



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**HONGOS ENDÓFITOS PRODUCTORES DE METABOLITOS
SECUNDARIOS CON POTENCIAL FITOTÓXICO Y ANTIFÚNGICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

BEATRIZ ARMENDÁRIZ GUILLÉN



MÉXICO, D.F

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

VOCAL: Dr. José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Dra. Irma Susana Rojas Tomé

1er. SUPLENTE: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

2do. SUPLENTE: M. en C. Abraham Madariaga Mazón

INSTITUTO DE QUÍMICA.

LABORATORIO 1-4. PRODUCTOS NATURALES

FACULTAD DE QUÍMICA. CIUDAD UNIVERSITARIA.

UNAM

ASESORA DEL TEMA: DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

SUSTENTANTE: BEATRIZ ARMENDÁRIZ GUILLÉN



AGRADECIMIENTOS

A la Máxima casa de Estudios la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** y a mi querida **FACULTAD DE QUÍMICA** que me brindaron la oportunidad y apoyo para desarrollarme personal y profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente trabajo a través del proyecto 81017 (responsable, Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava).

Al Programa Nacional de Becas para la Educación Superior (**PRONABES**), por el apoyo otorgado durante mi estancia en la Facultad.

A la **Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava** por todo el apoyo, conocimiento, tiempo, y dedicación otorgado a este proyecto y a mi persona, por todo el cariño, comprensión y amenas pláticas.

A la **Dra Susana Rojas Tomé**, y al **Dr. Fausto Rivero Cruz**, por todas las observaciones y aportaciones que ayudaron a mejorar el presente trabajo.

A la **M. en C. Lilia Vierna García**, por permitirme realizar mi servicio social y por todas las facilidades brindadas.

A todos mis maestros de la facultad por enseñarme el amor por el conocimiento y el aprendizaje, muy especialmente a **José Landeros** y **Raúl Garza** .Y a la maestra que me encaminó desde muy pequeña, con todo mi cariño maestra **Graciela Rubio Cruz**, gracias.

A las **M. en C. Brenda Lorena Sánchez**, **M. en C. Marbella García**, y a la **QFB. Rosa Elvira Sánchez**, por proporcionar los aislamientos de hongos endófitos objeto de estudio.

A mis lindas, y amables compañeras del laboratorio, 1-4 del Instituto de Química; **Lore, Eva, Marbe, Rosy, Kary, Angeles** y a mi queridísimo **Alvarito**, a todos gracias por la compañía en esas largas jornadas de trabajo, las pláticas y los consejos. A **Emma**, por enseñarme el uso de mi estimado compañero el oxímetro. A todos los chicos de Estancia y Servicio Social que son un gran apoyo para realizar el arduo trabajo en el laboratorio muchas gracias.



DEDICATORIAS

Con todo mi amor, y admiración a mis padres:

Patricia Guillén Ávila. Gracias mami por darme la vida, y por ser mi más grande ejemplo de fortaleza, lucha y amor. Gracias por hacerme la persona que soy, por amarme y apoyarme por sobre todas las cosas. Por ser mi guía, amiga, consejera, y mi mejor compañera de risas.

Jorge Armendáriz Tovar. Gracias por TODO papá. Es el ejemplo fehaciente de fuerza de voluntad, trabajo y perseverancia, gracias por esos besos y abrazos que siempre me ha brindado en abundancia.

Este logro es tan suyo como mío, gracias por los sacrificios y la paciencia; LOS AMO.

A mi sobrino **Omarcito**, por todos esos buenos momentos y la alegría brindada.

A **Geovanni Vázquez García.** Por existir y formar parte de mi vida. Gracias por todo lo compartido, por invitarme a conocer el mundo de tu mano y ayudarme a encontrar la inspiración. Eres parte de mis fortalezas. TE AMO.

A mis 3 hermanos **Hugo, Omar y Jorge** y al resto de mi familia, **abuelitos, tíos, primos** por la influencia que tuvieron en mi vida; gracias.

A **Margarita García**, por adoptarme en su familia; por sus muestras de cariño, su actitud positiva frente a todo, su fuerza y por supuesto las “anécdotas”, gracias.

Finalmente a mis compañeros y amigos que siempre estuvieron en los momentos importantes con una gran sonrisa, con un buen consejo, con un hombro para llorar; los quiero muchísimo; y lo llevo en mi corazón muy especialmente a; **Norma, Lety, Rayito, Ocelli, Gina, Andy, Chava, e Ingrid.** A mis muy apreciados y entrañables compañeros de DL, por cubrirme en tiempos de examen y apoyarme en momentos difíciles, **Yare, Luis y Héctor.**



Es más fácil desintegrar un átomo que un prejuicio.

Albert Einstein

Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas.

Louis Pasteur

*Después de escalar una gran colina, uno se encuentra sólo con que hay muchas
más colinas que escalar.*

Nelson Mandela

Inspiración, un instante de Libertad.

Geovanni V. G.



ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE CUADROS.....	11
LISTA DE GRÁFICOS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 ECOLOGÍA Y SOCIEDAD.....	17
2.2 ACTIVIDAD AGRÍCOLA.....	19
2.3 PRODUCTOS NATURALES.....	20
2.4 MICROORGANISMOS ENDÓFITOS.....	21
2.4.1 HONGOS.....	22
2.4.2. HONGOS ENDÓFITOS.....	24
2.4.3 METABOLISMO SECUNDARIO DE HONGOS ENDÓFITOS.....	26
2.4.4 METABOLITOS SECUNDARIOS DE HONGOS ENDÓFITOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	28
3. HIPÓTESIS.....	44
4. OBJETIVOS.....	45
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	45
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	47



5.1.1 MATERIAL FÚNGICO	48
5.1.1.2 HONGOS FITOPATÓGENOS.....	48
5.2 COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PURIFICACIÓN Y CRECIMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS.	49
5.2.1 PAPA-DEXTROSA-AGAR (PDA)	49
5.2.2 CALDO-PAPA-DEXTROSA (CPD)	49
5.2.3 MEDIO DE ARROZ (MA)	49
5.3 PURIFICACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS.....	49
5.4 CARACTERÍSTICAS MACRO Y MICROSCÓPICAS DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.	50
5.5 CULTIVOS EN PEQUEÑA ESCALA EN CONDICIONES ESTÁTICAS.	51
5.5.1 CULTIVO EN CPD.....	51
5.5.2 CULTIVO EN MEDIO ARROZ	51
5.6 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL MEDIO DE CULTIVO Y MICELIO.....	52
5.7 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO Y FITOTÓXICO.....	53
5.7.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	53
5.7.2 ACTIVIDAD FITOTÓXICA.....	54
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	56
6.1 OBTENCIÓN DE AISLAMIENTOS PUROS.....	56
6.2 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACRO Y MICROSCÓPICA DE LOS HONGOS ENDÓFITOS PUROS.	58
6.3 CONDICIONES DE CULTIVO.....	68
6.4 OBTENCIÓN DE CULTIVO EN PEQUEÑA ESCALA.....	69
6.5 EFECTO ANTIFÚNGICO.....	72
6.6 EFECTO FITOTÓXICO	76
6.6.1 GERMINACIÓN.....	78
6.6.2 CRECIMIENTO RADICULAR	81
6.6.3 RESPIRACIÓN CELULAR	84



7. CONCLUSIONES	91
8. PERSPECTIVAS	94
9. REFERENCIAS	96



LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Clasificación del reino de los hongos. Se muestran sólo divisiones (Phylum) y subdivisiones (Subphylum).	24
Figura 2. Principales rutas biosintéticas utilizadas por los microorganismos (Modificado de Dewick, 2012).	27
Figura 3. Diagrama general de actividades realizadas.	47
Figura 4. Endófito PB3fl. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). B) Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.	58
Figura 5. Endófito PB3fl. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). B) Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.	59
Figura 6. Endófito Ssp6ll19. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). B) Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.	60
Figura 7. Endófito SM2Fg3. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). B) Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.	61
Figura 8. Endófito SM2ell. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). B) Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.	61
Figura 9. Endófito LM5f2l2A. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). B) Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.	62
Figura 10. Endófito LM5f2l2B. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). B) Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.	63
Figura 11. Endófito LM3C1l. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). B) Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.	64
Figura 12. Endófito MA2h2ell. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). B) Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.	64



LISTA DE FIGURAS (Continuación)

	Página
Figura 13. Endófito MA1d1II. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). B) Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.	65
Figura 14 Curva de crecimiento del endófito LM3C1I. En medio PDA a los 2, 10, 15 y 30 días crecimiento.	66
Figura 15 Curvas de crecimiento de los 10 endófitos puros en estudio, en cultivos en PDA.	67
Figura 16. Perfil cromatográfico de los extractos orgánicos del hongo endófito SM2Fg3. 1) Extracto de CH ₂ Cl ₂ del medio de cultivo, 2) Extracto de AcOEt del medio de cultivo, 3) Extracto de CH ₂ Cl ₂ del micelio, y 4) Extracto de AcOEt del micelio. Cromatoplaaca eluída con CH ₂ Cl ₂ : AcOEt; 99:1 y revelada con H ₂ SO ₄ al 10%.	71



LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislados de hongos endófitos.	29
Cuadro 2. Asignación de claves a los hongos endófitos aislados de cada planta hospedera.	57
Cuadro 3 Rendimientos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos cultivados en pequeña escala.	70
Cuadro 4. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz a una concentración de 250 µg/mL.	75
Cuadro 5. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz a una concentración de 100 µg/mL.	77
Cuadro 6. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz sobre la germinación de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> a cuatro diferentes concentraciones.	79
Cuadro 7. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, obtenidos en CPD y arroz sobre la germinación de las semillas de <i>S. lycopersicum</i> a cuatro diferentes concentraciones.	80
Cuadro 8. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz sobre el crecimiento de la raíz <i>A. hypochondriacus</i> a cuatro diferentes concentraciones.	82
Cuadro 9. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, obtenidos en CPD y arroz sobre el crecimiento de la raíz de <i>S. lycopersicum</i> a cuatro diferentes concentraciones.	83
Cuadro 10. Efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de <i>A. hypochondriacus</i> a cuatro diferentes concentraciones.	85
Cuadro 11. Efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de <i>S. lycopersicum</i> a cuatro diferentes concentraciones.	86



LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfica 1. Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito PB311 cultivado en CPD, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .	87
Gráfica 2. Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito PB311 cultivado en CPD, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de <i>Solanum lycopersicum</i> .	87
Gráfica 3. Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito MA1d11 cultivado en CPD, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .	88
Gráfica 4 Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito MA1d11 cultivado en CPD, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de <i>Solanum lycopersicum</i> .	88
Gráfica 5. Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito LM3C11, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .	88
Gráfica 6. Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito LM3C11 cultivado en CPD, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de <i>Solanum lycopersicum</i> .	89
Gráfica 7. Efecto del extracto orgánico proveniente del cultivo en arroz del endófito Ssp61119, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .	89
Gráfica 8. Efecto del extracto orgánico proveniente del cultivo en arroz del endófito Ssp61119, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de <i>Solanum lycopersicum</i> .	89



LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
ANOVA	Análisis de Varianza
CCF	Cromatografía en capa fina
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ OH	Metanol
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media
cm	Centímetros
CP	Caldo papa
CPD	Caldo-papa-dextrosa
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
DF	Distrito Federal
g	Gramos
h	Horas
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
L	Litros
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minutos
µg	Microgramos
µL	Microlitros
mL	Mililitros
mm	Milímetros



°C	Grados Celsius o Centígrados
PDA	Papa-dextrosa-agar
ppm	Partes por millón
s	Segundo
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta



1. INTRODUCCIÓN

El interés por el cuidado del medio ambiente y los recursos naturales se ha incrementado notablemente durante las últimas décadas. La tendencia mundial en áreas productivas mira hacia nuevos horizontes, apostando por los productos naturales. El conocimiento en esta área ha ido en aumento, por lo que el número de productos naturales descubiertos es cada vez mayor. Dentro de los productos considerados como naturales se pueden encontrar organismos enteros, como plantas, animales y microorganismos o bien partes de ellos: hojas, fragmentos de algún animal o exudado producido por microorganismos y plantas (Sarker *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2009). Sin embargo, existe un grupo más que forma parte de los llamados productos naturales, los metabolitos secundarios (Firn, 2010), que si bien aparentemente no son indispensables para la supervivencia y desarrollo de los organismos que los producen, muestran diversas actividades biológicas. Los metabolitos aislados incluyen un número considerable de agentes antifúngicos, antibacterianos, anticancerígenos, antivirales, citotóxicos, insecticidas, nematocidas y fitotóxicos novedosos, entre otros (Demain, 1999; Gunatilaka, 2008; Dewik, 2009). Es de particular interés el efecto inhibitorio de los metabolitos secundario sobre el crecimiento de malezas y microorganismos fitopatógenos, debido a que normalmente a bajas concentraciones ejercen su efecto, lo que generalmente conlleva a una baja toxicidad para organismos vivos incluyendo al hombre y los animales y a un menor impacto en el medio ambiente (Butler, 2004; Karlovsky, 2008).

Las fuentes de productos naturales son inagotables y diversas, se encuentran presentes en la naturaleza, en todas las regiones. Así, los hongos son un grupo extenso de microorganismos distribuidos ampliamente en la mayoría de los ecosistemas existentes y algunos de ellos son capaces de producir metabolitos secundarios con importante actividad biológica y algunos otros, son por sí mismos muy eficientes como agentes de biocontrol (Strobel *et al.*, 2004;



Mathivanan *et al.*, 2008; Riga *et al.*, 2008; Mgbeahuruike *et al.*, 2010; Strobel *et al.*, 2011).

Dentro de este grupo de microorganismos se encuentran los hongos endófitos, que actualmente son considerados una fuente prometedora de metabolitos secundarios con actividad frente a plantas y microorganismos patógenos (Lu *et al.*, 2000; Thines *et al.*, 2003; Strobel y Daysi, 2004; Rosa *et al.*, 2012). La estrecha relación existente entre los hongos endófitos y su planta hospedera ha sido poco investigada, sin embargo, en los estudios realizados se ha observado que algunos de los metabolitos secundarios producidos por los endófitos ayudan a su hospedera a disminuir el ataque de patógenos y herbívoros, de igual manera se ha observado que la presencia de los endófitos incrementa en su hospederas los mecanismos de defensas químicos contra patógenos competidores y factores ambientales.(Ganley *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010).

En este contexto, el presente trabajo se desarrolló con la finalidad de estudiar el potencial antifúngico y fitotóxico de los metabolitos secundarios (extractos orgánicos) producidos por hongos endófitos aislados a partir de plantas recolectadas en una zona de alta biodiversidad, la 'Reserva de la Biosfera de Huautla' (REBIOSH), para contribuir al conocimiento acerca de los hongos endófitos y la relación con su planta hospedera y al desarrollo de agroquímicos de origen natural que sean eficaces y que tengan menor impacto ambiental.

El proyecto comprende: 1) la purificación y la caracterización macro y microscópica de aislamientos de hongos endófitos obtenidos de hojas sanas de *Salvia* sp., *Mimosa affinis*, *Sapium macrocarpum*, *Leucaena macrophylla*, y *Haematoxylon brasiletto*, 2) la obtención de los extractos orgánicos producidos por los hongos endófitos aislados, y 3) la evaluación del efecto de los extractos obtenidos sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica y sobre dos semillas de plantas de prueba.



2. ANTECEDENTES

2.1 ECOLOGÍA Y SOCIEDAD

Actualmente, el concepto de responsabilidad social es ambiguo y engloba acciones sociales y ambientales (destacando el aprovechamiento y explotación de recursos). Aunque dicho término fue introducido hace ya bastantes años, en los últimos tiempos ha logrado tomar mayor importancia, provocando ciertos debates y discusiones en torno al significado de la expresión (Khan *et al.*, 2012).

Si bien algunos conceptos son similares, con el paso de los años se han ido modificando y completando hasta llegar a lo que hoy en día se considera el significado más sólido, definiéndola como el compromiso consciente y congruente de cumplir integralmente con la finalidad personal o empresarial, considerando las expectativas económicas, sociales y ambientales de cada participante, demostrando respeto por la gente, los valores éticos, la comunidad y el medio ambiente, contribuyendo así a la construcción del bien común y buscando la preservación del entorno y la sustentabilidad de las futuras generaciones (Cajiga, 2012).

La responsabilidad social, usada de esta manera, va más allá de intereses personales, por lo que considera actividades como mayor participación en programas para mejorar la comunidad, brindar empleo a grupos minoritarios, mejora de la atención médica, seguridad y salud industrial, y cuidado del medio ambiente, entre otros (Lafuente *et al.*, 2003). En este último aspecto, la reducción de agentes contaminantes es uno de los puntos más importantes a considerar (ISO, 26000:2010).

En este contexto, la ecología juega un papel indispensable, y es definida, como el conjunto de conocimientos acerca de la economía de la naturaleza –la investigación del total de relaciones del animal con su ambiente inorgánico y orgánico; incluyendo, sobre todo, sus relaciones amistosas y hostiles con aquellos animales y plantas con las que está en contacto directo o indirecto- en resumen, la



ecología es el estudio de todas aquellas complejas interrelaciones a las que Darwin se refirió como las condiciones de la lucha por la existencia (Lorencio, 2000).

Así, un ecosistema funciona de manera organizada y equilibrada; los factores bióticos interactúan entre sí mediante fenómenos como la depredación, parasitismo, simbiosis, comensalismo, etc., estas interacciones son dinámicas y se encuentran condicionadas por los factores abióticos del medio ambiente (Tuininga, 2005). La armonía y el equilibrio de estas relaciones son las que hacen que un ecosistema funcione de manera adecuada. Sin embargo, el hombre se ha empeñado en romper este equilibrio y es, tristemente, el mayor agresor de la naturaleza, en su ambición por facilitar sus actividades cotidianas, como el trabajo y educación (con la fabricación de medios de transporte, edificios, maquinaria y equipos), y aumentar su producción de alimentos y servicios con la finalidad de obtener mayores ganancias en un menor tiempo y mejorar sus condiciones de vida ha optado por la explotación indiscriminada de recursos, sin detenerse a pensar en las consecuencias a corto y largo plazo (Shen, *et al.*, 2010).

Son muchas las áreas afectadas por este interés constante y creciente del ser humano de progresar; la tierra, el agua, la fauna, el aire y en ocasiones el mismo hombre son las principales víctimas. Las causas, son varias, entre ellas los grandes emporios empresariales, que son productores de una cantidad inmensa de desechos, que en ocasiones van a parar a ríos y mares, los automóviles que contaminan el aire y la tala inconsciente de árboles. Para fines del presente trabajo nos interesa particularmente el efecto ocasionado por el uso de los agroquímicos sintéticos utilizados en la agricultura que si bien, ayudan a la tierra a ser más productiva, la protegen contra el ataque de plagas y herbívoros y ayudan a preservar la cosecha, también han ocasionado severos daños al medio ambiente, debido a los altos niveles de acumulación química en suelo, aire y agua (Franci, 2002; Negev *et al.*, 2010).



2.2 ACTIVIDAD AGRÍCOLA

La agricultura es una actividad milenaria que ha sido fundamental para el sustento y supervivencia del ser humano, ambos han ido evolucionando de manera conjunta (Cánovas, *et al.*, 1993; FAO, 2011).

Actualmente, para el 70% de los pobres del mundo que viven en zonas rurales, la agricultura es la principal fuente de ingresos y de trabajo. Pero el agotamiento y la degradación de la tierra y del agua afectan gravemente la capacidad de cultivar alimentos y otros productos necesarios para sustentar los medios de vida en estas zonas y satisfacer las necesidades de la población urbana (Banco Mundial, 2012; FAO, 2012).

En los sistemas agrícolas se busca reducir las cadenas tróficas a su mínima expresión; se evita que los insectos, herbívoros u otros animales acaben con el cultivo, se eliminan las malezas, se combaten las enfermedades, todo ello para evitar que la energía sea aprovechada por otros organismos y que el hombre libre de competencia obtenga el máximo rendimiento (Anaya, 2003).

Así, el éxito de la producción en los sistema agrícolas depende de que las plantas cultivadas se adapten a las condiciones ambientales, y que genéticamente hablando, sean capaces de responder positivamente a las prácticas de cultivo, fertilización y manejo (Anaya, 2003).

Para obtener los mayores rendimientos y la mejor calidad en los productos de la agricultura, se ha optado por la protección y cuidado de los cultivos, para lo cual se ha implementado el uso de sustancias que controlen a las plagas y malezas, que ocasionan pérdidas económicas significativas. Sin embargo, a los agroquímicos sintéticos se les ha asociado una serie de problemas como la persistencia en el medio ambiente, la bioacumulación en los tejidos animales, la resistencia desarrollada por algunas plagas, los desequilibrios ecológicos que conlleva la eliminación de un organismo en un determinado ecosistema, provocando la disminución de fauna auxiliar y por tanto la proliferación de las



especies que compiten con ella, y finalmente la toxicidad para el hombre ya que se han observado residuos de estos agroquímicos en las superficies de los productos (Choy y Seeneevassen, 1998; Chang *et al.*, 2005; Ferrer *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2009) lo que ha provocado muertes por intoxicación con pesticidas (Wasim *et al.*, 2009).

Aunque en años recientes se ha producido un aumento de la presión social y legislativa para sustituir o reducir el uso de plaguicidas sintéticos, el dilema no es el uso o no de sustancias que nos ayuden a aumentar y mejorar la productividad agrícola, porque realmente si es necesario, por la gran demanda alimentaria que existe, y el mosaico tan grande de ecosistemas y especies existentes (INEGI, 2011), lo que puede dar lugar a relaciones antagónicas entre especies; los insectos, malas hierbas y hongos fitopatógenos causan grandes daños en la agricultura. Se estima que un 40% de los cultivos podría perderse durante la cosecha y un 20% más durante la post-cosecha (Gilligan, 2008; FAO, 2011), si no se utilizaran agroquímicos. Por lo tanto, el reto actual en la agricultura es, mejorar la productividad de las tierras y cuidar los productos cosechados, con el uso de sustancias que no provoquen daños a la tierra, al producto o a los mismos consumidores. De aquí la idea de aprovechar las sustancias presentes o producidas por los elementos de la misma naturaleza, las cuales pueden ayudar al ser humano siendo menos agresivas con el medio ambiente.

2.3 PRODUCTOS NATURALES

La naturaleza ha sido siempre una fuente inagotable de compuestos activos que tienen usos en áreas como la medicina y la agricultura. Algunos productos naturales cuentan con diversas ventajas sobre los productos sintéticos, como son la baja toxicidad, la poca retención en los tejidos de los seres vivos, baja acumulación en tierra, agua y aire y la aportación de estructuras complejas las cuales poseen una importante actividad biológica que pueden ser usadas en diferentes áreas (Nepote *et al.*, 2006; Arnason *et al.*, 2008; Dayan *et al.*, 2009; Mann y Kaufman, 2012).



Existen diferentes fuentes de obtención de productos naturales, las investigaciones en torno al mundo marino han avanzado sin embargo, la fuente de mayor importancia corresponde al mundo biológico terrestre: el reino animal, vegetal, hongos, algas, protozoos y bacterias. Desde tiempos muy remotos han sido las plantas la primera opción en el tratamiento de enfermedades y en las últimas décadas, han adquirido una mayor importancia tanto su estudio como el de microorganismos capaces de producir sustancias biológicamente activas. El ritmo del descubrimiento de productos naturales ha ido en aumento durante los últimos años (Bart, 2011).

Es importante mencionar que durante el período de 1989 a 1995, más del 60% de fármacos con actividad anti-infecciosa o anticancerígena, eran de origen natural (Butler, 2004; Newman y Cragg, 2005; Ravindra *et al.*, 2011). Ahora bien, de los 100,000 productos naturales producidos por microorganismos y plantas, alrededor de 50,000 son producidos por microorganismos (Chemler y Koffas, 2008). De los 12,000 antibióticos conocidos el 55% son producidos por bacterias filamentosas del género *Streptomyces*, 11% de otras bacterias filamentosas, 12% de bacterias no filamentosas y 22% por hongos (Evangelista-Martínez y Moreno-Enríquez, 2007).

La velocidad y facilidad para el aislamiento, separación, purificación y elucidación estructural de sustancias de origen natural va de la mano, con el desarrollo y disponibilidad de nuevos procedimientos que faciliten la automatización de cada una de las etapas, hasta llegar a la determinación estructural (Gil, 2002; Chemat *et al.*, 2012).

Dentro de los microorganismos que producen sustancias que pueden ser explotadas por los seres humanos se encuentran los microorganismos endófitos.

2.4 MICROORGANISMOS ENDÓFITOS

Los microorganismos endófitos son aquellos que viven dentro de los tejidos vegetales sanos sin causar ningún síntoma detectable de enfermedad a su



huésped (Tan y Zou, 2001; Strobel *et al.*, 2004; Gond, 2010). Las plantas normalmente albergan una gran cantidad de microorganismos endófitos, los cuales han sido poco estudiados, sin embargo en los últimos años han despertado un gran interés, debido no sólo a la extensa variedad existente, sino al potencial que tienen para producir nuevos productos naturales (Azevedo, 2000; Zhang *et al.*, 2006; Strobel *et al.*, 2011; Budhiraja *et al.*, 2012). Estos compuestos producidos por microorganismos endófitos han sido usados para el desarrollo humano, que van desde productos que protegen cultivos y cosechas (nematicidas, insecticidas, herbicidas, antifúngicos (Aneja *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Mgbeahuruike *et al.*, 2010; Mann, 2012; Rosa *et al.*, 2012); hasta aquellos con uso en la salud como antibióticos, anticancerígenos, antimicóticos, antivirales, y antioxidantes (Debbab *et al.*, 2009; Rhoden *et al.*, 2012). Muchos de los endófitos producen también algunos alcaloides tóxicos con el fin de proteger a sus hospederas contra ataques de herbivoría; también mejoran el crecimiento y el rendimiento de los cultivos cuando se someten a diversas condiciones de estrés (Ganley *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010). En la lista de microorganismos endófitos, los hongos son una opción actual de estudio; debido a la importancia de algunos productos de su metabolismo, dentro de los que destacan algunos con uso médico, y en la agricultura (Schulz *et al.*, 2002; Strobel y Daysi, 2004; Khan *et al.*, 2007; Debbab *et al.*, 2009).

