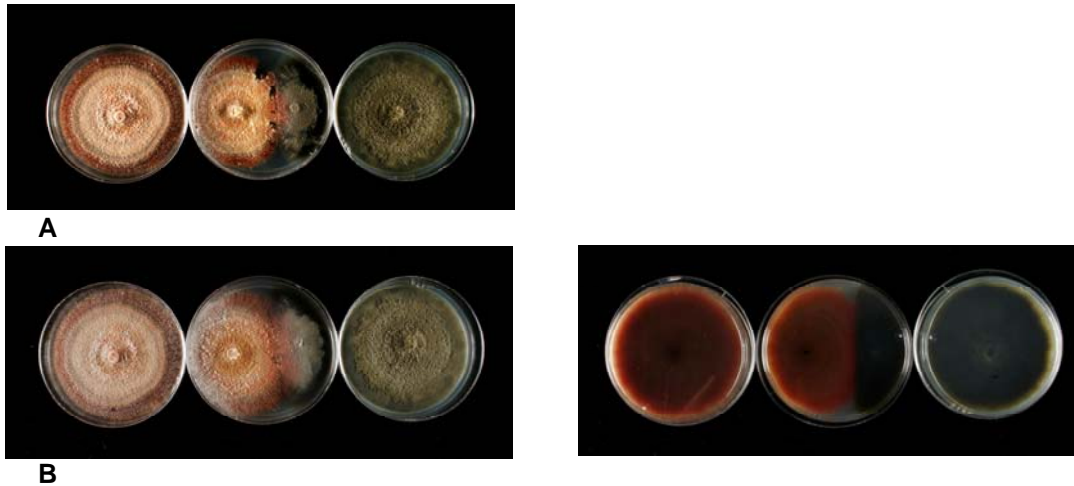


Figura 5. Bioensayo de antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Phoma medicaginis* sembrada 9 días después que *Fusarium* sp. **A.** Antagonismo a los 13 días. **B.** Antagonismo a los 17 días.

Antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Xylaria* sp.

En la Figura 6 **A** se presenta el antagonismo a los 22 días de interacción entre los hongos endófitos *Fusarium* sp. (LD1) y *Xylaria* sp. sembrados al mismo tiempo, observándose que *Xylaria* sp. crece sobre *Fusarium* sp. (LD1) e inhibe su crecimiento en un 50 %, además forma una barrera blanca de hifas.

En la Figura 6 **B**, se observa el antagonismo a los 26 días. *Xylaria* sp. continúa su crecimiento sobre *Fusarium* sp. (LD1) e inhibe su crecimiento en un 50 %. En la parte posterior de las cajas de Petri se observa que el micelio de *Xylaria* sp. tiene una coloración más amarilla con respecto al control de crecimiento.

En la Figura 6 **C**, se muestra el antagonismo a los 78 días. *Xylaria* sp. crece encima de *Fusarium* sp. (LD1) cubriéndolo casi por completo, y provocando una inhibición del 100 % sobre su crecimiento. Además, *Xylaria* sp. forma estromas (estructuras de reproducción) sobre el micelio de *Fusarium* sp. (LD1). De nueva cuenta, en la parte posterior de las cajas se observa que el micelio de *Xylaria* sp. tiene una coloración más amarilla con respecto al control, además se observa una barrera de color negro en la zona de interacción. Estos cambios en el color del micelio, posiblemente se deban a la producción de metabolitos secundarios bioactivos.

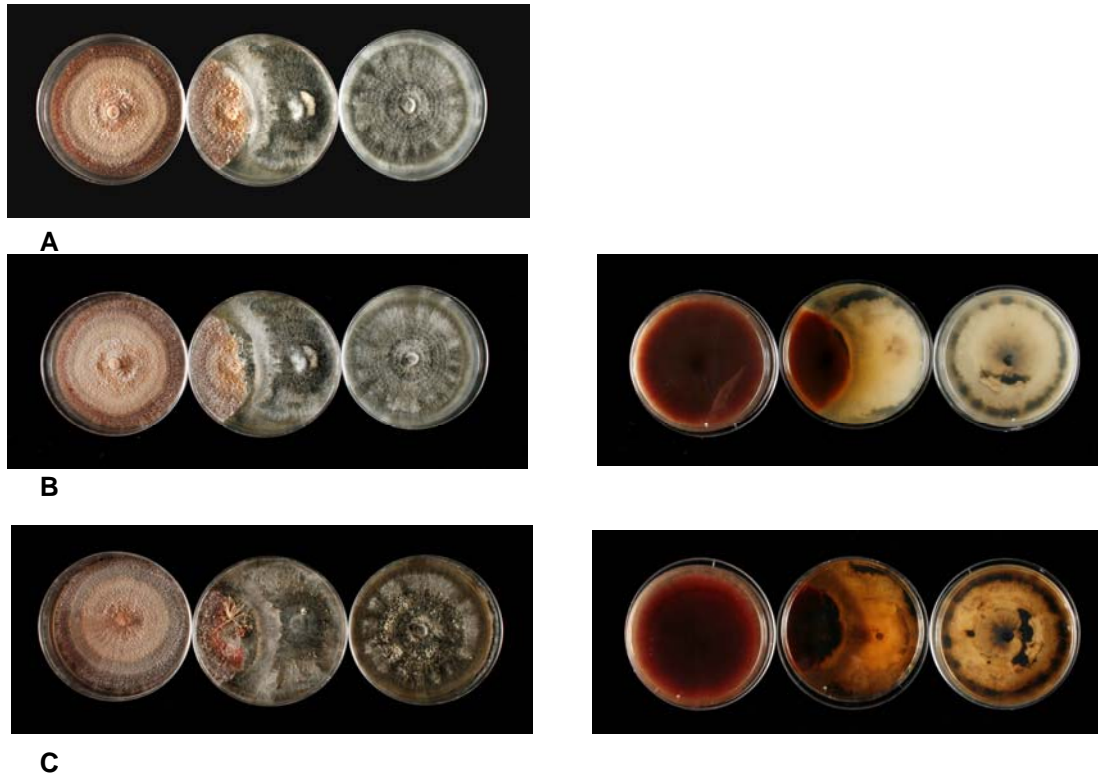


Figura 6. Bioensayo de antagonismo entre los hongos endófitos *Fusarium* sp. (LD1) y *Xylaria* sp. sembrados al mismo tiempo. **A.** Antagonismo a los 22 días. **B.** Antagonismo a los 26 días. **C.** Antagonismo a los 78 días.

Por otra parte, en la Figura 7 **A**, se observa el antagonismo a los 13 días de interacción antagónica entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Xylaria* sp., esta última sembrada 9 días después que *Fusarium* sp. (LD1). Este último inhibe el crecimiento de *Xylaria* sp. en un 31.6 %, no obstante, *Xylaria* sp. comienza a crecer sobre *Fusarium* sp. (LD1).

En la Figura 7 **B**, se muestra el antagonismo después de 17 días de interacción, observándose pocos cambios con respecto a la imagen anterior. En la parte posterior de las cajas de Petri, se observa un cambio en la coloración del micelio de *Xylaria* sp. similar al observado cuando los microorganismos se sembraron al mismo tiempo (Figura 6).

Por último, en la Figura 7 **C**, se presenta el antagonismo a los 69 días, en este caso, el micelio de *Fusarium* sp. (LD1) presenta una coloración rosa intensa y *Xylaria* sp. forma estromas en la zona de interacción. El crecimiento de *Fusarium* sp. (LD1) es inhibido en un 20 % por *Xylaria* sp. Estas observaciones, así como las obtenidas cuando los dos hongos endófitos se sembraron al mismo tiempo, indican que el hongo endófito *Xylaria* sp. también posee un alto potencial antagónico.

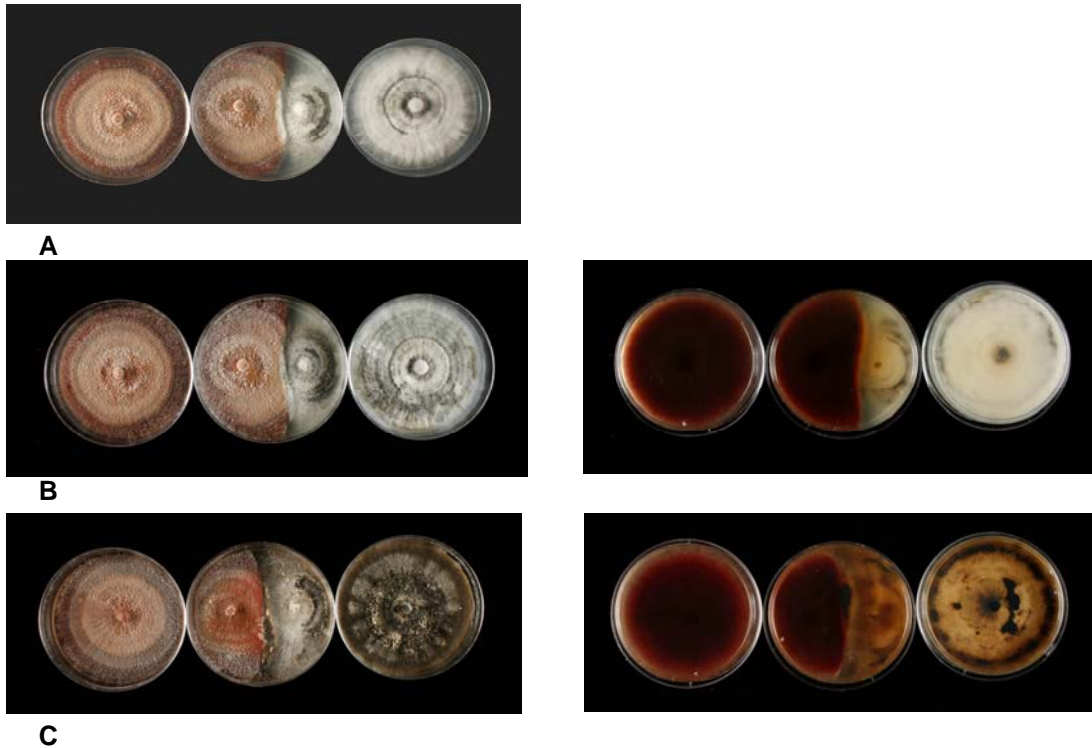


Figura 7. Bioensayo de antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Xylaria* sp. sembrada 9 días después que *Fusarium* sp. (LD1) **A.** Antagonismo a los 13 días. **B.** Antagonismo a los 17 días. **C.** Antagonismo a los 69 días.

Antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Guignardia mangiferae*

En la Figura 8 **A** se muestra el antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *G. mangiferae* a los 13 días de interacción. El micelio de ambos microorganismos crece en contacto. *G. mangiferae* es inhibida significativamente, en un 65.2 % por el endófito *Fusarium* sp. (LD1), además, se observa un cambio en su morfología, ya que en las zonas de interacción antagonica no produce el halo blanco observado en los controles de crecimiento.

En la Figura 8 **B**, se presenta el antagonismo a los 17 días. *Fusarium* sp. (LD1) crece sobre *G. mangiferae*. Sin embargo, el porcentaje de inhibición de su crecimiento es ligeramente menor (54.5 %), indicando que *G. mangiferae* incrementa sus defensas frente a su competidor.

Antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Phomopsis* sp.

En la Figura 9 **A**, se observa el antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Phomopsis* sp. a los 6 días de interacción. El micelio de *Fusarium* sp. (LD1) crece en contacto con el de

Phomopsis sp. e inhibe su crecimiento en un 38 %. También se observa que el micelio de ambos microorganismos cambia de color en la zona de interacción. El micelio de *Fusarium* sp. (LD1) adquiere una coloración amarilla y el de *Phomopsis* sp. es de color oscuro en la parte posterior del micelio.

En la Figura 9 **B**, se muestra el antagonismo a los 35 días. *Fusarium* sp. (LD1) inhibe el crecimiento de *Phomopsis* sp. en un 76 %. En la zona de interacción antagónica el micelio de *Fusarium* sp. (LD1) es de color rosa intenso y el de *Phomopsis* sp. toma una coloración más clara.

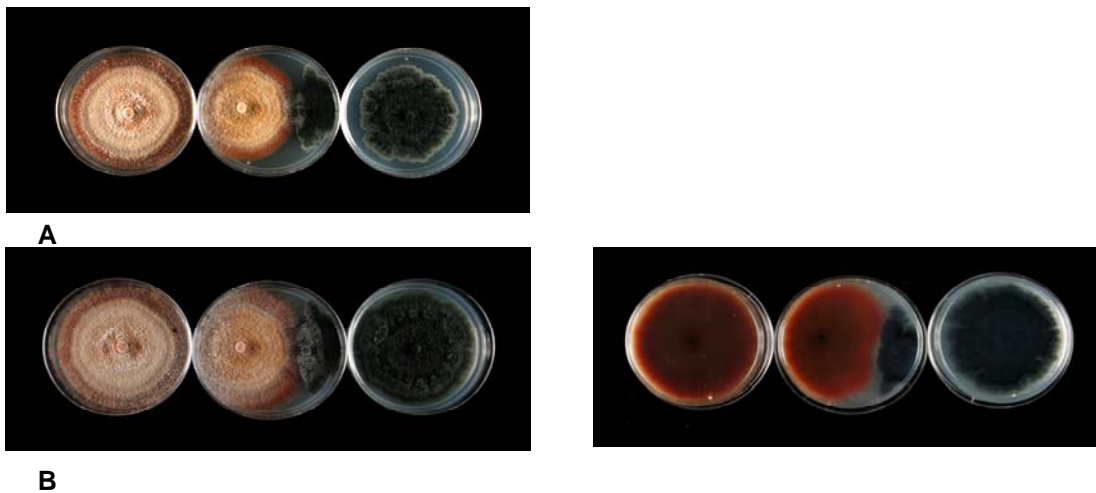


Figura 8. A. Bioensayo de antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Guignardia mangiferae* a los 13 días de interacción. **B.** Antagonismo a los 17 días.



Figura 9. A. Bioensayo de antagonismo entre *Fusarium* sp. y *Phomopsis* sp. a los 6 días de interacción antagónica. **B.** Antagonismo a los 35 días.

2.2 Antagonismo competitivo entre el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) y diferentes microorganismos fitopatógenos

Antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Alternaria solani*

En la Figura 10 **A**, se presenta el antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Alternaria solani* a los 6 días de interacción antagónica y como se puede observar *Fusarium* sp. (LD1) comienza a crecer sobre *A. solani* inhibiendo su crecimiento en un 61.1 %.

En la Figura 10 **B**, se observa el antagonismo a los 35 días, *Fusarium* sp. (LD1) continua su crecimiento sobre *A. solani* e inhibe su crecimiento en un 72%. El micelio de *A. solani* es de color grisáceo, comparado con el micelio de color negro del control de crecimiento.

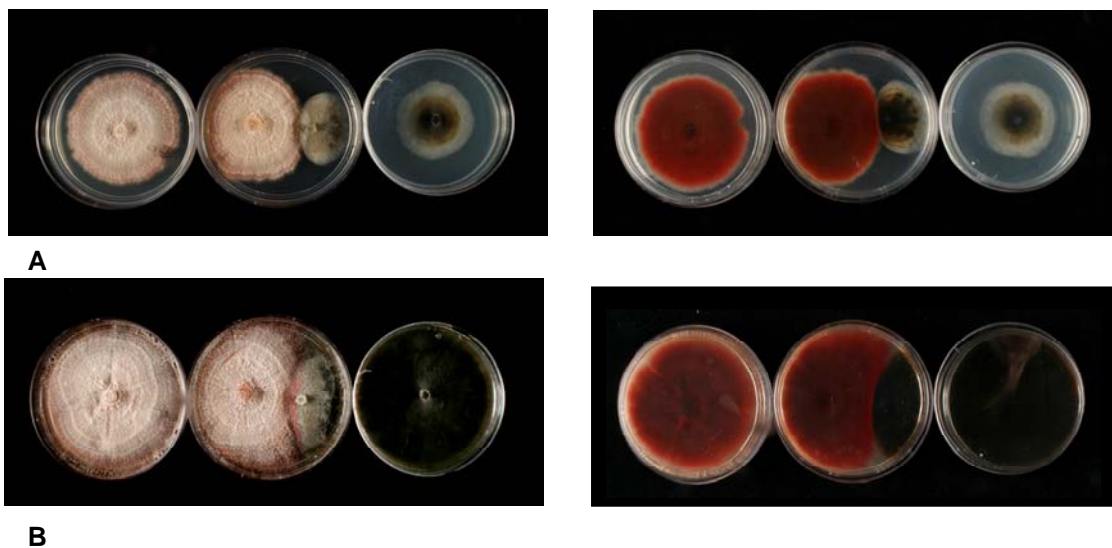


Figura 10. A. Bioensayo de antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Alternaria solani* a los 6 días de interacción antagónica. **B.** Antagonismo a los 35 días.

Antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Fusarium oxysporum*

En la Figura 11 **A**, se observa la interacción antagónica entre los hongos *Fusarium* sp. (LD1) y *Fusarium oxysporum* a los 6 días. El micelio de los dos hongos crece en contacto, *F. oxysporum* es inhibido por *Fusarium* sp. (LD1) en un 51.4 %. El micelio de ambas especies de *Fusarium* cambia morfológicamente con respecto a los controles de crecimiento. El micelio de *Fusarium* sp. (LD1) es de color amarillo y *F. oxysporum* forma una barrera miceliar de color blanco y textura algodonosa en la zona de interacción.

En la Figura 11 **B** se muestra el antagonismo a los 35 días, observándose que *F. oxysporum* produce pequeñas gotas de exudado en la zona de interacción antagonística. *Fusarium* sp. (LD1) inhibe en un 48.0 % a *F. oxysporum*.

