



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

ECOLOGÍA

Crecimiento, interacciones y capacidad de colonización de algunos hongos endófitos foliares asociados a *Coffea arabica*, y su posible papel ecológico dentro de la planta

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUZ SELENE VELÁZQUEZ BERMÚDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROCÍO CRUZ ORTEGA

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. MAYO DE 2014



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 02 de diciembre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, de la alumna **VELÁZQUEZ BERMÚDEZ LUZ SELENE** con número de cuenta: 511012215, con la tesis titulada "**CRECIMIENTO, INTERACCIONES Y CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE ALGUNOS HONGOS ENDÓFITOS FOLIARES ASOCIADOS A *Coffea arabica*, Y SU POSIBLE PAPEL ECOLÓGICO DENTRO DE LA PLANTA**", bajo la dirección de la **DRA. ANA LUISA ANAYA LANG**:

Presidente: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
Vocal: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS
Secretario: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
Suplente: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA
Suplente: DRA. MARIANA DEL OLMO RUIZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 04 de febrero de 2014

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por acreditar me como alumna de Maestría en Ciencias Biológicas, cuidar y vigilar mi desempeño como estudiante y otorgarme el grado correspondiente.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca proporcionada durante la duración del programa de Maestría en el que se realizó el presente proyecto.

Al proyecto del PAPIIT con clave IN209611 titulado: “Estudio de los hongos endófitos en cafetales de la región centro de Veracruz”, por el apoyo económico proporcionado para la realización de este trabajo.

A mi Directora de tesis, Dra. Ana Luisa Aanaya Lang por la confianza, la orientación y el apoyo que me brindó para la realización de este trabajo, y por su entusiasmo, con el cual me motivó en todo momento. Le agradezco también el haberme facilitado todos los medios necesarios para realizar las actividades desarrolladas en esta tesis.

A las Dras. María del Rocío Cruz Ortega y Hermelinda Margarita Villegas Ríos, por las valiosas aportaciones que realizaron como miembros del Comité Tutor de este trabajo, y porque siempre me apoyaron cuando lo necesité.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En estas líneas expreso mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que colaboraron de alguna manera en la realización del presente trabajo:

A la M. en C. Aurora Saucedo García por ser mi mentora en el estudio y manejo de los hongos endófitos, y por la amistad y el apoyo que siempre me brindó.

A las Dras. Mariana Del Olmo Ruiz y Concepción Toriello Nájera, por su apoyo en la revisión de este trabajo, que fue enriquecido con sus importantes aportaciones como miembros del Jurado evaluador.

A la Técnica Académica Q.A. Blanca Estela Hernández Bautista por la ayuda recibida durante la parte experimental realizada en este trabajo, y por estar siempre atenta para resolver con prontitud todos los requisitos administrativos que permitieron continuar este proyecto hasta su término.

A la Laboratorista María Teresa Caudillo Estrada, quien siempre se preocupó por la disponibilidad del material necesario para el desarrollo de este proyecto realizado en el laboratorio de Alelopatía.

A mis amigas Mariana Miranda y Tulia Balbuena que me alentaron a continuar con mis objetivos académicos, y que compartieron conmigo tiempos inolvidables.

A mis compañeros del Laboratorio de Alelopatía, con los que compartí parte de mi vida durante mi paso por el programa de maestría, y a aquellas personas que intervinieron en mi proceso de formación, les agradezco su tiempo, amistad y colaboración.

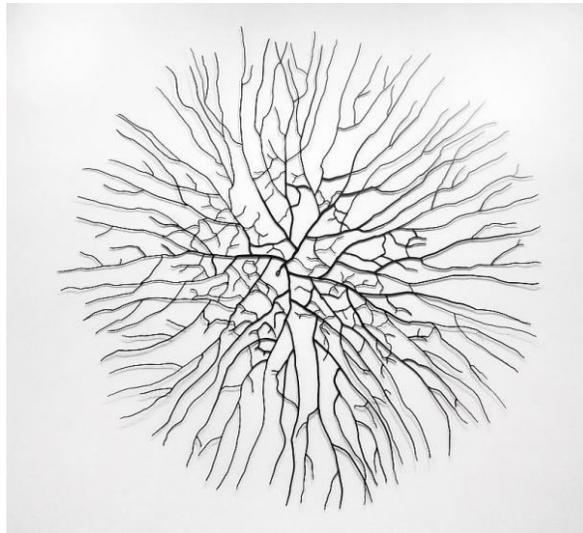
Sobre todo agradezco a los miembros de mi familia, que juntos conformamos un gran equipo con el que los obstáculos que se me presentaron en el camino desaparecieron:

A mis padres que me han colmado de amor, han guiado mi vida con enorme bondad y me han inculcado valores invaluable. Representan mis mejores ejemplos de vida y mi mayor orgullo.

A mi nueva familia Carlota, Celia, Karla y Sebastian, que me apoyaron siempre que lo necesité y me alentaron en todo momento a seguir adelante.

A ti César, mi esposo, compañero y amigo, con quien día a día vamos construyendo un mejor futuro uniendo nuestros esfuerzos. Para mi, es una bendición estar a tu lado y el compartir contigo emociones, sentimientos y vida. Este logro, también es tuyo.