2.4.1 Hongos

Los hongos, se encuentran dentro del dominio Eukarya (Eucarionte), formando el reino Fungi, que cuentan con características que permite diferenciarlos de los otros reinos que también conforman este dominio (Aristegui, 2002; Peregrín-Alvarez *et al.*, 2009; Kendrick, 2011).

Son organismos macroscópicos o microscópicos, representan un grupo ubicuo y diverso en el medio ambiente. Pueden existir y sobrevivir en la mayoría de los hábitats, donde se dedican principalmente a la degradación de la materia orgánica. Los hongos son saprófitos, simbioses, comensales o parásitos. La



mayoría son aerobios, aunque también existen anaerobios y anaerobios facultativos. Su pared celular, está conformada de quitina, β -glucano y manana (Latgé, 2006).

Los hongos generalmente, son de crecimiento lento, comparado con otros microorganismos como las bacterias (Murray, 2009) y son organismos capaces de producir metabolitos secundarios (Martínez-Luis *et al.*, 2005; Sumbali, 2005; Senyuva *et al.*, 2007).

En cuanto a la reproducción, se da más frecuentemente de manera asexual, bien por gemación (levaduras), por fragmentación y regeneración de hifas, mediante conidios, o esporas asexuales (mitosporas). Pero también existe la reproducción sexual; donde se produce una fusión de células o hifas de individuos diferentes formando un cigoto (Taylor *et al.*, 1999; Ugalde, 2006; Steyaert *et al.*, 2010).

El reino de los hongos representa un grupo de organismos con una gran variedad de estructuras, la mayoría están compuestos de estructuras vegetativas llamadas micelios. El micelio se forma a partir del conjunto de hifas, las cuales comienzan a partir de la germinación de una espora. El micelio vegetativo es aquel que se encarga de absorber los nutrientes para el hongo, mientras el micelio aéreo es el encargado de la reproducción del hongo (Sumbali, 2005; Stephenson, 2010).

La clasificación de los hongos es muy compleja, ya que son muchas las diferencias entre ellos. La clasificación actual se basa principalmente, en las características morfológicas de las estructuras involucradas en la reproducción sexual y asexual (Prats, 2007; Weber, *et al.*, 2009).

La clasificación que se presenta a continuación agrupa a los hongos tomando en cuenta sólo la filogenia mono y deja fuera los grupos polifiléticos, donde se encuentra la división zygomycota, la cual en esta clasificación se encuentra distribuida en las subdivisiones del Filo *Glomeromycota*. Tampoco toma en cuenta otros organismos anteriormente incluidos en el reino, y que ahora se sabe que no pertenecían a éste, tales como los oomicetos (White *et al.*, 2006; Hibbett *et al.*,



2007; Lee *et al.*, 2010).

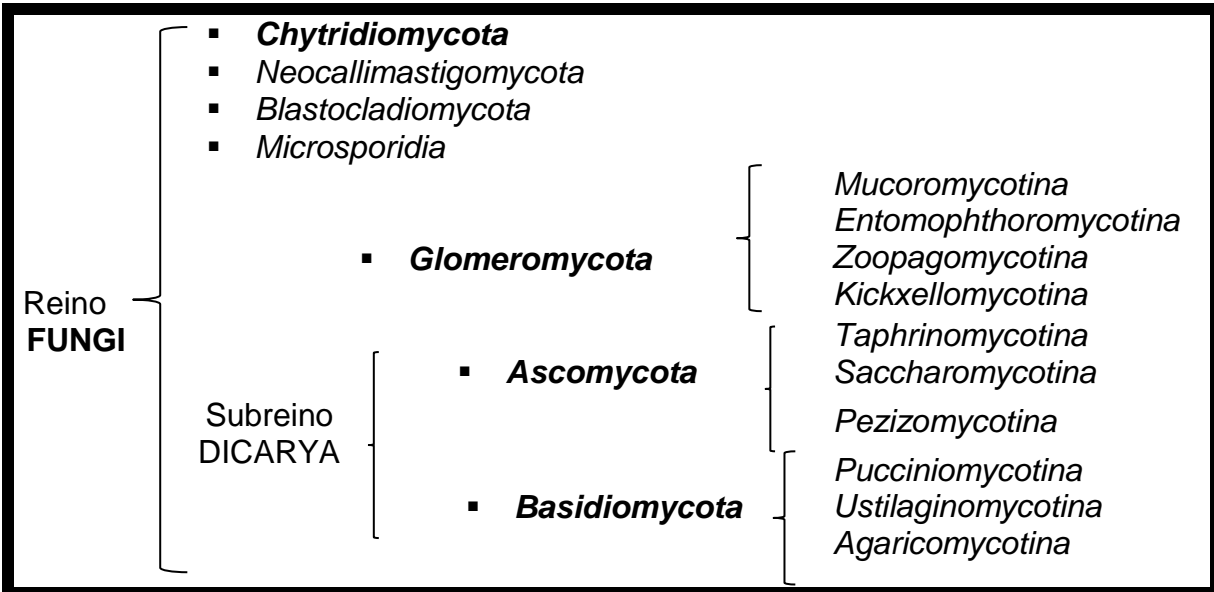


Figura 1. Clasificación del reino de los hongos. Se muestran sólo divisiones (Phylum) y subdivisiones (Subphylum).

En total, esta clasificación incluye un reino, un subreino que abarca la división *Ascomycota* y *Basidiomycota*, 7 divisiones, 10 subdivisiones, 35 clases, 12 subclases y 129 órdenes (Hibbett *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010).

2.4.2. Hongos endófitos

Por su parte, los hongos endófitos son microorganismos que viven colonizando los tejidos vivos de su planta huésped, desarrollando relaciones que van desde simbióticas hasta patógenas (Tan y Zou, 2001; Faeth, 2002; Strobel y Daisy, 2004; Herre *et al.*, 2007; Arnold, 2007)

Los hongos endófitos juegan un papel importante como mutualistas potenciales al aumentar la respuesta en defensa del hospedero contra patógenos (Arnold, 2007; Tan y Zou, 2001; Arnold *et al.*, 2003). Hay tres clases de mecanismos potenciales por los cuales los endófitos podrían contribuir a la protección de su hospedera (Herre *et al.*, 2007):



- 1) Mecanismos indirectos, induciendo o incrementando la expresión de sistemas de defensa químicas o fisiológicas intrínsecas del hospedero.
- 2) Mecanismos directos, produciendo defensas las cuales son sintetizadas directamente por el endófito y que son mediadas por metabolitos secundarios o enzimas.
- 3) Mecanismos ecológicos, las respuestas se desencadenan cuando el endófito se encuentra en contacto cercano con su competidor, y se originan por ocupación del nicho ecológico.

El grado en el que cualquiera de estos tres mecanismos predomina, tienen diferentes consecuencias para la ecología y evolución de las relaciones hospedero-endófito y endófito-patógeno (Herre *et al.*, 2007).

Por otro lado, los hongos endófitos pueden beneficiar a su hospedera aumentando su tolerancia al estrés, resistencia a fitopatógenos y/o herbívoros (nematodos, mamíferos e insectos); en semillas de *Theobroma cacao*, se demostró que la presencia de hongos endófitos aumentaba la defensa de la planta hospedera frente a *Phytophthora* sp., los hongos endófitos inoculados a las semillas fueron aislados de la misma planta hospedera (Arnold *et al.*, 2003).

Algunos inducen un mayor potencial alelopático del hospedero sobre otras especies vegetales que crecen a su alrededor, que usualmente son competidores por el espacio y nutrientes, esto mediante la producción de metabolitos secundarios (Tan y Zou, 2001). La meleina es una isocumarina aislada de *Penicillium janczewskii* endófito de *Prumnopitys andina* y es conocida por su fuerte actividad herbicida y alguicida, impidiendo el crecimiento de algunas plantas y algas que pudieran competir con su hospedera (Tan y Zou, 2001; Schmeda *et al.*, 2005).

Finalmente, algunos hongos endófitos utilizan la estrategia ecológica para proteger a su planta huésped mediante el contacto directo con su competidor, a través del hiperparasitismo y la depredación; *Trichoderma* sp., por ejemplo, es capaz de



parasitar las hifas del patógeno *Rhizoctonia* sp., con lo cual se logra controlar el crecimiento de dicho patógeno (Grosch *et al.*, 2010).

La información anterior pone de manifiesto que los hongos endófitos constituyen una importante fuente de moléculas novedosas que presentan actividad biológica, de interés en áreas como la agrícola, la medicina y otras industrias (Tan y Zou, 2001; Strobel y Daysi, 2004; Wicklow *et al.*, 2005; Webster y Weber, 2007; Varughese *et al.*, 2012).

2.4.3 Metabolismo secundario de hongos endófitos

Los hongos endófitos compiten entre ellos por el mismo sustrato o hábitat y han desarrollado mecanismos para poder permanecer en un ecosistema, incluyendo la producción de enzimas y/o metabolitos secundarios que les permiten parasitar a otros microorganismos (Cazar, 2004; García, 2004; Fox *et al.*, 2008).

Los organismos a través de reacciones químicas comunes a todos los seres vivos sintetizan metabolitos primarios, incluyendo aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, ácidos carboxílicos, entre otros. Y a través de las mismas o similares vías biosintéticas a partir de los metabolitos primarios, se originan los metabolitos secundarios. Por lo que se puede decir que la relación entre ambos es muy estrecha (Craney *et al.*, 2012).

Los metabolitos secundarios no son esenciales para el desarrollo del hongo en el cultivo de crecimiento, pero sirven en diversas funciones para la supervivencia del hongo en la naturaleza (Croteau *et al.*, 2000).

Los metabolitos secundarios poseen una gran heterogeneidad química (Anaya, 2001; Karlovsky 2008), y la mayoría de ellos se derivan del acetyl-CoA, del ácido shikímico o del ácido mevalónico (Figura 2), que forman las tres principales rutas sintéticas (Dewick, 2011).



hongo endófito aislado de *Cinnamomum zeylanicum*; es capaz de producir compuestos orgánicos volátiles con un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Strobel *et al.*, 2001; Ezra *et al.*, 2004 Gabler *et al.*, 2009).

2.4.4 Metabolitos secundarios de hongos endófitos con actividad biológica.

Es importante mencionar, que la producción de metabolitos secundarios no se da en todas las condiciones, de hecho son producidos generalmente por un organismo o grupo de organismos particulares (Dewick, 2009), por lo tanto, es difícil hacer una división

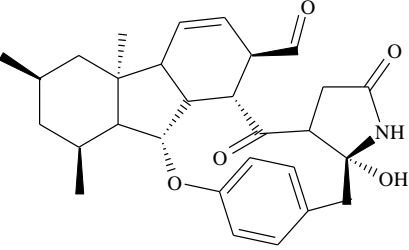
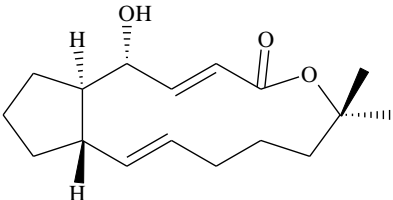
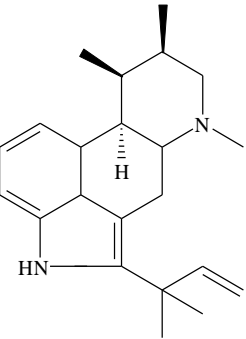
Actualmente se conocen miles de metabolitos secundarios con actividad biológica, aunque probablemente existan millones aun esperando ser descubiertos; dentro de los principales grupos conocidos, se encuentran:

- Fenilpropanoides
- Acetogeninas
- Terpenoides
- Esteroides
- Alcaloides
- Cumarinas
- Preusomerinas
- Xantoquinodinas

En el Cuadro 1 se muestran ejemplos selectos de la amplia diversidad de especies de hongos endófitos que se han aislado, así como los metabolitos secundarios que producen y su actividad biológica.

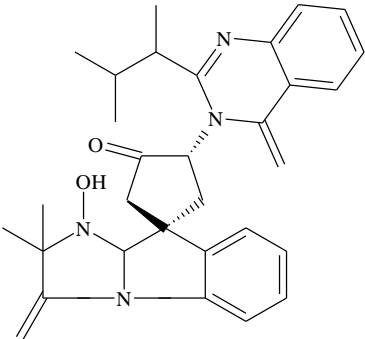
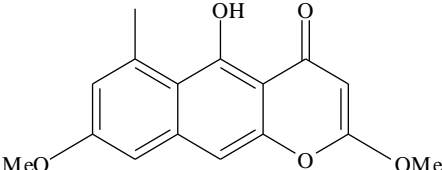


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos.

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Acremonium zeae</i> NRRL 13540 (Hypocreales mitosporico)</p> <p>Endófito de <i>Zea mays</i> L. (Poaceae)</p>	 <p>Pirrocidina A (Wicklow <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>Antifúngico <i>F. verticillioides</i>, <i>A. flavus</i></p> <p>Antibacteriano <i>Clavibacter</i> <i>michiganensis</i></p>
<p><i>Aspergillus clavatus</i> Cepa H-037 (Trichocomaceae)</p> <p>Endófito de <i>Taxus mairei</i> y <i>Torreya</i> <i>grandis</i> (Taxaceae)</p>	 <p>Brefeldina A (Zhu <i>et al.</i>, 2000)</p>	<p>Antifúngico <i>Candida albicans</i></p> <p>Antiviral Sindbis</p> <p>Anticancerígeno HCT 116</p>
<p><i>Aspergillus fumigatus</i> CY018 (Trichocomaceae)</p> <p>Endófito de <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p>	 <p>Fumigaclavina C (Liu <i>et al.</i>, 2004)</p>	<p>Antifúngico <i>Candida albicans</i></p>

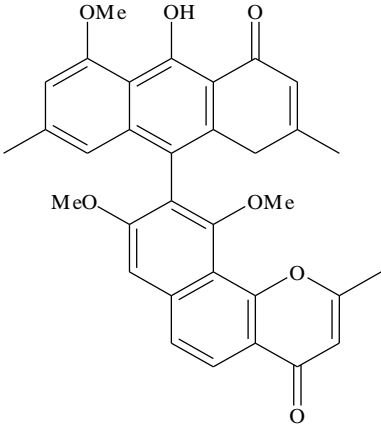
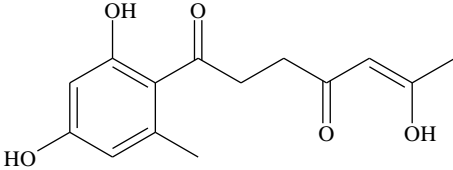
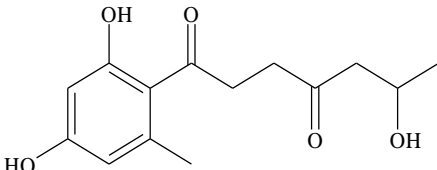


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Aspergillus fumigatus</i> CY018 (Trichocomaceae)</p> <p>Endófito de <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p>	 <p>Fumitremorgina C (Cole <i>et al.</i>, 2004)</p>	<p>Antifúngico <i>Candida albicans</i></p>
<p><i>Aspergillus niger</i> IFB- E003 (Trichocomaceae)</p> <p>Endófito de <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p>	 <p>Rubrofusarina B (Song <i>et al.</i>, 2004)</p>	<p>Antibacteriano <i>E. coli</i>, <i>B. subtilis</i></p> <p>Citotóxico SW1116</p> <p>Inhibidor de la xantina oxidasa</p>

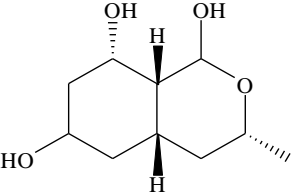
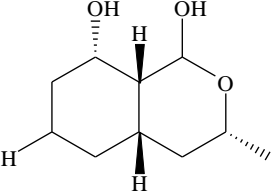
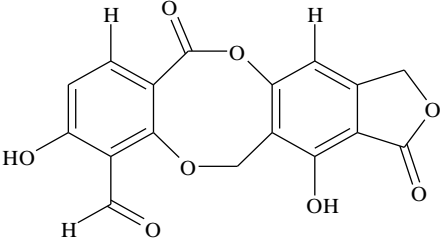


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p>Aspergillus niger IFB-E003 (Trichocomaceae)</p> <p>Endófito de <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p>	 <p>Fonsecinona A (Song <i>et al.</i>, 2004)</p>	<p>Antifúngico <i>T. rubrum</i> Inhibidor de la xantina oxidasa</p>
<p><i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae)</p> <p>Endófito de <i>Ephedra fasciculata</i> (Ephedraceae)</p>	 <p>Globosumona A</p>  <p>Globosumona B (Bashyal <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>Citotóxico NCI-H460 MCF-7 SF-268 MIA Pa Ca-2</p>

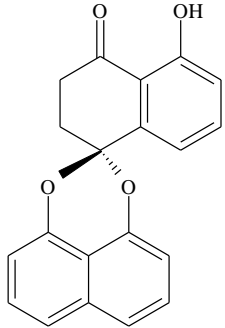
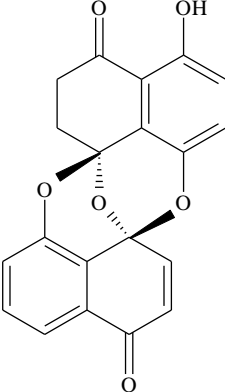


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Botrytis</i> sp. (Sclerotiniaceae)</p> <p>Endófito de <i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)</p>	 <p>6-hidroxiiramulosina</p>  <p>8-dihidroramulosina (Stierle <i>et al.</i>, 1998)</p>	<p>Antibiótico</p>
<p><i>Cordyceps dipterigena</i> F0307</p> <p>Endófito de <i>Desmotes</i> <i>incomparabilis</i> (Rutaceae)</p>	 <p>Cordicepsidona A (Varughese <i>et al.</i>, 2012)</p>	<p>Antifúngico <i>Gibberella</i> <i>fujikuroi</i> <i>Pythium ultimum</i></p>

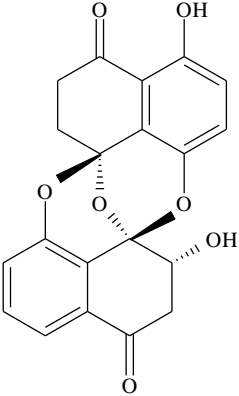
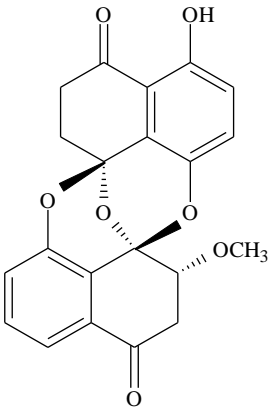


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Edenia gomezpomapea</i></p> <p>Endófito de <i>C. acuminata</i> Endófito de (Verbenaceae)</p>	 <p>Palmarumicina CP₂</p>  <p>Preusomerina EG₁ (Macías-Rubalcava <i>et al.</i>, 2008)</p>	<p>Antifúngico</p> <p><i>A. solani</i>, <i>P. parasitica</i>, <i>P. capsici</i>, <i>F. oxysporum</i></p>

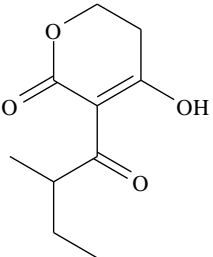
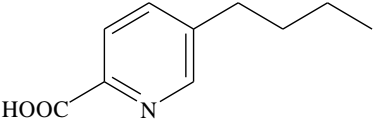
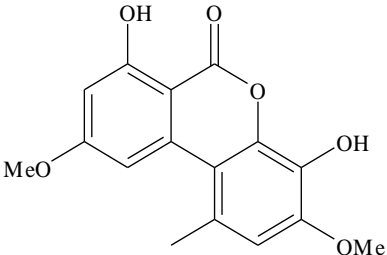


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Edenia gomezpomapea</i></p> <p>Endófito de Endófito de <i>C. acuminata</i> (Verbenaceae)</p>	 <p>Preusomerina EG₂</p>  <p>Preusomerina EG₃ (Macías-Rubalcava <i>et al.</i>, 2008)</p>	<p>Antifúngico</p> <p><i>A. solani</i>, <i>P. parasitica</i>, <i>P. capsici</i>, <i>F. oxysporum</i></p>

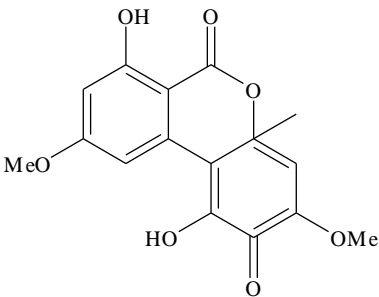
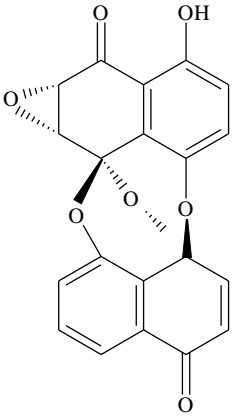


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Fusarium</i> sp.</p> <p>Endófito de <i>Selaginella pallescens</i> (Selaginellaceae)</p>	 <p>Pentacétido CR377 (Tan y Zou 2001)</p>	<p>Antifúngico <i>C. albicans</i></p>
<p><i>Fusarium verticillioides</i></p> <p>Endófito de <i>Zea mays</i> (Poaceae)</p>	 <p>Ácido fusárico (Bacon <i>et al.</i>, 2004)</p>	<p>Antibiótico <i>Bacillus</i> <i>mojavensis</i></p>
<p><i>Microsphaeropsis olivaceae</i> (Ascomycota mitosporico)</p> <p>Endófito de <i>Pilgerodendron uviferum</i> (Cupressaceae)</p>	 <p>Grafislactona (Song <i>et al.</i>, 2004)A</p>	<p>Inhibidor de AChE Antioxidante Secuestrador de radicales libres</p>

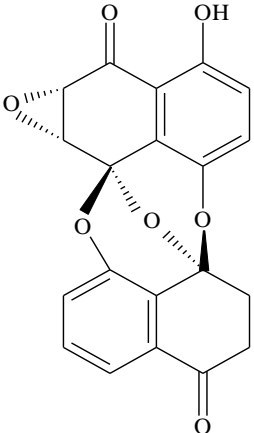
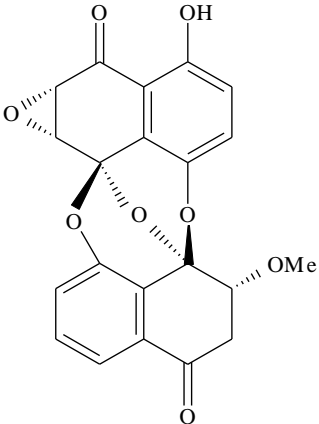


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Microsphaeropsis olivaceae</i> (Ascomycota mitosporico)</p> <p>Endófito de <i>Pilgerodendron uviferum</i> (Cupressaceae)</p>	 <p>Botrallina (Hormazahal <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>Inhibidor de AChE</p>
<p><i>Mycelia sterilia</i> (Ascomycota)</p> <p>Endófito de <i>Atropa bedallona</i> (Solanaceae)</p>	 <p>Preusomerina G (Krohn <i>et al.</i>, 1997)</p>	<p>Antibacteriano <i>B. megaterium</i>, <i>M. violaceum</i> Antifúngico</p>



Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Mycelia sterilia</i> (Ascomycota)</p> <p>Endófito de <i>Atropa bedallona</i> (Solanaceae)</p>	 <p>Preusomerina H</p>  <p>Preusomerina I (Krohn <i>et al.</i>, 1997)</p>	<p>Antibacteriano <i>B. megaterium</i> <i>M. violaceum</i></p> <p>Antifúngico</p>

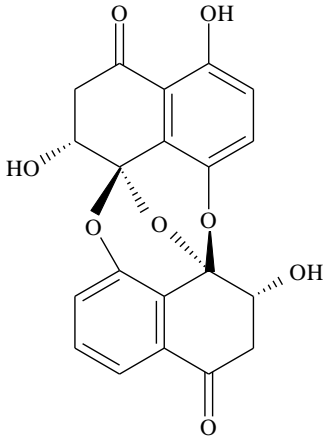
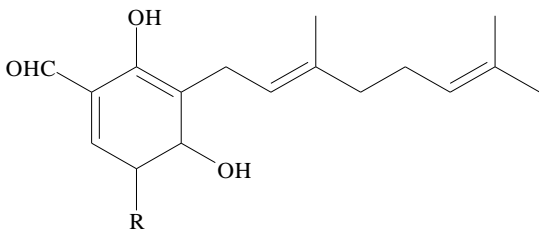
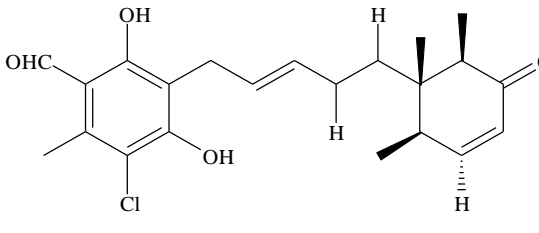


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Mycelia sterilia</i> (Ascomycota)</p> <p>Endófito de <i>Atropa bedallona</i> (Solanaceae)</p>	<div data-bbox="662 491 1029 919"></div> <p data-bbox="743 1003 967 1037">Preusomerina J</p> <div data-bbox="701 1121 993 1549"></div> <p data-bbox="717 1633 993 1726">Preusomerina K (Krohn <i>et al.</i>, 1997)</p>	<p>Antibacteriano <i>B. megaterium</i> <i>M. violaceum</i></p> <p>Antifúngico</p>