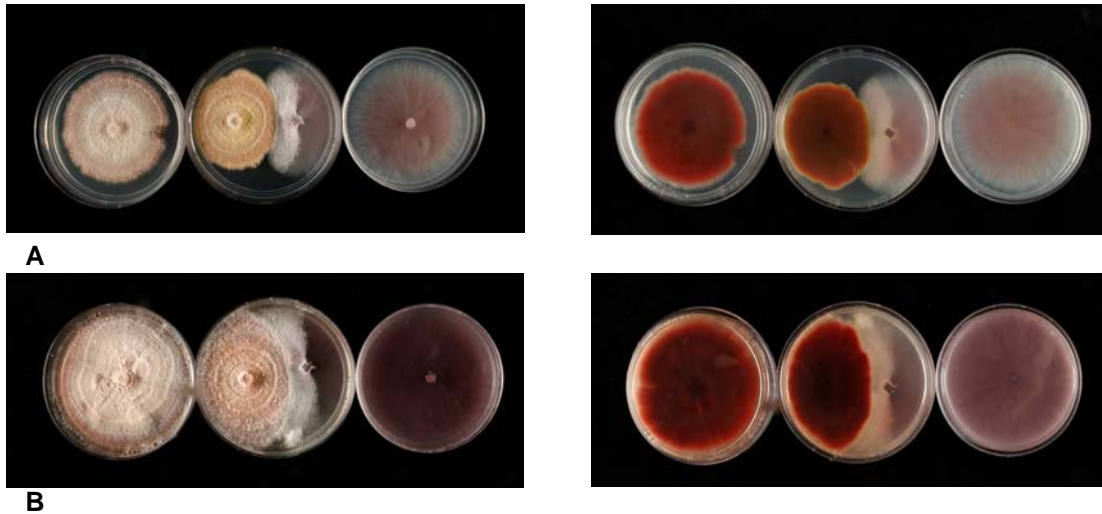


Figura 11. A. Bioensayo de antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *F. oxysporum* a los 6 días de interacción. **B.** Antagonismo a los 35 días.

Antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Rhizoctonia* sp.

En la Figura 12 **A**, se presenta el antagonismo entre el endófito *Fusarium* sp. (LD1) y el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia* sp. a los 6 días de antagonismo. Los micelios de ambas especies crecen y se ponen en contacto. El crecimiento de *Rhizoctonia* sp. es inhibido por el del endófito *Fusarium* sp. (LD1) en un 65.7 %. El crecimiento de *Fusarium* sp. (LD1) es más evidente que el de *Rhizoctonia* sp., extendiendo su micelio hasta el inóculo de *Rhizoctonia* sp.

En la Figura 12 **B** se muestra el antagonismo a los 10 días de interacción antagonística. *Rhizoctonia* sp. comienza a crecer sobre *Fusarium* sp. (LD1), sin embargo su crecimiento aún es inhibido por el endófito *Fusarium* sp. (LD1) en un 92.3 %.

Por último, en la Figura 12 **C** se observa que el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) crece sobre *Rhizoctonia* sp. abarcando más allá del inóculo e inhibiendo el crecimiento de su competidor en un 100 % (antagonismo a los 22 días).

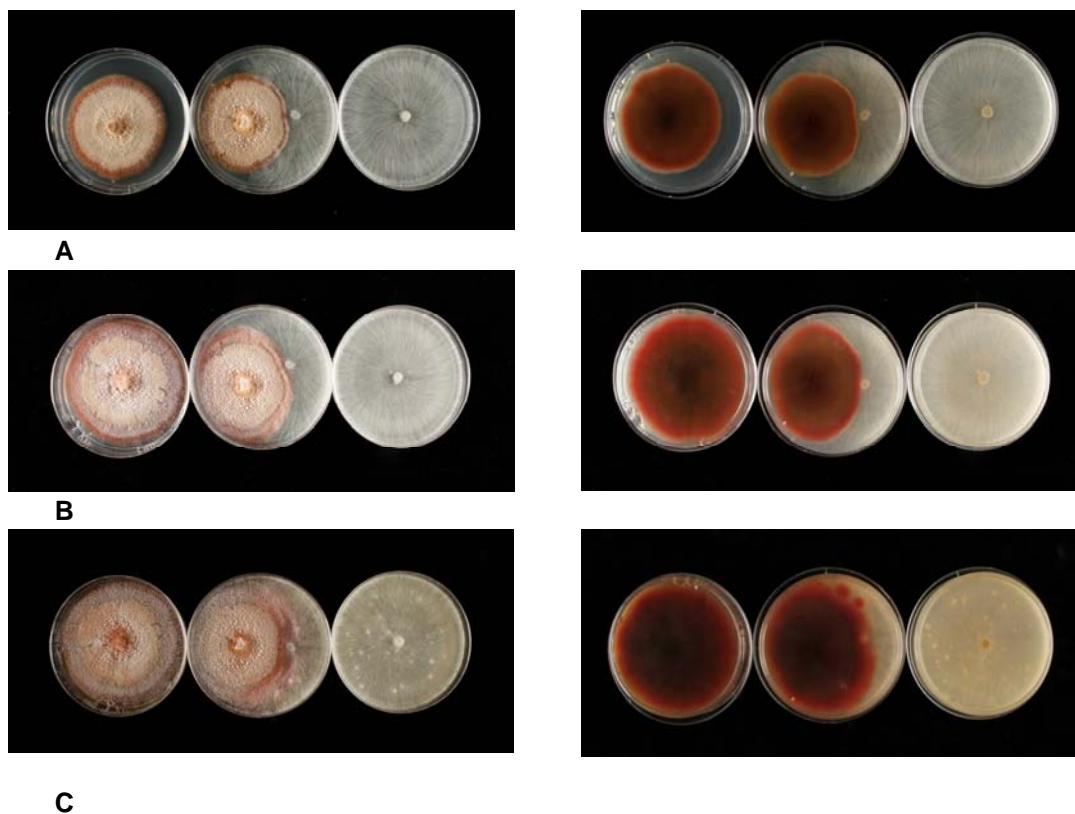


Figura 12. **A.** Bioensayo de antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Rhizoctonia* sp. a los 6 días de interacción antagónica. **B.** Antagonismo a los 10 días. **C.** Antagonismo a los 22 días.

Antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *P. capsici*

En la Figura 13 **A**, se observa el antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Phytophthora capsici* a los 6 días de antagonismo. *Fusarium* sp. (LD1) inhibe a distancia el crecimiento de *P. capsici* de manera importante, observándose una inhibición del 81.4 %. El potencial antagónico del endófito *Fusarium* sp. (LD1) puede deberse a la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica que son difundidos en el medio de cultivo y que inhiben a distancia el crecimiento de *P. capsici*. También, se observa que el micelio de ambas especies presenta una coloración amarilla en la zona de interacción antagónica.

En la Figura 13 **B** se muestra el antagonismo a los 10 días, observándose que el micelio de los dos microorganismos crece en contacto en la zona de interacción. No obstante, el crecimiento de *P. capsici* es inhibido en un 92.3 % por el endófito *Fusarium* sp. (LD1). Finalmente, en la Figura 13 **C** se presenta el antagonismo a los 22 días. *Fusarium* sp. (LD1) crece casi por completo encima de *P. capsici*, inhibiendo su crecimiento en un 100 %.

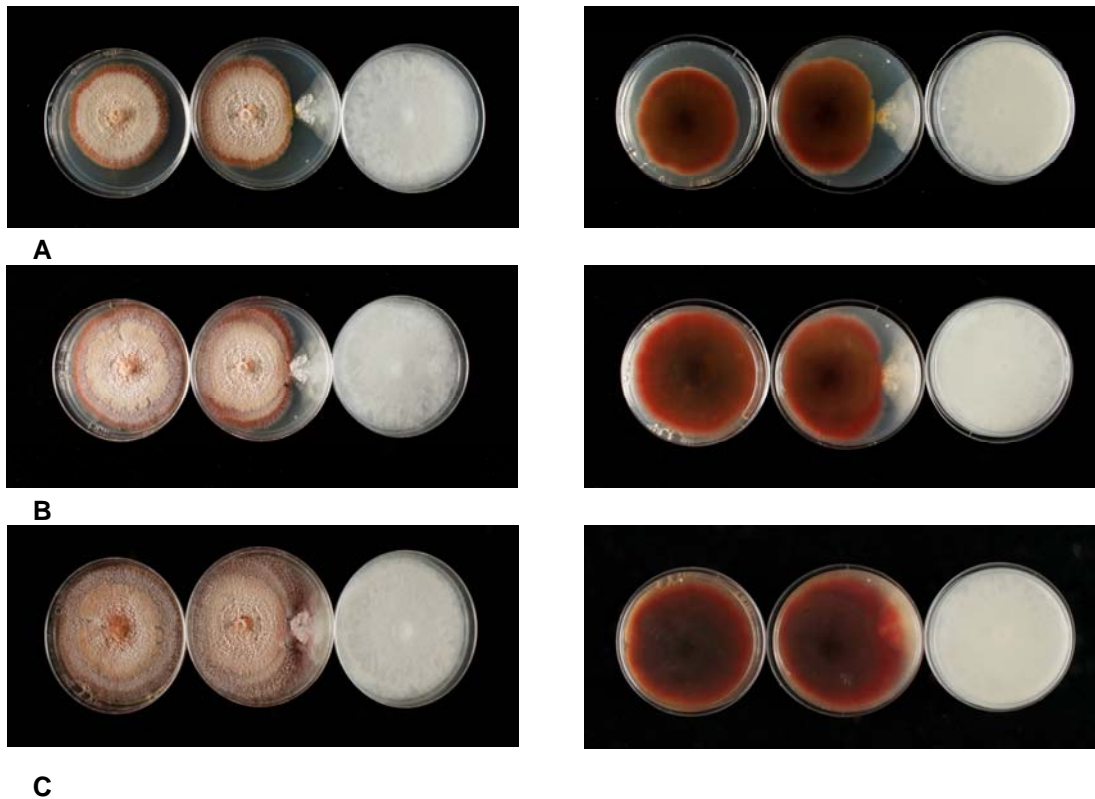


Figura 13 A. Bioensayo de antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *P. capsici* a los 6 días de interacción antagónica. **B.** Antagonismo a los 10 días. **C.** Antagonismo a los 22 días.

Antagonismo entre *Fusarium* sp. (aislamiento LD1; aislado de *L. castilloi*) y *Fusarium* sp. (aislado de *C. acuminata*)

En la Figura 14 **A** se presenta el antagonismo entre el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) aislado de las hojas de *L. castilloi* y el hongo fitopatógeno *Fusarium* sp. aislado de *C. acuminata*, a los 6 días de antagonismo. *Fusarium* sp. (LD1) inhibe el crecimiento de *Fusarium* sp. en un 50.7 %. Las hifas de ambos hongos están en contacto en la zona de interacción antagónica. El micelio de *Fusarium* sp., aislado de *C. acuminata*, cambia de color en la zona de antagonismo observándose de color rosa pálido.

En la Figura 14 **B** se observa el antagonismo a los 35 días. El hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) inhibe en un 73.1 % el crecimiento del fitopatógeno *Fusarium* sp. Este microorganismo muestra cambios morfológicos ya que su micelio presenta un aspecto algodonoso en la zona de contacto con *Fusarium* sp. (LD1).

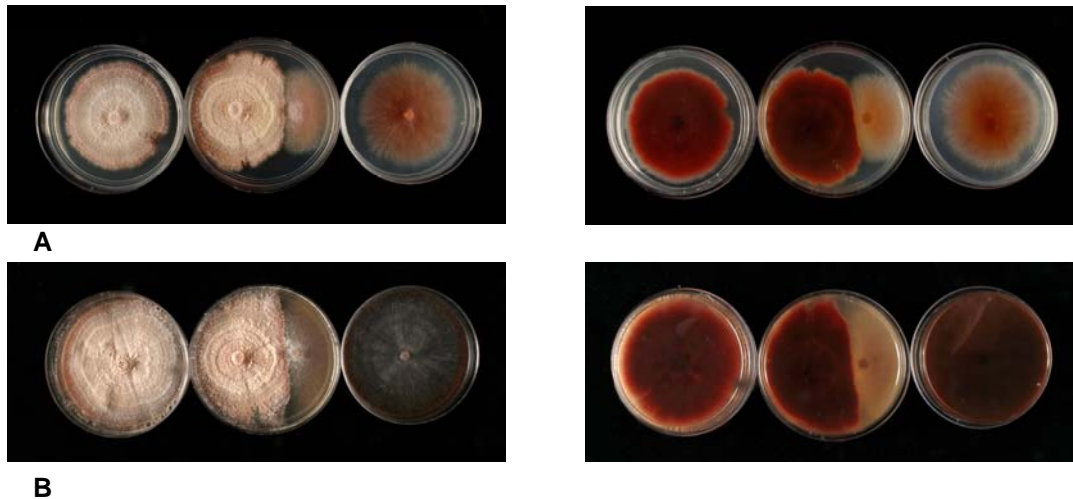


Figura 14 A. Bioensayo de antagonismo entre *Fusarium* sp. (hongo endófito LD1; aislado de *L. castilloi*) y *Fusarium* sp. (hongo fitopatógeno aislado de *C. acuminata*) a los 6 días de interacción antagónica. **B.** Antagonismo a los 35 días.

Antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Pestalotiopsis* sp.

En la Figura 15 **A**, se presenta el antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Pestalotiopsis* sp. a los 13 días de interacción, observándose que existe contacto entre los micelios de las dos especies competidoras. *Fusarium* sp. (LD1) inhibe el crecimiento de *Pestalotiopsis* sp. en un 35 %.

En la Figura 15 **B** se muestra el antagonismo a los 17 días. En la zona de interacción los micelios de los dos microorganismos crecen en contacto, sin embargo, *Pestalotiopsis* sp. continúa inhibido por el endófito *Fusarium* sp. (LD1) en un 31.6 %. En la parte posterior de las cajas de Petri, se puede observar que en la zona de la interacción antagónica hay diferente coloración de los micelios. *Pestalotiopsis* sp., muestra una coloración ligeramente amarilla con respecto al control de crecimiento y *Fusarium* sp. (LD1), es de color rosa intenso. Este cambio de color puede deberse a una mayor producción de metabolitos secundarios bioactivos que se difunden en el medio de cultivo y que posiblemente forman parte de los mecanismos de defensa de *Fusarium* sp. (LD1), contra microorganismos competidores.

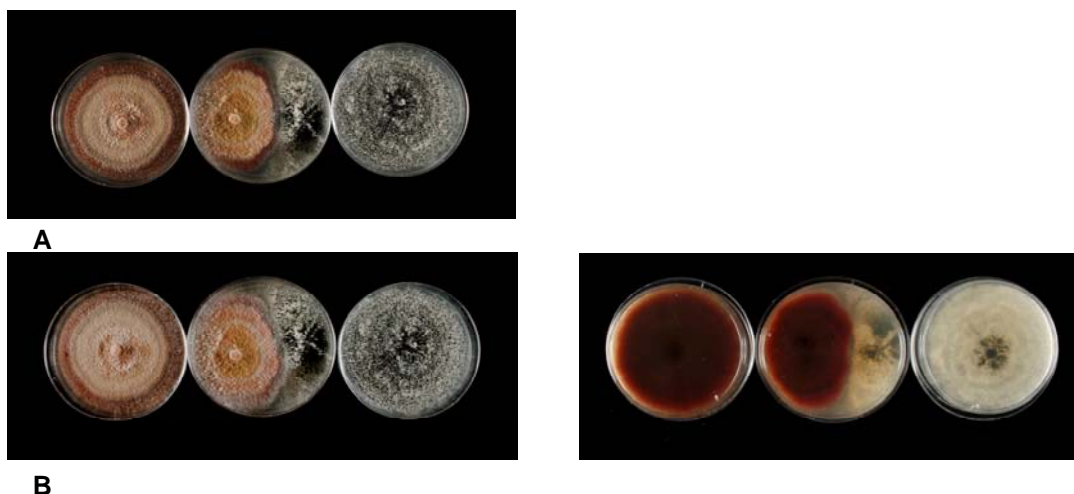


Figura 15. A. Bioensayo de antagonismo entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Pestalotiopsis* sp. a los 13 días de interacción antagónica. **B.** Antagonismo a los 17 días.

Los resultados de los bioensayos de antagonismo entre el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) y los diferentes microorganismos competidores, permiten establecer que *Fusarium* sp. (LD1), es un hongo endófito con importante potencial antifúngico, ya que con excepción del hongo endófito *Xylaria* sp., inhibió significativamente el crecimiento de todos los microorganismos competidores (Cuadro 7). En general, el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) inhibe en mayor grado el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos (*A. solani*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *P. capsici*, *Fusarium* sp., y *Pestalotiopsis* sp.) que el de los hongos endófitos evaluados (*P. medicaginis*, *Xylaria* sp. y *G. mangiferae*). *P. capsici* y *Rhizoctonia* sp. son las especies fitopatógenas más afectadas por la presencia del hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1). A los 22 días de interacción antagónica el crecimiento de ambos microorganismos es inhibido en un 100%.

En el Cuadro 8 se resumen los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. (LD1) provocado por la presencia de los diferentes microorganismos competidores. Estos valores confirman, de nueva cuenta, que el endófito *Fusarium* sp. (LD1), posee un importante potencial antifúngico, ya que únicamente es inhibido por los hongos endófitos *Phoma medicaginis* y *Xylaria* sp. cuando la inoculación se realizó al mismo tiempo que *Fusarium* sp. (LD1). A los 16 días de interacción antagónica ambos endófitos inhiben aproximadamente el 37 % el crecimiento de *Fusarium* sp. (LD1) y a los 78 días de interacción, *Xylaria* sp. inhibe el 100 % el crecimiento de *Fusarium* sp. (LD1), al mismo tiempo que forma estromas sobre el micelio de *Fusarium* sp. (LD1).

Cuadro 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento de los microorganismos competidores en los bioensayos de antagonismo con el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1).

Tipo de Microorganismo	Microorganismo competidor	% inhibición inicial	% inhibición final
Endófitos	<i>Phoma medicaginis</i> ¹	24.5 * ^a	15.4 ^h
	<i>Phoma medicaginis</i> ²	40.5 * ^b	35.0 * ^g
	<i>Xylaria</i> sp. ¹	0.0 ^a	0.0 ⁱ
	<i>Xylaria</i> sp. ²	31.6 * ^b	4.3 ^j
	<i>Guignardia mangiferae</i>	70.0 * ^b	54.5 * ^g
	<i>Phomopsis</i> sp.	37.9 * ^c	76.0 * ^e
Fitopatógenos	<i>Alternaria solani</i>	61.1 * ^c	72.0 * ^e
	<i>Fusarium oxysporum</i>	51.4 * ^c	48.0 * ^e
	<i>Rhizoctonia</i> sp.	65.7 * ^d	100.0 * ^f
	<i>Phytophthora capsici</i>	81.4 * ^d	100.0 * ^f
	<i>Fusarium</i> sp.	50.7 * ^c	73.1 * ^e
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	35.0 * ^b	31.6 * ^g

¹Inoculados al mismo tiempo, ² inoculados 9 días después que *Fusarium* sp. (LD1). ^acalculado a los 16 días de interacción antagónica, ^bcalculado a los 7 días, ^ccalculado a los 4 días, ^dcalculado a los 3 días, ^ecalculado a los 35 días, ^fcalculado a los 22 días, ^gcalculado a los 17 días, ^hcalculado a los 26 días, ⁱcalculado a los 78 días, ^jcalculado a los 69 días de interacción antagónica. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P< 0.05). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 8. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* sp. (LD1) en los bioensayos de antagonismo con diferentes los microorganismos competidores.

Tipo de Microorganismo	Microorganismo competidor	% inhibición inicial	% inhibición final
Endófitos	<i>Phoma medicaginis</i> ¹	37.5* ^a	44.4* ^h
	<i>Phoma medicaginis</i> ²	0.0 ^b	0.0 ^g
	<i>Xylaria</i> sp. ¹	39.1* ^a	100.0* ⁱ
	<i>Xylaria</i> sp. ²	0.0 ^b	20.0 ^j
	<i>Guignardia mangiferae</i>	0.0 ^b	0.0 ^g
	<i>Phomopsis</i> sp.	0.0 ^c	0.0 ^e
Fitopatógenos	<i>Alternaria solani</i>	0.0 ^c	0.0 ^e
	<i>Fusarium oxysporum</i>	1.2 ^c	3.6 ^e
	<i>Rhizoctonia</i> sp.	0.0 ^d	0.0 ^f
	<i>Phytophthora capsici</i>	0.0 ^d	0.0 ^f
	<i>Fusarium</i> sp.	0.0 ^c	0.0 ^e
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	3.2 ^b	10.3 ^g

¹Inoculados al mismo tiempo, ² inoculados 9 días después que *Fusarium* sp. (LD1). ^acalculado a los 16 días de interacción antagónica, ^bcalculado a los 7 días, ^ccalculado a los 4 días, ^dcalculado a los 3 días, ^ecalculado a los 35 días, ^fcalculado a los 22 días, ^gcalculado a los 17 días, ^hcalculado a los 26 días, ⁱcalculado a los 78 días, ^jcalculado a los 69 días de interacción antagónica. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P< 0.05). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

Estas observaciones en conjunto, indican por un lado, que la competencia entre hongos endófitos también depende de los patrones de colonización de los hongos dentro de su planta hospedera y, por otra parte, permiten confirmar que los hongos endófitos establecen una estrecha comunicación con su medio ambiente, de donde provienen múltiples señales que influyen sobre la síntesis de sus metabolitos secundarios. Entre las principales causas endógenas de producción de metabolitos secundarios en los hongos, se encuentra la aparición de estructuras morfológicas tales como esporas, esclerocios o estromas. Estas características las observamos claramente en los antagonismos entre *Fusarium* sp. (LD1) y *Xylaria* sp. ya que se pudo establecer que el potencial antagónico demostrado por estos microorganismos está directamente relacionado con los tiempos de inoculación y además se observó formación de estructuras de reproducción sobre el micelio de *Fusarium* sp. (LD1). [Shearer, 1995].

Por último, en el Cuadro 9 se presenta el tipo de interacción entre los microorganismos competidores, de acuerdo con los parámetros establecidos por Yuen y colaboradores (1999). A cada microorganismo se le asignó una categoría y un valor numérico de acuerdo al tipo de interacción que presentó frente a su competidor (Cuadro 3; ver materiales y métodos). Los valores numéricos asignados permitieron calcular un índice de antagonismo de 8, para los hongos endófitos, y de 19 para los microorganismos fitopatógenos. Confirmando que el potencial antagónico de *Fusarium* sp. (LD1) es mayor sobre los microorganismos fitopatógenos que sobre los hongos endófitos.

2.3. Análisis microscópicos de las hifas en las zonas de interacción antagónica

Con la finalidad de establecer si el potencial antagónico demostrado por el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) en los bioensayos de antagonismo, es mediado por interacciones competitivas directas o indirectas, se realizó un análisis microscópico de los micelios en las zonas más cercanas a la interacción antagónica (Figura 1). Este análisis permitió establecer que no existe antagonismo directo entre las hifas del hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) y sus diferentes competidores, ya que en ningún caso se observó destrucción de las hifas (lisis, aumento de vacuolas etc.), a pesar de que uno de los microorganismos creciera encima del otro o de que entremezclaran los micelios.

A manera de ejemplo, en la Figura 16, se presentan las observaciones microscópicas de la interacción antagónica entre los hongos endófitos *Fusarium* sp. (LD1) y *G. mangiferae*.

Cuadro 9. Tipo de interacción antagonica entre *Fusarium* sp. (LD1) y los microorganismos competidores en los bioensayos de antagonismo y valores numéricos asignados (modificado de Yuen *et al.*, 1999).

Tipo de Microorganismo	Microorganismo competidor	Categoría	Puntos
Endófitos	<i>Phoma medicaginis</i> ¹	A1	-1
	<i>Phoma medicaginis</i> ²	D	3
	<i>Xylaria</i> sp. ¹	A1	-1
	<i>Xylaria</i> sp. ²	B	1
	<i>Guignardia mangiferae</i>	D	3
	<i>Phomopsis</i> sp.	D	3
Fitopatógenos	<i>Alternaria solani</i>	D	3
	<i>Fusarium oxysporum</i>	D	3
	<i>Rhizoctonia</i> sp.	D	3
	<i>Phytophthora capsici</i>	E	4
	<i>Fusarium</i> sp.	D	3
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	D	3

¹Inoculados al mismo tiempo, ²inoculados 9 días después de *Fusarium* sp.

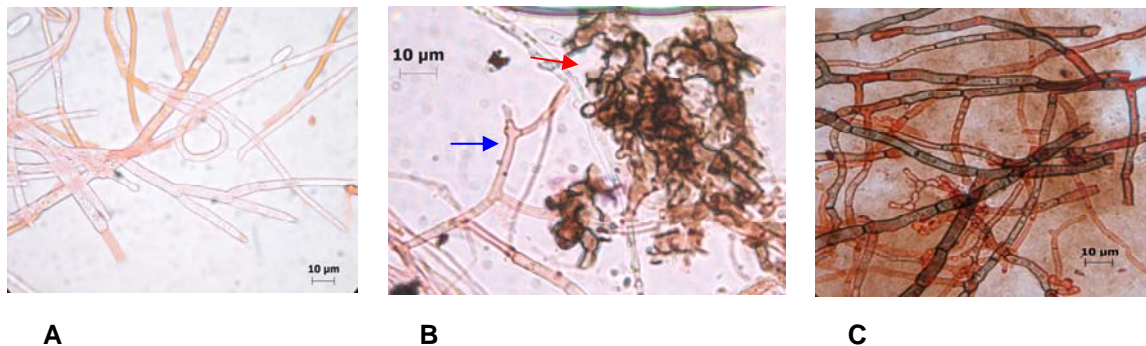


Figura 16. Interacción antagonica entre *Fusarium* sp. (LD1) y *G. mangiferae*. **A.** Control de crecimiento de *Fusarium* sp. (LD1) **B.** Interacción antagonica: *Fusarium* sp. (LD1) [flecha azul] y *G. mangiferae* (flecha roja). **C.** Control de crecimiento de *G. mangiferae*. Observaciones a 100x, teñidas con rojo congo.

Con base en los resultados obtenidos hasta ahora, podemos establecer que la competencia entre el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) y sus diferentes microorganismos competidores, es mediada principalmente, por interacciones físicas directas, por contacto de micelio. Este tipo de mecanismo fue evidente cuando en la zona de interacción entre los dos microorganismos competidores, se observó la formación de barreras miceliales, es decir uno de los microorganismos respondió a la cercanía de otro,

observándose una proliferación masiva de hifas en la zona de contacto entre los microorganismos, y también cuando se observó que las colonias crecieron en contacto o de manera entremezclada. Por otra parte, es importante destacar que este tipo de interacciones está mediada a su vez por interferencia química, es decir en condiciones de antagonismo, los hongos incrementan la producción de metabolitos secundarios bioactivos que se difunden en el medio de cultivo y que inhiben en alto grado el crecimiento de los microorganismos competidores (Widden, 1997; Boddy, 2000).

La colonización de *L. castilloi* por hongos endófitos, particularmente por *Fusarium* sp. (LD1) pueden disminuir los daños de su planta hospedera por la acción de hongos fitopatógenos, mediada principalmente por la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica, o bien, inhibiendo directamente la colonización de los hongos fitopatógenos. Sin embargo, los mecanismos responsables de estas complejas interacciones son muy difíciles de establecer (Arnold *et al.*, 2003; Herre *et al.*, 2007). Cabe mencionar que los hongos endófitos que actúan como antagonistas de microorganismos fitopatógenos, son de gran interés desde el punto de vista de su aplicación en el control de enfermedades de las plantas, ya que se ha observado que algunos de ellos pueden reducir el daño y pérdida de tejidos vegetales ocasionados por microorganismos patógenos (Tan y Zou, 2001; Arnold *et al.*, 2003; Strobel *et al.*, 2004).

Con la intención de corroborar que el potencial demostrado por el endófito *Fusarium* sp. (LD1) es debido principalmente a la producción de metabolitos secundarios bioactivos se evaluó el efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio sobre el crecimiento de microorganismo fitopatógenos de prueba. De manera adicional, se evaluó la posible interacción endófito planta mediante evaluación del efecto de los extractos sobre la germinación y la longitud de la raíz de plantas modelo.

3. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *Fusarium* sp. (LD1) y evaluación del potencial aleloquímico de sus extractos orgánicos

En primer lugar, se establecieron las condiciones óptimas de crecimiento del hongo *Fusarium* sp. (LD1) mediante la realización de cultivos en pequeña escala (1L), verificando el desarrollo del microorganismo en diferentes medios de cultivo, distintas condiciones de incubación (estática vs agitación) y diferentes tiempos incubación (15, 30 y 90 días) a 28 °C. Posteriormente, se evaluó cuantitativamente el posible efecto alelopático de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de *Fusarium* sp. (LD1) mediante

la determinación de su efecto sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba y sobre la germinación y la longitud de la raíz de tres plantas modelo, mediante el método de dilución en la caja de Petri.

Los medios de crecimiento seleccionados (Cuadro 2, materiales y métodos) para la optimización de las condiciones de cultivo de *Fusarium* sp. (LD1) son los más utilizados para cultivar microorganismos fúngicos (Ulloa y Hanlin, 1978; Murià, 2007; Frisvad *et al.*, 2008).

En todos los casos se obtuvieron los extractos orgánicos a partir del micelio húmedo (maceración) y del medio de cultivo (partición), utilizando CH₂Cl₂ y AcOET como disolventes de extracción. En los Cuadros 10 y 11 se presentan los rendimientos de biomasa producida y de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, observándose diferencias considerables, tanto en la biomasa generada como en los rendimientos de extracto en función del medio de cultivo empleado y de las condiciones de incubación.

En general, la cantidad de biomasa y el rendimiento de los extractos de los cultivos en condiciones de agitación son mayores cuando el microorganismo se incubó por un periodo de quince días. Los extractos obtenidos al utilizar como medio de cultivo CPD y Sabouraud fueron los más abundantes, además el medio de cultivo CPD es el medio que se extrae en menor cantidad con los disolventes utilizados (Cuadro 10).

A continuación, cada uno de los extractos obtenidos se analizó por CCF, observándose diferencias en la composición entre los extractos del medio de cultivo y micelio, por lo que se decidió evaluarlos por separado, obteniéndose cuatro extractos por medio de cultivo, es decir dos por cada período de incubación (15 y 30 días).

Con respecto a los cultivos en condiciones de incubación estáticas, en el Cuadro 11 se observa que los rendimientos de los extractos obtenidos para el medio de cultivo son menores a los del micelio. De nueva cuenta, los extractos obtenidos a partir de los cultivos en CPD y Sabouraud presentan los mayores rendimientos. Cabe mencionar que estos cultivos se incubaron por un periodo de 90 días, ya que como se mencionó anteriormente, el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) es un microorganismo de crecimiento muy lento y en estas condiciones requiere mayor tiempo para terminar su fase de crecimiento e iniciar la biosíntesis de metabolitos secundarios.

El análisis por cromatografía en capa fina de cada uno de los extractos obtenidos permitió observar que también existe una diferencia en la composición metabólica entre los extractos del medio de cultivo y micelio, por lo que se evaluaron por separado.

Cuadro 10. Comparación de los rendimientos obtenidos de los extractos orgánicos del hongo *Fusarium* sp. (LD1) en cultivos en pequeña escala en condiciones agitación.

Medio de cultivo	Tiempo de incubación (días)	Biomasa (g)	Extracto del Medio de cultivo (mg/L)	Extracto del Micelio (mg/L)
V8	15	5.7	27.8	23.4
	30	3.3	34.4	32.8
CPD	15	6.3	113.8	975.3
	30	5.1	118.5	1691.8
CP	15	2.0	26.0	23.2
	30	1.3	72.3	30.5
Sab	15	11.0	164.6	36.4
	30	6.6	45.3	701.9

Cuadro 11. Comparación de los rendimientos obtenidos de los extractos orgánicos del hongo *Fusarium* sp. (LD1) en cultivos en pequeña escala en condiciones estáticas.

Medio de cultivo	Biomasa (g)	Extracto del Medio de cultivo (mg/L)	Extracto del Micelio (mg/L)
V8	1.0	100.5	162.4
CPD	5.6	89.2	1534.0
CP	1.1	17.4	21.5
Sab	5.5	97.2	217.0

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos resultantes se llevó a cabo mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba: *A. solani*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. y *P. capsici*. En el Cuadro 12 se presenta el efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio en condiciones de agitación sobre estos cuatro microorganismos. Todos los extractos evaluados inhibieron significativamente el crecimiento de al menos uno de los microorganismos de prueba. En todos los casos el crecimiento del fungoide *P. capsici*, es el más afectado. Los extractos obtenidos utilizando como medio de cultivo CP (30 días) y Sabouraud (15 días) inhiben su crecimiento en un 100%. Estas últimas observaciones

concuerdan con los resultados de los bioensayos de antagonismo entre el endófito *Fusarium* sp. (LD1) y *P. capsici* en donde se observó que el crecimiento de *P. capsici*, es inhibido en un 100% después de 22 días de interacción antagónica.

En general, los extractos obtenidos a partir de los cultivos en Sabouraud incubados durante 15 o 30 días inhiben significativamente el crecimiento de todos los microorganismos fitopatógenos evaluados, constituyendo, así el medio de cultivo idóneo para la obtención de metabolitos secundarios con actividad antifúngica.

Con base en los porcentajes de inhibición causados por la presencia de los extractos del medio de cultivo y micelio sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos evaluados podemos establecer el siguiente orden de inhibición sobre su crecimiento: *P. capsici* > *Rhizoctonia* sp. > *A. solani* > *F. oxysporum*.

Cuadro 12. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos a 250 ppm de los cultivos en condiciones de agitación.

Medio de cultivo	Tiempo de incubación (días)	% de Inhibición del crecimiento radial			
		<i>P. capsici</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>A. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
Medio de cultivo					
CPD	15	55.6 ± 0.02 *	22.2 ± 0.03	16.2 ± 0.01	18.0 ± 0.14
	30	58.5 ± 0.02 *	15.2 ± 0.02	13.2 ± 0.09	11.4 ± 0.05
CP	15	ND	ND	ND	ND
	30	100.0±0.00*	52.2 ± 0.10 *	23.7 ± 0.03 *	11.4 ± 0.02
V8	15	ND	ND	ND	ND
	30	-4.9 ± 0.03	2.2 ± 0.02	7.9 ± 0.02	11.4 ± 0.09
Sab	15	100.0± 0.00*	55.6 ± 0.05 *	43.2 ± 0.03 *	30.0 ± 0.05 *
	30	48.0 ± 0.05 *	40.0 ± 0.02 *	34.9 ± 0.03 *	21.4 ± 0
Micelio					
CPD	15	40.0 ± 0.02 *	0.0 ± 0.03	13.5 ± 0.05	16.0 ± 0.07
	30	65.9 ± 0.03 *	4.3 ± 0.07	13.2 ± 0.09	6.8 ± 0.00
CP	15	40.0 ± 0.06 *	35.6 ± 0.03 *	24.3 ± 0.00*	22.0 ± 0.03
	30	ND	ND	ND	ND
V8	15	-6.7 ± 0.09	37.8 ± 0.07 *	13.5 ± 0.03	28.0 ± 0.03 *
	30	53.7 ± 0.02 *	15.2 ± 0.10	13.2 ± 0.03	11.4 ± 0.00
Sab	15	53.3 ± 0.00 *	51.1 ± 0.07 *	32.4 ± 0.02 *	26.0 ± 0.00 *
	30	62.2 ± 0.01 *	34.0 ± 0.05 *	32.6 ± 0.07 *	7.1 ± 0.07

* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P< 0.05). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones; los números negativos indican estimulación del crecimiento; ND bioensayos no realizados por insuficiencia de extracto.