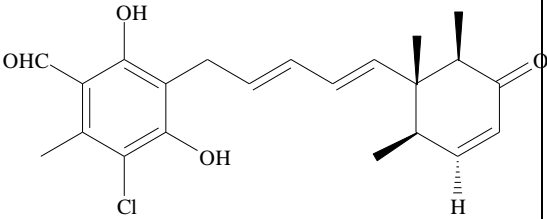
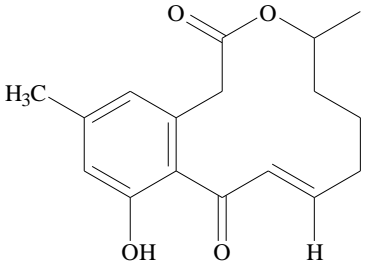
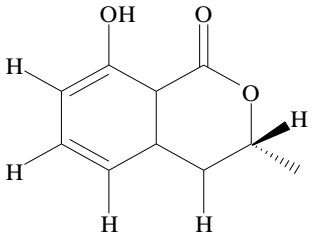


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Mycelia sterilia</i> (Ascomycota)</p> <p>Endófito de <i>Atropa bedallona</i> (Solanaceae)</p>	 <p>Preusomerina L (Krohn <i>et al.</i>, 1997)</p>	<p>Antibacteriano <i>B. megaterium</i> <i>M. violaceum</i></p> <p>Antifúngico</p>
<p><i>Nectria galligena</i> (Nectriaceae)</p> <p>Endófito de <i>Malus domestica</i> (Rosaceae)</p>	 <p>Coletoclorina B</p>  <p>Illicolina C (Gutierrez <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>Inhibe AChE Inhibe α-glucuronidasa</p>

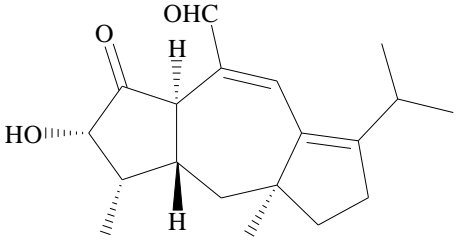
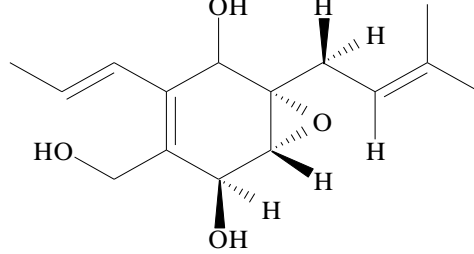
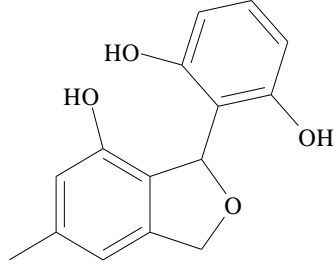


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Nectria galligena</i> (Nectriaceae)</p>	 <p>Illicolina E (Gutierrez <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>Inhíbe AChE Inhíbe α-glucuronidasa</p>
<p>Endófito de <i>Malus domestica</i> (Rosaceae)</p>	 <p>α,β-dehydrocurvularina (Gutierrez <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>Inhíbe germinación y crecimiento radicular y epicotilar Semillas de mijo Abtibacteriano <i>P. syringae</i></p>
<p><i>Penicillium janczewskii</i> (Trichocomaceae)</p> <p>Endófito de <i>Prumnopitys andina</i> (Podocarpaceae)</p>	 <p>Meleina (Schmeda <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>Antibacteriano <i>B. subtilis</i> <i>M. luteus</i> <i>S. aureus</i> Antiviral Virus de la hepatitis C Antifúngico <i>P. variotii</i> <i>P. notatum.</i></p>

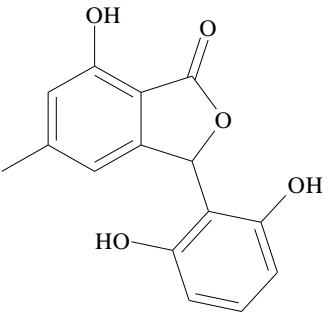
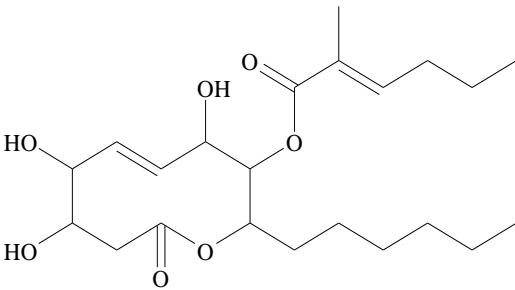
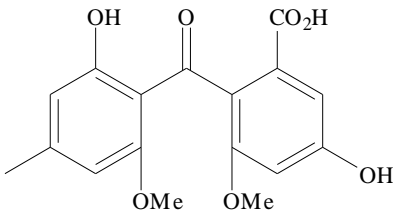


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Periconia</i> sp. OBW-15 (Halosphaeriaceae)</p> <p>Endófito de <i>Taxus cuspidata</i> (Taxaceae)</p>	 <p>Periconicina A (Shin <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>Antifúngico <i>C. albicans</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i> Inhibe el crecimiento radicular</p>
<p><i>Pestalotiopsis jesteri</i> (Amphisphaeriaceae)</p> <p>Endófito de <i>Fragraea bodenii</i> (Gentianaceae)</p>	 <p>Jesterona (Li y Strobel, 2005)</p>	<p>Antifúngico <i>Pythium ultimum</i></p>
<p><i>Pestalotiopsis microspora</i> (Amphisphaeriaceae)</p> <p>Endófito de <i>Terminalia morobensis</i> (Combretaceae)</p>	 <p>Pestacina (Harper <i>et al.</i>, 2003)</p>	<p>Antifúngico <i>P. ultimum</i> Antioxidante</p>

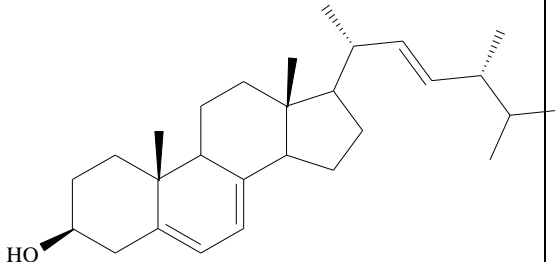
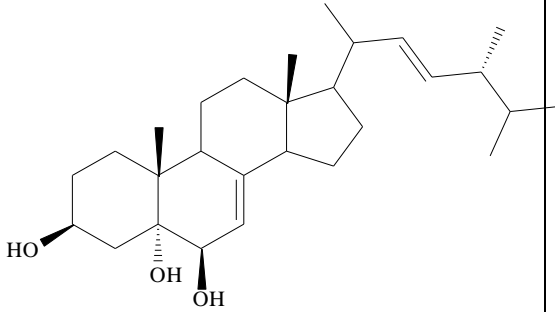
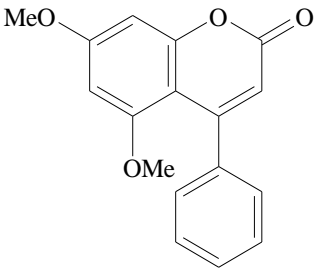


Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Pestalotiopsis microspora</i> (Amphisphaeriaceae)</p> <p>Endófito de <i>Terminalia morobensis</i> (Combretaceae)</p>	 <p>Isopestacina (Harper <i>et al.</i>, 2003)</p>	<p>Antifúngico <i>P. ultimum</i> Antioxidante</p>
<p><i>Phomopsis</i> sp. (Valsaceae)</p> <p>Endófito de <i>Eryhrina crista-galli</i> (Fabaceae)</p>	 <p>Fomol (Weber <i>et al.</i>, 2004)</p>	<p>Antibacteriano Antifúngico Antiinflamatorio TNF-alpha, STAT1/STAT2 y NF-kappaB Edema en oreja de ratón.</p>
<p><i>Rhizoctonia</i> sp. Cy064 (Hymemomycetes mitosporico)</p> <p>Endófito de <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p>	 <p>Acido rizoctonico (Ma <i>et al.</i>, 2004)</p>	<p>Antibacteriano <i>Helicobacter pylori</i>.</p>



Cuadro 1. Metabolitos secundarios bioactivos aislado de hongos endófitos (continuación).

Endófito productor/ Hospedera	Estructura química	Actividad biológica
<p><i>Rhizoctonia</i> sp. Cy064 (Hymemomycetes mitosporico)</p> <p>Endófito de <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p>	 <p>Ergosterol</p>  <p>3β,5α,6β-trihidroxiergosta-7,22-dieno (Ma <i>et al.</i>, 2004)</p>	<p>Antibacteriano <i>H. pylori.</i></p>
<p><i>Streptomyces</i> <i>aureofaciens</i> CMUAc 130 (Streptomycetaceae)</p> <p>Endófito de <i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)</p>	 <p>5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina (Taechowisan <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>Antifúngico <i>F oxysporum.</i> <i>Colletotrichum</i> <i>musae.</i></p>



3. HIPÓTESIS

Los hongos endófitos desarrollan una relación tan estrecha con su hospedera que algunos de ellos son capaces de producir metabolitos secundarios que pueden brindar o ayudar a la planta a desarrollar mecanismos de protección, ayudando así a su supervivencia. Por lo tanto, al aislar los hongos endófitos de su hospedera y crecerlos en las condiciones óptimas para su desarrollo, estos producirán metabolitos secundarios que podrán presentar actividad antifúngica y/o fitotóxica.



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Establecer las características macro y microscópicas de diez hongos endófitos aislados a partir de hojas sanas de cinco plantas colectadas en una zona de alta biodiversidad, y obtener los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, evaluando su actividad biológica sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura y sobre el crecimiento de dos especies vegetales, con la finalidad de evidenciar la presencia de metabolitos secundarios con potencial antifúngico y/o herbicida, que puedan contribuir al desarrollo de nuevos agroquímicos de origen natural, que sean eficaces y puedan tener menor impacto ambiental.

4.2 Objetivos Particulares

- Comprobar la pureza de diferentes aislamientos de hongos endófitos de hojas sanas de *Salvia* sp., *Mimosa affinis*, *Sapium macrocarpum*, *Leucaena macrophylla*, y *Haematoxylon brasiletto*, mediante resiembras sucesivas.
- Realizar el análisis detallado de las características macro (descripción de la colonia anverso, reverso y tasa de crecimiento) y microscópicas (obtención de microcultivos para observar tipos de hifas y estructuras de reproducción) de los hongos endófitos puros.
- Cultivar en pequeña escala los hongos endófitos puros, empleando condiciones de incubación estáticas, y caldo-papa-dextrosa y arroz como medios de crecimiento.
- Obtener los extractos orgánicos de los cultivos en caldo-papa-dextrosa a partir del medio de cultivo a través de particiones sucesivas y del micelio someténdolo a un proceso de maceración exhaustivo.



- Establecer la similitud de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio mediante un análisis cromatográfico en capa fina.
- Evaluar cuantitativamente el potencial antifúngico de los extractos orgánicos de cada hongo endófito, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum*, empleando el método de dilución en agar.
- Determinar cuantitativamente el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*, utilizando el método dilución en agar.
- Establecer la concentración inhibitoria media de los extractos orgánicos más activos, sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las semillas de prueba.
- Poner en evidencia a los hongos endófitos productores de metabolitos secundarios que conduzcan al desarrollo de nuevos agentes antifúngicos o herbicidas alternativos.



5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la Figura 3 se muestra el esquema general de actividades realizadas durante el proceso experimental.

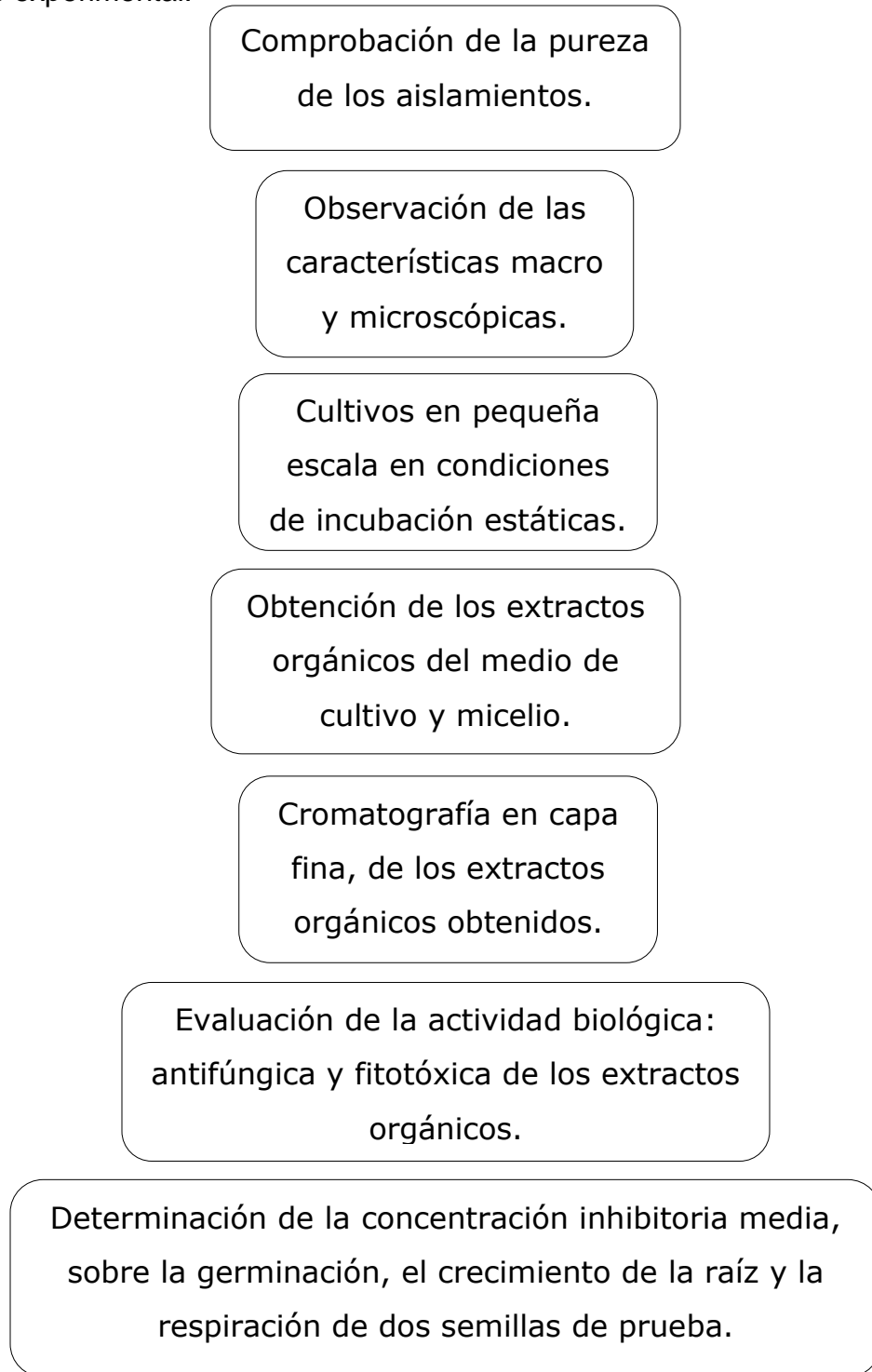


Figura 3. Diagrama general de actividades realizadas.



5.1 MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1.1 Material Fúngico

5.1.1.1 Hongos endófitos.

Se emplearon un total de 9 aislamientos de hongos endófitos aislados a partir de hojas sanas de plantas de *Salvia* sp., *Mimosa affinis*, *Sapium macrocarpum*, *Leucaena macrophylla*, y *Haematoxylon brasiletto*, las cuales fueron colectadas en septiembre de 2010 en una zona de alta biodiversidad, la 'Reserva de la Biosfera de Huautla (REBIOSH)' ubicada en el municipio de Quilamula, estado de Morelos, México. A partir de estos aislamientos se obtuvieron 15 hongos endófitos puros, de los cuales se eligieron 10 para continuar con el desarrollo del presente trabajo.

5.1.1.2 Hongos fitopatógenos.

Como microorganismos de prueba se utilizaron cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, dos hongos, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* (Eumycota); y dos oomicetos, *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum* (Oomycota). Las cepas de microorganismos fueron donadas por la Dra. Olga Gómez y la M. en C. Bertha Tlapal Bolaños, del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

5.1.2 Plantas

Se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae), [amaranto], y *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) [jitomate]. Las semillas de amaranto se compraron en el mercado de Tulyehualco México, D.F y las de jitomate se adquirieron en 'Semillas Berentsen', Celaya, Guanajuato, México.



5.2 COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PURIFICACIÓN Y CRECIMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS.

5.2.1 Papa-Dextrosa-Agar (PDA)

Se hirvieron durante 20 min, 200 g de papas frescas previamente pelada y cortada en cubos pequeños. La decocción resultante se filtró a través de gasa, y se agregaron 20 g de dextrosa y 15 g de agar. Finalmente, se aforó a un volumen final de 1000 mL con agua destilada y se homogenizó totalmente y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Ulloa y Hanlin, 1978).

En caso de requerir antibiótico, éste se adicionó en el medio de cultivo estéril y aun sin solidificar (~40 °C) el procedimiento se realiza en condiciones de esterilidad minutos antes de vaciar en cajas Petri.

5.2.2 Caldo-Papa-Dextrosa (CPD)

El CPD se preparó siguiendo la metodología indicada para el medio PDA con la diferencia de que no se le adicionó agar.

5.2.3 Medio de Arroz (MA)

Se lavaron perfectamente 300 g de arroz y se dejó remojar en agua corriente durante una 1 h se retiró el agua de remojo. Se colocó en un matraz Fernbach de 3000 mL y se agregaron 300 mL de agua destilada. Finalmente se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Aly *et al.*, 2008).

5.3 PURIFICACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS.

A partir de los 9 aislamientos iniciales, se llevó a cabo una serie de resiembras a cajas Petri con medio PDA natural. En algunos casos fue necesaria la adición de antibióticos: cloranfenicol 1 g/L, nitrofurantoína 1 g/L o ampicilina 1 g/L, para la eliminación de bacterias. Los diferentes hongos endófitos, se resembraron hasta observar que las características de crecimiento fueran homogéneas.



Para verificar la pureza de los aislamientos de cada hongo se resembró en 4 cajas Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA. El inóculo se realizó con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro del micelio del hongo en estudio, cultivado previamente en PDA durante 10 días. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente, y con fotoperiodo de luz artificial-oscuridad 12:12 h. Se observaron diariamente, registrando el crecimiento del hongo endófito hasta que alcanzara el límite de crecimiento, es decir, hasta que llenó la caja que lo contenía. Estas observaciones permitieron calcular la tasa de crecimiento y observar la homogeneidad de las características del micelio.

5.4 CARACTERÍSTICAS MACRO Y MICROSCÓPICAS DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.

Las características macroscópicas de cada hongo en estudio se establecieron realizando observaciones en el microscopio estereoscópico de las cajas de Petri empleadas en la purificación de los aislamientos. Se registraron las características del micelio aéreo: color en la parte superior (anverso) y posterior (reverso), textura, consistencia y tipo de crecimiento, así como la presencia de estructuras de reproducción. También se verificó la producción de exudado y la difusión en el medio de cultivo de sustancias coloridas (metabolitos secundarios), y se obtuvieron fotografías de los endófitos a diferentes tiempos de crecimiento (Sánchez, 2010).

Para la determinación de la tasa de crecimiento de los hongos fue necesario registrar diariamente el crecimiento radial o irregular de cada endófito, hasta llegar al límite de la caja. Esta información analizada por medio de escaneo de imágenes con ayuda del escáner CI 202 (Área Meter) permite obtener el crecimiento en cm^2 por día. Las curvas de crecimiento se construyeron graficando el área en cm^2 vs tiempo en días, donde la pendiente indica la tasa de crecimiento. La tasa de crecimiento de los diferentes aislamientos se clasificó como crecimiento lento, medio y rápido (Sánchez, 2010).



Por otra parte, las características microscópicas se establecieron a partir de tinciones frescas realizadas a partir de microcultivos, los cuales permitieron el crecimiento del micelio sobre un portaobjetos el cual fue teñido con rojo Congo para observar las características microscópicas de cada hongo: tipo de micelio (septado o cenocítico), estructuras reproductivas (esporangióforos, conidióforos, basidióforos, ascas) y/o esporas observadas (Sánchez, 2010). Las estructuras fueron apreciadas con ayuda de un microscopio óptico a 40X, marca Motic, (modelo BA410). Finalmente, se capturaron las imágenes con ayuda de una cámara digital, Moticom 2000 de 2.0 (Digital microscopy).

5.5 CULTIVOS EN PEQUEÑA ESCALA EN CONDICIONES ESTÁTICAS.

5.5.1 Cultivo en CPD

Los cultivos en condiciones estáticas empleando CPD se realizaron en matraces Fernbach de 3000 mL conteniendo 1200 mL de medio de cultivo. Los matraces se incubaron durante 30 días a 28°C con un fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad 12:12 h. El inóculo consistió en 5 cortes circulares del micelio de cada hongo endófito, hechos con un sacabocado estéril de 10 mm de diámetro, los inóculos se tomaron del micelio cultivado previamente en PDA durante 8 días (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

5.5.2 Cultivo en medio arroz

Con la finalidad de optimizar las condiciones de cultivo, mejorando el rendimiento obtenido para los extractos orgánicos derivados de los cultivos en CPD, se seleccionaron dos hongos endófitos y se cultivaron en medio arroz. Los cultivos se realizaron en matraces Fernbach de 2800 mL conteniendo 300 g de arroz y 300 mL de agua destilada. Los matraces se incubaron en condiciones estáticas durante 30 días a 28°C con un fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad 12:12 h

(Muriá, 2007). El inóculo fue realizado de la misma manera que para los cultivos en CPD.



5.6 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL MEDIO DE CULTIVO Y MICELIO.

Finalizado el período de incubación de los cultivos en pequeña escala, se procedió a verificar la pureza de los cultivos, mediante preparaciones del medio de cultivo y/o micelio obtenido a los que se les realizó una tinción de Gram, la cual permitió observar que el proceso de crecimiento del hongo no fue afectado por bacterias.

Posteriormente, el medio de cultivo y micelio de los cultivos en CPD se separó, mediante una filtración utilizando gasa. El micelio húmedo se sometió a un proceso de maceración con diclorometano (CH_2Cl_2), realizándose 5 extracciones con un volumen de 500 mL de disolvente, dejando entre cada extracción un periodo de tres días. Inmediatamente después y con el mismo procedimiento, se realizaron 5 extracciones más con acetato de etilo (AcOEt). Al término de la maceración, los extractos resultantes se filtraron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. Por otra parte, los extractos del medio de cultivo se obtuvieron mediante sucesivas particiones empleando también CH_2Cl_2 y AcOEt como disolventes de extracción. La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío.

Los extractos del medio de cultivo y micelio, obtenidos con CH_2Cl_2 y con AcOEt se compararon por cromatografía en capa fina (CCF), con excepción del hongo con clave MA2h2ell, todos los extractos analizados, resultaron cromatográficamente similares, por lo que se decidió unirlos, reduciendo así a dos extractos por hongo (extracto del medio de cultivo CH_2Cl_2 -AcOEt y extracto del micelio CH_2Cl_2 -AcOE). Por último, se registró el rendimiento.

Los extractos orgánicos de los cultivos en medio arroz se obtuvieron mediante un proceso de maceración exhaustivo, siguiendo la metodología empleada para los extractos orgánicos derivados del micelio de los cultivos en CPD. Nuevamente, los dos extractos orgánicos (CH_2Cl_2 y AcOEt) se unieron de acuerdo con el análisis por CCF.



Posteriormente, se evaluó el potencial antifúngico y fitotóxico de todos los extractos obtenidos (23 extractos) [Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2010].

5.7 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO Y FITOTÓXICO

5.7.1 Actividad antifúngica

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico de los extractos orgánicos obtenidos en pequeña escala, se realizó mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos con importancia económica: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum*, utilizando el método de dilución en agar.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar las muestras se pesaron 20 mg de cada extracto y se disolvieron en metanol (~100-300 µL). A continuación, se adicionaron 40 mL de agua destilada estéril y 40 mL de PDA al 2 %, para obtener una concentración final de 250 µg/mL. En cada caja de Petri se colocaron 5 mL de la disolución y se dejaron solidificar (~ 40 °C). A continuación, 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 Petri se incubaron de 2 a 4 días, dependiendo del microorganismo de prueba, a 28 °C con fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad 12:12 h (2 días para los oomicetos y 4 para los hongos). Paralelamente, se realizaron controles negativos PDA-agua (1%) y PDA-Agua (1%)-metanol (300 µL). Como control positivo se utilizó el fungicida comercial Prozycar® 50 P.H (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato) a una concentración de 250 µg/mL, para hongos verdaderos y el Ridomil Gold 4E® (metalaxil-m) para los oomicetos a una concentración de 250 µg/mL.

Al finalizar el período de incubación se realizaron dos mediciones perpendiculares del diámetro del micelio de cada uno de los hongos fitopatógenos y sus respectivas repeticiones. 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 GraphPad Prism versión 5.0) [Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008].

5.7.2 Actividad fitotóxica

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio, se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación, la longitud de la raíz y la respiración de las plántulas de *A. hypochondriacus* y *S. esculentum*, utilizando el método de dilución en agar. Estas especies son plantas modelo ampliamente utilizadas para establecer de manera preliminar el efecto herbicida de extractos orgánicos, fracciones cromatográficas y compuestos puros, son especies que presentan alta viabilidad y rápida germinación (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2010, Sánchez, 2010, Huelgas, 2011).