En el Cuadro 13 se presenta el efecto de los extractos obtenidos en condiciones de incubación estáticas sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos de prueba. La actividad antifúngica demostrada por los extractos es diferente a la presentada por los extractos obtenidos en condiciones de agitación. En este caso, el crecimiento de *P. capsici*, no es inhibido por todos los extractos evaluados, además, los porcentajes de inhibición son menores y la mayoría de ellos no significativos. En este caso, también se observó que, en general, los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en medio Sabouraud, presentan la mayor inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos. Los extractos obtenidos en V8 no se evaluaron debido a que su rendimiento era insuficiente.

Cabe mencionar que la evaluación conjunta de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio para el cultivo en CPD demostró en la mayoría de los casos, un mayor potencial antifúngico al demostrado cuando los extractos se evaluaron de manera independiente.

Cuadro 13. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos a 250 ppm de los cultivos en condiciones estáticas.

Medio de cultivo	% de inhibición del crecimiento radial			
	<i>P. capsici</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>A. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
Medio de cultivo				
CPD	17.8 ± 0.10	48.0 ± 0.02 *	25.6 ± 0.03 *	23.8 ± 0.24
CP	15.6 ± 0.07	40.0 ± 0.02 *	20.9 ± 0.07	16.7 ± 0.26
Sab	26.7 ± 0.03 *	28.0 ± 0.07 *	32.6 ± 0.09 *	26.2 ± 0.03 *
Micelio				
CPD	33.3 ± 0.05 *	34.0 ± 0.07 *	32.6 ± 0.05 *	9.5 ± 0.05
CP	71.1 ± 0.02 *	56.0 ± 0.03 *	20.9 ± 0.00	16.7 ± 0.07
Sab	0.00 ± 0.00	52.0 ± 0.07 *	39.5 ± 0.09 *	11.9 ± 0.05
Medio + Micelio				
CPD	100.0 ± 0.00 *	44.0 ± 0.03 *	65.1 ± 0.05 *	16.7 ± 0.05

* Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos establecer el siguiente orden de inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos: *Rhizoctonia* sp. >

A. solani > *P. capsici*, > *F. oxysporum*. En esta ocasión *F. oxysporum* también es la especie menos afectada.

A continuación, se procedió a determinar el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y la longitud de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus*, *E. crus-galli* y *L. esculentum*. En el Cuadro 14 se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento de la raíz para cada uno de los extractos evaluados. Los resultados obtenidos indican claramente que los extractos derivados de los cultivos de *Fusarium* sp. incubados por 15 días en V8 y Sabouraud son los más fitotóxicos, siendo aún más evidente el potencial fitotóxico sobre el crecimiento de *L. esculentum* y *E. crus-galli*. Los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD incubando el microorganismo por 30 días inhiben selectivamente el crecimiento de las semillas de *A. hypochondriacus* y el extracto del medio de cultivo obtenido a los 15 días de incubación estimula significativamente el crecimiento de *E. crus-galli*. En ningún caso se observó un efecto significativo sobre la germinación de las tres plantas de prueba.

En el Cuadro 15 se presentan los porcentajes de inhibición de los extractos obtenidos de los cultivos en condiciones estáticas, sobre el crecimiento de la raíz de las tres plantas de prueba. Los extractos obtenidos al utilizar como medio de cultivo V8 y CP no se evaluaron debido a que su rendimiento, no fue suficiente para realizar todos los bioensayos. En general, los extractos obtenidos utilizando Sabouraud, inhiben significativamente la longitud de la raíz de todas las plantas de prueba, siendo más evidente el efecto fitotóxico del extracto del medio de cultivo, sobre la longitud de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *L. esculentum*, inhibiendo su crecimiento en ambos casos más del 80%. Los extractos obtenidos con medio CPD no inhiben de manera significativa el crecimiento de las plantas modelo. Sin embargo, la mezcla del extracto del medio de cultivo y micelio, sí inhibe de manera significativa el crecimiento de *A. hypochondriacus* (35.9 %). En ningún caso se observó un efecto significativo sobre la germinación de las tres plantas de prueba.

Con base en la actividad biológica demostrada por los extractos orgánicos obtenidos del hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) incubándolo en diferentes medios, podemos establecer que los medios V8, CPD y Sabouraud son los que demostraron la mayor actividad biológica.

Estos resultados confirman que los metabolitos secundarios producidos por el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) son los responsables del potencial antagónico

demostrado por *Fusarium* sp. (LD1) en los bioensayos de antagonismo directo y que también poseen actividad biológica sobre el crecimiento de las plantas de prueba.

Cuadro 14. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos a 100 ppm de los cultivos en condiciones de agitación.

Medio de cultivo	Tiempo de incubación (días)	% de Inhibición de la longitud de la raíz		
		<i>A. hypochondriacus</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>E. crus-galli</i>
Medio de cultivo				
CPD	15	17.9 ± 0.71	9.2 ± 2.70	-30.5 ± 1.34 *
	30	46.8 ± 0.36 *	1.3 ± 4.1	5.1 ± 1.30
CP	15	ND	ND	ND
	30	14.7 ± 0.54	5.0 ± 4.60	0.5 ± 0.70
V8	15	64.3 ± 0.91 *	100 ± 0.00 *	40.6 ± 0.91 *
	30	22.0 ± 0.45	100 ± 0.00 *	13.0 ± 0.91
Sab	15	77.4 ± 0.16 *	73.2 ± 1.42 *	34.4 ± 0.72 *
	30	ND	ND	ND
Micelio				
CPD	15	21.4 ± 0.46	-1.9 ± 1.70	-18.0 ± 0.98
	30	30.3 ± 0.53 *	6.0 ± 3.20	0.5 ± 1.20
CP	15	14.3 ± 0.56	7.4 ± 2.10	-7.8 ± 0.68
	30	19.3 ± 0.96	30.0 ± 4.40 *	8.7 ± 0.60
V8	15	29.8 ± 0.65 *	73.5 ± 1.10 *	25.8 ± 1.00 *
	30	19.3 ± 0.25	16.7 ± 2.60	21.0 ± 0.25
Sab	15	78.6 ± 0.07 *	83.1 ± 0.77 *	73.4 ± 0.58 *
	30	ND	ND	ND

* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P < 0.05). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones; los números negativos indican estimulación del crecimiento; ND bioensayos no realizados por insuficiencia de extracto.

Cuadro 15. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos a 100 ppm de las cultivos en condiciones estáticas.

Medio de cultivo	Extracto	% de Inhibición de la longitud de la raíz		
		<i>A. hypochondriacus</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>E. crus-galli</i>
CPD	Medio	15.7 ± 0.6	16.6 ± 1.7	13.6 ± 2.5
	Micelio	13.3 ± 0.2	0.0 ± 0.7	7.1 ± 0.8
	Med+ Mic	34.9 ± 0.3 *	8.1 ± 3.7	-2.7 ± 1.6
Sab	Medio	80.7 ± 0.1 *	85.7 ± 0.5 *	59.2 ± 3.6 *
	Micelio	42.2 ± 0.8 *	50.8 ± 1.4 *	15.8 ± 1.9

* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P < 0.05). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones; los números negativos indican estimulación del crecimiento.

4. Cultivo en mediana escala

El hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) se cultivó en mediana escala en condiciones estáticas en V8 (10 L), CPD (20 L) y Sabouraud (5 L). En el Cuadro 16 se presenta el rendimiento de los extractos obtenidos. En todos los casos los extractos del micelio son los más abundantes, particularmente, el obtenido en CPD. En general, el rendimiento por litro de cultivo es similar al obtenido a partir de los cultivos en pequeña escala.

Cuadro 16. Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los cultivos en mediana escala.

Medio de cultivo	Condiciones (L)	Biomasa seca (g/L)	Extracto del Medio(mg/L)	Extracto del Micelio (mg/L)
V8	10	1.4	116.5	174.5
CPD	20	15.2	62.3	1620.6
Sab	5	2.8	98.5	188.9

En la Figura 17 se puede observar la comparación de los perfiles cromatográficos en CCF de los extractos obtenidos del medio de cultivo y micelio, observándose diferencias en la composición metabólica en función del medio de cultivo utilizado, principalmente en los extractos de los medios de cultivo. El extracto del medio de cultivo obtenido en medio Sabouraud presenta una mayor cantidad de compuestos polares y los extractos del micelio de los cultivos en Sabouraud y V8 comparten la mayor parte de metabolitos secundarios. En general, todos los extractos orgánicos presentan diversos metabolitos secundarios poco polares comunes a los tres cultivos. Leslie y Summerell (2006) señalan que el género *Fusarium*, produce diferentes micotoxinas o metabolitos secundarios que son comunes cuando crece en un medio de cultivo y que están ausentes o su rendimiento varía cuando la misma cepa es cultivada en otro medio. Estas diferencias en los perfiles metabólicos son las responsables del potencial antifúngico y fitotóxico demostrado por los diferentes extractos obtenidos en pequeña escala.

Posteriormente, se verificó la actividad biológica de los extractos de los cultivos en mediana escala mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba.

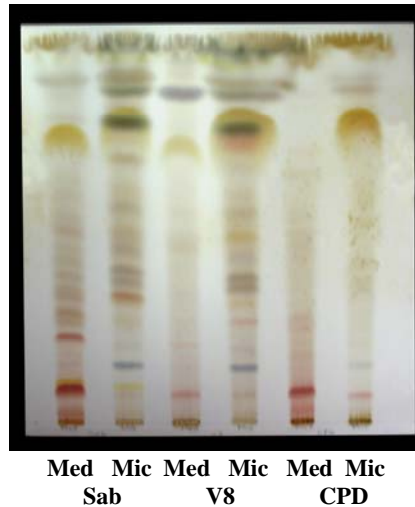


Figura 17. Cromatografía en capa fina comparativa de los extractos del medio de cultivo y micelio del endófito *Fusarium* sp., utilizando como medios de cultivo: Sabouraud, V8 y CPD. Sistema de elución: CH₂Cl₂-MeOH 95:5, revelador H₂SO₄ al 10%.

En general, los extractos orgánicos obtenidos en CPD son los únicos que presentan actividad antifúngica significativa sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba (Cuadro 17). El potencial antifúngico de estos extractos es mayor al demostrado por los obtenidos a partir de los cultivos en pequeña escala, esto puede deberse a que en este caso los cultivos se mantuvieron por un periodo de tiempo mucho mayor y es posible que bajo estas condiciones se produzca una mayor cantidad de metabolitos secundarios activos o mayor número de ellos, indicando que un periodo de incubación prolongado en condiciones estáticas favorece la obtención de extractos orgánicos bioactivos. El orden de actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos es el siguiente: *A. solani* > *Rhizoctonia* sp. > *P. capsici* y *F. oxysporum*.

Por otra parte, también se confirmó el potencial fitotóxico de los extractos obtenidos de los cultivos en mediana escala del endófito *Fusarium* sp. (LD1), mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus*, *L. esculentum*, *E. crus-galli* y *L. multiflorum*.

De nueva cuenta, los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD, presentan en general, la mayor actividad fitotóxica sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus*, *L. esculentum* y *E. crus-galli* (Cuadro 18). El potencial fitotóxico, en este caso también es mayor al demostrado por los extractos obtenidos en pequeña escala.

El extracto del medio de cultivo obtenido en V8 inhibe significativamente el crecimiento de *A. hypochondriacus* y *L. esculentum* y el del extracto del medio de cultivo en medio Sabouraud inhibe únicamente de manera significativa el crecimiento de *A. hypochondriacus*. La especie más afectada por todos los extractos evaluados es *L. esculentum*. El crecimiento de *L. multiflorum* no es afectado por ningún tratamiento.

En ningún caso se observó un efecto significativo sobre la germinación de las plantas de prueba.

Cuadro 17. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos a 250 ppm de los cultivos en mediana escala.

Medio de cultivo	Extracto	% de inhibición del crecimiento radial			
		<i>P. capsici</i>	<i>Rhizoctonia sp.</i>	<i>A. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
CPD	Medio	39.3 ± 0.02 *	41.7 ± 0.02 *	55.2 ± 0.00 *	33.3 ± 0.02 *
	Micelio	79.4 ± 0.03 *	31.9 ± 0.03 *	48.4 ± 0.01 *	15.4 ± 0.00
V8	Medio	-13.5 ± 0.02	47.3 ± 0.25 *	11.3 ± 0.09	11.4 ± 0.03
	Micelio	-20.2 ± 0.10 *	29.0 ± 0.43 *	2.9 ± 0.07	1.4 ± 0.02
Sab	Medio	4.9 ± 0.03	36.0 ± 0.21 *	15.0 ± 0.04	18.9 ± 0.05
	Micelio	2.3 ± 0.01	20.9 ± 0.14 *	23.8 ± 0.09 *	8.9 ± 0.04

* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P< 0.05). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones; los números negativos indican estimulación del crecimiento.

Cuadro 18. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos a 100 ppm de los cultivos en mediana escala.

Medio de cultivo	Extracto	% de Inhibición de la longitud de la raíz		
		<i>A. hypochondriacus</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>E. crus-galli</i>
CPD	Medio	73.0 ± 0.3 *	67.1 ± 5.7 *	40.9 ± 1.5 *
	Micelio	37.4 ± 0.6 *	36.6 ± 2.5 *	14.0 ± 4.5
		<i>A. hypochondriacus</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>L. multiflorum</i>
V8	Medio	23.9 ± 0.11 *	37.3 ± 0.06 *	18.0 ± 0.04
	Micelio	16.8 ± 0.10	38.1 ± 0.04 *	15.2 ± 0.13
Sab	Medio	39.9 ± 0.02 *	14.6 ± 0.14	-9.9 ± 0.04
	Micelio	5.9 ± 0.08	18.1 ± 0.04	10.9 ± 0.06

* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P< 0.05). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones; los números negativos indican estimulación del crecimiento.

Con base en el potencial alelopático demostrado por los extractos orgánicos obtenidos a partir de los cultivos en mediana escala, se eligió por su bioactividad y

rendimiento al extracto del micelio de *Fusarium* sp. (LD1) en CPD (Cuadros 16, 17 y 18) para realizar un fraccionamiento primario biodirigido.

5. Fraccionamiento químico biodirigido

El fraccionamiento químico biodirigido del extracto orgánico del micelio del cultivo en mediana escala de *Fusarium* sp. (LD1) se realizó en dos partes, debido a que el extracto crudo presentaba metabolitos secundarios en dos fases y con perfiles cromatográficos diferentes: una fase sólida y una fase líquida muy abundante con características oleosas.

5.1. Fraccionamiento primario de la parte líquida

Las fracciones primarias obtenidas se agruparon de acuerdo con su similitud cromatográfica en 11 grupos (Cuadro 4). En los Cuadros 19 y 20 se presenta la actividad biológica de seis fracciones primarias sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos (*P. capsici*, *Rhizoctonia* sp., *A. solani* y *F. oxysporum*) y plantas de prueba (*A. hypochondriacus*, *L. esculentum* y *L. multiflorum*), respectivamente.

Con excepción de la fracción 10 que inhibe significativamente el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. y *A. solani* y de la fracción 7 que inhibe el crecimiento de *F. oxysporum*., en general, no hay inhibición significativa sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos de prueba. Por el contrario, la fracción 6 estimula significativamente el crecimiento radial de *Rhizoctonia* sp. (Cuadro 19).

Cuadro 19. Efecto antifúngico de las fracciones primarias a 250 ppm del micelio en CPD.

Fx	% de Inhibición del crecimiento radial			
	<i>P. capsici</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>A. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
4	-2.0 ± 0.00	-11.3 ± 0.04	5.0 ± 0.03	7.1 ± 0.01
6	-0.3 ± 0.05	-27.3 ± 0.08 *	3.2 ± 0.01	15.3 ± 0.01
7	-2.8 ± 0.04	-18.3 ± 0.07	10.8 ± 0.06	33.7 ± 0.44 *
8	-2.0 ± 0.00	-11.3 ± 0.10	12.0 ± 0.03	12.4 ± 0.02
9	2.0 ± 0.03	-8.7 ± 0.03	11.7 ± 0.02	19.7 ± 0.02
10	16.0 ± 0.04	42.0 ± 0.03 *	41.1 ± 0.04 *	19.4 ± 0.03

* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P< 0.05). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones; los números negativos indican estimulación del crecimiento.

En contraste, en el Cuadro 20 se presenta la actividad biológica de las 6 fracciones primarias evaluadas, sobre el crecimiento de las plantas de prueba. En todos los casos el crecimiento de la raíz de las semillas de *L. esculentum* y *L. multiflorum* se estimuló de manera significativa por todos los tratamientos, siendo más evidente la estimulación sobre el crecimiento de las semillas de *L. esculentum*. Las fracciones primarias evaluadas no demostraron ningún efecto alelopático significativo sobre el crecimiento de *A. hypochondriacus*.