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar las muestras se pesaron 4 mg de extracto orgánico y se disolvieron en metanol (~100-300 μ L). Posteriormente, se agregaron 20 mL de agua destilada y 20 mL de agar al 2 %, obteniéndose una concentración final de 100 μ g/mL. Posteriormente, 5 mL de las disoluciones se vertieron en las cajas de Petri y se dejaron solidificar por completo (~ 40 °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°C y la actividad fitotóxica se registró contando el número de semillas germinadas y midiendo la longitud de la raíz después de 24 h para el caso de *A. hypochondriacus*, y 72 h para *S. lycopersicum*. Paralelamente, se evaluaron los controles positivos y negativos. Como control negativo se usó agar-agua al 1 % y agar-agua al 1 %-metanol (~100-300 μ L). Como control positivo se usó el herbicida comercial RIVAL® (Glifosato: sal monoamónica de N-(fosfometil) glicina) a 100 y 200 μ g/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, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

Los extractos orgánicos que demostraron los mayores porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba, se seleccionaron para evaluar su efecto sobre la respiración durante el proceso de germinación de las plántulas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*, mediante el registro del consumo de oxígeno utilizando un electrodo de Clark tipo O₂ conectado a un oxímetro YSI[®] modelo 5300 a 27°C. Las muestras a evaluar se prepararon siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente, utilizando en este caso 4 diferentes concentraciones, 25, 50, 100 y 200 µg/mL y 30 semillas de prueba. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las plántulas de cada una de las cajas de Petri se transfirieron a una celda de vidrio, y se adicionaron 5 mL de agua desionizada. El consumo de oxígeno se registró cada 5 segundos durante 3 minutos (King-Díaz, *et al.*, 2005). El análisis mediante regresión lineal simple de cada una de las curvas permitió determinar cuantitativamente el oxígeno consumido por las plántulas de cada una de las semillas de prueba. Por último, se determinó la longitud de las radículas y se contó el número de semillas sin germinar. Los resultados de germinación, crecimiento de la raíz y consumo de oxígeno, se analizaron mediante un ANOVA de una vía, modelo I ($\alpha=0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD. Asimismo, los valores de concentración inhibitoria media (CI₅₀) se determinaron usando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Sánchez, 2010; Huelgas, 2011).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La presente investigación se desarrolló con el propósito de estudiar el potencial antifúngico y fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, obtenidos a partir de diez hongos endófitos aislados de cinco diferentes plantas, colectadas en una zona de alta biodiversidad. Con este trabajo se pretende poner en evidencia la importancia que han adquirido los metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos.

Los resultados obtenidos se dividen en cinco partes. La primera comprende la purificación y determinación de las características macro y microscópica de 10 aislamientos de hongo endófitos. La segunda corresponde a la obtención de cultivos en pequeña escala en condiciones estáticas, empleando como medios de crecimiento caldo-papa-dextrosa y arroz. La tercera pertenece a la obtención de los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio. La cuarta etapa abarca, la evaluación cuantitativa del potencial antifúngico y fitotóxica de los extractos orgánicos, sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura y dos plantas de prueba. Finalmente, la quinta parte incluye la determinación de la CI_{50} de los extractos orgánicos que presentaron mayor actividad fitotóxica, sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las dos semillas de prueba.

6.1 Obtención de aislamientos puros

El presente proyecto se inició con 9 aislamientos de hongos endófitos de hojas sanas de plantas de *Salvia* sp., *Mimosa affinis*, *Sapium macrocarpum*, *Leucaena macrophylla*, y *Haematoxylon brasiletto*. Estas especies se colectaron en la 'Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla' (REBIOSH), en el estado de Morelos. La vegetación de esta zona es de selva baja caducifolia y cuenta con un total de 130 familias, 469 géneros y 967 especies de plantas vasculares (Saldaña Fernández; *et al.*, 2007). El criterio de selección fue además de plantas que crecen en aéreas de gran diversidad biológica (Guirado, 2008) aquellas que no



presentaran ningún daño por patógenos o herbívoros, es decir, se colectaron bajo un criterio ecológico. Cabe destacar que para las plantas elegidas no hay reportes en la literatura, acerca del aislamiento e identificación de sus hongos endófitos.

A partir de los aislamientos iniciales, se logró la obtención de 14 hongos puros, eligiéndose 10 de ellos para continuar con la estrategia experimental planteada. A cada una de los aislamientos puros se les asignó una clave para facilitar su identificación. Las claves de cada hongo se designaron de la siguiente manera: las primeras dos o tres letras corresponden a las iniciales de la planta hospedera, los caracteres siguientes consisten en las resiembras necesarias para el aislamiento puro. En el caso de *Haematoxylon brasiletto*, el nombre común más utilizado es palo de Brasil, por lo cual las iniciales en la clave para los aislamientos de esta planta son PB.

En el Cuadro 2 se muestran las claves asignadas a cada una de los aislamientos puros.

Cuadro 2. Asignación de claves a los hongos endófitos aislados de cada planta hospedera.

Hospedera	Clave del hongo endófito
<i>Haematoxylon brasiletto</i>	PB3fl* PB3fi*
<i>Salvia sp.</i>	Ssp6ll19*
<i>Sapium macrocarpum</i>	SM2Fg3* SM2Fg3IA SM2Fg3IB SM2Fg3IC SM2ell*
<i>Leucaena macrophylla</i>	LM5f2l2A* LM5f2l2B* LM5f2l2R LM3C1l*
<i>Mimosa affinis</i>	MA2h2el* MA1d1ll*

* Hongos endófitos elegidos para trabajar.



6.2 Determinación de las características macro y microscópica de los hongos endófitos puros.

Las características macroscópicas de los hongos puros se determinaron por observación con un microscópico estereoscópico de los cultivos en PDA, estableciéndose: color, textura, superficie, consistencia y tipo de crecimiento del micelio, presencia de pigmentos y de exudado. Las características microscópicas se establecieron a partir de tinciones de los micelios frescos, teñidos con rojo Congo, por observación con un microscópico óptico, registrándose el tipo de micelio (septado o cenocítico, hialino o dematiáceo), estructuras reproductivas, ascas y esporas [basidiosporas, ascosporas, esporangiosporas y/o conidios]. A continuación se describen las características más importantes para cada uno de los hongos seleccionados.

En la Figura 4 **A** se muestra un cultivo de 15 días en CPD del endófito **PB301**. Se observa la formación de micelio aéreo aterciopelado y de consistencia dura, presenta elevación umbonada inicialmente es de color blanco y con el tiempo se torna color café. Se observa producción de exudado color café intenso. En el envés se presenta una coloración amarilla. Su crecimiento es radial con bordes ligeramente lobulados, con una tasa de crecimiento de 2.5 cm²/día (Fig. 15)

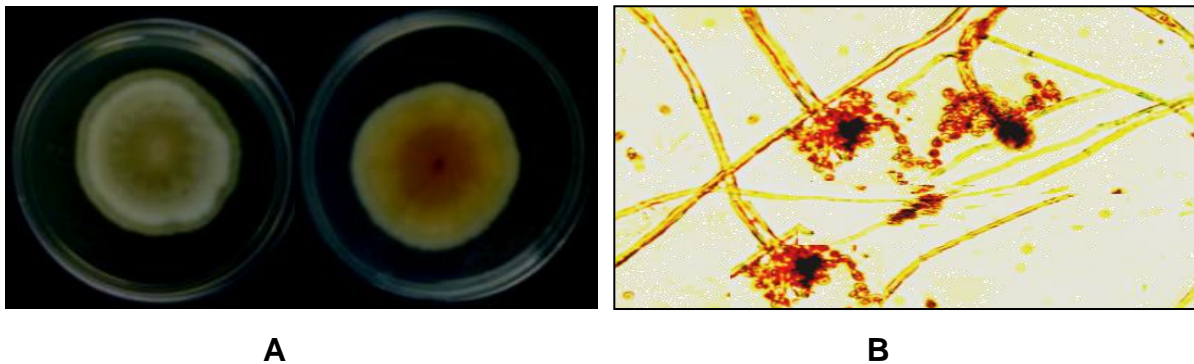


Figura 4. Endófito **PB301**. **A)** Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). **B)** Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.

La Figura 4 **B**, presenta las estructuras del endófito **PB301** en una preparación teñida con rojo Congo observada a 40X. Se aprecian hifas septadas dematiáceas,



esporas y conidióforos con vesículas y conidios. La tinción nos permite observar estructuras muy similares a cabezas aspergilares.

En la Figura 5 **A** se muestra un cultivo de 15 días en CPD del hongo endófito **PB3fl**. Se observa la formación de micelio aéreo con elevación irregular de aspecto opaco y consistencia dura, inicialmente color blanco que después toma una coloración café tenue y en algunas partes aparecen puntos de color verde; el crecimiento es radial con bordes regulares. Hay escasa producción de exudado hialino. La tasa de crecimiento es de $6.18 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Fig.15). En el envés, presenta anillos con bordes irregulares y presenta una coloración inicialmente blanca que con el paso de los días se torna amarilla tenue y se difunde en todo el medio de cultivo.

En la Figura 5 **B** se presentan las estructuras observadas para el endófito **PB3fl** en una preparación microscópica teñida con rojo Congo, observándose hifas septadas dematiáceas y esporas aisladas.

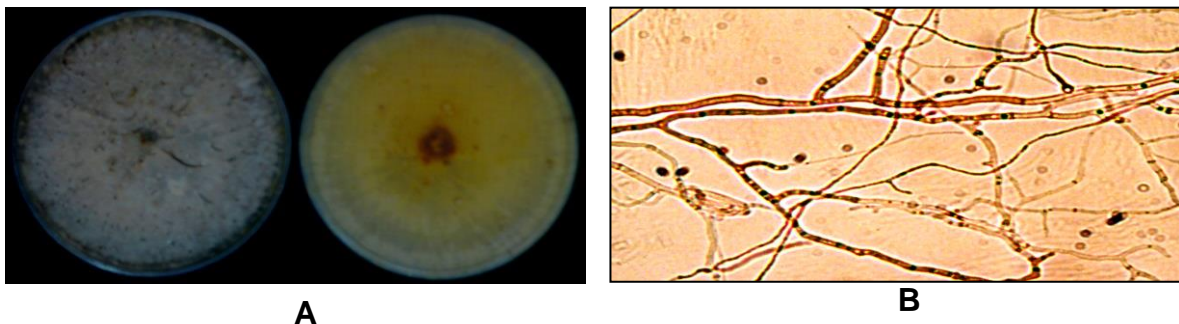


Figura 5. Endófito PB3fl. **A)** Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). **B)** Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.

En la Figura 6 **A** se muestra un cultivo de 15 días en CPD del hongo endófito **Ssp6II19**. Este microorganismo forma micelio aéreo de crecimiento denso, apariencia algodonosa, y de consistencia membranosa. Es de color blanco en la periferia, el centro está formado por micelio de consistencia ligeramente mucosa de color amarillo. Con la edad la colonia se torna color café muy suave. En el envés presenta una coloración inicialmente amarilla que con el paso de los días se difunde ligeramente al medio. No se observó la producción de exudado. El



crecimiento es radial con bordes ligeramente ondulados. Su tasa de crecimiento es $8 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Fig. 15).

En la Figura 6 **B** se presentan las estructuras observadas a 40X en una preparación del micelio fresco teñido con rojo Congo, observándose hifas septadas hialinas. También se observan hifas más delgadas que provienen de algunas más gruesas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.

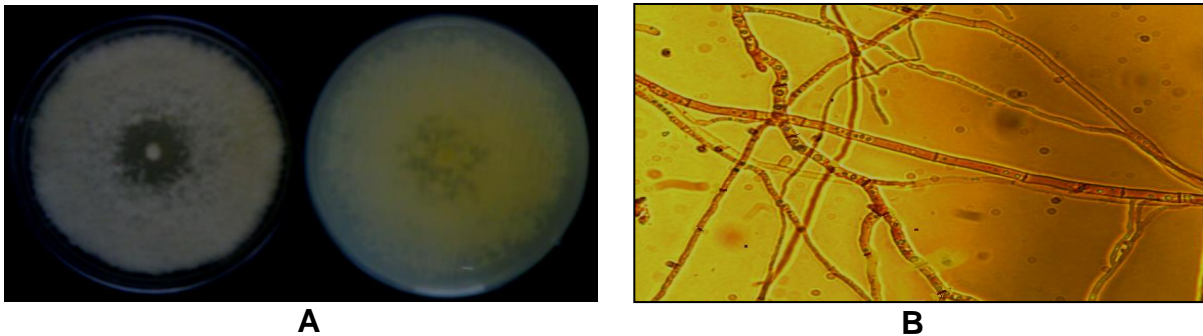


Figura 6. Endófito Ssp6II19. **A)** Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). **B)** Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.

En la Figura 7 **A** se muestra un cultivo de 15 días en CPD del hongo **SM2Fg3**. Este microorganismo forma micelio aéreo, que en un inicio es de color blanco, alrededor del tercer día comienza a tornarse de color café, es de textura pulverulenta forma anillos radiales, alternando color blanco-café, hasta que finalmente se torna totalmente color café con el tiempo, sin perder su forma anillada. Se observó escasa producción de exudado de color ámbar. En el envés también presenta anillos radiales, se observa la producción de pigmentos color ámbar que se difunde abundantemente al medio de cultivo. El crecimiento es radial con bordes lisos bien definidos. La tasa de crecimiento es de $5.1 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Fig. 15), logrando llenar la caja de Petri con medio PDA en un lapso de 15 días.

En la Figura 7 **B** se presentan las estructuras observadas a 40X en una preparación microscópica teñida con colorante rojo Congo. Se observan hifas septadas, hialinas. Dentro de las estructuras de reproducción se observan



conidióforos de donde sobresalen conidios agrupados en racimos, estructuras muy similares al género *nodulisporium*.

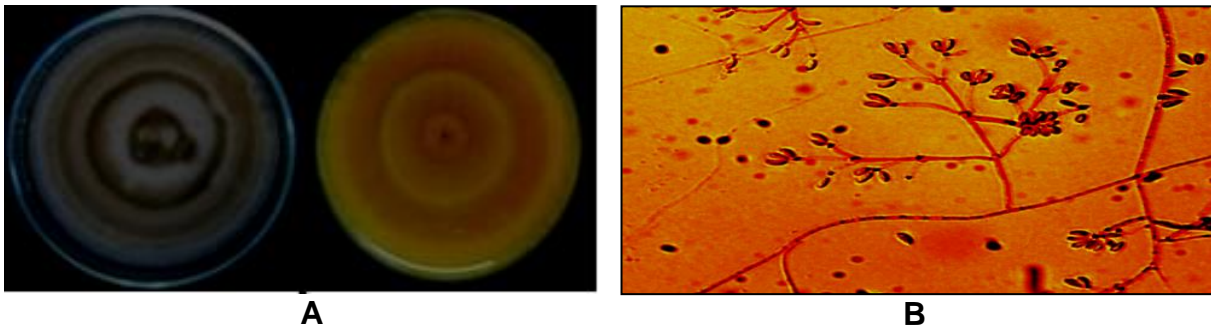


Figura 7. Endófito SM2Fg3. **A)** Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). **B)** Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.

En la Figura 8 **A** se muestra un cultivo de 15 días en CPD del hongo endófito **SM2ell**. Este hongo forma micelio aéreo de textura granular, consistencia dura, inicialmente es de color blanco, y posteriormente se torna de color café muy tenue. Produce escaso exudado hialino. En la superficie hay formación de surcos. En el envés es de color blanco, y con el paso del tiempo cambia a una coloración amarilla tenue. La tasa de crecimiento es de 4.7 cm²/día (Fig. 15).

La Figura 8 **B** muestra las estructuras observadas a 40X en una tinción con rojo Congo del micelio fresco; donde se aprecian hifas septadas hialinas, también se observan algunas hifas más delgadas que derivan de hifas más gruesas, que probablemente estén relacionadas con de la edad de las hifas. En estas condiciones de crecimiento no fue posible observar estructuras de reproducción.

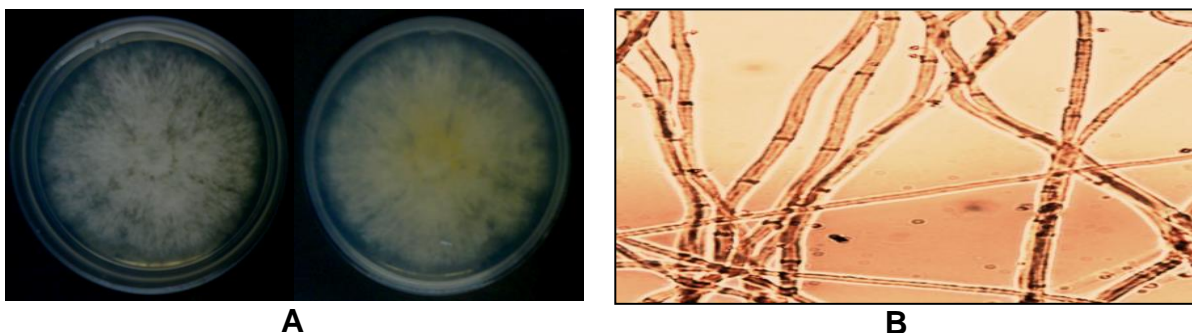


Figura 8. Endófito SM2ell. **A)** Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). **B)** Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.



En la Figura 9 **A** se muestra un cultivo de 15 días en CPD del hongo endófito **LM5f2I2A**. Este hongo forma micelio aéreo plano, de textura aterciopelada y aspecto brillante, es de color blanco y se mantiene alrededor de dos meses, después comienzan a aparecer puntos de color café oscuro y finalmente se torna de apariencia pecosa. El crecimiento es radial, con bordes lisos bien definidos. La tasa de crecimiento es de $4.3 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Fig. 15). En el envés presenta una coloración amarilla intensa que se difunde abundantemente en el medio de crecimiento, se observa la formación de un halo sectorizado de color anaranjado en el centro de la caja el cual no alcanza la periferia.

La Figura 9 **B**, muestra las estructuras observadas en una preparación microscópica de micelio del endófito teñido con rojo Congo. Se observan hifas septadas, ramificadas, y dematiáceas, además se observan hifas de diferente grosor, las hifas delgadas, provienen de las más gruesas. Bajo estas condiciones de cultivo no se observaron estructuras de reproducción, no obstante se aprecian algunas esporas aisladas.

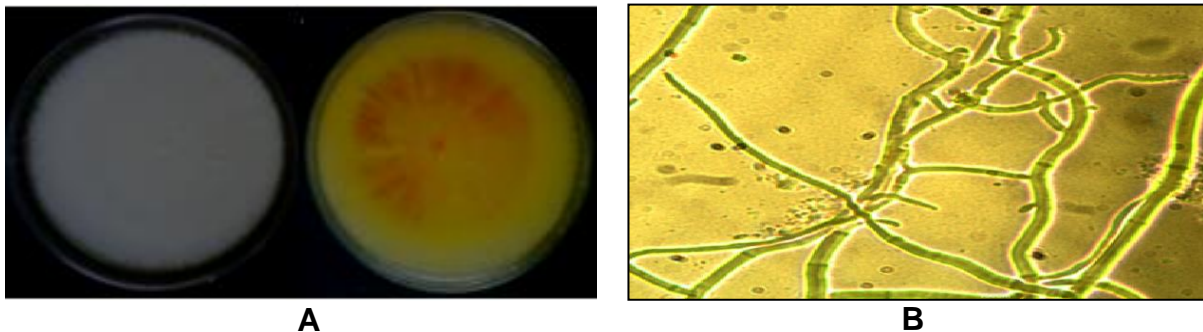


Figura 9. Endófito LM5f2I2A. **A)** Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). **B)** Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.

En la Figura 10 **A** se muestra un cultivo de 15 días en CPD del endófito **LM5f2I2B**. Su crecimiento radial con bordes lobulados, con superficie rugosa y consistencia dura, su micelio es de color blanco y con el tiempo se torna con partes de color verde para obtener finalmente un aspecto moteado. Con la edad se observa la producción de exudado hialino. En el envés presenta una coloración amarilla tenue que se concentra en la parte central y se difunde escasamente al medio. La tasa de crecimiento es de $5.2 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Fig. 15)



En la Figura 10 **B**, se presentan las estructuras observadas en una preparación del micelio fresco teñido con rojo Congo, donde se pueden apreciar hifas septadas, dematiáceas algunas en forma de rizos. Las condiciones de crecimiento no permitieron observar estructuras de reproducción.

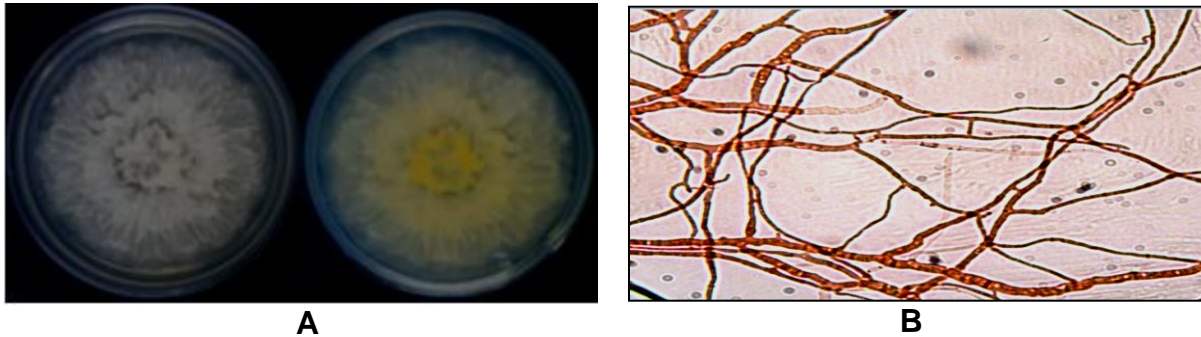


Figura 10. Endófito LM5f2l2B. **A)** Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). **B)** Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.

En la Figura 11 **A** se muestra un cultivo de 15 días en CPD del hongo endófito **LM3C1I**. Este endófito presenta micelio aéreo de forma irregular, elevación umbonada, textura lanosa y de aspecto opaco, la superficie crece en forma de capas lanosas, es inicialmente de color blanco brillante, y posteriormente se torna color café verdoso, y finalmente al paso del tiempo se aprecia totalmente de color café-marrón. Las hifas nuevas siguen el mismo patrón de crecimiento, por tal motivo, en el cultivo de 15 días de crecimiento es posible apreciar hifas totalmente oscuras y algunos holanes en la periferia de color blanco. No produce exudado y su tasa de crecimiento es de $5.3 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Fig. 15). El envés del micelio es inicialmente color blanco, y con el paso de los días se observa totalmente café muy oscuro.

La Figura 11 **B** muestra las estructuras observadas a 40X del hongo endófito **LM3C1I** en una tinción con rojo Congo. Se aprecian hifas septadas, hialinas. Bajo estas condiciones de crecimiento no fue posible observar estructuras de reproducción.

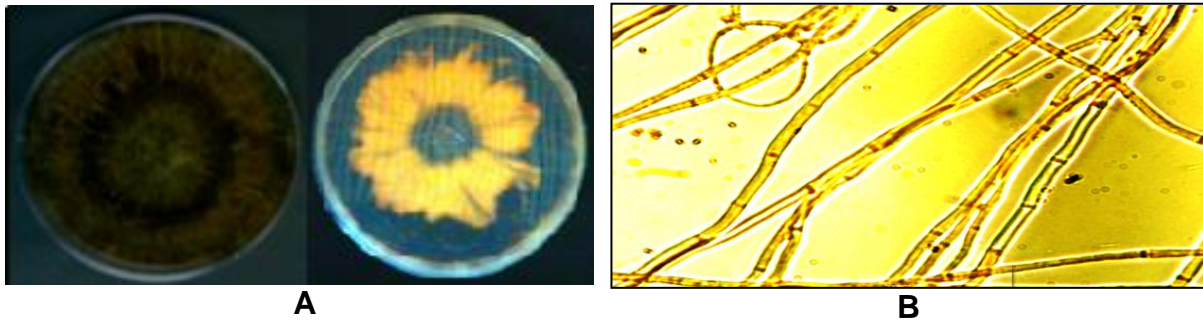


Figura 11. Endófito LM3C11. **A)** Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). **B)** Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.

La Figura 12 **A** muestra un cultivo de 15 días en CPD del hongo endófito **MA2e2hII**. Este microorganismo forma micelio aéreo de superficie plana, textura algodonosa, y consistencia fibrosa, y de aspecto opaco. En un principio es de color blanco, con el tiempo se observa de color salmón y finalmente se torna de color café claro. Su crecimiento es radial con bordes regulares. No hay producción de exudado. La tasa de crecimiento es de $6.8 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Fig.15). En el envés se observa de color ligeramente amarillo y con el paso de los días aparecen zonas de color salmón que se aprecian dispersas por todo el micelio.

La Figura 12 **B** presenta las estructuras del hongo endófito **MA2e2hII** teñidas con colorante rojo Congo observadas a 40X. Las hifas observadas son ramificadas, septadas y dematiáceas, se observan esporas aisladas parecidas a conidiosporas, sin embargo no se observan conidióforos. Se logran observar hifas de diferentes grosores, que provienen de una misma hifa.

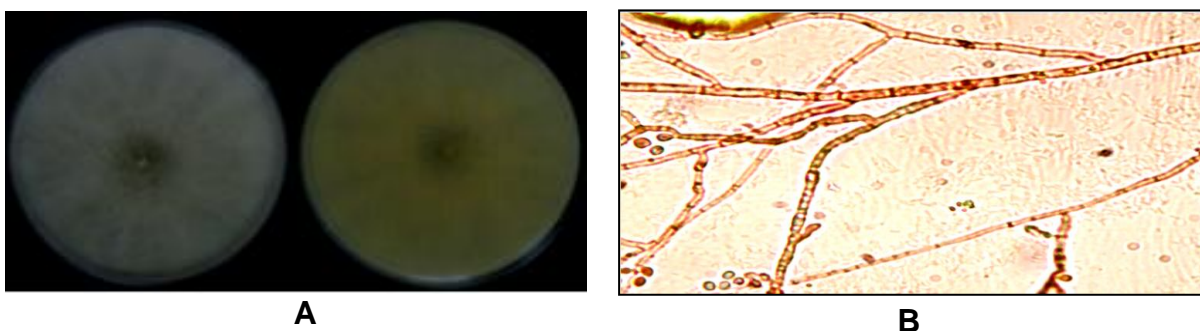


Figura 12. Endófito MA2h2eII. **A)** Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). **B)** Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.

Finalmente, en la Figura 13 **A** se muestra un cultivo de 15 días en CPD del hongo endófito **MA1d1II**. Forma un micelio aéreo de superficie plana, textura pulverulenta



en el centro y algodonosa en la periferia, de consistencia vellosa. Inicialmente es color blanco y posteriormente se torna totalmente de color café. El crecimiento es radial con los bordes irregulares. No hay presencia de exudado. En el envés presenta una coloración amarilla intensa que se difunde al medio de cultivo, con el paso de los días este pigmento se torna negro brillante. La tasa de crecimiento es de 4.8 cm²/día (Fig. 15).

La Figura 13 **B** muestra las estructuras que presenta el hongo **MA1d1II** observadas a 40X en una tinción con rojo Congo. Se logran apreciar múltiples hifas ramificadas, septadas hialinas. Se observan conidios agrupados en racimos que se originan de un conidióforo y algunas conidiosporas aisladas. Estructuras muy parecidas a *nodulisporium*.

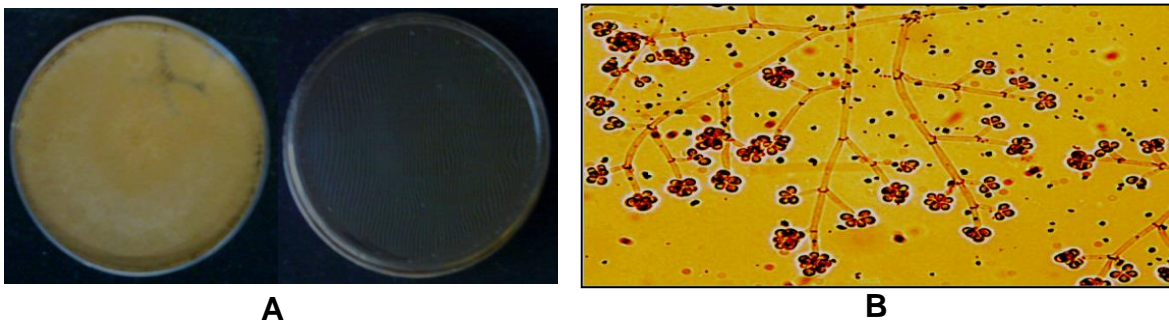


Figura 13. Endófito MA1d1II. **A)** Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.), reverso (der.). **B)** Observación microscópica en 40X, teñida con colorante rojo Congo.

Cabe destacar que la homogeneidad observada en las características tanto macro como microscópicas de cada una de las cuatro resiembras analizadas para cada uno de los aislamientos en estudio, permitió confirmar su pureza. Por lo que se puede asegurar que los hongos endófitos en estudio pertenecen a un solo morfotipo.

En la Figura 14 se muestra a manera de ejemplo las imágenes del crecimiento en diferentes etapas del hongo endófito LM3C1I. Como se logra observar las características macroscópicas del hongo endófito LM3C1I se van modificando con el paso de los días; el micelio aéreo que en un inicio es de color blanco, con el paso del tiempo comienza a tornarse de color beige en el centro, hasta quedar totalmente de color café-verdoso. Pasando por una etapa en la que se logra



apreciar que las hifas nuevas de la periferia son de color blanco, mientras el centro empieza a cambiar de color. En el reverso también hay cambios en la coloración del micelio, de un micelio blanco pasa a color amarillo en el centro y verde oscuro en la periferia a los 30 días de crecimiento. Las mismas características se mostraron en cada una de las 4 cajas resembradas en PDA. Además, esta información permitió la obtención de las curvas de crecimiento de cada uno de los microorganismos puros (Fig.15).

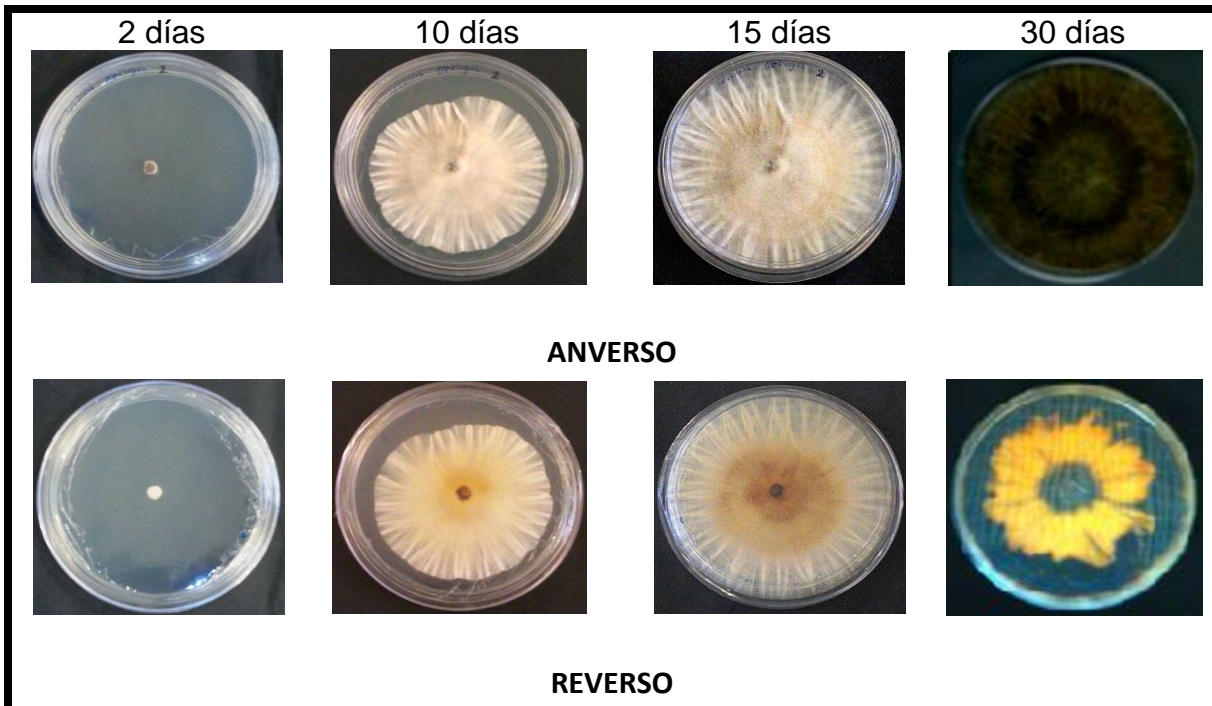
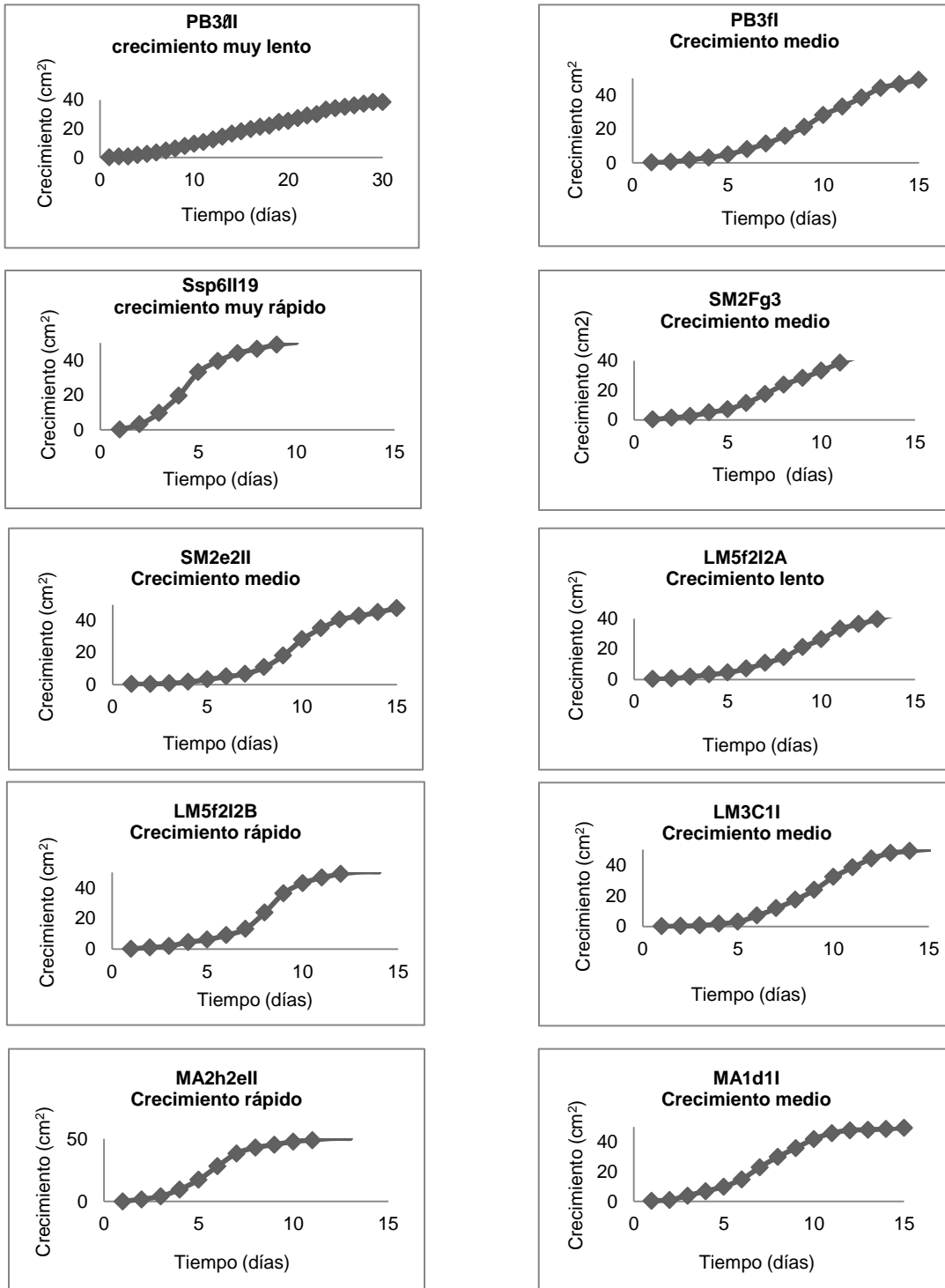


Figura 14. Curva de crecimiento del endófito LM3C11. En medio PDA a los 2, 10, 15 y 30 días crecimiento.

La tasa de crecimiento para cada aislamiento puro se estableció mediante la construcción de las curvas de crecimiento, graficando el área en cm^2 vs tiempo en días, donde la pendiente indica la tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$). Dicha tasa de crecimiento se clasificó arbitrariamente en 5 categorías como: crecimiento muy lento ($< 3 \text{ cm}^2/\text{día}$), lento ($3-4.5 \text{ cm}^2/\text{día}$) medio ($4.6-6 \text{ cm}^2/\text{día}$), rápido ($6.1-7 \text{ cm}^2/\text{día}$) y muy rápido ($> 8 \text{ cm}^2/\text{día}$). Las curvas de crecimiento obtenidas para los 10 endófitos se presentan en la Figura 15 indicando a qué tipo de crecimiento pertenece.



Figura 15 Curvas de crecimiento de los 10 endófitos puros en estudio, en cultivos en PDA.





Como se puede apreciar todos los hongos presentan un comportamiento típico de crecimiento, observándose las fases de latencia, crecimiento exponencial y estacionaria (Al-Qadiri *et al.*, 2007). Estas características son importantes ya que los aislamientos puros crecen a la misma tasa de crecimiento, siempre y cuando se siembren exactamente bajo las mismas condiciones, como se hizo en el presente trabajo. Asimismo, se puede aprovechar la tasa de crecimiento calculada, para realizar bioensayos de antagonismo directo entre hongos endófitos y entre endófitos y fitopatógenos con importancia económica, y de esta forma elegir de manera preliminar a los hongos con mayor potencial antagónico (Huelgas, 2011; Sánchez, 2010; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008). En este proyecto se estableció el potencial biológico directamente a nivel de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio.

6.3 Condiciones de cultivo

Con el propósito de obtener los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos y comprobar que poseen potencial antifúngico y fitotóxico, cada hongo fue cultivado en pequeña escala empleando 1.2 L de medio CPD, incubándolo bajo condiciones estáticas, por un período de 30 días, con fotoperiodo de luz fluorescente oscuridad 12:12 h a temperatura ambiente.

Inicialmente los endófitos se cultivaron en CPD, este medio de cultivo favorece el crecimiento de los hongos endófitos y, en general, permite la producción de metabolitos secundarios con buenos rendimientos (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2010). Adicionalmente, se cultivaron en medio arroz a los endófitos que no desarrollaron apropiadamente en CPD y/o que presentaron el menor rendimiento para los extractos derivados del medio de cultivo y micelio (Aly *et al.*, 2008). Asimismo, se corroboró si el endófito que presentó el mayor rendimiento para los extractos orgánicos, también crece favorablemente en medio arroz mejorando el rendimiento obtenido en CPD.



6.4 Obtención de cultivo en pequeña escala

Con excepción del hongo Ssp6II19, todos los hongos se vieron favorecidos al crecerlos en medio CPD, incubándolos bajo condiciones estáticas, ya que lograron crecer totalmente en la superficie del medio de cultivo en el tiempo estipulado, no hubo problemas de contaminación y se obtuvieron buenos rendimientos para los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, permitiendo así, llevar a cabo las pruebas biológicas preliminares para establecer su potencial biológico. Es importante mencionar, que estos hongos conservaron las características macroscópicas observadas en cultivos sólidos en caja Petri. Los hongos que habían producido exudado en caja lo hicieron también en medio líquido, sin embargo, el endófito PB3II, tuvo una producción de exudado aún más cuantiosa, motivo por el cual se separó con ayuda de una pipeta Pasteur, para posteriormente extraer los metabolitos secundarios presentes en el exudado, desafortunadamente no se logró obtener compuestos detectables por cromatografía en capa fina (CCF).

El hongo Ssp6II19 no logró crecer de manera satisfactoria en medio líquido. Las características macroscópicas fueron diferentes a las observadas en cultivo en caja de Petri empleado PDA. El micelio aéreo mostró un aspecto cremoso y consistencia mucilaginoso. Al término del mes de incubación la superficie del medio de cultivo estaba llena en su totalidad, sin embargo el grosor del micelio era muy escaso a diferencia del crecimiento observado en caja Petri, donde el micelio es muy denso y de aspecto algodonoso (Figura 6 A). La preparación microscópica realizada al medio de cultivo y micelio después de finalizado el periodo de incubación no mostró contaminación por bacterias lo que pudo haber explicado las diferencias macroscópicas, por lo que es evidente que el medio CPD en condiciones de incubación estáticas, no es el idóneo para el desarrollo de este endófito. A pesar del crecimiento pobre del microorganismo, se procedió a obtener los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, desafortunadamente, el rendimiento fue muy bajo y no fue suficiente para realizar las pruebas biológicas. Con la finalidad de optimizar su crecimiento y por ende el de los extractos



orgánicos, se decidió cultivarlo en medio de arroz (incubación estática, periodo de 30 días, fotoperiodo 12:12 h a temperatura ambiente). Por otra parte, el cultivo del endófito PB30I en CPD, proporcionó el mayor rendimiento para los extractos del medio de cultivo y micelio, no obstante, también se cultivó en medio arroz para verificar si este medio mejora la producción de metabolitos secundarios. En ambos casos se observó que el desarrollo de los endófitos es similar al observado en medio sólido.

En todos los casos, una vez transcurrido el periodo de incubación, se obtuvieron los extractos orgánicos empleando un proceso de maceración para el micelio y mediante un proceso exhaustivo de partición para los extractos del medio de cultivo utilizando CH_2Cl_2 y AcOEt como disolventes de extracción. En el Cuadro 3 se muestran los rendimientos obtenidos para los extractos orgánicos de los 10 endófitos cultivados en pequeña escala, en los dos medios de cultivo empleados. Como se puede apreciar, en los cultivos en CPD, en todos los casos se obtuvo un rendimiento mucho mayor para el extracto del micelio que para el derivado del medio de cultivo.

Cuadro 3. Rendimientos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos cultivados en pequeña escala.

Clave del Endófito	Medio de Cultivo	Rendimiento de los extractos orgánicos (mg/L)		Rendimiento total (mg)
		Medio de cultivo	Micelio	
PB30I	CPD	772.4	3816.3	4588.7
PB30I	Arroz	2056.4***		2056.4
PB3fI	CPD	45.7	361.4	407.1
Ssp6I19	CPD	40	68.8	108.8
Ssp6I19	Arroz	1255.9***		1255.9
SM2Fg3	CPD	537.7	762.1	1299.8
SM2eII	CPD	452.7	815.1	1267.8
LM5f2I2A	CPD	30.9	344.2	375.1
LM5f2I2B	CPD	31.8	400.5	719.3
LM3C1I	CPD	233.7	817.1	1050.8
MA2h2eII	CPD	221.7*	200.5**	724.2
MA1d1II	CPD	250.1	615.9	866.0

Los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos del medio de cultivo extraído con CH_2Cl_2 * y con AcOEt**, son diferentes por lo que se decidió no unirlos y evaluarlos de manera independiente. *** El rendimiento corresponde a 300 mg de arroz.



Cabe mencionar que cada uno de los extractos orgánicos obtenidos se analizó por CCF. En primera instancia se realizó la comparación del perfil metabólico de los extractos obtenidos para el medio de cultivo con CH_2Cl_2 y AcOEt, y para los del micelio, observándose que, con excepción de los extractos del endófito MA2h2ell, cada par de extractos (extracto del micelio CH_2Cl_2 y AcOEt y extracto del medio de cultivo CH_2Cl_2 y AcOEt) son cromatográficamente similares, por lo que se decidió unirlos. Una vez reunidos los extractos orgánicos, se realizó otro análisis cromatográfico con el fin de comparar los extractos del medio de cultivo y los del micelio de cada hongo. La CCF permitió observar diferencia en la composición metabólica entre los extractos del medio de cultivo y del micelio de cada endófito, por lo que se decidió evaluarlos por separado.

En la Figura 16 se muestra a manera de ejemplo la CCF para los extractos derivados del cultivo del endófito SM2Fg3 en CPD, observándose pequeñas diferencias en los metabolitos secundarios presentes en el medio de cultivo empleando CH_2Cl_2 y AcOEt, esta misma información se obtuvo para los extractos del micelio. Las diferencias observadas radican únicamente en la concentración de los compuestos, siendo mayor en la extracción con CH_2Cl_2 , lo cual no es sorprendente debido a que es el primer disolvente utilizado. También se puede apreciar una clara diferencia en los perfiles metabólicos del medio de cultivo y micelio.



Figura 16. Perfil cromatográfico de los extractos orgánicos del hongo endófito SM2Fg3. 1) Extracto de CH_2Cl_2 del medio de cultivo, 2) Extracto de AcOEt del medio de cultivo, 3) Extracto de CH_2Cl_2 del micelio, y 4) Extracto de AcOEt del micelio. Cromatoplaca eluída con CH_2Cl_2 : AcOEt; 99:1 y revelada con H_2SO_4 al 10%.



Finalmente, en el Cuadro 3 también se muestra el rendimiento de los extractos orgánicos de los endófitos Ssp61119 y PB311, que fueron cultivados además en medio arroz. Como se puede observar en el caso del endófito Ssp61119, se logró optimizar el rendimiento de extracto, obteniéndose aproximadamente 12 veces más que en medio CPD, sin embargo, el hongo PB311, el cual presentó el mayor rendimiento total de extractos orgánicos (4588.7 g) en CPD, no permitió la obtención de un mayor rendimiento en la producción extractos orgánicos, por el contrario, se obtuvo aproximadamente la mitad del rendimiento (2056.4 g), observado en CPD. Estos resultados permiten concluir que cada hongo tiene exigencias nutricionales diferentes, y éstas influyen directamente no sólo en la producción cuantitativa de metabolitos secundarios, sino en el origen de los mismos, como veremos más adelante, al evaluar la actividad biológica que presentan (Ghanem *et al.*, 2000).

Cabe mencionar que en los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña escala de los endófitos con clave: LM3C11 (medio de cultivo), LM5f2I2B (medio de cultivo), PB311 (micelio/arroz y CPD) y Ssp61119 (micelio/arroz) se observó la precipitación espontánea de un sólido cristalino. El análisis por CCF de estos sólidos demostró que están constituidos por más de un compuesto mayoritario. Actualmente se encuentran en proceso de purificación.

A continuación se procedió a establecer el potencial antifúngico de los extractos orgánicos, evaluando el efecto de los mismos sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica y el potencial fitotóxico sobre la germinación y longitud de la raíz de dos plantas de prueba.

6.5 Efecto antifúngico

El potencial antifúngico de los extractos orgánicos se estableció cuantitativamente mediante el estudio del efecto de los mismos sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Pythium aphanidermatum*, y



Phytophthora capsici. En el Cuadro 4 se muestra el efecto antifúngico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz.

De manera general, se puede apreciar que los extractos orgánicos obtenidos a partir del medio de cultivo proveniente de los cultivos en CPD presentan una mayor actividad antifúngica que los derivados del micelio. Por otra parte, los extractos orgánicos obtenidos a partir del cultivo de los endófitos PB3011 y Ssp61119 que se cultivaron adicionalmente en arroz, presentan una actividad antifúngica similar sobre el crecimiento de los hongos verdaderos (*F. oxysporum* y *A. alternata*). En contraste, muestran mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los oomicetos fitopatógenos, en comparación con los extractos orgánicos derivados de los cultivos en CPD.

Con excepción de los extractos orgánicos de los endófitos PB3011 (medio de cultivo), que inhibieron totalmente a *P. capsici*, y LM3C11 (medio de cultivo y micelio), que inhibieron el 100% del crecimiento de ambos oomicetos de prueba, en todos los casos el crecimiento del hongo *A. alternata* es el más afectado, presentando porcentajes de inhibición significativos que van desde el 20% hasta el 50%, en 17 de los 23 extractos evaluados. Por otra parte, es importante resaltar que el efecto inhibitorio provocado por los extractos de los endófitos PB3011 y LM3C11 muestra cierta especificidad hacia los oomicetos fitopatógenos, resultando de particular interés su estudio debido a la gran problemática que originan estos microorganismo en la agricultura moderna (Lamour *et al.*, 2012; Suleiman, 2010).

Con excepción de *F. oxysporum*, para cada microorganismo de prueba se encontró por lo menos un extracto orgánico con mayor o igual actividad antifúngica que la demostrada por el fungicida comercial Prozyca[®] 50 P.H empleado como control positivo. Cabe destacar que para *A. alternata* los 17 extractos orgánicos con actividad antifúngica significativa son más activos que el fungicida comercial, el cual presenta un porcentaje de inhibición del 40% sobre su crecimiento a la concentración de prueba que fue de 250 µg/mL.



Cabe destacar que los extractos orgánicos de seis de los endófitos cultivados mostraron actividad antifúngica significativa frente a todos los microorganismos de prueba. El hongo endófito PB30I (medio arroz) inhibe en todos los casos por encima del 40% el crecimiento de los fitopatógenos; los endófitos SM2Fg3 y LM5f2I2B ambos del medio de cultivo, inhiben el crecimiento más del 20%; el hongo LM3C1I (micelio) muestra inhibiciones superiores al 30%; el endófito MA2h2eII (medio de cultivo extracto de CH₂Cl₂), presenta porcentajes de inhibición del 20 al 50%, y finalmente, el endófito MA1d1II (medio de cultivo) exhibe inhibiciones del 20 al 70%.

Los porcentajes de inhibición mostrados por los extractos evaluados sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos, permiten establecer el siguiente orden de susceptibilidad: *A. alternata* > *P. capsici* > *F. oxysporum* > *P. aphanidermatum*. A pesar de que el crecimiento de *P. aphanidermatum* es inhibido totalmente en presencia de los extractos orgánicos del endófito LM3C1I, tanto de medio de cultivo como del micelio, es el microorganismo que se ve afectado por un menor número de extractos orgánicos.

Algunos extractos evaluados no sólo muestran efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los fitopatógenos, sino que también afectan sus características morfológicas. Los cambios observados incluyen el adelgazamiento de las hifas, la modificación en la cantidad y distribución de éstas, y cambios en la consistencia y coloración del micelio. Así por ejemplo, los extractos orgánicos de los hongos endófitos PB30I (arroz) y MA2h2eII (medio de cultivo, extracto de CH₂Cl₂) provocan que *F. oxysporum*, inicialmente con micelio de tonalidad morada, se torne totalmente blanco. Este último extracto (MA2h2eII) provocó un adelgazamiento en las hifas de *P. aphanidermatum* y una consistencia mucilaginoso en algunas partes del micelio en comparación con los controles negativos de crecimiento que mostraron consistencia algodonosa. Por otra parte, los extractos del endófito PB30I (arroz y CPD) provocan un cambio en el color y textura del micelio de *A. alternata*, la consistencia algodonosa de su micelio



cambió a mucilaginoso, y el micelio es totalmente de color negro, a diferencia del color grisáceo observado en los controles negativos.

Cuadro 4. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz a una concentración de 100 µg/mL.