En ningún caso se observó inhibición sobre la germinación y/o el crecimiento de las plantas de prueba.

Cuadro 20. Porcentajes de estimulación del crecimiento radical de las fracciones primarias a 100 ppm sobre las semillas de prueba.

Fx	% de Estimulación de la longitud de la raíz		
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>L. multiflorum</i>
4	10.1 ± 0.07	71.2 ± 0.29 *	32.9 ± 0.21*
6	8.2 ± 0.09	61.1 ± 0.08 *	31.6 ± 0.11*
7	3.1 ± 0.09	80.8 ± 0.16 *	28.4 ± 0.09*
8	5.6 ± 0.11	58.7 ± 0.07 *	43.3 ± 0.22 *
9	8.7 ± 0.03	34.0 ± 0.05*	26.1 ± 0.18*
10	6.8 ± 0.06	41.7 ± 0.21 *	33.4 ± 0.17*

* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P< 0.05). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

5.2. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria 4 (40-70)

El fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa 4 se realizó por CCFP y permitió la obtención de 5 fracciones secundarias. El análisis por CCF de la fracción mayoritaria 4-I indicó que aparentemente estaba constituida por un metabolito secundario, sin embargo, en el Cuadro 29 se detalla el análisis por CG-EM de esta fracción, mostrando ser una mezcla compleja de compuestos.

La fracción 4-I presenta actividad antifúngica significativa sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia* sp. y *F. oxysporum*, inhibiendo su crecimiento en un 65.3 ± 0.33 y 20.3 ± 0.06 %, respectivamente. Por otra parte, el crecimiento de *P. capsici* y de *A. solani* se estimuló significativamente por la presencia de esta fracción, en un 28.9 ± 0.00 y 25.0 ± 0.00 %, respectivamente.

Con respecto a la actividad fitotóxica, los compuestos que constituyen la fracción secundaria 4-I, no demostraron actividad biológica sobre las plantas de prueba. En consecuencia, el efecto estimulante sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *L. esculentum* y *L. multiflorum* demostrado por la fracción primaria 4 (Cuadro 20) se debe probablemente a la mezcla de metabolitos secundarios presentes en las fracciones secundarias 4-II a 4-V o a la mezcla de todos ellos actuando sinérgicamente.

5.3. Fraccionamiento primario de la parte sólida

El fraccionamiento primario la fase sólida del extracto del micelio del cultivo en mediana escala, se realizó utilizando CC obteniéndose 12 grupos de fracciones primarias (Cuadro 6) y debido a que se obtuvieron bajos rendimientos en la mayoría de ellas y/o a que son muy difíciles de solubilizar en MeOH o acetona no fue posible determinar su actividad biológica.

6. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos del micelio y fracciones cromatográficas utilizando CG-EM

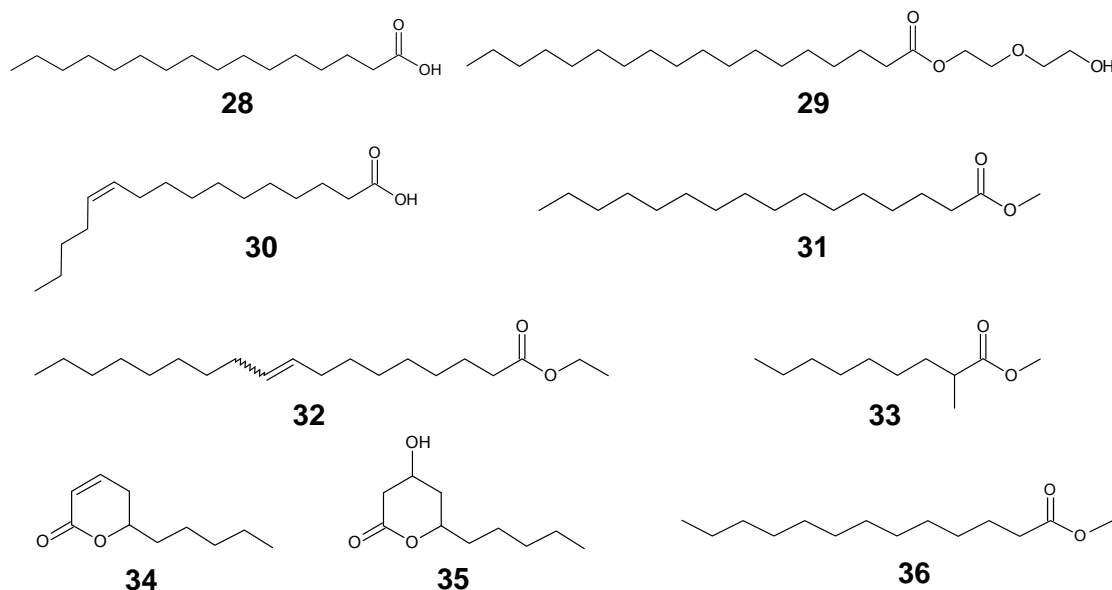
La identificación preliminar de los metabolitos secundarios presentes en el extracto activo del micelio (fase líquida y sólida) y de las fracciones primarias y secundarias activas obtenidas de la fase líquida, se realizó mediante CG-EM. La identificación de los posibles compuestos se realizó por comparación de sus espectros de masas con los de la base de datos del NIST.

En el Cuadro 21, se muestran los metabolitos secundarios presentes en la parte líquida del extracto del micelio, observándose que el endófito *Fusarium* sp. (LD1) produce una gran diversidad de compuestos entre los que destacan diferentes alcoholes, ésteres, cetonas, aldehídos, alcanos, alquenos, ácidos carboxílicos y derivados de furano y pirano. Los compuestos más abundantes son: el ácido *n*-hexadecanoico o ácido palmítico (**28**) [24.06 %], el octadecanoato de 2-(2-hidroxietoxi)etilo (**29**) [13.50 %], el ácido *Z*-11 hexadecenoico (**30**) [9.06 %] y el hexadecanoato de metilo (**31**) [8.16 %].

En el Cuadro 22 se muestran los compuestos presentes en la parte sólida del extracto del micelio, en este caso la variedad estructural comprende principalmente, ésteres, aldehídos, ácidos carboxílicos y derivados pirano. Los compuestos mayoritarios

son: el ácido *n*-hexadecanoico (**28**) [22.28 %], el 9-octadecenoato de etilo (**32**) [14.24 %], el ácido *Z*-11 hexadecenoico (**30**) [11.37 %] y el 2-metilnonanoato de metilo (**33**) [9.76 %].

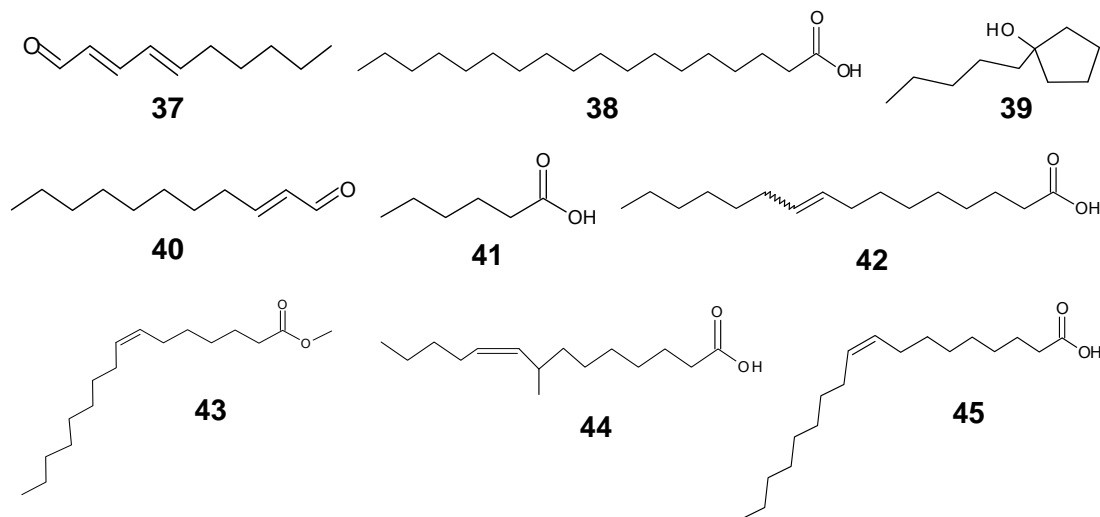
Cabe mencionar que la parte líquida y la sólida del extracto del micelio en CPD, comparten en común cinco compuestos: la 5,6-dihidro-6-pentil-2*H*-piran-2-ona (**34**), la tetrahidro-4-hidroxi-6-pentil-2*H*-piran-2-ona (**35**), el ácido *Z*-11-hexadecenoico (**30**), el ácido *n*-hexadecanoico(**28**) y el tridecanoato de metilo (**36**).



En los Cuadros 23-28 se presentan los compuestos identificados en las fracciones primarias 4 y 6-10 (parte líquida) y como es de esperarse los compuestos presentes en cada una de las fracciones incluyen diferentes, ésteres, aldehídos, ácidos carboxílicos y derivados pirano y furano entre otros.

Los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la fracción 4 son: el ácido *n*-hexadecanoico (**28**) [25.47 %], el (*E,E*)-2,4-decadienal (**37**) [23.59 %] y el ácido octadecanoico (**38**) [15.63 %]. En la fracción 6 los compuestos más abundantes son: el ácido *n*-hexadecanoico (**28**) [13.45%], el 1-propil-1-ciclopentanol (**39**) [8.24%], el 2-undecenal (**40**) [7.74 %] y el ácido hexanoico (**41**) [7.44 %]. En la fracción 7 son: el ácido *n*-hexadecanoico (**28**) [24.95 %], el ácido 9-hexadecenoico (**42**) [23.19 %] y el ácido octadecanoico (**38**) [20.62 %]. En la fracción 8 son: el ácido 9-hexadecenoico (**42**) [52.94 %], el ácido octadecanoico (**38**) [13.20 %] y el (*Z*)-7-hexadecenoato de metilo (**43**) [12.49 %]. En la fracción 9 son: el ácido *n*-hexadecanoico (**28**) [29.96 %], el ácido *Z*-8-metil-9-tetradecenoico (**44**) [23.18 %], ácido *cis*-9-octadecenoico o ácido oléico (**45**)

[22.14 %] y el octadecanoato de 2-(2-hidroxietoxi)etilo (**29**) [13.30 %]. Finalmente, los compuestos mayoritarios en la fracción 10 son: el ácido *n*-hexadecanoico (**28**) [20.31 %], el 5,6-dihidro-6-pentil-2*H*-piran-2-ona (**34**) [15.41 %] y el ácido hexanoico (**41**) [10.02 %].

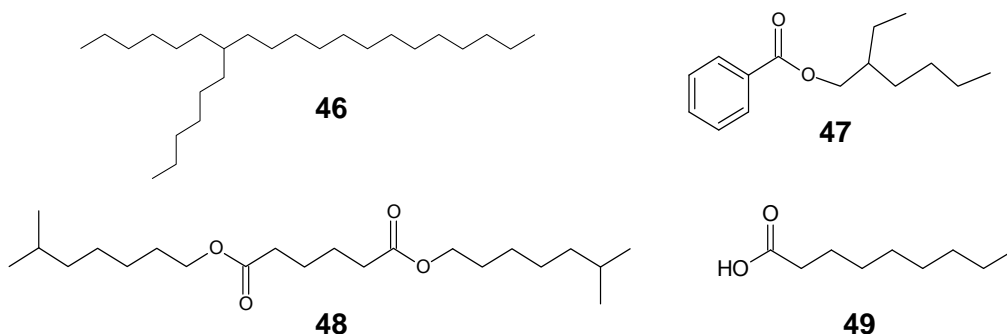


El extracto total del micelio en mediana escala en CPD, demostró un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento radial de *P. capsici* (79.4 %), *Rhizoctonia* sp. (31.9 %) y *A. solani* (48.4 %). Sin embargo, en general las fracciones primarias de la parte líquida no presentan efecto antifúngico significativo sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba. Por el contrario, la fracción 6 estimula significativamente el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. Por otra parte, el extracto total del micelio presentó efecto fitotóxico significativo sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* (37.4 %) y *L. esculentum* (36.6 %). No obstante, la actividad biológica de las fracciones primarias de la parte líquida, sobre el crecimiento de las plantas de prueba también es un efecto estimulante sobre su crecimiento. Estas observaciones en conjunto, indican que el potencial antagónico evidenciado por el extracto total del micelio, sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba, es debido principalmente a los metabolitos secundarios presentes en la fase sólida y/o fracciones primarias o bien a los compuestos que no volatilizaron en el análisis por CG-EM y que no han sido identificados a la fecha. En consecuencia, es necesario realizar un nuevo cultivo a una mayor escala (60-80 L) con el fin de aislar y caracterizar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antifúngica y fitotóxica demostrada.

Cabe hacer notar que dentro de los compuestos mayoritarios presentes en las diferentes fracciones primarias analizadas (fase líquida) la mayoría de ellos son ácidos

carboxílicos, los cuales pueden ser los responsables del efecto estimulante sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *L. esculentum* y *L. multiflorum*.

Finalmente, en el Cuadro 29 se presentan los metabolitos secundarios presentes en la fracción secundaria 4-I. Los compuestos mayoritarios en esta fracción son: el 7-hexileicosano (**46**) [11.29 %], el 1,3-bencendicarboxilato de *bis*-2-etilhexilo (**47**) [9.95 %], el hexandioato de diisooctilo (**48**) [8.93 %] y el ácido *cis*-9-octadecenoico ó ácido oléico (**45**) [8.22 %]. La mayoría de los compuestos son ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas y aldehídos.



La fracción 4-I presenta actividad antifúngica significativa sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia* sp. (65.3 %) y *F. oxysporum* (20.3 %). También demostró estimulación significativa sobre el crecimiento de *P. capsici* (28.9 %) y *A. solani* (25.0 %). Sin embargo, la actividad biológica de los constituyentes de la fracción secundaria 4-I sobre el crecimiento de las plantas de prueba no es significativa. Confirmando nuevamente, que el efecto alelopático demostrado por la fracción primaria 4 se debe posiblemente, como ya se mencionó, a la mezcla de metabolitos secundarios presentes en las demás fracciones secundarias o a la mezcla de ellos en diferentes concentraciones y probablemente actuando de manera sinérgica.

Cabe mencionar que este tipo de compuestos han sido aislados a partir de diferentes fuentes naturales, así por ejemplo el hongo endófito *Trichoderma hartzium*, aislado de *Theobroma cacao* produce ácido nonanoico (**49**), el cual inhibe *in vitro* a los patógenos *Crinipellis perniciosa* y *Moniliophthora rorei* de su hospedera. En otros experimentos se demostró que las semillas inoculadas con *T. hartzium* contiene ácido nonanoico (**49**) en sus tejidos indicando que este compuesto es producido de manera importante por el endófito (Herre, *et al.*, 2007).

Cuadro 21. Metabolitos secundarios presentes en la fase líquida del extracto del micelio de *Fusarium* sp. (LD1) en CPD.

Posible compuesto	Área %	R.T. (s)	PM	Fórmula
1-metoxi-2-metil-3-buteno	0.20	348.1	100	C ₆ H ₁₂ O
2-heptanona	0.13	128.7	114	C ₇ H ₁₄ O
Heptanal	0.25	133.9	114	C ₇ H ₁₄ O
Octanal	0.38	180.0	128	C ₈ H ₁₆ O
2-butiltetrahidrofurano	3.58	224.2	128	C ₈ H ₁₆ O
Ácido heptanoico	0.18	235.5	130	C ₇ H ₁₄ O ₂
3,4-dimetil-3-hexanol	0.44	413.9	130	C ₈ H ₁₈ O
2-pentilfurano	0.66	173.1	138	C ₉ H ₁₄ O
Nonanal	2.32	227.4	142	C ₉ H ₁₈ O
Ácido octanoico	0.28	277.5	144	C ₈ H ₁₆ O ₂
(Z)-2-decenal	2.77	297.9	154	C ₁₀ H ₁₈ O
3-decin-2-ol	0.18	345.0	154	C ₁₀ H ₁₈ O
3,6-dimetil-4-octanona	0.10	172.1	156	C ₁₀ H ₂₀ O
2,4,6-trimetiloctano	0.13	176.1	156	C ₁₁ H ₂₄
Octanoato de metilo	0.31	234.9	158	C ₉ H ₁₈ O ₂
(E)-5-metil-4-undeceno	1.98	294.0	168	C ₁₂ H ₂₄
2-undecenal	3.58	339.8	168	C ₁₁ H ₂₀ O
5,6-dihidro-6-pentil-2H-Piran-2-ona *	1.02	385.6	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂
Ácido 9-oxononanoico	2.79	402.1	172	C ₉ H ₁₆ O ₃
Ácido 8-clorodecanoico	3.64	206.7	178	C ₁₀ H ₁₉ ClO ₂
2-(bromometil)tetrahidro-2H-pirano	0.79	298.4	178	C ₆ H ₁₁ BrO
Butanoato de (E)-3-metil-2-hexenilo	2.26	342.9	184	C ₁₁ H ₂₀ O ₂
9-oxononanoato de metilo	0.49	367.1	186	C ₁₀ H ₁₈ O ₃
Tetrahidro-4-hidroxi-6-pentil-2H-piran-2-ona *	0.85	476.5	186	C ₁₀ H ₁₈ O ₃
2-nitro-4-nonanol	0.25	188.3	189	C ₉ H ₁₉ O ₃ N
4-cloro-3-n-hexiltetrahidropirano	2.67	333.2	204	C ₁₁ H ₂₁ ClO
Tetrahidro-6-nonil-2H-piran-2-ona	0.28	595.9	226	C ₁₄ H ₂₆ O ₂
Tridecanoato de metilo *	3.81	591.0	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Hexacloroetano	0.40	212.8	234	C ₂ Cl ₆
Ácido pentadecanoico	1.23	489.1	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
Ácido 9-hexadecenoico	0.69	587.0	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Ácido Z-11-hexadecenoico *	9.06	604.4	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Ácido n-hexadecanoico o ác. palmítico *	24.06	558.6	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
(Z)-7-hexadecenoato de metilo	3.51	583.7	268	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
Hexadecanoato de metilo	8.16	533.2	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
Pentadecanoato de etilo	1.32	552.3	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
Eicosanoato de etilo	1.38	608.9	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
Octadecanoato de 2-(2-hidroxietoxi)etilo	13.50	611.5	372	C ₂₂ H ₄₄ O ₄

* Compuestos presentes también en la fase sólida del extracto del micelio de *Fusarium* sp.

Cuadro 22. Metabolitos secundarios presentes en la fase sólida del extracto del micelio de *Fusarium* sp. (LD1) en CPD.

Posible compuesto	Área %	R.T. (s)	PM	Fórmula
5,6-dihidro-6-pentil-2 <i>H</i> -piran-2-ona *	0.03	385.5	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂
Tetrahidro-4-hidroxi-6-pentil-2 <i>H</i> -piran-2-ona *	0.24	475.3	186	C ₁₀ H ₁₈ O ₃
2-metilnonanoato de metilo	9.76	552.0	186	C ₁₁ H ₂₂ O ₂
Farnesol (isómero a)	0.08	755.5	222	C ₁₅ H ₂₆ O
Tridecanoato de metilo *	3.64	590.0	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Ácido <i>Z</i> -11-hexadecenoico *	11.37	603.4	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Ácido <i>n</i> -hexadecenoico o ác. palmítico *	22.28	553.0	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
9,12-octadecadienal	8.74	601.9	264	C ₁₈ H ₃₂ O
Ácido octadecanoico	8.85	608.3	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
9,12-octadecadienoato de metilo	5.66	581.2	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
11-octadecenoato de metilo	5.84	583.1	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
9-octadecenoato de etilo	14.24	601.1	310	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
Pentadecanoato de 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etilo	0.35	635.7	316	C ₁₈ H ₃₄ O ₄
1-iodo-tetradecano	0.08	458.9	324	C ₁₄ H ₂₉ I
Octadecanoato de 2-(2-hidroxietoxi)etilo	8.85	608.5	372	C ₂₂ H ₄₄ O ₄

* Compuestos presentes también en la fase líquida del extracto del micelio de *Fusarium* sp.

Cuadro 23. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 4 (fase líquida) del extracto del micelio de *Fusarium* sp. (LD1) en CPD.

Posible compuesto	Área %	R.T. (s)	PM	Fórmula
1-metoxi-2-metil-3-buteno	6.32	347.8	100	C ₆ H ₁₂ O
Nonanal	3.64	226.6	142	C ₉ H ₁₈ O
(<i>E,E</i>)-2,4-decadienal	23.59	321.6	152	C ₁₀ H ₁₆ O
(<i>Z</i>)-2-decenal	5.94	297.0	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Hexacloroetano	7.02	212.4	234	C ₂ Cl ₆
Ácido <i>Z</i> -11-hexadecenoico	8.57	598.7	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	25.47	550.0	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
9-octadecenal	3.81	679.5	266	C ₁₈ H ₃₄ O
Ácido octadecanoico	15.63	605.1	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂

Cuadro 24. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 6 (fase líquida) del extracto del micelio de *Fusarium* sp. (LD1) en CPD.

Posible compuesto	Área %	R.T. (s)	PM	Fórmula
Ácido butanoico	0.03	149.7	88	C ₄ H ₈ O ₂
1-metoxi-2-metil-3-buteno	0.20	347.5	100	C ₆ H ₁₂ O
5-aminopentanol	1.09	297.4	103	C ₅ H ₁₃ NO
Heptanal	0.43	133.7	114	C ₇ H ₁₄ O
5-etildihidro-2(3 <i>H</i>)-furanona	0.43	206.9	114	C ₆ H ₁₀ O ₂
3-metoxi-1-hexeno	0.55	227.9	114	C ₇ H ₁₄ O
4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	2.73	109.4	116	C ₆ H ₁₂ O ₂
Ácido hexanoico	7.44	203.3	116	C ₆ H ₁₂ O ₂
Octanal	0.51	179.6	128	C ₈ H ₁₆ O
2-butiltetrahidrofurano	3.64	223.2	128	C ₈ H ₁₆ O
1-propil-1-ciclopentanol	8.24	341.5	128	C ₈ H ₁₆ O
Ácido heptanoico	3.38	233.3	130	C ₇ H ₁₄ O ₂
3,4-dimetil-3-hexanol	3.22	411.1	130	C ₈ H ₁₈ O
2-pentilfuranol	1.28	172.7	138	C ₉ H ₁₄ O
4,4,6-trimetil-2-ciclohexen-1-ol	7.08	332.1	140	C ₉ H ₁₆ O
Nonanal	3.95	226.5	142	C ₉ H ₁₈ O
Ácido octanoico	0.15	274.9	144	C ₈ H ₁₆ O ₂
(<i>E,E</i>)-2,4-decadienal	0.88	321.9	152	C ₁₀ H ₁₆ O
(<i>E</i>)-2-decenal	1.15	290.4	154	C ₁₀ H ₁₈ O
(<i>Z</i>)-2-decenal	3.98	296.9	154	C ₁₀ H ₁₈ O
3-metil-4-nonanona	0.63	171.6	156	C ₁₀ H ₂₀ O
3- <i>n</i> -propil-5-metilhexan-2-ona	0.41	403.0	156	C ₁₀ H ₁₇ O
Ácido nonanoico	1.17	314.7	158	C ₉ H ₁₈ O ₂
2-undecenal	7.74	338.8	168	C ₁₁ H ₂₀ O
5,6-dihidro-6-pentil-2 <i>H</i> -piran-2-ona	0.36	385.3	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂
6,7-dodecanediona	0.66	209.4	198	C ₁₂ H ₂₂ O ₂
<i>E</i> -2-octenoato de <i>E</i> -2-hexenilo	0.62	397.3	224	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
Tridecanoato de metilo	2.50	531.1	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Hexacloroetano	1.60	212.3	234	C ₂ Cl ₆
Ácido <i>Z</i> -11-hexadecenoico	4.08	599.1	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	13.45	550.7	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
10-[(tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)oxi]-1-decanol	0.48	585.3	258	C ₁₅ H ₃₀ O ₃
2-(2-propenoiloxi)tetradecano	4.46	293.0	268	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
(<i>Z</i>)-7-hexadecenoato de metilo	1.15	581.9	268	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
Pentadecanoato de 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etilo	1.55	635.1	316	C ₁₈ H ₃₄ O ₄
Hexadecanoato de 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etilo	3.47	692.6	330	C ₁₉ H ₃₆ O ₄
Octadecanoato de 2-(2-hidroxietoxi)etilo	3.58	605.5	372	C ₂₂ H ₄₄ O ₄
9,12-octadecadienoato de (<i>Z,Z</i>)-, 2-(acetiloxi)- 1-[(acetiloxi)metil]etilo	1.72	946.7	438	C ₂₅ H ₄₂ O ₆

Cuadro 25. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 7 (fase líquida) del extracto del micelio de *Fusarium* sp. (LD1) en CPD.

Posible compuesto	Área %	R.T. (s)	PM	Fórmula
1-metoxi-2-metil-3-buteno	2.56	348.1	100	C ₆ H ₁₂ O
4-metil-3-hexanona	4.31	342.0	114	C ₆ H ₁₁ O
Ácido hexanoico	0.46	191.9	116	C ₆ H ₁₂ O ₂
Tetrahidro-1,3-oxazin-2-tiona	0.02	683.2	117	C ₄ H ₇ NOS
2-butiltetrahidrofurano	0.50	223.5	128	C ₈ H ₁₆ O
2,2'-bi-1,3-dioxolano	0.53	481.7	146	C ₆ H ₉ O ₄
(<i>E,E</i>)-2,4-decadienal	2.12	322.1	152	C ₁₀ H ₁₆ O
(<i>Z</i>)-2-decenal	0.95	296.7	154	C ₁₀ H ₁₈ O
2-decen-1-ol	1.36	226.5	156	C ₁₀ H ₂₀ O
2-undecenal	1.89	338.7	168	C ₁₁ H ₂₀ O
2-oxononanoato de metilo	0.17	830.5	186	C ₁₀ H ₁₈ O ₃
Tridecanoato de metilo	4.43	588.9	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Hexacloroetano	4.32	212.2	234	C ₂ Cl ₆
Ácido 9-hexadecenoico	23.19	599.6	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	24.95	550.2	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
(<i>Z</i>)-7-hexadecenoato de metilo	2.27	581.8	268	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
5-acetoxipentadecano	0.15	685.4	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
Ácido octadecanoico	20.62	606.2	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Hexadecanoato de 2,3-dihidroxi-propilo	4.81	635.0	330	C ₁₉ H ₃₈ O ₄
9-octadecenoato de (<i>Z</i>)-, 2-(acetiloxi)-1-[(acetiloxi)metil]etilo	0.40	679.4	440	C ₂₅ H ₄₄ O ₆

Cuadro 26. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 8 (fase líquida) del extracto del micelio de *Fusarium* sp. (LD1) en CPD.

Posible compuesto	Área %	R.T. (s)	PM	Fórmula
(<i>E,E</i>)-2,4-decadienal	0.58	321.5	152	C ₁₀ H ₁₆ O
Ácido 9-oxononanoico	0.67	398.1	172	C ₉ H ₁₆ O ₃
Tetrahidro-4-hidroxi-6-pentil-2 <i>H</i> -piran-2-ona	0.54	475.0	186	C ₁₀ H ₁₈ O ₃
Tridecanoato de metilo	7.23	532.0	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Ácido 9-hexadecenoico	52.94	608.3	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	7.59	557.4	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
(<i>Z</i>)-7-Hexadecenoato de metilo	12.49	583.6	268	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
Ácido octadecanoico	13.20	612.3	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
9,12-octadecadienoato de metilo	4.61	581.2	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
<i>Trans</i> -2-undecilciclopropanopentanoato de metilo	0.15	524.9	310	C ₂₀ H ₃₈ O ₂

Cuadro 27. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 9 (fase líquida) del extracto del micelio de *Fusarium* sp. (LD1) en CPD.

Posible compuesto	Área %	R.T. (s)	PM	Fórmula
2,3-dihidro-4-metilfurano	0.80	332.6	84	C ₅ H ₈ O
Metoxiciclobutano	0.04	384.8	86	C ₅ H ₁₀ O
Fosfolano	0.25	349.6	88	C ₆ H ₁₅ O ₄ P
2-piperidinona	0.09	282.9	99	C ₅ H ₉ NO
2(5 <i>H</i>)-tiofenona	0.08	403.5	100	C ₄ H ₄ OS
Hidrazida del ácido butírico	0.02	325.8	102	C ₄ H ₉ N ₂ O
<i>N,N,N'</i> -trimetil-1,2-etanodiamina	0.09	398.8	102	C ₅ H ₁₄ N ₂
3-etil-1,4-hexadieno	0.21	459.1	110	C ₈ H ₁₄
Ácido hexanoico	0.21	197.5	116	C ₆ H ₁₂ O ₂
1-propil-1-ciclopentanol	0.19	342.2	128	C ₈ H ₁₆ O
2-pentilfurano	0.15	173.1	138	C ₉ H ₁₄ O
Nonanal	0.03	226.9	142	C ₉ H ₁₈ O
Ácido octanoico	0.12	278.5	144	C ₈ H ₁₆ O ₂
2-butil-4-metil-1,3-dioxolano	0.09	331.9	144	C ₈ H ₁₆ O ₂
Ácido propilpropanedioico	0.12	234.9	146	C ₆ H ₁₀ O ₄
(<i>E,E</i>)-2,4-decadienal	0.04	322.1	152	C ₁₀ H ₁₆ O
(<i>Z</i>)-2-decenal	0.39	297.3	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Octanoato de metilo	0.12	234.6	158	C ₉ H ₁₈ O ₂
Ácido nonanoico	0.04	314.0	158	C ₉ H ₁₈ O ₂
Isotiocianato de benzoilo	0.10	621.4	163	C ₈ H ₅ NOS
5,6-dihidro-6-pentil-2 <i>H</i> -piran-2-ona	0.17	385.5	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂
Ácido 9-oxononanoico	0.62	402.9	172	C ₉ H ₁₆ O ₃
(<i>E</i>)-2-dodecenal	0.10	339.2	182	C ₁₂ H ₂₂ O
Nonanoato de metilo	0.25	366.8	186	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
Tetrahidro-4-hidroxi-6-pentil-2 <i>H</i> -piran-2-ona	0.04	475.8	186	C ₁₀ H ₁₈ O ₃
Nonanedioato de monometilo	0.03	434.2	202	C ₁₀ H ₁₈ O ₄
Tridecanoato de metilo	0.27	468.2	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Ácido tetradecanoico	0.65	490.6	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
1,1-dimetoxi dodecano	0.20	448.6	230	C ₁₄ H ₃₀ O ₂
Hexacloroetano	0.10	212.8	234	C ₂ Cl ₆
ácido <i>Z</i> -8-metil-9-tetradecenoico	23.18	607.7	240	C ₁₅ H ₂₈ O ₂
Ácido pentadecanoico	0.05	519.5	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
1-propilheptil etilfosfonofluoridato	0.08	341.6	252	C ₁₂ H ₂₆ FO ₂ P
Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	29.96	562.5	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
(<i>Z</i>)-7-hexadecenoato de metilo	4.08	583.7	268	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
Ácido oléico o ácido <i>cis</i> -9-octadecenoico	22.14	607.4	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
9,12-octadecadienoato de metilo	0.72	581.4	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
trans-ciclopropanopentanoato de 2-undecilmetilo	0.43	525.3	310	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
Pentadecanoato de 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etilo	0.11	636.1	316	C ₁₈ H ₃₄ O ₄
4,5- <i>bis</i> -dimetoximetil-octanedioato de dimetilo	0.35	425.1	350	C ₁₄ H ₂₆ O ₈
Octadecanoato de 2-(2-hidroxietoxi)etilo	13.30	612.0	372	C ₂₂ H ₄₄ O ₄

Cuadro 28. Metabolitos secundarios presentes en la fracción 10 (fase líquida) del extracto del micelio de *Fusarium* sp. (LD1) en CPD.

Posible compuesto	Área %	R.T. (s)	PM	Fórmula
2-piperidinona	0.47	291.8	99	C ₅ H ₉ NO
<i>N,N,N'</i> -trimetil-1,2-etanodiamina	3.73	384.7	102	C ₅ H ₁₄ N ₂
1-hidroxi-2-pentanona	0.03	511.4	102	C ₅ H ₁₀ O ₂
2,4-dimetil-1-penten-3-ona	1.34	133.8	112	C ₇ H ₁₂ O
<i>Cis</i> -2-butil-3-metil-oxirano	1.21	290.8	114	C ₇ H ₁₄ O
Ácido hexanoico	10.02	201.6	116	C ₆ H ₁₂ O ₂
<i>Trans</i> -tetrahidro-5-metil-2-furanmetanol	0.04	339.9	116	C ₆ H ₁₂ O ₂
Ácido heptanoico	1.84	236.2	130	C ₇ H ₁₄ O ₂
Ácido 5-hidroxi-2-hexenoico	0.45	444.2	130	C ₆ H ₁₁ O ₃
Sulfuro de dimetilaminometilisopropilo	0.46	398.2	133	C ₁₀ H ₁₆ NS
2-pentilfuran	2.02	172.3	138	C ₉ H ₁₄ O
(<i>E</i>)-4-nonenal	4.45	223.0	140	C ₉ H ₁₆ O
(<i>Z</i>)-2-nonenal	1.31	246.0	140	C ₉ H ₁₆ O
4,4,6-trimetil-ciclohex-2-en-1-ol	1.70	331.8	140	C ₉ H ₁₆ O
1-butil-5-metil-2-pirazolina	0.25	374.0	140	C ₈ H ₁₆ N ₂
Nonanal	1.63	226.1	142	C ₉ H ₁₈ O
Ácido octanoico	0.72	279.0	144	C ₈ H ₁₆ O ₂
5,6-dihidro-6-pentil-2 <i>H</i> -piran-2-ona	15.41	385.5	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂
3-hidroxi-2-metilen-butanoato de butilo	0.67	381.3	172	C ₉ H ₁₆ O ₃
Ácido 9-oxononanoico	2.71	401.6	172	C ₉ H ₁₆ O ₃
Ácido 8-clorodecanoico	1.15	383.8	178	C ₁₀ H ₁₉ ClO ₂
11-dodecen-2-ona	0.21	459.8	182	C ₁₂ H ₂₂ O
2-dodecanona	0.38	308.2	184	C ₁₂ H ₂₄ O
Tetrahidro-4-hidroxi-6-pentil-2 <i>H</i> -piran-2-ona	4.65	477.0	186	C ₁₀ H ₁₈ O ₃
1,12-dodecanodiamina	2.19	441.0	200	C ₁₂ H ₂₈ N ₂
4-metil-3,6-diisopropil-2,5-dicetomorfolina	2.29	407.8	213	C ₁₁ H ₁₉ NO ₃
4-metil-3-(2-metilpropil)-6-isopropil-2,5-dioxomorfolina	2.46	432.9	227	C ₁₂ H ₂₁ NO ₃
Ácido tetradecanoico	1.09	489.3	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Tridecanoato de metilo	1.18	531.1	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
1,1-dimetoxidodecano	1.25	448.6	230	C ₁₄ H ₃₀ O ₂
Ácido <i>Z</i> -11-hexadecenoico	5.07	600.9	254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	20.31	554.6	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Pentandioato de 3-metildibutilo	1.31	464.5	258	C ₁₅ H ₂₈ O ₄
Ácido octadecanoico	5.61	607.4	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Octadecanoato de metilo	0.26	589.3	298	C ₉ H ₁₈ O ₂
2-(3-bromo-5,5,5-tricloro-2,2-dimetilpentil)-1,3-dioxolano	0.10	481.5	352	C ₁₀ H ₁₆ BrCl ₃ O ₂

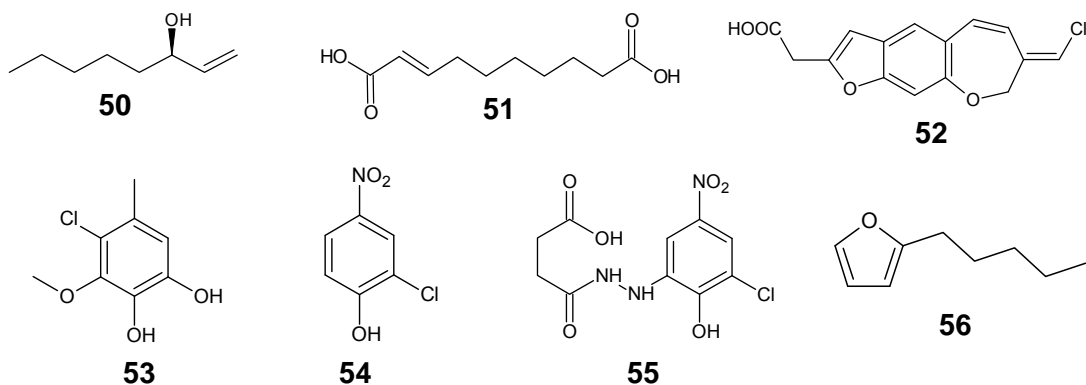
Cuadro 29. Metabolitos secundarios presentes en la fracción secundaria 4-I (fase líquida) del extracto del micelio de *Fusarium* sp. (LD1) en CPD.