Clave del endófito	Extracto	% de Inhibición del crecimiento radial			
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
PB3fII	MC	41.0 ± 0.52*	51.2 ± 0.45*	10.8 ± 0.51	100 ± 0.00*
	Mic.	14.8 ± 0.73	33.2 ± 0.52*	11.0 ± 0.52	20.4 ± 0.63*
PB3fII	Arroz	46.5 ± 0.70*	46.5 ± 0.70*	42.8 ± 1.04*	63.5 ± 1.90*
PB3fI	MC	13.3 ± 0.73	24.3 ± 0.82*	9.0 ± 1.04	37.3 ± 1.04*
	Mic	9.3 ± 0.90	24.8 ± 0.51*	4.0 ± 0.90	6.3 ± 0.82
Ssp6II19	MC	20.0 ± 0.74*	26.0 ± 0.74*	9.5 ± 0.87	28.5 ± 1.26*
	Mic	4.5 ± 0.70	25.0 ± 1.17*	0 ± 0.00	5.5 ± 1.26
Ssp6II19	Arroz	24.8 ± 0.90*	28.5 ± 0.70*	4.0 ± 1.05	50.3 ± 0.82*
SM2Fg3	MC	20.3 ± 0.35*	25.2 ± 0.35*	20.1 ± 0.52*	56.3 ± 0.35*
	Mic	4.0 ± 0.52	11.5 ± 0.51	12.8 ± 0.51	19.5 ± 0.70
SM2eII	MC	20.0 ± 0.52*	20.0 ± 0.52*	15.0 ± 0.52	30.8 ± 0.51*
	Mic	14.8 ± 0.51	20.5 ± 0.45*	4.3 ± 0.35	20.2 ± 0.45*
LM5f2I2A	MC	5.5 ± 0.45	11.2 ± 0.52	15.0 ± 0.52	17.3 ± 0.51
	Mic	4.8 ± 0.51	15.3 ± 0.51	3.5 ± 0.45	2.8 ± 0.51
LM5f2I2B	MC	20.5 ± 0.70*	31.0 ± 0.90*	25.8 ± 0.97*	36.0 ± 1.30*
	Mic	8.8 ± 0.73	26.0 ± 1.05*	7.8 ± 1.10	20.3 ± 0.63*
LM3C1I	MC	35.6 ± 0.32	44.5 ± 0.30	100.0 ± 0.00*	100.0 ± 0.00*
	Mic	33.0 ± 0.52*	39.5 ± 0.51*	100.0 ± 0.00*	100.0 ± 0.00*
MA2h2eII	MC AcOEt	3.0 ± 0.52	9.8 ± 0.97	9.5 ± 1.5	6.8 ± 1.30
	MC CH ₂ Cl ₂	20.0 ± 0.01*	49.0 ± 0.52*	44.0 ± 1.81*	47.8 ± 2.25*
	Mic	13.0 ± 0.90	41.0 ± 0.91*	4.5 ± 0.70	27.3 ± 2.16*
MA1d1II	MC	20.0 ± 0.52*	21.6 ± 0.45*	34.5 ± 0.45*	69.5 ± 0.70*
	Mic	13.5 ± 0.69	14.0 ± 0.45	20.5 ± 0.45*	43.0 ± 0.52*
Fungicida comercial	µg/mL				
Metalaxil	250	40.0 ± 0.01	9.5 ± 0.01	100.0 ± 0.00	95.0 ± 0.02
Carbendazim	250	100 ± 0.03	18.3 ± 0.04	0 ± 0.00	16.8 ± 0.03

MC. Medio de Cultivo, Mic. Micelio * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05), se presenta el promedio de cuatro repeticiones realizadas. Los valores de DS están expresados de acuerdo con los obtenidos sobre la inhibición del crecimiento radial, antes se obtener los % de inhibición.

Finalmente, cabe resaltar que el rendimiento obtenido para los extractos orgánicos a partir de los cultivos en pequeña escala, no es suficiente para establecer la CI₅₀ sobre la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos ensayados. Sin embargo,



los resultados obtenidos a una concentración de 100 µg/mL, permiten claramente poner en evidencia el potencial antifúngico de los metabolitos secundarios producidos por los endófitos en estudio, constituyendo la mayoría de ellos candidatos idóneos para cultivarlos en mediana escala y obtener los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica.

A continuación, se procedió a determinar el potencial herbicida de los extractos orgánicos empleando dos plantas de prueba.

6.6 Efecto fitotóxico

La evaluación cuantitativa de la actividad fitotóxica de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los cultivos en pequeña escala se realizó por medio de la determinación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*, empleando el método de dilución en caja de Petri.

En primer lugar, se realizó un bioensayo preliminar con los extractos orgánicos empleando una concentración de prueba de 100 µg/mL. En el Cuadro 5 se muestran los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de la raíz de las dos plantas blanco. Como se puede observar, en su mayoría, los extractos fúngicos evaluados provocan una inhibición significativa sobre las dos especies. En general, la especie vegetal más afectada por los tratamientos son las semillas de jitomate, donde se obtuvieron 12 extractos, que inhiben más del 50 % su crecimiento radical y dos de ellos muy cercanos al 100 % de inhibición, los extractos del medio de cultivo y micelio del endófito MA1d1II, que inhiben en un 97.7 % y 98.7 %, respectivamente. En el caso de las semillas de amaranto son 11 los extractos orgánicos que mostraron una actividad inhibitoria sobre la longitud de la raíz, por encima del 50 % y un extracto que inhibe totalmente la germinación y el crecimiento de la raíz; el extracto del micelio del endófito SM2ell.

A diferencia del efecto antifúngico, los extractos orgánicos no muestran diferencias significativas entre la actividad fitotóxica provocada por los extractos del medio de



cultivo y los de micelio, salvo contados casos. Los extractos de los endófitos Ssp6II19, LM3C1I (medio de cultivo), MA2h2eII (medio de cultivo, CH₂Cl₂) y LM5f2I2B (micelio) inhiben en mayor grado el crecimiento de la raíz de las semillas de amaranto. Por su parte, las semillas de jitomate son inhibidas en mayor grado por los extractos de los hongos PB3fII, SM2Fg3, SM2eII y LM5f2I2B (micelio) y Ssp6II19, MA1d1II (medio de cultivo) y MA2h2eII (medio de cultivo, CH₂Cl₂).

Cuadro 5. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz a una concentración de 100 µg/mL.

Endófito	Extracto	% de Inhibición de la longitud de la raíz	
		<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
PB3fII	MC	80.7 ± 0.34*	62.5 ± 0.22*
	Mic	78.5 ± 0.29*	76.9 ± 0.25*
PB3fII	Arroz	70.5 ± 0.25*	51.7 ± 0.43*
PB3fI	MC	25.8 ± 0.20*	26.0 ± 0.45*
	Mic	29.7 ± 0.27*	30.4 ± 0.85*
Ssp6II19	MC	71.4 ± 0.31*	85.8 ± 0.38*
	Mic	25.3 ± 0.21*	25.1 ± 0.58*
Ssp6II19	Arroz	32.6 ± 0.22*	84.3 ± 0.38*
SM2Fg3	MC	87.8 ± 0.33*	40.0 ± 0.13*
	Mic	82.8 ± 0.25*	50.9 ± 0.41*
SM2eII	MC	22.6 ± 0.38*	18.0 ± 1.01
	Mic	26.2 ± 0.31*	100.0 ± 1.07*
LM5f2I2A	MC	23.7 ± 0.26*	16.0 ± 0.63
	Mic	16.4 ± 0.28	24.9 ± 0.58*
LM5f2I2B	MC	31.0 ± 0.21*	25.2 ± 0.37*
	Mic	52.4 ± 0.23*	32.9 ± 0.56*
LM3C1I	MC	66.2 ± 0.43*	65.9 ± 0.31*
	Mic	43.9 ± 0.31*	61.8 ± 1.41*
MA2h2eII	MC AcOEt	40.1 ± 0.32*	42.1 ± 0.43*
	MC CH ₂ Cl ₂	65.5 ± 0.27*	80.4 ± 1.09*
	Mic	43.2 ± 0.19*	53.7 ± 1.04*
MA1d1II	MC	97.7 ± 0.13*	63.3 ± 0.15*
	Mic	98.7 ± 0.13*	42.2 ± 0.14*
Herbicida comercial	µg/mL		
Glifosato	100	39.8 ± 0.31	66.2 ± 0.21
Glifosato	200	52.0 ± 0.38	74.7 ± 0.30

MC. Medio de Cultivo, Mic. Micelio * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05), se presenta el promedio de cuatro repeticiones. Los valores de DS están expresados de acuerdo con los obtenidos sobre el crecimiento de la raíz, antes se obtener los % de inhibición.



Es de resaltar que en el caso de la semillas de amaranto, 14 extractos fúngicos presentan un mayor efecto fitotóxico sobre las semillas blanco que el herbicida comercial Glifosato[®] utilizado como control positivo, a la misma concentración de prueba que fue de 100 µg/mL y, aun utilizando el herbicida comercial a 200 µg/mL, se tienen 10 extractos con un efecto superior al control positivo. Para las semillas de jitomate, son 5 los extractos orgánicos evaluados a 100 µg/mL que presentan una mejor actividad fitotóxica que el herbicida Glifosato[®] usado a 200 µg/mL.

Por otra parte, con respecto al proceso de germinación, en general no se observaron efectos inhibitorios significativos a la concentración de prueba que fue de 100 µg/mL.

Los resultados obtenidos hasta este punto ponen en evidencia el importante potencial fitotóxico de los extractos orgánicos evaluados, convirtiéndolos en excelentes candidatos de estudio como fuente de posibles agentes de control de malezas, debido a que todos mostraron efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de una o ambas especies vegetales. Con base en estas consideraciones, se decidió profundizar en el potencial fitotóxico de estos extractos, mediante la obtención de las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las semillas de amaranto y jitomate.

6.6.1 Germinación

Todos los extractos fúngicos en estudio se evaluaron utilizando cuatro concentraciones de prueba, 25, 50, 100 y 200 µg/mL. Los extractos ensayados mostraron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración sobre la germinación de las semillas de amaranto (Cuadro 6), sin embargo, sólo 6 de ellos mostraron una $CI_{50} < 200$ µg/mL, que fue la máxima concentración de prueba. Cabe destacar que los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del endófito MA1d1II, que inhiben la germinación con una CI_{50} de 36.14 y 33.67 µg/mL, respectivamente y los del medio de cultivo del hongo SM2eII 45.42 µg/mL, son los



únicos que presentan valores de CI_{50} menores a los mostrados por el herbicida comercial Glifosato® (CI_{50} 66.75 $\mu\text{g/mL}$), empleado como control positivo.

Cuadro 6. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz sobre la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* a cuatro diferentes concentraciones.

Endófito	Extracto	% de Inhibición de la germinación de las semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>				CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
		25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	
PB3fl	MC	13.2 \pm 0.25	16.5 \pm 0.19	18.0 \pm 0.14	39.5 \pm 0.07*	>200
	Mic	12.5 \pm 0.22	17.5 \pm 0.17	21.7 \pm 0.11*	40.9 \pm 0.03*	>200
PB3fl	Arroz	9.7 \pm 0.18	11.9 \pm 0.13	12.4 \pm 0.09	19.2 \pm 0.01	>200
PB3fl	MC	ND				
	Mic	10.5 \pm 0.24	14.6 \pm 0.17	17.4 \pm 0.10	20.1 \pm 0.04*	>200
Ssp6fl19	MC	ND				
	Mic	ND				
Ssp6fl19	Arroz	21.4 \pm 0.31*	27.4 \pm 0.25*	35.9 \pm 0.15*	46.8 \pm 0.11*	>200
SM2Fg3	MC	10.2 \pm 0.21	12.8 \pm 0.18	19.5 \pm 0.13	25.15 \pm 0.08*	>200
	Mic	9.7 \pm 0.18	13.8 \pm 0.15	21.9 \pm 0.09*	23.9 \pm 0.04*	>200
SM2eII	MC	-----				
	Mic	22.1 \pm 0.21*	51.4 \pm 0.13*	93.1 \pm 0.10*	97.5 \pm 0.07*	45.42
LM5f2I2A	MC	-----				
	Mic	-----				
LM5f2I2B	MC	ND				
	Mic	7.5 \pm 0.24	13.7 \pm 0.19	15.9 \pm 0.15	23.8 \pm 0.10*	>200
LM3C1I	MC	16.5 \pm 0.17	36.4 \pm 0.15*	41.9 \pm 0.11*	65.8 \pm 0.06*	112.6
	Mic	18.9 \pm 0.18	31.9 \pm 0.14*	39.9 \pm 0.09*	60.8 \pm 0.03*	133.9
MA2h2eII	MC AcOEt	20.0 \pm 0.23*	23.3 \pm 0.16*	40.10 \pm 0.10*	59.2 \pm 0.01	181.1
	MC CH ₂ Cl ₂	17.1 \pm 0.31	20.3 \pm 0.26*	27.7 \pm 0.18*	30.7 \pm 0.1*	>200
	Mic	17.3 \pm 0.27	19.5 \pm 0.20	30.1 \pm 0.16*	41.7 \pm 0.09*	>200
MA1d1II	MC	41.7 \pm 0.19*	54.9 \pm 0.13*	79.4 \pm 0.09*	96.2 \pm 0.03*	36.14
	Mic	43.2 \pm 0.21*	59.2 \pm 0.16*	87.4 \pm 0.10*	98.6 \pm 0.07*	33.67
Herbicida comercial						
Concentración		50	100	200	400	
Glifosato		19.9 \pm 0.31	27.40 \pm 0.25*	75.1 \pm 0.20*	98.2 \pm 0.15*	66.75

MC. Medio de Cultivo, Mic. Micelio * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones realizadas. Los valores de DS están expresados de acuerdo con los obtenidos sobre el crecimiento de la raíz, antes se obtener los % de inhibición; ND bioensayos no realizados por insuficiencia de extracto. ----- bioensayo no realizado por escasa actividad biológica a 100 $\mu\text{g/mL}$.

De manera similar, en el Cuadro 7 se puede ver que el efecto sobre la germinación de las semillas de jitomate es semejante al demostrado sobre las semillas de amaranto. En este caso son dos los extractos que presentan mejor



actividad que el herbicida comercial (Glifosato[®]), el cual presenta un valor de Cl_{50} de 117.8 $\mu\text{g/mL}$. De nuevo, los extractos de medio de cultivo y micelio del endófito MA1d1II, presentan un mayor potencial fitotóxico sobre la germinación de las semillas de jitomate, teniendo valores de Cl_{50} de 36.61 y 38.73 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Cuadro 7. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, obtenidos en CPD y arroz sobre la germinación de las semillas de *S. lycopersicum* a cuatro diferentes concentraciones.

Endófito	Extracto	% de Inhibición de la germinación de las semillas de <i>Solanum lycopersicum</i>				Cl_{50} $\mu\text{g/mL}$
		25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	
PB3II	MC	14.2 \pm 0.21	15.0 \pm 0.17	17.5 \pm 0.11	40.8 \pm 0.05*	>200
	Mic	11.7 \pm 0.23	14.7 \pm 0.18	16.7 \pm 0.13	35.8 \pm 0.10*	>200
PB3II	Arroz	10.8 \pm 0.19	12.5 \pm 0.14	12.5 \pm 0.09	16.7 \pm 0.04	>200
PB3fI	MC	ND				
	Mic	9.2 \pm 0.22	11.7 \pm 0.18	14.2 \pm 0.12	15.0 \pm 0.09	>200
Ssp6II19	MC	ND				
	Mic	ND				
Ssp6II19	Arroz	15.0 \pm 0.31	16.7 \pm 0.25	20.8 \pm 0.19	35.8 \pm 0.15*	>200
SM2Fg3	MC	13.3 \pm 0.27	15.8 \pm 0.20	20.0 \pm 0.15	22.5 \pm 0.11	>200
	Mic	10.0 \pm 0.21	15.8 \pm 0.15	22.5 \pm 0.10	24.2 \pm 0.07	>200
SM2eII	MC	-----				
	Mic	13.3 \pm 0.22	15.0 \pm 0.17	21.7 \pm 0.12	23.3 \pm 0.06	>200
LM5f2I2A	MC	-----				
	Mic	-----				
LM5f2I2B	MC	ND				
	Mic	8.3 \pm 0.27	10.0 \pm 0.21	12.5 \pm 0.16	14.2 \pm 0.10	>200
LM3C1I	MC	14.2 \pm 0.30	33.3 \pm 0.23*	35.0 \pm 0.16*	62.5 \pm 0.11*	136.8
	Mic	12.5 \pm 0.19	30.8 \pm 0.13*	33.3 \pm 0.09*	60.8 \pm 0.03*	147.3
MA2h2eII	MC AcOEt	20.0 \pm 0.20	23.3 \pm 0.17	25.0 \pm 0.12	27.5 \pm 0.09*	>200
	MC CH ₂ Cl ₂	15.0 \pm 0.31	16.7 \pm 0.24	17.5 \pm 0.18	19.2 \pm 0.07	>200
	Mic	14.2 \pm 0.22	15.0 \pm 0.18	16.7 \pm 0.15	17.5 \pm 0.10	>200
MA1d1II	MC	39.2 \pm 0.19*	56.7 \pm 0.13*	82.5 \pm 0.09*	98.3 \pm 0.04*	36.61
	Mic	36.7 \pm 0.24*	54.2 \pm 0.19*	85.0 \pm 0.15*	97.5 \pm 0.10*	38.73
Herbicida comercial						
Concentración		50	100	200	400	
Glifosato		5.9 \pm 0.16	10.0 \pm 0.13	13.3 \pm 0.09	100 \pm 0.04*	117.8

MC. Medio de Cultivo, Mic. Micelio * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones. Los valores de DS están expresados de acuerdo con los obtenidos sobre el crecimiento de la raíz, antes se obtener los % de inhibición; ND bioensayos no realizados por insuficiencia de extracto. ----- bioensayo no realizado por escasa actividad biológica a 100 $\mu\text{g/mL}$.



Es importante resaltar, que si bien el mecanismo de acción del glifosato no es directamente sobre la germinación de las semillas, sino que inhibe la biosíntesis de aminoácidos aromáticos que interfiere en el crecimiento de la raíz (Salazar y Madrid, 2011), sí nos permite sentar un antecedente de la actividad que presentan los extractos orgánicos obtenidos de los hongos endófitos sobre la germinación de nuestras semillas de prueba. Además, se seleccionó como control positivo por ser uno de los herbicidas más ampliamente empleados en la agricultura moderna.

6.6.2 Crecimiento Radicular

Por otra parte, con respecto al efecto fitotóxico de los extractos fúngicos del medio de cultivo y micelio de los 10 endófitos en estudio sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de amaranto, en el Cuadro 8 se puede apreciar que todos mostraron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración. También se puede observar que la CI_{50} mostrada por el herbicida comercial Glifosato® (64.68 $\mu\text{g/mL}$) es mayor a la que presentan 5 de los extractos fúngicos evaluados. Siendo nuevamente los extractos del endófito MA1d1II tanto de medio de cultivo como de micelio los que reportan la menor CI_{50} , 37.35 $\mu\text{g/mL}$ y 38.1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Con base en la potencia demostrada por los extractos fúngicos evaluados, se puede establecer el siguiente orden fitotoxicidad (CI_{50}): extracto de medio de cultivo del endófito MA1d1II (37.35 $\mu\text{g/mL}$) > extracto de medio de cultivo del endófito SM2Fg3 (37.62 $\mu\text{g/mL}$) > extracto micelio del endófito MA1d1II (38.10 $\mu\text{g/mL}$) > extracto micelio del endófito SM2Fg3 (39.74 $\mu\text{g/mL}$) > extracto de medio de cultivo del endófito LMC1I (56.57 $\mu\text{g/mL}$) > extracto micelio del endófito PB3II (57.58 $\mu\text{g/mL}$) > extracto de medio de cultivo del endófito PB3II (59.78 $\mu\text{g/mL}$) > Glifosato (64.68 $\mu\text{g/mL}$).

A pesar de que los datos anteriores son los más representativos, los cuatro primeros extractos no presentan diferencias significativas entre ellos, por lo que se puede decir que tienen una actividad fitotóxica muy similar. Lo mismo sucede con los cuatro últimos extractos. No obstante, existe diferencia significativa entre los



cuatro primeros y los cuatro últimos quedando claro que los primeros tienen una mejor actividad inhibitoria frente a las semillas de amaranto.

Cuadro 8. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz sobre el crecimiento de la raíz *A. hypochondriacus* a cuatro diferentes concentraciones.

Endófito	Extracto	% de Inhibición del crecimiento de la raíz <i>Amaranthus hypochondriacus</i>				Cl ₅₀ µg/mL
		25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	
PB3fl	MC	19.2 ± 0.22	37.9 ± 0.15*	78.9 ± 0.10*	81.5 ± 0.08*	59.78
	Mic	20.5 ± 0.23*	42.9 ± 0.18*	74.2 ± 0.10*	85.3 ± 0.07*	57.58
PB3fl	Arroz	24.1 ± 0.25*	35.2 ± 0.18*	69.3 ± 0.12*	77.1 ± 0.05*	66.7
PB3fl	MC	ND				
	Mic	17.8 ± 0.31	26.4 ± 0.27*	31.5 ± 0.19*	45.9 ± 0.12*	>200
Ssp6fl19	MC	ND				
	Mic	ND				
Ssp6fl19	Arroz	10.8 ± 0.19	18.7 ± 0.16	34.9 ± 0.09*	51.3 ± 0.01*	187.6
SM2Fg3	MC	26.9 ± 0.21*	67.9 ± 0.17*	89.3 ± 0.10*	90.1 ± 0.08*	37.62
	Mic	26.0 ± 0.24*	63.9 ± 0.19*	86.9 ± 0.11*	91.3 ± 0.05*	39.74
SM2ell	MC	-----				
	Mic	10.5 ± 0.23	19.8 ± 0.18	29.1 ± 0.13*	62.3 ± 0.09*	154.4
LM5f2l2A	MC	-----				
	Mic	-----				
LM5f2l2B	MC	ND				
	Mic	23.0 ± 0.31*	31.6 ± 0.25*	55.8 ± 0.19*	71.3 ± 0.14*	86.65
LM3C1l	MC	27.8 ± 0.25*	41.6 ± 0.21*	70.2 ± 0.15*	85.6 ± 0.10*	56.57
	Mic	15.2 ± 0.19	25.1 ± 0.17*	45.7 ± 0.14*	68.9 ± 0.08*	111.4
MA2h2ell	MC AcOEt	16.2 ± 0.21	22.1 ± 0.15*	45.8 ± 0.12*	61.5 ± 0.07*	127.8
	MC CH ₂ Cl ₂	20.8 ± 0.24*	33.2 ± 0.19*	68.0 ± 0.14*	79.5 ± 0.09*	69.69
	Mic	18.4 ± 0.22	28.9 ± 0.17*	45.0 ± 0.11*	57.1 ± 0.04*	137
MA1d1ll	MC	30.2 ± 0.32	64.9 ± 0.24*	88.0 ± 0.17*	97.9 ± 0.11*	37.35
	Mic	25.8 ± 0.24*	66.9 ± 0.20*	90.0 ± 0.15*	98.7 ± 0.07*	38.1
Herbicida comercial						
Concentración µg/mL		50	100	200	400	
Glifosato		20.7 ± 0.31	42.1 ± 0.22*	55.3 ± 0.15*	99.5 ± 0.10*	64.68

MC. Medio de Cultivo, Mic. Micelio * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05), se presenta el promedio de cuatro repeticiones. Los valores de DS están expresados de acuerdo con los obtenidos sobre el crecimiento de la raíz, antes se obtener los % de inhibición; ND bioensayos no realizados por insuficiencia de extracto. ----- bioensayo no realizado por escasa actividad biológica a 100 µg/mL.

En el Cuadro 9 se presentan los valores de Cl₅₀ sobre la longitud de la raíz de la planta de jitomate. Se puede apreciar que los extractos fúngicos también muestran un efecto fitotóxico dependiente de la concentración y que siete de los extractos orgánicos obtenidos a partir los cultivos en pequeña escala, muestran una Cl₅₀ menor a la del Glifosato[®], el cual presenta una Cl₅₀ de 61.49 µg/mL. Siendo de



nueva cuenta los extractos del endófito MA1d1II con una CI_{50} 28.76 $\mu\text{g/mL}$, junto con el extracto del micelio del hongo SM2Fg3 los más potentes, este último con una CI_{50} de 20.63 $\mu\text{g/mL}$, evidentemente muy por debajo de la CI_{50} obtenida para el herbicida comercial.

Cuadro 9. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, obtenidos en CPD y arroz sobre el crecimiento de la raíz de *S. lycopersicum* a cuatro diferentes concentraciones.

Endófito	Extracto	% de Inhibición de la longitud de la raíz <i>Solanum lycopersicum</i>				CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
		25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	
PB3II	MC	18.7 \pm 0.22	34.5 \pm 0.19*	65.8 \pm 0.12*	80.1 \pm 0.09*	71.03
	Mic	24.7 \pm 0.27*	55.3 \pm 0.21*	78.3 \pm 0.17*	87.5 \pm 0.10*	46.74
PB3II	Arroz	18.9 \pm 0.21	37.9 \pm 0.16*	54.9 \pm 0.10*	70.1 \pm 0.07*	79.19
PB3fI	MC	ND				
	Mic	14.8 \pm 0.22	23.2 \pm 0.17*	32.5 \pm 0.10*	49.5 \pm 0.04*	>200
Ssp6II19	MC	ND				
	Mic	ND				
Ssp6II19	Arroz	15.1 \pm 0.31	21.6 \pm 0.24*	37.2 \pm 0.18*	54.3 \pm 0.11*	170.6
SM2Fg3	MC	38.6 \pm 0.24*	68.8 \pm 0.19*	88.1 \pm 0.12*	96.9 \pm 0.05*	32.19
	Mic	42.3 \pm 0.27*	75.4 \pm 0.22*	90.4 \pm 0.15*	97.2 \pm 0.08*	20.63
SM2eII	MC	-----				
	Mic	14.4 \pm 0.19	20.3 \pm 0.13*	28.9 \pm 0.09*	52.3 \pm 0.02*	>200
LM5f2I2A	MC	-----				
	Mic	-----				
LM5f2I2B	MC	ND				
	Mic	21.4 \pm 0.22*	32.3 \pm 0.17*	56.1 \pm 0.12*	72.2 \pm 0.07*	85.64
LM3C1I	MC	22.9 \pm 0.31*	36.7 \pm 0.25*	55.8 \pm 0.19*	69.9 \pm 0.12*	83.50
	Mic	26.0 \pm 0.25*	45.5 \pm 0.17*	69.3 \pm 0.11*	81.2 \pm 0.06*	56.62
MA2h2eII	MC AcOEt	22.7 \pm 0.21*	30.5 \pm 0.16*	44.9 \pm 0.13*	59.7 \pm 0.08*	127.1
	MC CH ₂ Cl ₂	26.5 \pm 0.30*	45.6 \pm 0.23*	70.3 \pm 0.15*	85.9 \pm 0.11*	54.55
	Mi	16.9 \pm 0.23	31.2 \pm 0.16*	47.6 \pm 0.11*	69.8 \pm 0.05*	101.8
MA1d1II	MC	44.8 \pm 0.42*	70.5 \pm 0.35*	90.2 \pm 0.22*	98.5 \pm 0.19*	28.76
	Mic	40.9 \pm 0.22*	75.4 \pm 0.17*	93.1 \pm 0.12*	99.1 \pm 0.05*	29.68
Herbicida comercial						
Concentración		50	100	200	400	
Glifosato		26.7 \pm 0.24	41.9 \pm 0.19	55.0 \pm 0.13	100 \pm 0.03	61.49

MC. Medio de Cultivo, Mic. Micelio * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones. Los valores de DS están expresados de acuerdo con los obtenidos sobre el crecimiento de la raíz, antes se obtener los % de inhibición; ND bioensayos no realizados por insuficiencia de extracto. ----- bioensayo no realizado por escasa actividad biológica a 100 $\mu\text{g/mL}$.