Posible compuesto	Area %	R.T. (s)	PM	Fórmula
(Z)-2-heptenal	3.42	104.8	112	C ₇ H ₁₄ O
3-hexene-2,5-diol	0.35	109.1	116	C ₆ H ₁₂ O ₂
1-octen-3-ol	0.09	110.6	128	C ₈ H ₁₆ O
2-etil-1-hexanol	2.42	122.2	130	C ₈ H ₁₈ O
Nonanal	1.13	140.3	142	C ₉ H ₁₈ O
Ácido octanoico	0.72	161.6	144	C ₈ H ₁₆ O ₂
(E,E)-2,4-decadienal	5.75	190.2	152	C ₁₀ H ₁₆ O
(Z)-2-decenal	3.95	177.1	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Ácido nonanoico	0.94	182.4	158	C ₉ H ₁₈ O ₂
2-undecenal	0.54	198.8	168	C ₁₁ H ₂₀ O
3-metilheptil acetato	0.69	149.1	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
2-metil-dodecano	1.55	260.4	184	C ₁₃ H ₂₈
Ácido dodecanoico	5.95	240.4	200	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
Hidroxitolueno butilado	0.69	226.3	220	C ₁₅ H ₂₄ O
(Z)-2-butenedioato de dibutilo	2.32	231.4	228	C ₁₂ H ₂₀ O ₄
Ácido tetradecanoico	0.76	273.8	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Tridecanoato de metilo	0.43	297.5	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Ácido n-hexadecanoico	7.69	306.2	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
2,6-dimetilheptadecano	1.96	323.3	268	C ₁₉ H ₄₀
Dibutil ftalato	0.78	373.5	278	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Eicosano	0.91	293.3	282	C ₂₀ H ₄₂
Ácido cis-9-octadecenoico ó ácido oléico	8.22	332.1	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
2-metil-propanoato de 1-(1,1-dimetiletíl)-2-metil-1,3-propanedieilo	0.82	241.3	286	C ₁₅ H ₂₈ O ₄
Metoxiacetato de 3-tetradecilo	2.85	506.6	286	C ₁₇ H ₃₄ O ₃
1,2-bencendicarboxilato de butil ciclohexilo	1.79	467.1	304	C ₁₈ H ₂₄ O ₄
Hexadecanoato de 1,1-dimetiletilo	3.00	335.9	312	C ₁₉ H ₄₀ O ₂
2,4-bis(1-metil-1-feniletíl)-fenol	1.69	380.3	330	C ₂₄ H ₂₆ O
(Z)-2-butendiato de di-2-etilhexilo	1.31	329.6	340	C ₂₀ H ₃₆ O ₄
7-hexileicosano	11.29	412.4	366	C ₂₆ H ₅₄
Hexandioato de diisooctilo	8.93	363.2	370	C ₂₂ H ₄₂ O ₄
2,4-bis(dimetilbenzil)-6-t-butilfenol	1.58	379.5	386	C ₂₆ H ₃₀ O
1,3-bencendicarboxilato de bis-2-etilhexilo	9.95	406.6	390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
1,2,3-propantricarboxilato de 2-(acetiloxi)-tributilo	0.70	344.2	402	C ₂₀ H ₃₄ O ₈
11-deciltetracosano	4.82	459.7	478	C ₃₄ H ₇₀

El (3*R*)-1-octen-3-ol (**50**), se ha encontrado en muchos hongos (*Basidiomycota*) y es responsable del olor típico de los cuerpos fructíferos frescos. Este alcohol junto con el ácido (8*E*)-10-oxo-8-decenoico (**51**) presentan actividad antifúngica sobre *Penicillium expansum* (Spiteller, 2008).

Spiteller (2008) reporta que algunos basidiomicetos (hongos macroscópicos) producen metabolitos secundarios halogenados. Este tipo de compuestos han sido obtenidos tanto de los cuerpos fructíferos como del micelio y poseen diversas actividades biológicas. Así por ejemplo, el ácido pterulínico (**52**) [compuesto clorado] aislado de diversos basidiomicetos, demostró actividad fungicida; el alcalinafenol A (**53**) [un polifenol clorado] aislado del micelio de *Mycelia alcalina* y de otros basidiomicetos, tiene propiedades antifúngicas; el 2-cloro-4-nitrofenol (**54**) aislado *Stephanospora caroticolor*, también presenta propiedades antifúngicas. Los cuerpos fructíferos intactos de *S. caroticolor* producen la estefanosporina (**55**) un precursor del 2-cloro-4-nitrofenol (**54**), sin embargo, por medio de un mecanismo de defensa química, activado por heridas, la estefanosporina (**55**) se oxida a 2-cloro-4-nitrofenol (**54**).

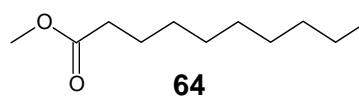
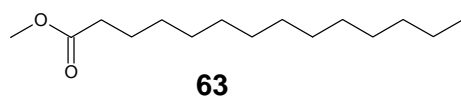
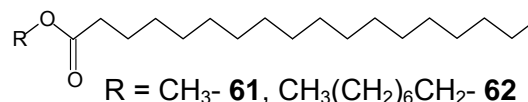
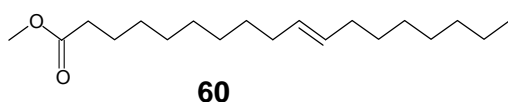
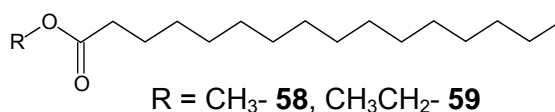
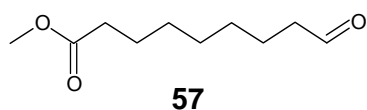
El 2-pentilfurano (**56**) es uno de los compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito *Muscodor albus*, aislado de *Cinnamomum zeylanicum*. La mezcla de compuestos volátiles producidos por este hongo es letal para una amplia variedad de hongos y bacterias patógenas de plantas y del humano, también tienen efecto contra ciertos insectos y nemátodos (Strobel *et al.*, 2001; Strobel, 2006a, b; Ezra *et al.*, 2004).



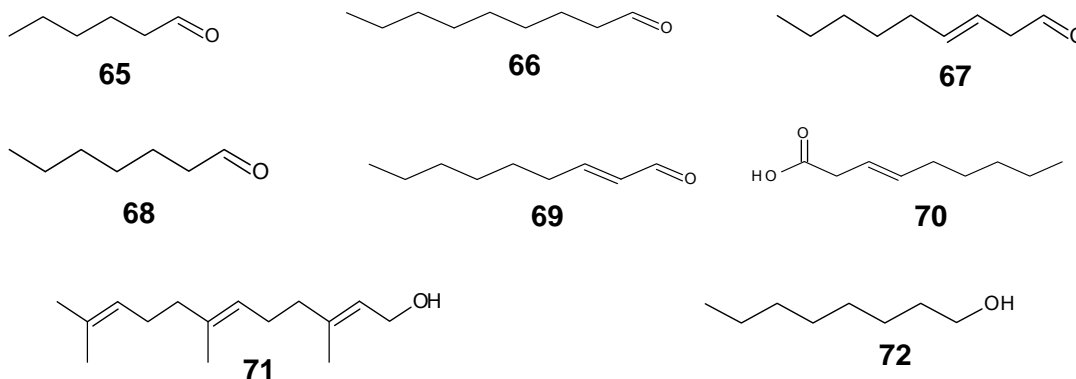
Es importante señalar que varios de los posibles compuestos identificados en el extracto del micelio del hongo endófito *Fusarium sp.* (LD1), podrían ser compuestos orgánicos volátiles que pueden actuar a distancia sobre los organismos blanco, en

consecuencia, posteriormente se determinará si *Fusarium* sp. (LD1) también produce metabolitos volátiles bioactivos (Strobel *et al.*, 2001; Strobel, 2006a, b; Ezra *et al.*, 2004).

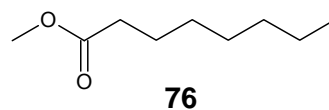
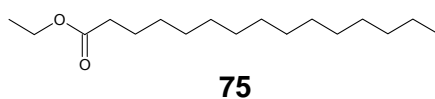
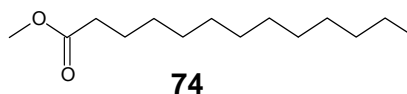
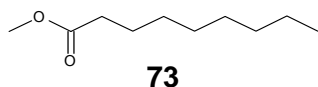
Por otra parte, estudios realizados sobre diferentes especies vegetales también han demostrado que este tipo de compuestos presentan diversas actividades biológicas, así por ejemplo Monroy-Vázquez y colaboradores (2009) encontraron que el extracto metanólico de frutos de chayote *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*, presentan actividad antiproliferativa y citotóxica sobre las líneas tumorales L-929 y HeLa. Los compuestos mayoritarios de la fracción de mayor actividad son ésteres metílicos, etílicos y/o octílicos del los ácidos 9-oxo-nonanoico (**57**), hexadecanoico (**58**, **59**), 10-octadecenoico (**60**) y octadecanoico (**61**, **62**). Se sabe que altas concentraciones de ésteres de ácidos grasos causan muerte celular por apoptosis, y cuando las concentraciones se incrementan, la muerte celular ocurre por necrosis (Kharroubi *et al.*, 2004; Benzaria *et al.*, 2007; Takeara *et al.*, 2007). Diversos autores han demostrado que algunos ácidos grasos, principalmente los insaturados, son tóxicos sobre varias líneas celulares tumorales humanas como son el cáncer de próstata, pecho, vejiga, pulmón y sobre la leucemia. Los ácidos grasos C-18 (**38**) a una concentración de 10 µg/mL inhiben la proliferación celular en un 99.4 % de líneas celulares cancerígenas de rata. Los ácidos grasos palmítico (**28**) y (*Z*)-9-octadecenoico (**45**) tienen propiedades apoptóticas en líneas tumorales de colon, debido a que provocan daño en el DNA e interfieren en la activación de la caspasa-3 (Monroy-Vázquez *et al.*, 2009). Tso *et al.* (1965) encontró que los ésteres de los ácidos grasos con cadena C-6 a C-18 inhiben yemas axilares (brotes) en el tabaco, las cuales pueden ser causadas por bacterias (fitoplasmas). Siendo los más activos los ésteres metílicos de ácidos grasos con C-14 (**63**) y C-10 (**64**). También se ha encontrado que algunos presentan propiedades herbicidas.



Se ha visto que el aceite esencial de *Pimenta auritum*, presenta actividad antidermatofítica *in vitro*, donde el ácido hexadecanoico (**28**) es uno de los componentes principales (Hernández Díaz *et al.*, 2003). Las cetonas y aldehídos como el hexanal (**65**), nonanal (**66**), 3-nonenal (**67**), heptanal (**68**), 2-nonenal (**69**) y los ácidos carboxílicos como son el hexanoico (**41**), nonanoico (**49**) y 3-nonenoico (**70**) son los componentes volátiles presentes en el aceite de girasol ozonizado, el cual se utiliza como medicamento, actuando como agente germicida de amplio espectro y muy efectivo sobre procesos infecciosos producidos por virus, bacterias, parásitos y hongos (Ledea Lozano, 2004). El 5,6-dihidro-6-pentil-2H-piran-2-ona (**34**) es el compuesto volátil mayoritario de la harina obtenida del árbol de mezquite (*Prosopis* spp.), la cual se utiliza para producir alimentos horneados (Takeoka *et al.*, 2009). El sesquiterpeno farnesol (**71**) está presente en muchos aceites esenciales, es un acaricida natural y feromona de varios insectos. Es un inductor del arresto del ciclo celular y de apoptosis en una gran variedad de líneas celulares de carcinoma, también se ha reportado que inhibe la tumorigénesis en varios modelos animales, sugiriendo que actúa como un agente quimiopreventivo y antitumoral *in vivo* (Joo y Jetten, 2010). Xu y colaboradores (2009) reportaron la composición química y bioactividades de los extractos etéreos del hongo endófito *Paecilomyces* sp. y de su hospedera: *Panax ginseng*, así como el análisis comparativo de sus constituyentes, donde el nonanal (**66**) y el ácido octadecanoico (**38**) forman parte del extracto de *Paecilomyces* sp., el cual inhibe completamente el crecimiento de *Pyricularia oryzae* a una concentración de 7.8 µg/mL. El octanol (**72**) es uno de los constituyentes del extracto de *Panax ginseng*. Ambos extractos fueron probados sobre cuatro hongos patógenos del humano. La CI_{80} del extracto de *Paecilomyces* sp. fue de 4 µg/mL para *Trichophyton rubrum*. La evaluación de la actividad antitumoral *in vitro* demostró que la mayoría de los valores de CI_{50} son menores a 20 µg/mL.



La actividad biológica demostrada por los compuestos mencionados, confirma que el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) produce un gran diversidad de metabolitos secundarios con actividad biológica. El 5,6-dihidro-6-pentil-2*H*-piran-2-ona (**34**), el 1-octen-3-ol (**50**), el 2-pentilfurano (**56**), los ésteres: 9-oxononanoato de metilo (**57**), nonanoato de metilo (**73**), hexadecanoato de metilo (**58**), octadecanoato de metilo (**61**), 9-octadecenoato de etilo (**32**), tridecanoato de metilo (**74**), pentadecanoato de etilo (**75**), octanoato de metilo (**76**); los ácidos grasos: nonanoico (**49**), *n*-hexadecanoico o palmítico (**28**), (*Z*)-9-octadecenoico (**45**), octadecanoico (**38**), 3-nonenoico (**70**), hexanoico (**41**); los aldehídos: nonanal (**66**), 3-nonenal (**67**), heptanal (**68**), 2-nonenal (**69**) y el sesquiterperno farnesol (**71**) se encuentran presentes en el extracto orgánico del micelio de *Fusarium* sp. (LD1). Estos compuestos así como los constituyentes totales del extracto del micelio pueden estar involucrados en la defensa de su planta hospedera contra patógenos o bien ayudando a su hospedera estimulando su crecimiento (Herre *et al.*, 2007).



VII. Conclusiones

El análisis de las características macroscópicas y microscópicas del hongo endófito LD1 aislado de hojas sanas de *Lonchocarpus castilloi* permitió establecer que pertenece al género *Fusarium*.

El hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) demostró un potencial importante antifúngico en bioensayos de antagonismo directo. Con excepción de los hongos endófitos *Xylaria* sp. y *Phoma medicaginis*, inhibió significativamente el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici*, *Fusarium* sp. (aislado de *C. acuminata*), *Pestalotiopsis* sp., *G. mangiferae* y *Phomopsis* sp. En general, el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) inhibe en mayor grado el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos (*A. solani*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *P. capsici*, *Fusarium* sp. y *Pestalotiopsis* sp.) que el de los hongos endófitos de prueba (*P. medicaginis*, *Xylaria* sp., *Phomopsis* sp. y *G. mangiferae*).

Los mecanismos de competencia entre el hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) y diferentes microorganismos competidores de prueba es mediada principalmente por interferencia química, es decir, en condiciones de antagonismo es probable que *Fusarium* sp. (LD1) incremente la producción de metabolitos secundarios bioactivos que se difunden en el medio de cultivo inhibiendo el crecimiento de sus competidores.

Los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) poseen actividad antifúngica sobre el crecimiento de *F. oxysporum*, *A. solani*, *Rhizoctonia* sp. y *P. capsici*, confirmando el potencial antagónico observado en los bioensayos de antagonismo directo. Los extractos más activos son los obtenidos utilizando como medio de cultivo Sabouraud y caldo papa dextrosa.

Los extractos del medio de cultivo y micelio de *Fusarium* sp. (LD1) también presentan actividad biológica sobre el crecimiento de *A. hypochondriacus*, *E. crus-galli*, *L. esculentum* y *L. multiflorum*. En general, los extractos orgánicos con mayor actividad biológica son los obtenidos en medio de cultivo jugo de ocho verduras, Sabouraud y caldo papa dextrosa. Los extractos orgánicos obtenidos en caldo papa dextrosa presentan la mayor actividad fitotóxica sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba.

La producción de los metabolitos secundarios bioactivos del hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) depende de la composición del medio de cultivo (caldo papa dextrosa, caldo papa, medio de jugo de ocho verduras y medio Sabouraud), de las condiciones (estática vs agitación) y tiempo de incubación (15, 30 y 90 días). Las diferencias en los perfiles metabólicos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de *Fusarium* sp. (LD1) son las responsables de la actividad biológica demostrado por los diferentes extractos orgánicos. El hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1), genera los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, con la mayor actividad biológica y mayores rendimientos en cultivos en caldo papa dextrosa.

La identificación preliminar de los metabolitos secundarios presentes en el extracto activo y en las fracciones cromatográficas del micelio de *Fusarium* sp. (LD1), mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, permitió establecer que endófito *Fusarium* sp. (LD1) produce una gran diversidad de compuestos entre los que destacan diferentes alcoholes, ésteres, cetonas, aldehídos, alcanos, alquenos, ácidos carboxílicos y derivados de furano y pirano.

Muchos de los compuestos identificados en los extractos orgánicos y fracciones cromatográficas de *Fusarium* sp. (LD1) corresponden a metabolitos bioactivos aislados previamente a partir de diferentes fuentes naturales. Específicamente, los compuestos producidos por *Fusarium* sp. (LD1) podrían actuar conjuntamente para producir los diferentes efectos alelopáticos observados.

La actividad biológica demostrada por los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de *Fusarium* sp. (LD1) permiten proponerlo como un hongo con posible uso como agente de biocontrol y como un candidato para el posible desarrollo de nuevos agentes antifúngicos y herbicidas de origen natural más eficaces y biodegradables.

Fusarium sp. (LD1) produce metabolitos secundarios que pueden interferir en la colonización de *L. castilloi* por diversos microorganismos endófitos (competencia por interferencia química), así como contribuir directamente en la defensa de su planta hospedera contra microorganismos fitopatógenos, mediante la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica, o bien, inhibiendo directamente la colonización de los microorganismo fitopatógenos (competencia por interferencia física).

El presente proyecto constituye una contribución al conocimiento de las posibles relaciones ecológicas que establece *Fusarium* sp. (LD1) con otros microorganismos endófitos, fitopatógenos y con su planta hospedera, así como, al posible papel de sus metabolitos secundarios en estas complejas relaciones. Los estudios sobre la ecología química de los hongos endófitos de plantas leñosas permiten obtener información importante sobre las interacciones biológicas que establecen. Además, abren el camino para la búsqueda de novedosos compuestos con actividad biológica y posible utilidad en el control de algunas plagas y enfermedades.

VIII. Perspectivas

- Clasificar taxonómicamente hasta especie al hongo endófito *Fusarium* sp. (LD1) mediante la aplicación de técnicas moleculares.
- Aislar y purificar a los metabolitos secundarios responsables de la actividad alelopática demostrada por los extractos orgánicos y fracciones cromatográficas del cultivo en mediana escala de *Fusarium* sp. (LD1) en caldo papa dextrosa.
- Confirmar la presencia de los metabolitos secundarios encontrados en los extractos orgánicos y fracciones cromatográficas del micelio de *Fusarium* sp. (LD1), mediante la comparación de sus espectros de masas con los de muestras auténticas adquiridas comercialmente y/o mediante la determinación de los índices de retención de Kovats.
- Determinar si *Fusarium* sp. (LD1) produce metabolitos volátiles, utilizando la técnica de microextracción en fase sólida (SPME).
- Realizar el fraccionamiento químico biodirigido de los extractos obtenidos de los cultivos en mediana escala de *Fusarium* sp. (LD1) en el medio Sabouraud y V8 y aislar y caracterizar a los metabolitos secundarios responsables de la actividad alelopática.
- Determinar cuantitativamente el efecto antifúngico y fitotóxico de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas de los diferentes cultivos de *Fusarium* sp. (LD1).
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas y de difracción de rayos X.
- Determinar el efecto citotóxico de los extractos y de los aleloquímicos aislados sobre diversas líneas celulares con la finalidad de establecer posibles efectos tóxicos sobre el hombre y los animales.
- Profundizar en el estudio de las relaciones endófito-endófito, endófito-fitopatógeno y endófito-planta hospedera.

IX. Referencias

- Ahmed, N. E.; Sugimoto, Y.; Gabar, A.; Babiker, T.; Mohamed, O. E.; Yongqing, M.; Inanaga, S; Nakajima, H. 2001. Effects of *Fusarium solani* isolates and metabolites on *Striga germination*. *Weed Science*. 49:354–358 pp.
- Alexopoulos, C. J.; Blackwell, M. y Mims, C. W. 1996. *Introductory Mycology*. 4th ed. John Wiley & Sons, INC. USA.
- Anaya, A. L. 2003. *Ecología Química*. Ed. Plaza y Valdés. México.
- Anaya, A. L.; Espinosa-García, F. J. y Cruz-Ortega, R. 2001. *Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. Ed. Plaza y Valdés. México. 33-67 pp.
- Anaya, A. L.; Espinosa-García, F. J. 2006. La Química que Entreteje a los Seres Vivos. *Ciencias*, julio-septiembre. No. 083. UNAM. México. 4 -13 pp.
- Arnold, A. E.; Mejía, L. C.; Kyllö, D.; Rojas, E. I.; Maynard, Z.; Robbins, N. y Herre, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. 2003. *PNAS*. 100 (26). 15649-15654 pp.
- Bacon, C. W.; Hinton, D. M.; Porter, J. K.; Glenn, A. E.; Kuldau, G. 2004. Fusaric acid, a *Fusarium verticillioides* metabolite, antagonistic to the endophytic biocontrol bacterium *Bacillus mojavensis*. *Canadian Journal of Botany*. 82(7): 878–885 pp.
- Bacon, C.W. y White, J.F., 2000. *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, New York.
- Bacon, C. W. y Yates, I. E. 2006. Endophytic Root Colonization by *Fusarium* Species: Histology, Plant Interactions, and Toxicity. En *Soil Biology. Microbial Root Endophytes*. B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Volume 9. Cap 8. 133-147 pp.
- Benzaria, A.; Meskini, N.; Dubois, M.; Némoz, G.; Lagarde, M. y Prigent, A.-F. 2007. Phospholipase D as a potential target for the antiproliferative effects of polyunsaturated fatty acids in rat thymocytes. *Journal Nutritional Biochemistry*. 18: 228-235 pp.
- Body, L. 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*. 31: 185-194 pp.
- Booth, C. *Fusarium: Laboratory guide to the identification of the major species*. 1977. Commonwealth Mycological Institute.
- Bonifaz, A. 1994. *Micología Médica Básica*. Ed. Méndez. México. 448, 449 pp.
- Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Capítulo 6. Universidad Nacional de Salta.

- Carrillo, L. 2003. Microbiología Agrícola. Capítulo 6. Universidad Nacional de Salta.
- Cueto, M.; Jensen, P. R.; Fenical, W. 2000. N-Methylsalsalvamide, a cytotoxic cyclic depsipeptide from a marine fungus of the genus *Fusarium*. *Phytochemistry*. 55. 223-226 pp.
- Duke, S.O.; Abbas, H.K. 1995. Natural products with potential use as herbicides. *American Chemical Society Symp Ser.* 582: 348-362 pp.
- Einhellig, F. A. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Journal of Agron.* 88: 886-893 pp.
- Evidente, A. y Motta, A. 2001. Phytotoxins from fungi, pathogenic for agrarian, forestal and weedy plants. En: Tringali, C. (Ed.), *Bioactive Compounds from Natural Source*, Chapter 12. Taylor & Francis, London. 473-525 pp.
- Ezra, D.; Hess, W. M.; Strobel, G. 2004. New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*. 150: 4023–4031 pp.
- Fischbach, M. A. y Clardy, J. 2007. One pathway, many products. *Nature Chemical Biology*. 3, (7), 353-355 pp.
- Frisvad, J. C.; Andersen, B.; Thrane, U. 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*. 112. 231–240 pp.
- Ghisalberti, E. 1993. Detection and isolation of Bioactive Natural Products en *Bioactive Natural Products. Detection, isolation and Structural Determination*. Colegate, S. Y Molyneux, R. Editores. CRC Press. USA. 10-49 pp.
- Gómez-Garibay, F.; Reyes Chilpa, R.; Quijano, L.; Calderón Pardo, J. S.; Rios Castillo, T. 1995. Methoxy furan auranols with fungistatic activity from *Lonchocarpus castilloi*. *Phytochemistry*. 29. No. 2. 459-463 pp.
- Gloer, J. B. 1995. The chemistry of fungal antagonism and defence. *Canadian Journal of Botany*. 73, Suppl. 1, S. 1265–1274 pp.
- Gunatilaka, L. 2006. Natural Products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*. 69: 509-526 pp.
- Harborne, J. B. 1999. *Recent Advances in Chemical Ecology*. *Natural Products Reports*. 16, 509-523.
- Hernández Díaz, L.; Rodríguez Jorge, M.; García, D. y Pino Alea, J. 2004. Actividad antidermatofítica *in vitro* de aceites esenciales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Vo. 8 No. 2.

- Herre, E. A.; Mejía, L.C.; Kylo, D. A.; Rojas, E.; Maynard, Z.; Butler, A.; y Van Bael, S. A. 2007. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*. 88(3): 550–558 pp.
- Joo, J. y Jetten, A. 2010. Molecular Mechanisms involved in Farnesol-Induced Apoptosis. *Cancer Letters*. 287(2): 123.
- Kharroubi, I.; Ladrie, L.; Cardozo, A. K.; Dogusan, Z.; Cnop, M.; y Eizirik, A. D. 2004. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic β -cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor- κ B and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology*. 145: 5087-5096 pp.
- Kuklinski, C. 2000. *Farmacognosia*. Ed. Omega. Barcelona. 52-53 pp.
- Leslie, John F.; Summerell, Brett A. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. USA. 2006.
- Ledea Lozano, O. E. 2004. Estudio de la composición química del aceite de girasol ozonizado Oleozon[®]. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. Vol. 35. No. 1.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Castella, G.; KostECKi, M.; Golinski, P.; Ritieni, A.; Chelkowski, J. 1998. Beauvericin Production by *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. Aug. 3084–3088 pp.
- Macías-Rubalcava, M. L.; Hernández-Bautista, B. E.; Jiménez-Estrada, M.; González, M. C.; Glenn, A. E.; Hanlin, R. T.; Hernández-Ortega, S.; Saucedo-García, A.; Muriá-González, J. M.; Anaya, A. L. 2008. Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry*. 69. 1185–1196 pp.
- Mead, R.; Curnow, R. N.; Hasted, A. M. (eds.). 2002. *Statistical Methods In Agriculture And Experimental Biology*. 3rd Ed. Chapman And Hall. Crc, Boca Raton, Fl.
- Meléndez González, C. 2009. Potencial aleloquímico del endófito *Edenia gomezpompae* sobre diferentes comunidades de hongos endófitos de plantas tropicales. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
- Monroy-Vázquez, M. E.; Soto-Hernández, M.; Cadena-Iñiguez, J.; Santiago-Osorio, E.; Ruiz-Posadas, L. M.; Rosas-Acevedo, H. 2009. Estudio Biodirigido de un Extracto Alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Agrociencia*. 43: 777-790 pp.
- Muriá González, M. J. 2007. Búsqueda de actividad antifúngica y fitotóxica en algunos hongos endófitos aislados de hojas de árboles de la selva mediana subperenifolia de Quintana Roo. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM.

- Reigosa, M.; 1999. Ecophysiological Approach in Allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 18 (5): 577–608 pp.
- Reyes-Chilpa, R.; Viveros-Rodríguez, N.; Gómez-Garibay, F. y Alavez-Solano, D. 1995. Antitermitic activity of *Lonchocarpus castilloi* flavonoids and heartwood extracts. *Journal of Chemical Ecology*. 21. No. 4. 455-463 pp.
- Saucedo, G. A. (2006) Búsqueda de compuestos bioactivos en hongos antagónicos endófitos de plantas con potencial aleloquímico de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Saxena, S.; Pandey, A. K. 2001. Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 395-403 pp.
- Schulz, B. y Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*. 109 (6). 661-686 pp.
- Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Römmert, A. y Krohn, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*. 106 (9): 996-1004.
- Shearer, C. A. Fungal competition. 1995. *Canadian Journal of Botany*. 73 (S1): 1259–1264 pp.
- Shu, R.G.; Wang, F.W.; Yang, Y.M.; Liu, Y.X.; Tan, R. X. 2004. Antibacterial and Xanthine Oxidase Inhibitory Cerebrosides from *Fusarium* sp. IFB-121, an Endophytic Fungus in *Quercus variabilis*. *Lipids*. Vol. 39. No. 7.
- Silva Guzmán, J.A. y Richter, H.G. 2006: MACHICHE (*Lonchocarpus castilloi*, *Lonchocarpus* spp.). Ficha técnica. Departamento de Madera, Celulosa y Papel, CUCEI, Universidad de Guadalajara.
- Solfrizzo, M.; Forbes-Smith, M.; Strange, R. N.; Visconti, A. 1994. Separation of Chlamydosporol Epimers by Reversed-Phase HPLC Using Commercial Solvent Optimisation Software. *Chromatographia*. Vol. 39, No. 7/8.
- Soriano del Castillo, J. M.; et al. 2007. Micotoxinas en alimentos. Díaz de Santos Ed. España.
- Spiteller, P. 2008. Chemical Defence Strategies of Higher Fungi. *Chemistry: A European Journal*. 14: 9100 – 9110 pp.
- Stahl, E. 1969. Thin layer chromatography. Academic Press Inc. Nueva York.
- Stone. J. K.; Polishook, J. D.; White, J. F. 2004. Endophytic fungi. En: Mueller, G. M.; Bills, G. F.; Foster, M. S. (Eds). *Biodiversity of fungus: Inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press. China. 241-270 pp.

- Strobel, G.; Dirkse, E.; Sears, J. y Markworth, C. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*. 147: 2943–2950 pp.
- Strobel, G. 2006. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology* 240–244 pp.
- Strobel, G. 2006. *Muscodor albus* and its biological promise. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33: 514–522 pp.
- Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U. y Harper, J. 2004. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*. 67: 257-268 pp.
- Takeara, R.; P. C. Jimenez, Veras, D. de Moraes, M. O. Pessoa, C. Peoporine N., Callegari J. L., da Cruz T. M., and Veras C. L. 2007. Antileukemic effects of *Didemnum psammatoedes* (Tunicata: Ascidiacea) constituents. *Comparative biochemistry and physiology, part A: Molecular & integrative physiology*.
- Takeoka, G. R.; Wong, R. Y.; Dao, L. y Felker, P. 2009. Identification of 5,6-dihydro-6-propyl-2H-pyran-2-one as the major volatile constituent in mesquite (*Prosopis*) flour. *Food Chemistry*. 115: 1025–1027 pp.
- Tan, R. X. y Zou, W. X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Products Reports*. 18: 448-459.
- Tso, C.; Steffens, G.; Engelhaupt, M. E. 1965. Tobacco Sucker Control Inhibition of Tobacco Axillary Bud Growth with Fatty Acid Methyl Esters. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. Vol. 13, No. 1. Jan.-Feb. 78-81 pp.
- Ulloa, M. y Hanlin, R. 1978. *Atlas de Micología Básica*. Concepto S.A. ed. México.
- Van Bael, S. A.; Maynard, Z.; Rojas, E.; Mejía, L.; Kyllö, D. A.; Herre, E. A.; Robbins, N.; Bischoff, J. F.; Arnold, A. E. 2005. Emerging Perspectives on the Ecological Roles of Endophytic Fungi in Tropical Plants. En Dighton, J., White, J. F. y Oudemans, P. editores. *The Fungal Community: its organization and role in the ecosystem*. 3er. Ed. Boca Ratón: Taylor and Francis.
- Widden, P. 1997. Competition and the fungal community. En Wicklow D. B. Sönderström editores. *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlang. Alemania. 135-147 pp.
- Xua, L.; Hana, T.; Wub, J.; Zhanga, Q.; Zhanga, H.; Huang, B.; Rahmanc, K.; Qina, L. 2009. Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Panax ginseng* and its endophytic fungus. *Phytomedicine*. 16: 609–616 pp.
- Xu, L; Zhao, J.; Huang, Y.; Peng, Y; Wu, J.; Zhou, L. 2008. Beauvericin produced by an endophytic fungus *Fusarium redolens* isolated from *Dioscorea zingiberensis* and its antibacterial activity. *Abstracts / Journal of Biotechnology*. 136S S140–S143.

- Xu, L.; Zhou, L.; Leung, P.; Wu, J. 2008. Optimization of beauvericin production in *Fusarium redolens* Dzf2 mycelial liquid culture. Abstracts / Journal of Biotechnology. 136S S290–S344.
- Yuen, T.K.; Hyde, K.D.; Hodgkiss, I.J. 1999. Interspecific Interactions among Tropical and Subtropical Freshwater Fungi. Microbial Ecology. 37:257–262 pp.