De la misma manera como se expresó para las semillas de amaranto se presentan a continuación los extractos más potentes, ordenados con base en su CI_{50} :



extracto micelio del endófito SM2Fg3 (20.63 $\mu\text{g/mL}$) > extracto de medio de cultivo del endófito MA1d1II (28.76 $\mu\text{g/mL}$) > extracto de medio de cultivo del endófito SM2Fg3 (32.19 $\mu\text{g/mL}$) > extracto micelio del endófito PB3II (46.74 $\mu\text{g/mL}$) > extracto medio de cultivo- CH_2Cl_2 , del endófito MA2h2eII (54.55 $\mu\text{g/mL}$) > extracto micelio del endófito LM3C1I (56.62 $\mu\text{g/mL}$) > Glifosato (61.49 $\mu\text{g/mL}$).

Nuevamente, entre los primeros cuatro datos con excepción del primero no existe diferencia significativa, de manera similar el efecto de los últimos tres extractos no difiere estadísticamente. Por lo que se puede concluir que extracto del micelio del hongo endófito SM2Fg3 es tres veces más activo que el Glifosato[®].

Los resultados obtenidos hasta este punto, permiten establecer claramente que los extractos orgánicos de los diferentes endófitos muestran un mayor efecto sobre el crecimiento de la raíz que sobre la germinación. Con la finalidad de explorar de manera preliminar el posible mecanismo de acción de los extractos fúngicos, se evaluó su efecto sobre la respiración durante el proceso de germinación de las plantas blanco.

6.6.3 Respiración celular

Finalmente, la CI_{50} sobre el proceso de respiración de las plántulas de amaranto y jitomate se estableció mediante el registro del consumo de oxígeno en presencia de los extractos orgánicos evaluados, empleando cuatro concentraciones de prueba 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$. El análisis mediante regresión lineal de cada uno de los tratamientos permitió determinar el oxígeno consumido por las plántulas. En los Cuadros 10 y 11 se muestran los resultados para las semillas de amaranto y jitomate, respectivamente. Todos los extractos fúngicos inhiben el consumo de oxígeno en forma dependiente de la concentración, obteniéndose $\text{CI}_{50} < 200$ $\mu\text{g/mL}$.

En el Cuadro 10 se muestra el efecto provocado por los extractos orgánicos sobre las plántulas de amaranto. De manera general, el consumo de oxígeno es inhibido por encima del 70%, a la máxima concentración utilizada (200 $\mu\text{g/mL}$). Sin embargo, en algunos casos no se observan diferencias significativas entre la



concentración de 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$, lo que podría estar hablando de un efecto de saturación. Se obtuvieron 7 extractos con mayor inhibición sobre el consumo de oxígeno que el herbicida comercial que presenta una CI_{50} de 68.56 $\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 10. Efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD y arroz sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de *A. hypochondriacus* a cuatro diferentes concentraciones.

Endófito	Extracto	% de Inhibición sobre el consumo de oxígeno <i>Amaranthus hypochondriacus</i>				CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
		25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	
PB3fl	MC	21.7 \pm 0.26	47.8 \pm 0.18	63.5 \pm 0.12	87.0 \pm 0.04	58.93
	Mic	22.5 \pm 0.22	48.4 \pm 0.21	79.7 \pm 0.19	90.1 \pm 0.09	50.39
PB3fl	Arroz	25.6 \pm 0.26	45.3 \pm 0.25	72.1 \pm 0.18	88.7 \pm 0.01	53.86
PB3fl	MC	ND				
	Mic	23.2 \pm 0.25	43.5 \pm 0.19	60.9 \pm 0.13	81.2 \pm 0.06	64.9
Ssp6l19	MC	ND				
	Mic	ND				
Ssp6l19	Arroz	25.3 \pm 0.19	38.9 \pm 0.16	59.2 \pm 0.10	66.0 \pm 0.08	80.2
SM2Fg3	MC	29.3 \pm 0.19	42.1 \pm 0.16	82.14 \pm 0.05	93.6 \pm 0.01	49.61
	Mic	22.9 \pm 0.21	35.7 \pm 0.18	61.4 \pm 0.10	80.7 \pm 0.05	71.05
SM2ell	MC	-----				
	Mic	14.3 \pm 0.17	22.9 \pm 0.16	31.4 \pm 0.14	57.1 \pm 0.08	102.6
LM5f2l2A	MC	-----				
	Mic	-----				
LM5f2l2B	MC	ND				
	Mic	15.0 \pm 0.18	23.0 \pm 0.15	48.6 \pm 0.11	74.3 \pm 0.05	102.3
LM3C1l	MC	18.3 \pm 0.23	41.8 \pm 0.19	60.8 \pm 0.10	80.7 \pm 0.05	69.24
	Mic	19.9 \pm 0.23	35.3 \pm 0.19	65.7 \pm 0.11	82.3 \pm 0.05	69.01
MA2h2ell	MC AcOEt	17.6 \pm 0.25	29.4 \pm 0.21	41.2 \pm 0.17	70.6 \pm 0.08	110.80
	MC CH_2Cl_2	23.5 \pm 0.22	35.3 \pm 0.19	47.1 \pm 0.16	76.5 \pm 0.07	87.4
	Mic	11.8 \pm 0.26	35.3 \pm 0.20	53.0 \pm 0.19	64.7 \pm 0.10	100.20
MA1d1ll	MC	18.8 \pm 0.22	43.8 \pm 0.16	89.6 \pm 0.03	94.8 \pm 0.02	51.15
	Mic	11.5 \pm 0.25	30.6 \pm 0.19	80.9 \pm 0.06	93.1 \pm 0.02	63.67
Herbicida comercial						
Concentración		50	100	200	400	
Glifosato		22.1 \pm 0.21	41.3 \pm 0.19	54.3 \pm 0.15	88.9 \pm 0.09	68.56

MC. Medio de Cultivo, Mic. Micelio * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones. Los valores de DS están expresados de acuerdo con los obtenidos sobre el crecimiento de la raíz, antes se obtener los % de inhibición; ND bioensayos no realizados por insuficiencia de extracto. ----- bioensayo no realizado por escasa actividad biológica a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Por otro lado, en el caso de las plántulas de jitomate (Cuadro 11), en general los extractos muestran también una actividad inhibitoria sobre el consumo de oxígeno,



por encima del 70%. Se observa también que el extracto obtenido a partir del micelio del endófito MA1d1II es el tratamiento con mayor actividad sobre el consumo de oxígeno en comparación con el Glifosato®.

Cuadro 11 Efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, obtenidos en CPD y arroz sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de *S. lycopersicum* a cuatro diferentes concentraciones.

Endófito	Extracto	% de Inhibición sobre el consumo de oxígeno <i>Solanum lycopersicum</i>				CI ₅₀ µg/mL
		25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	
PB3II	MC	27.5 ± 0.25	40.5 ± 0.19	53.6 ± 0.15	76.8 ± 0.07	64.80
	Mic	25.7 ± 0.18	45.2 ± 0.15	79.8 ± 0.10	81.3 ± 0.06	51.67
PB3II	Arroz	20.1 ± 0.32	32.1 ± 0.25	55.9 ± 0.19	68.9 ± 0.09	90.25
PB3fI	MC	ND				
	Mic	15.8 ± 0.31	32.7 ± 0.23	47.4 ± 0.17	75.1 ± 0.07	64.93
Ssp6II19	MC	ND				
	Mic	ND				
Ssp6II19	Arroz	30.8 ± 0.17	37.7 ± 0.16	65.4 ± 0.08	72.3 ± 0.07	65.76
SM2Fg3	MC	25.3 ± 0.19	32.1 ± 0.17	45.7 ± 0.14	59.2 ± 0.11	125.0
	Mic	25.5 ± 0.20	33.1 ± 0.18	52.4 ± 0.12	86.4 ± 0.03	75.87
SM2eII	MC	-----				
	Mic	19.0 ± 0.17	40.5 ± 0.12	91.4 ± 0.01	98.3 ± 0.003	52.53
LM5f2I2A	MC	-----				
	Mic	-----				
LM5f2I2B	MC	ND				
	Mic	22.9 ± 0.16	31.4 ± 0.14	40.0 ± 0.13	65.7 ± 0.07	119.1
LM3C1I	MC	23.5 ± 0.23	41.17 ± 0.19	52.9 ± 0.14	70.6 ± 0.08	81.39
	Mic	23.5 ± 0.23	37.9 ± 0.19	47.1 ± 0.16	76.5 ± 0.07	84.96
MA2h2eII	MC AcOEt	29.4 ± 0.21	39.5 ± 0.19	52.9 ± 0.14	70.6 ± 0.08	95.33
	MC CH ₂ Cl ₂	23.5 ± 0.30	46.1 ± 0.18	55.9 ± 0.14	80.6 ± 0.08	66.60
	Mic	29.4 ± 0.21	35.3 ± 0.19	53.0 ± 0.14	64.7 ± 0.10	91.39
MA1d1II	MC	18.8 ± 0.23	43.8 ± 0.14	89.6 ± 0.05	94.8 ± 0.02	51.15
	Mic	47.7 ± 0.13	73.1 ± 0.08	79.6 ± 0.06	86.1 ± 0.04	24.22
Herbicida comercial						
Concentración		50	100	200	400	
Glifosato		25.3 ± 0.24	62.1 ± 0.20	70.1 ± 0.10	89.9 ± 0.04	44.91

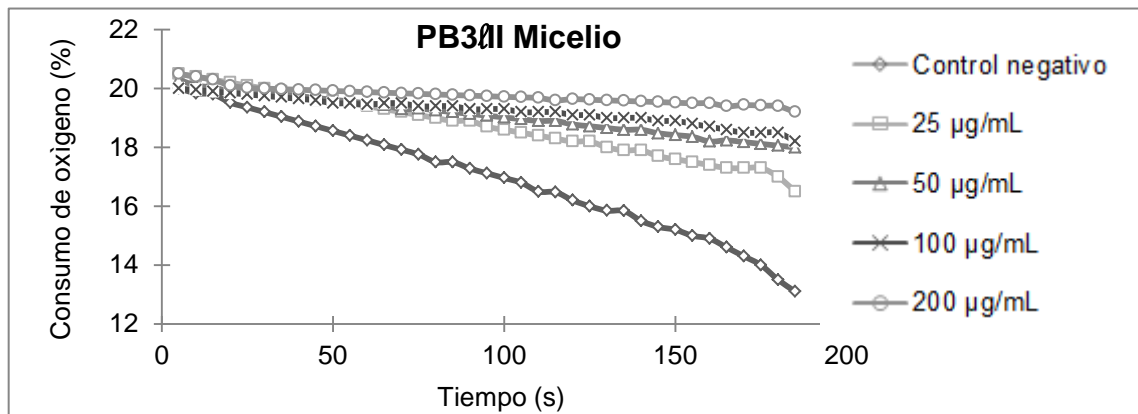
MC. Medio de Cultivo, Mic. Micelio.* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05), se presenta el promedio de cuatro repeticiones. Los valores de DS están expresados de acuerdo con los obtenidos sobre el crecimiento de la raíz, antes se obtener los % de inhibición; ND bioensayos no realizados por insuficiencia de extracto. ----- bioensayo no realizado por escasa actividad biológica a 100 µg/mL.

A manera de ejemplo en las Gráficas 1-8, se muestra el efecto de algunos de los extractos fúngicos evaluados sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de

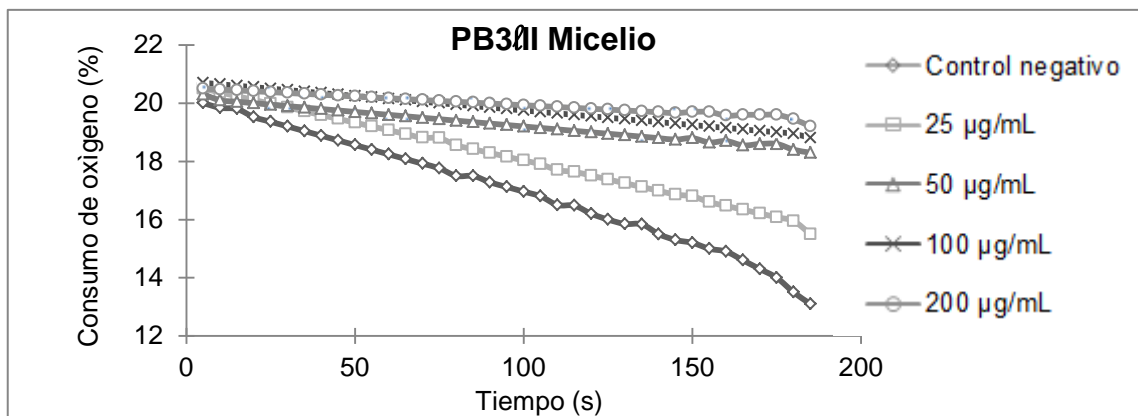


amaranto y jitomate. Como se observa, en todos los casos el efecto es dependiente de la concentración, es decir, el consumo de oxígeno disminuye conforme aumenta la concentración del tratamiento. De igual manera se logra observar que el consumo de oxígeno es proporcional al número de plántulas. Así, los tratamientos que provocaron un mayor efecto inhibitorio sobre la germinación o que inhibieron más el crecimiento de la raíz, son también los que registran un menor consumo de oxígeno.

Gráfica 1. Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito PB3011 cultivado en CPD, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de *Amaranthus hypochondriacus*.

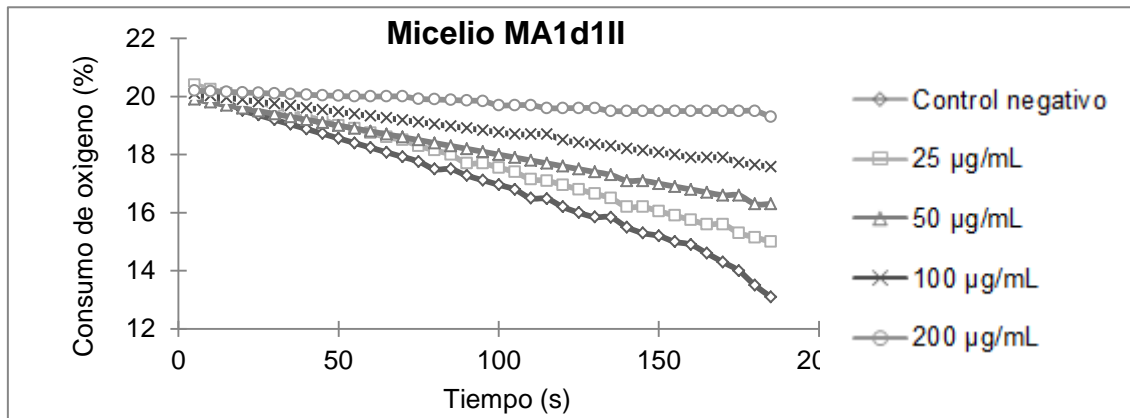


Gráfica 2. Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito PB3011 cultivado en CPD, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de *Solanum lycopersicum*.

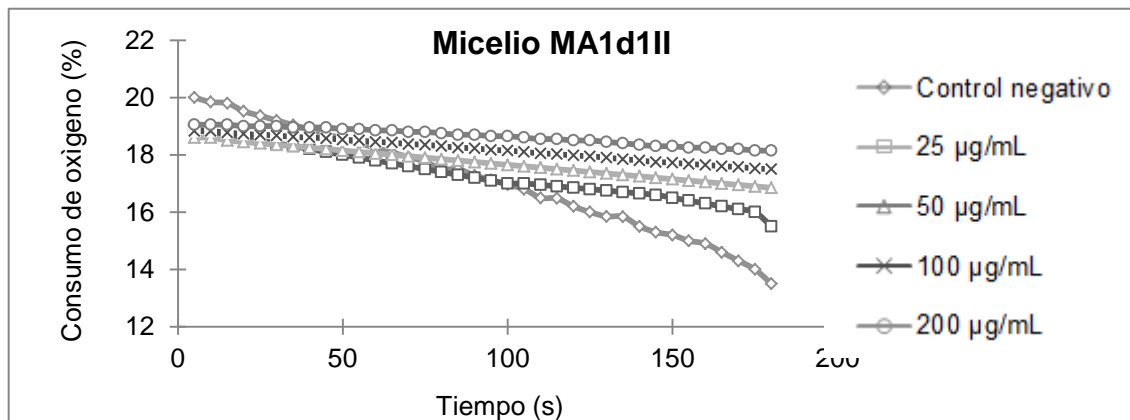




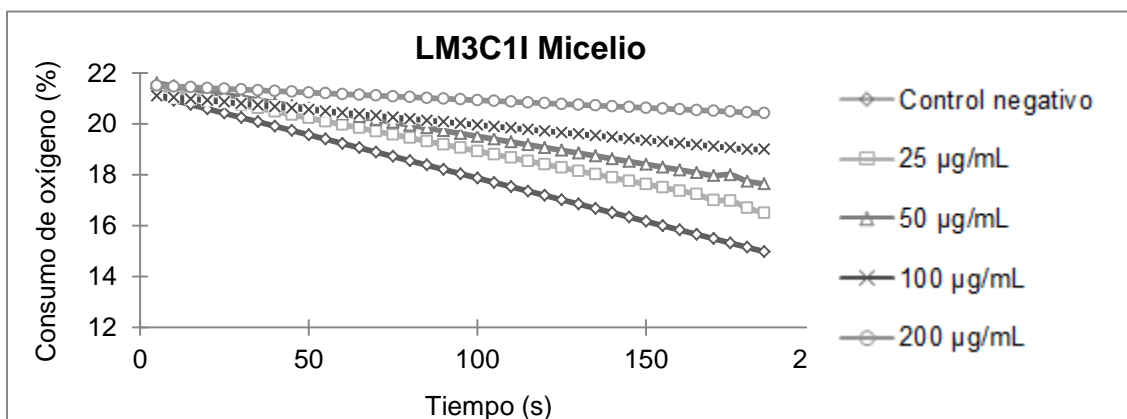
Gráfica 3. Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito MA1d1II cultivado en CPD, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de *Amaranthus hypochondriacus*.



Gráfica 4 Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito MA1d1II cultivado en CPD, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de *Solanum lycopersicum*.

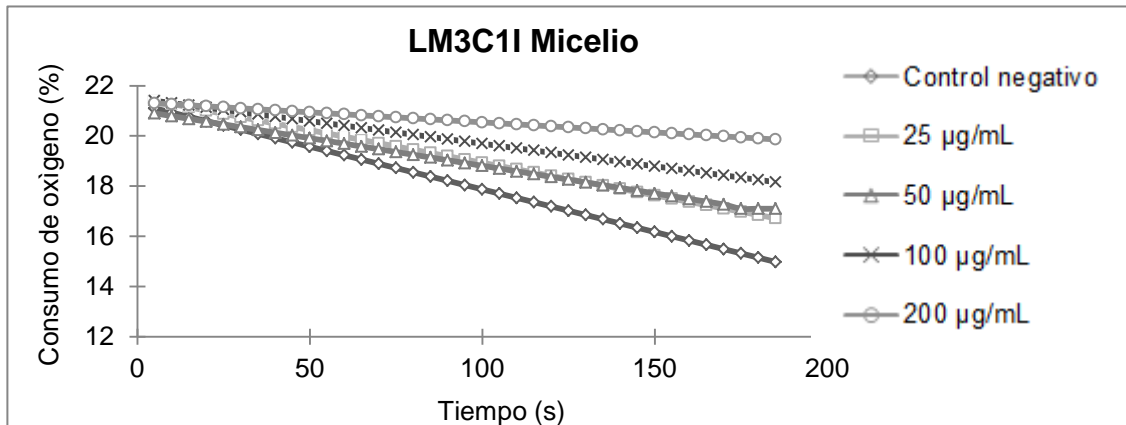


Gráfica 5. Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito LM3C1I, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de *Amaranthus hypochondriacus*.

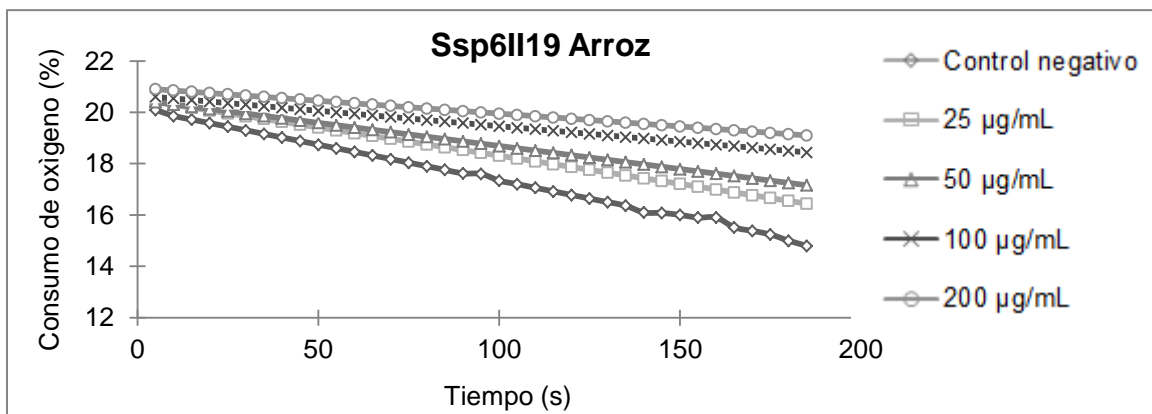




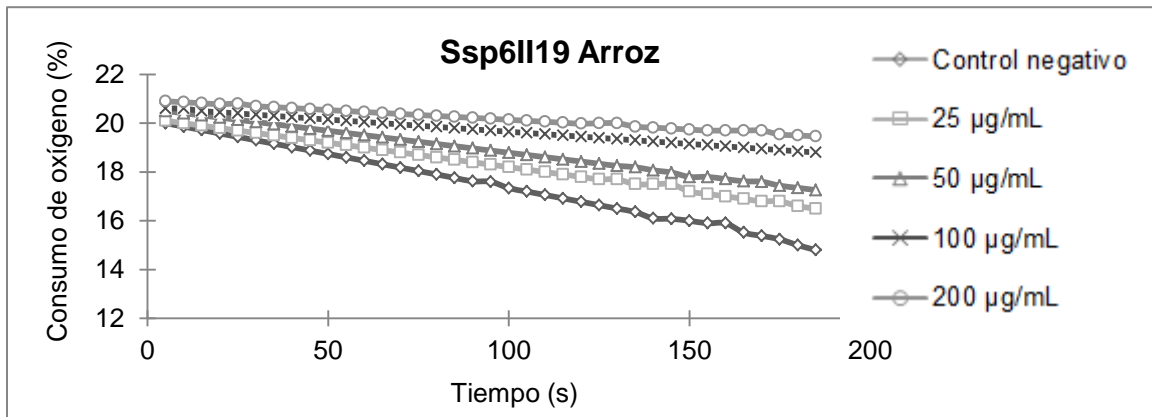
Gráfica 6. Efecto del extracto orgánico del micelio del endófito LM3C11 cultivado en CPD, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de *Solanum lycopersicum*.



Gráfica 7. Efecto del extracto orgánico proveniente del cultivo en arroz del endófito Ssp61119, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de *Amaranthus hypochondriacus*.



Gráfica 8. Efecto del extracto orgánico proveniente del cultivo en arroz del endófito Ssp61119, sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de *Solanum lycopersicum*.





Con base en los resultados de fitotoxicidad y con la finalidad de establecer si el mecanismo de acción fitotóxico observado sobre las plantas blanco y principalmente el provocado sobre el consumo de oxígeno es a nivel de la respiración celular, es necesario en un estudio posterior, evaluar el efecto de los extractos orgánicos y de los metabolitos secundarios presentes, sobre la respiración en mitocondrias asiladas.

Finalmente, los resultados obtenidos muestran que los extractos orgánicos derivados de 9 hongos endófitos aislados de plantas que crecen en una zona de alta diversidad biológica tienen potencial como posibles agentes antifúngicos y herbicidas de origen natural, constituyendo candidatos idóneos para realizar estudios químicos dirigidos enfocados en el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica demostrada a nivel de extractos orgánicos. Además, confirman que efectivamente los hongos endófitos son una fuente cuantiosa de metabolitos secundarios bioactivos.



7. CONCLUSIONES

El estudio de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos en estudio permitió determinar la pureza y la tasa de crecimiento de cada uno de los aislamientos obtenidos de las hojas sanas de *Salvia* sp., *Mimosa affinis*, *Sapium macrocarpum*, *Leucaena macrophylla*, y *Haematoxylon brasiletto*.

Con excepción del endófito Ssp61119, todos los hongos cultivados en pequeña escala crecieron satisfactoriamente en medio CPD, incubándolos bajo condiciones estáticas, por un período de 30 días, con fotoperiodo de luz artificial-oscuridad 12:12 h a temperatura ambiente.

Las condiciones óptimas de crecimiento del hongo endófito Ssp61119, son en medio arroz, bajo condiciones estáticas incubando el microorganismo por 30 días, con fotoperiodo luz artificial-oscuridad 12:12 h a temperatura ambiente, obteniéndose ~12 veces más extracto orgánico, del medio de cultivo y micelio que el derivado de los cultivos medio CPD.

La inhibición significativa sobre el crecimiento de al menos uno de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, demostrada por los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y/o micelio de los hongos endófitos estudiados, confirman que estos endófitos poseen potencial antifúngico. Sugiriendo que la actividad antifúngica que exhiben, se encuentra involucrada dentro de los principales mecanismos de defensa de su hospedera y de competencia entre los diversos endófitos que la colonizan.

Los extractos orgánicos derivados del cultivo en CPD del endófito PB3011, muestran los mayores rendimientos y la mayor actividad sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, y *Phytophthora capsici*.

El efecto fitotóxico demostrado por los extractos fúngicos sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las semillas de amaranto y jitomate, pone de manifiesto el alto potencial herbicida que



poseen los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos aislados. Lo que insinúa una base en la relación entre el endófito y su hospedera, es decir, mediante la producción de metabolitos secundarios que evitan el crecimiento de otras plantas que pudieran competir con su hospedera por espacio y nutrientes o bien que le permitan la colonización de su hospedera.

Los extractos fúngicos evaluados presentan un mayor efecto fitotóxico sobre el crecimiento de la raíz que sobre la germinación de las semillas de amaranto y jitomate. Varios de ellos manifiestan $CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ y menores a las demostradas por el herbicida comercial Glifosato[®], empleado como control positivo. Asimismo, su efecto sobre la respiración durante el proceso de germinación de las plantas blanco, permite establecer a la respiración como un posible mecanismo de acción de algunos de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos, observándose en todos los casos $CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$.

Los extractos de medio de cultivo y micelio del endófito MA1d1II son los que presentan el mayor efecto inhibitorio sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y germinación durante el proceso de respiración de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*.

La producción y actividad de los metabolitos secundarios bioactivos de los hongos endófitos, dependen en gran medida de la composición del medio de cultivo, cada hongo endófito tiene requerimientos nutricionales diferentes. Así, el endófito PB3II se ve favorecido en la producción de su metabolismo secundario en medio de cultivo caldo papa dextrosa, obteniéndose altos rendimientos; sin embargo, los extractos orgánicos obtenidos a partir de su cultivo en medio de arroz, presentan mayor actividad antifúngica. La actividad fitotóxica de los extractos obtenidos en los dos medios de cultivo no muestra diferencias significativas.

Las diferencias metabólicas mostradas en los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio para cada hongo endófito



estudiado, son las responsables de la variedad en la actividad biológica mostrada por los diferentes extractos fúngicos.

La evaluación cuantitativa del efecto tóxico de los extractos orgánicos de los diez endófitos estudiados sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos y plantas blanco, ponen en evidencia su potencial como posibles agentes antifúngicos y herbicidas de origen natural, constituyendo nueve de ellos candidatos idóneos para realizar estudios químicos biodirigidos conducentes al aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica demostrada a nivel de extractos.

Las hojas sanas de *Salvia* sp., *Mimosa affinis*, *Sapium macrocarpum*, *Leucaena macrophylla*, y *Haematoxylon brasiletto*, colectadas en una zona de alta biodiversidad como lo es la REBIOSH, están colonizadas por endófitos productores de metabolitos con propiedades antifúngicas y fitotóxicas, corroborando así, que los hongos endófitos que crecen en zonas biológicamente diversas son una fuente inagotable de compuestos con actividad biológica.

El presente trabajo contribuye al conocimiento del posible papel de los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos en las complejas relaciones que existe entre estos y su hospedera. Asimismo, se demuestra que el estudio químico y biológico de los hongos endófitos es de suma importancia para la búsqueda y desarrollo de compuestos novedosos que presenten actividad biológica y que puedan ser útiles como agroquímicos naturales alternativos, para el control de plagas y enfermedades en la agricultura.



8. PERSPECTIVAS

- Clasificar taxonómicamente hasta especie a los nueve aislamientos que mostraron el mayor potencial antifúngico y fitotóxico, mediante la utilización de técnicas moleculares modernas.
- Cultivar en mediana escala empleando las condiciones óptimas de crecimiento los endófitos que mostraron la mayor actividad biológica y obtener los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, lo que permitirá la realización de un mayor número de pruebas biológicas.
- Realizar el estudio químico biodirigido de los extractos fúngicos con mayor actividad biológica derivados de los cultivos en median escala, empleando el método de dilución en agar para monitorear la actividad biológica.
- Aislar y purificar el mayor número de metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica demostrada por las fracciones activas y determinar cuantitativamente el efecto fitotóxico y antifúngico.
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas y de difracción de rayos X.
- Purificar y establecer la estructura molecular de los sólidos cristalinos obtenidos de los extractos de los endófitos, PB30I (cultivo en arroz y en CPD), LM3C1I (medio de cultivo), Ssp6I19 (cultivo en arroz) y LM5f2I2B (medio de cultivo), empleando técnicas espectroscópicas y espectrométricas y de difracción de rayos X.



-
- Determinar los posibles efectos tóxicos de los extractos y compuestos puros, sobre el hombre y los animales mediante la observación de la actividad citotóxica sobre diversas líneas celulares.
 - Profundizar en el estudio del papel que desempeñan los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos en las estrechas relaciones entre endófitos con su entorno y principalmente con su planta hospedera.



9. REFERENCIAS

- Al-Qadiri, H. M., Nivin, I. A., Mengshi, L., Murad, A., Anna, G., Cavinato, B. A. (2007). **Studying of the Bacterial Growth Phases Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis.** J. of Rapid Met. & Automation in Microbiol.16.
- Anaya, A. L. (2003). **Ecología Química.** Edit. Plaza y Valdez. México.
- Anaya, A. L., Espinosa-García, F. J. Cruz-Ortega, R. (2001). **Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación.** Ed. Plaza y Valdés. México. 33-67 pp.
- Aneja, M., Gianfagna, T. J., Hebbar, P. K. (2005). **Trichoderma harzianum Produces Nonanoic Acid, an Inhibitor of Spore Germination and Mycelial Growth of Two Cacao Pathogens.** Physiol. and Mol. Plant Pathol. 67.
- Aristeguí-Bial. (2002). **El reino de los Hongos.** Revista Iberoamericana de Micología.
- Arnason, J. T., Sims, S. R., Scott, I. M. (2008). **Natural Products From Plants as Insecticides.** Phytochem. and Pharmacog.
- Arnold, A. E. (2007). **Understanding the Diversity of Foliar Endophytic Fungi: Progress, Challenges, and Frontiers.** Fungal Biol Rev. 21.
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E. A. (2003). **Fungal Endophytes Limit Pathogen Damage in a tropical tree.** PNAS 100.
- Azevedo, J. L. (2000). **Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants.** J. of Biotechnol. 3.
- 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.** Can. J. of Botany.
- **Banco Mundial** (2011). Recuperado el 10 de diciembre de 2012 en <http://www.bancomundial.org/publicaciones/>.
- Bart, H. J. (2011). **Extraction of Natural Products from Plants. An Introduction.** Ind. Scale Nat.Prod. Ext.



- Bashyal, B. P., Wijeratne, E. M., Faeth, S. H., Gunatilaka, A. L. (2005). **Globosumones A-C, Cytotoxic Orsellinic Acid Esters from the Sonoran Desert Endophytic Fungus *Chaetomium globosum***. J. Nat. Prod.
- Budhiraja, A., Nepali, K., Sapra, S., Gupta, S., Kumar, S., Dhar, K. L. (2012). **Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn.** Med Chem Res.
- Butler, M. S. (2004). **The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery**. J. Nat. Prod, 67.
- Cajiga, J. F. (2012). **Responsabilidad Social Empresarial**. Centro Mexicano para la Filantropía (Cemefi).
- Cánovas, F. A. (1993). **Tratado de Agricultura Ecológica**.
- Cazar, M^a. E. (2002). **Control de Fitopatógenos con Metabolitos Secundarios de Hongos**. Rev. de la Univ. de Azuay. Dic..
- Chang, J. M., Chen, T. H., Fang, T. J. (2005). **Pesticide residue Monitoring in Marketed Fresh Vegetables and Fruits in Central Taiwan (1999-2004) and an Introduction to the HACCP System**. J. of Food and Drug Anal. 13.
- Chemat, F., Vian, M. A., Cravotto, G. (2012). **Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles**. Int. J. Mol. Sci, 13.
- Chemler, J. A., Koffas, M. A. (2008). **Metabolic Engineering for Plant Natural Product Biosynthesis in Microbes**. Chem. Biotech, 19.
- Choy, F. L., Seeneevassen, S. (1998). **Monitoring Insecticide Residues in Vegetables and Fruits at the Market Level**. Food and Agr Res.
- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Dorner, J. W., Wilson, D. N., Johnson, J. C., Johnson, J. A., Bedell, N., Springer, D. M., Chexal, J. P., Clardy, K., Cox, J. C. (1997). **Mycotoxins Produced by *Aspergillus fumigatus* Species Isolated from Molded Silage**. J. Agric. Food Chem.
- Craney, A., Ozimok, C., Pimentel, S.M., Capretta, A., Nodwell, J.R. (2012). **Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism**. Chem Biolol. 19.



- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. (2002). **Natural Products (Secondary Metabolites)**. En: Biochem and Molec Biol of Plants.
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., Duke, S. O. (2009). **Natural Products in Crop Protection**. Bioorg. Med. Chem. 17.
- Debbab, A., Aly, A. H., Edrada-Ebel, A., Müller, E. G., Mosaddak, M., Hakiki, A., Ebel, R., Proksch, P. (2009). **Bioactive Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Chaetomium sp.* Isolated from *Salvia officinalis* Growing in Morocco**. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.13.
- Demain, A L. (1999). **Pharmaceutically Active Secondary Metabolites of Microorganisms**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52.
- Dewick, M. P. (2011). **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. 3ra edic. Editorial Wiley.
- Ezra, D., Hess, W. M., Strobel, G. A. (2004). **New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus**. Microbiol. 12.
- Faeth, S. H. (2002). **Are endophytic fungi defensive plant mutualists?**. OIKOS 98.
- FAO (2011). Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Otterdijk, R., Meybeck, A. **Global Food Losses and Food Waste. Extent, Causes and Prevention**
- Ferrer, I., García, J. F., Mezcua, M., Thurman, E. M., Fernández-Alba, A. R. (2005). **Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry**. J. of Crom. 30.
- Firn, R. (2010). **What are Natural Products?** Nature's Chemicals: The Natural Products That Shaped our World. 10.
- Fox, E. M., Howlett, B. J. (2008). **Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology**. Current Opin in Microbiol. 11.
- Franci, A. M. (2002). **Soja, agroquímicos y salud**. Editorial Eduvim. 2.
- Gabler, F. M., Mercier, J., Jiménez, J. I., Smilanick, J. L. (2009). **Integration of continuous biofumigation with *Muscodor albus* with pre-cooling fumigation with ozone or sulfur dioxide to control postharvest gray mold of table grapes**. Postharv Biol and Technol. 55.



- Gao, F., Dai, C., Liu, X. (2010). **Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens.** Afr. J. Microbiol. Res. 4 (13).
- García, D. E. (2004). **Los metabolitos Secundarios de las Especies Vegetales.** Pastos y Forrajes. 27.
- Ghanem, N. B., Yusef, H. H., Mahrouse, H. K. (2000). **Production of *Aspergillus terreus* Xylanase in Solid-State Cultures: Application of the Plackett–Burman Experimental Design to Evaluate Nutritional Requirements.** Bio. Technol, 73.
- Gilligan, C. A. (2008). **Sustainable agriculture and plant diseases: an epidemiological perspective.** Phil. Trans. R. Soc. 363.
- Gil-Ruiz, P. (2002). **Productos Naturales.** 1ª ed. Universidad Politécnica de Navarra.
- Gond, S. K., Verma, V. C., Mishra, A., Kumar, A. y Kharwar, R. N. (2010). **Role of Fungal Endophytes in Plant Protection.** CAB International. Management of Fungal Plant Pathogens (eds A. Arya y A.E. Perello).
- Grosch, R., Scherwinski, K., Lottmann, J., Berg, G. (2006). **Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community.** Mycol Res.
- Guirado-Abreu, A.; Cuéllar, A. (2008). **Strategies for the Selection of Medicinal Plants to be Studied.** Rev Cub. Plant Med. 13.
- Gunatilaka, A. A. L. (2006). **Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence.** J. Nat. Prod. 69.
- Gutierrez, M., Theoduloz, C., Rodriguez, J., Lolas, M., Schmeda-Hirschmann, G. (2005). **Bioactive Metabolites from the Fungus *Nectria galligena*, the Main Apple Canker Agen in Chile.** J. Agric. Food Chem. 53.
- Harper, J. K., Arif M., Ford, E. J., Strobel, G. A., Porco, J. A., Tomer D. P., O'Neill, K. L., Grant, D. M. (2003). **Pestacin: 1,3-dihydro Isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* Possessing Antioxidant and Antimycotic Activities.** Tetrah. 59.



- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Cking, R. L., Lumbsch, T. H., Lutzoni, F. P., Matheny, B., Mclaughlin, D. J., Martha, J., Redhead, S. (2007). **A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi** *En Mycol. research* 509–547 pp.
- Hormazahal, E., Schmeda-Hirschmann, G., Astudillo, L., Rodriguez, J., Theoduloz, C. Z., Naturforsch, C. (2005). **Metabolites from *Microsphaeropsis olivacea*, an Endophytic Fungus of *Pilgerodendron uviferum***. *J. Biosci.*
- Huelgas, P. (2011). **Potencial Aleloquímico del Hongo Endófito *Xylaria* sp., Aislado de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae) Sobre el Crecimiento de Microorganismos y Plantas**. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
- **INEGI, (2011)**. Actividad agrícola. Recuperado el 16 de diciembre de 2012 en <http://cuentame.inegi.gob.mx/economia/primarias/agri/default.asp>.
- Karlovsky, Petr. (2008). **Secondary Metabolites in Soil Ecology**. *Soil Biology* 14.
- Kendrick, B. (2011). **Fungi and the History of Mycology**. ELS. John Wiley & Sons.
- Khan, M. T., Khan, N. A., Ahmed, S., Ali, M. (2012). **Corporate Social Responsibility (CSR) – Definition, Concepts and Scope (a Review)**. *J. of Manag. And Soc. Sci.*
- Khan, Y. M., Aliabbas, S., Kumar, V., Rajkumar, S. (2009). **Recent Advances in Medicinal Plant Biotechnology**. *Indian J. of Biotech.* 8.
- Krohn, K., Bahmasari, R., Florke, V., Ludewig, K., Kliche-Spory, C., Michel, A., Aust, H., Draeger, S., Schulz, B., Antu, S. (1997). **Dihydroisocumarins from Fungi: Isolation, Structura Elucidation, Circular Dichroism and Biological Activity**. *Phytochem.*
- Lafuente, A., Viñuales, V., Pueyo, R. y Llaría, J. (2003). **Responsabilidad Social Corporativa y Políticas Públicas**.
- Lamour, H. K., Stam, R., Jupe, J., Huitema, E. (2012). **The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici***. *Mol. Plant Pat*, 13.



- Latgé, J. P., Calderone, R. (2006). **The Fungal Cell Wall. the Mycota, Growth, Differentiation and Sexuality. the Fungal Cell Wall. 1.**
- Lee, S. C., Wenjun, M. N., Shertz, C., Heitman, J. (2010). **The Evolution of Sex: a Perspective from the Fungal Kingdom.** Microbiol Mol Biol Rev 74.
- Li, J. Y., Strobel, G. A. (2001). **Jesterone and Hydroxy-jesterone Antioomycete Cyclohexenone Epoxides from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis jesteri*.** Phytochem. 57.
- Liu, J. Y., Song, Y. C., Zhanh, Z., Wang, L., Guo, Z. J., Zou, W. X., Tan, R. X. (2004). ***Aspergillus fumigatus* CY018, an Endophytic Fungus in *Cynodon dactylon* as a Versatile Producer of New and Bioactive Metabolites.** J. Biotechnol.
- Lorenzo, G. C. (200). **De la Historia y Futuro de la Ecología.** En: Ecología de Comunidades Edit. EGONDI. 29-56 pp.
- Ma, Y. M., Li, Y., Liu, J. Y., Song, Y. C., Tan, R. X. (2004). **Anti-*Helicobacter pylori* Metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an Endophytic Fungus in *Cynodon dactylon*.** Fitoter. 75.
- 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*.** Phytochem. 69.
- Mann, R. S., Kaufman, P. E. (2012). **Natural Product Pesticides: Their Devepment, Delevry and Use Against Insect Vectors.** Rev. in Org. Chem. 9.
- Martínez-Luis, S., González, M. C., Ulloa, M., Mata, R. (2005). **Phytotoxins from the Fungus *Malbranchea aurantiaca*.** Phytochem. 66.
- Mathivanan, N., Prabavathy, V.R., Vijayanandraj, V.R. (2008). **The Effect of Fungal Secondary Metabolites on Bacterial and Fungal Pathogens** Soil Biology 14.
- Mgbearuiké, A. C., Sun H., Fransson, P., Kasanen, R., Daniel, G., Karlsson, M., Asiegbu, F. O. (2011). **Screening of *Phlebiopsis gigantea***



isolates for traits associated with biocontrol of the conifer pathogen *Heterobasidion annosum*. J. Biol Cont. 30.

- Murray, R. P., Ken, S., Michael, A. P. (2009). **Microbiología Médica**. Elsevier, España.
- Negev, M., Garb, Y., Biller, B., Sagy, G., Tal, A. (2010). **Environmental Problems, Causes, and Solutions: An Open Question. J. Of Envr Educ. 41.**
- Nepote, D. M., Lamarque, A. L., Zygadlo, J. A. (2006). **Natural Products as Antioxidants**. Phytochem. 2.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2006). **Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years**. J. Nat. Prod. 70.
- Norma ISO 26000:2010 **Responsabilidad Social**. 1ra Ed. 2010 Nov. Recuperado el 03 de diciembre de 2012 en <http://www.globalstd.com/pdf/rs-iso26000-2010.pdf>.
- Peregrín-Alvarez, J. M., Sanford, C., Parkinson, J. (2009). **The Conservation and Evolutionary Modularity of Metabolism**. Genom Biol. 10.
- Pérez, Ma. A., Segura, A., García, R., Colinas, T., Pérez, M., Vázquez, A., y Navarro, H. (2009). **Residuos de Plaguicidas Organofosforados en Cabezuela de Brócoli (*Brassica oleracea*) Determinados por Cromatografía de Gases**. Rev. Int. de Cont. Amb. 25.
- Prats, G. (2007). **Microbiología Clínica**. Buenos Aires, Madrid. Editorial Méd. Panam.
- Ravindra, N., Kharwar, A., Mishra, S., Gond, K., Stierle, A. y Stierleb, D. (2011). **Anticancer Compounds Derived from Fungal Endophytes: their Importance and Future Challenges**. The Royal Soc. of Chem.
- Rhoden, S. A., Garcia, A., Bongiorno, V. A., Azevedo, J. L., Pamphile, J. A. (2012). **Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Trichilia elegans* A. Juss.** J. of Applied Pharm. Science. 2 (8).
- Riga, E., Lacey, L. A., Guerra, N. (2008). ***Muscodor albus*, a Potential Biocontrol Agent Against Plant-Parasitic Nematodes of Economically Important Vegetable Crops in Washington State, USA**. J. Biol. Cont. 45.



- Rosa, L. H., Tabanca, N., Zhigiang, T., David, P., Wedge, E., Morales, R. (2012). **Antifungal activity of extracts from endophytic fungi associated with *Smilax maintained* in vitro as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse.** Can. J. Microbiol. 58.
- Salazar, N. J., Madrid, M. L. **Herbicida Glifosato: Usos, Toxicidad y Regulación** (2011). Rev. de Cien. Biol. y de la Sal. 8.
- Saldaña-Fernández, J. (2007). **Estudios Sociales**, Nueva Época. 1.
- Sánchez-Fernández, R. E. (2010). **Potencial Alelopático de Extractos del Micelio y Medio de Cultivo de un Hongo Endófito Aislado de *Lonchocarpus Castilloi* (Fabaceae).** (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
- Satyajit, D. S., Zahid, L., and Alexander, I. G. (2005). **Natural Products Isolation** Met. in Biotech. 20.
- Schmeda-Hirschmann, G., Hormozabal, E., Astudillo, L., Rodriguez, J., Theoduloz, C. (2005). **Secondary Metabolites from Endophytic Fungi Isolated from the Chilean Gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque).** Worl J. Microbiol. Biotech.
- Senyuva, H. Z., Gilbert, J. (2007). **Rapid Analysis of Crude Fungal Extracts for Secondary Metabolites by LC/TOF-MS A New Approach to Fungal Characterization.** Agil. Technol. Inc.
- Shen, L., Worrell, E., Patel, M. K. (2010). Environmental impact assessment of man-made cellulose fibres. Resour, Conserv and Recy. 55.
- Shin, D. S., Oh, M. N., Yang, H. C., Oh, K. B. (2005). **Biological Characterization of Periconicins, Bioactive Secondary Metabolites, Produced by *Periconia* sp. OBW-15.** J. Microbiol. Biotech. 15.
- Song, Y. C., Huang, W. Y., Sun, C., Wang, F. W., Tan, R. X. (2005). **Characterization of Graphis lactone A as the Antioxidant and free Radical Scavenging Substance from the Culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an Endophytic Fungus in *Trachelospermum jasminoides*.** Biol. Pharm. Bull.
- Song, Y. C., Li, H., Ye, Y. H., Shan, C. Y., Yang, Y. M., Tan, R. X. (2004). **Endophytic Naphthopyrone Metabolites are co-Inhibitors of Xanthine**



Oxidase, SW1116 Cell and Some Microbial Growths. FEMS Microbiol. Lett.

- Stepherson, S. L. (2010). **The kingdom fungi.** En: The Biology of Mushrooms, Molds and Lichens. Tiember press. China.
- Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza, M. A., Stewart, A. (2010). **Reproduction Without Sex: Conidiation in the Filamentous Fungus Trichoderma.** Microbiol. 156.
- Stierle, D. B., Stierle, A., Kunz, A. (1998). **Dihydroramulosin from *Botrytis* sp.** J. Nat. Prod.
- Strobel, G A., Singh, S. K., Hassan, S. R., Mitchell, A. M., Geary, B., Sears, J. (2011). **An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. From Creosote Bush Producing Biologically Active Volatile Compounds Having Fuel Potential.** FEMS Microbiol Lett 320.
- Strobel, G. A., Daisy, B., Uvidelio, C., Harper, J. (2004). **Natural Products from Endophytic Microorganisms.** J. Nat. Prod., 67: 257-268 pp.
- Strobel, G. A., Dirkse, E., Sears, J., Markworth, C. (2001). **Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a Novel Endophytic Fungus.** Microbiol. 7.
- Suleiman, M. N. (2010). **Occurrence of *Pythium aphanidermatum* on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in Nigeria.** J. Appl. Biosci.
- Sumbali, G. (2005). **The Fungi.** Edit. Alpha Science. India.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y., Lumyong, S. (2005). **Secondary Metabolites from Endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 and their Antifungal Activity.** Microbiol. 151.
- Tan, R. X., Zou, W. X. (2001). **Endophytes: a Rich Source of Functional Metabolites.** Nat. Prod. Rep.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Fisher, M. C. (1999). **The evolution of Asexual Fungi: Reproduction, Speciation and Classification.** An. Rev of Phytopathol. 37.
- Thines, E., Anke, H., Weber, R. S. (2003). **Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi.** Mycol. Res. 108.



- Tuininga, A. R. (2005). **Interespecific Interaction Terminology: from Mycology to General Ecology**. En: **The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem**. Dighton, J., White, J. Oudemans, P. Tayllor and Francis. E.U. 265-283 pp.
- Ugalde, U. (2006). **Autoregulatory Signals in Mycelial Fungi**. En: **The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality**. 203-213 pp.
- Ulloa, M., Hanlin, R. (1978). **Atlas de Micología Básica**. Concepto S.A. ed. México.
- Varughese, T., Rios, N., Higginbotham, S., Arnold, A. E., Phyllis, D. C., Kursar, T. A., Gerwick, W. (2012). **Antifungal Depsidone Metabolites from *Cordyceps dipterigena*, an Endophytic Fungus Antagonistic to the Phytopathogen *Gibberella fujikuroi***. Elsevier, Tetrahedron Letters.
- Wasim, A., Dwaipayan, S., Ashim, C. (2009). **Impact of Pesticides Use in Agriculture: Their Benefits and Hazards**. Inter. tox.
- Weber, D., Terner, O., Anke, T., Gorzalczancy, S., Martino, V., Acevedo, C. (2004). **Phomol, a New Antiinflammatory Metabolite from an Endophyte of the Medicinal Plant *Erythrina crista-galli***. J. Antibiot. 57.
- Weber, W. S. (2009). **Recent Developments in the Molecular Taxonomy of Fungi**. Physiol and Gen. 1.
- Webster, H. A., Weber, R. (2007). **Introduction to Fungi**. Third edition. Cambridge University press. New York USA.
- White, M. M., James, T. Y., O'Donnell, K., Cafaro, M. J., Tanabe, Y., Sugiyama, J. (2006). **Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data**. Mycol. 98.
- Wicklow, D. T., Roth, R., Deyruo, S. T., Gloer, J. B. (2005). **A Prospective Endophyte of Maize: *Acremonium zeae* Antibiotics Inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticilloides***. Mycol. Res. 109.
- Zhang, H. W., Song, Y. C., Tan, R. X. (2006). **Biology and chemistry of endophytes**. Nat. Prod. Rep. 23.
- Zhang, K., Li, G., Xu, J., Dong, J., Liu, Y. (2007). **Nematicidal Substances from Fungi**. Rec. Pat. on Biotech. 1.



-
- Zhu, J. W., Nagasawa, H., Nagura, F., Mohamad, S. B., Uto, Y., Okura, K., Hori, H. (2000). **Elucidation of Strict Structural Requirements of Brefeldin A as an Inducer of Differentiations and Apoptosis.** *Biorg. Med. Chem.* 8.