*Dedico este trabajo a quienes me inspiran:
A mi padre y mis hermanos que viajaron a la luz,
a mi madre que es una guerrera extraordinaria,
y a César, mi amado compañero de vida.*



ROXY PAINE, *Micelio* (2010)

***“– Son demasiado pequeños, demasiado confusos;
nadie sabrá nunca nada con exactitud acerca de ellos.
Los pondremos sencillamente en la clasificación de Caos –”***

Expresión de Lineo sobre los microorganismos en: Cazadores de Microbios de Paul De Kruif.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
I. RESUMEN	1
I. SUMMARY	3
II. INTRODUCCIÓN	5
2.1 Reino Mycota	5
2.1.1 Diversidad	5
2.1.2 Características	5
2.1.3 Clasificación	6
2.1.4 Crecimiento de los hongos y colonización del sustrato	7
2.2 Asociaciones planta-hongo	8
2.2.1 Definición de simbiosis	8
2.2.2 Evolución y diversificación	9
2.3 Hongos endófitos	10
2.3.1 Definición	10
2.3.2 Ubicuidad y Diversidad	10
2.3.3 Hongos endófitos foliares de plantas leñosas	11
2.3.4 Diversidad funcional y papel ecológico	13
2.4 Interacciones entre hongos	15
2.4.1 Interacciones <i>in vitro</i> entre pares de hongos	16
2.4.2 Interacciones entre hongos endófitos	20
2.4.3 Interacción entre hongos endófitos y hongos fitopatógenos	21
2.5 <i>Hemileia vastatrix</i> Berk & Broome, hongo causante de la roya del café	22
2.5.1 Biología	22
2.5.2 Fases de infección	23
2.6 Importancia económica de la roya del café	25
2.7 Importancia económica del cultivo del café en México	25
2.8 Antecedentes. Los hongos endófitos del café	26
III. HIPÓTESIS	29
IV. OBJETIVO GENERAL	29
4.1 Objetivos específicos	30
V. MATERIALES Y MÉTODOS	31

5.1 Selección de los hongos endófitos y obtención de otros materiales biológicos	31
5.2 Bioensayo de crecimiento de los hongos endófitos.....	32
5.3 Bioensayos de interacción <i>in vitro</i> entre los hongos endófitos.....	35
5.3.1 Interacción entre los hongos endófitos por captura primaria de recursos	35
5.3.1.1 Evaluación microscópica de las interacciones.....	35
5.3.1.2 Evaluación macroscópica de las interacciones	37
5.4 Bioensayos de interacción complementarios entre los hongos endófitos	39
5.4.1 Interacción entre los hongos endófitos por captura secundaria de recursos y evaluación de la capacidad de reemplazo de cada uno.....	39
5.4.2 Bioensayos del potencial alelopático de cada uno de los hongos endófitos sobre el crecimiento de los demás.....	41
5.5 Bioensayos de inoculación de hongos endófitos <i>in vivo</i>	43
5.5.1 Obtención de plantas libres de hongos endófitos.....	44
5.5.1.1 Desinfección de las semillas y condiciones de crecimiento.....	44
5.5.1.2 Monitoreo de plantas de café libres de hongos endófitos.....	45
5.5.2 Elaboración de inóculo a base de micelio.....	46
5.5.2.1 Bioensayo 1. Inoculación de plantas con dos concentraciones de micelio fragmentado	46
5.5.2.2 Bioensayo 2. Tratamientos de inoculación con micelio en plantas de café.....	47
5.5.3 Elaboración de inóculo a base de esporas	48
5.5.3.1 Bioensayo 3: Inoculación de hojas desprendidas con suspensión de esporas de los hongos endófitos.....	48
5.5.3.2 Bioensayo 4: Inoculación de plantas de café con suspensión de esporas de <i>Cryptosporiopsis</i> sp. y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 2.....	49
5.6 Bioensayo de hongos endófitos contra <i>Hemileia vastatrix</i> Berk & Broome, 1869.....	50
5.6.1 Efecto de los hongos endófitos sobre la germinación de las urediniosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> 'la roya del café'.....	50
5.6.2 Bioensayo de inoculación de los hongos endófitos y <i>Hemileia vastatrix</i> sobre hojas desprendidas.....	51
VI. RESULTADOS	53
6.1 Bioensayos de crecimiento de los hongos endófitos	53
6.1.1 Comparación de los parámetros de crecimiento entre hongos endófitos, y entre cada hongo endófito cultivado en PDA y PDA+EC	54
6.2 Bioensayos de interacción <i>in vitro</i> entre los hongos endófitos.....	56

6.2.1 Interacción entre los hongos endófitos por captura primaria de recursos y evaluación microscópica de las interacciones	56
6.2.2 Interacción entre los hongos endófitos por captura primaria de recursos y evaluación macroscópica de las interacciones.....	58
6.2.2.1 Hongos endófitos con alteraciones en sus áreas de crecimiento antes del contacto con cada uno de los demás (A_i).....	60
6.2.2.2 Hongos endófitos con alteraciones en sus áreas de crecimiento medidas al final del periodo de medición (A_f).....	61
6.2.2.3 Hongos endófitos con alteraciones en sus tasas de crecimiento en la interacción con los demás (TC_i)	62
6.2.2.4 Efectos y respuestas competitivas de los hongos endófitos.....	63
6.2.2.5 Índices de dominancia	67
6.2.3 Bioensayos de interacción complementarios.....	68
6.2.3.1 Bioensayo de captura secundaria de recursos y evaluación de la capacidad de reemplazo.....	68
6.2.3.2 Bioensayo de crecimiento en PDA con filtrado de medios de cultivo.....	73
6.2.4 Jerarquización de los hongos endófitos de acuerdo a su desempeño general	76
6.3 Inoculación de hongos endófitos en hojas de plantas de café.....	77
6.3.1 Colonización de plantas inoculadas con suspensión de micelio	77
6.3.2 Colonización de plantas inoculadas con suspensión de micelio y distintas técnicas de inoculación	78
6.3.3 Colonización de hojas desprendidas con suspensión de esporas	79
6.3.4 Colonización de plantas de café con suspensión de esporas de <i>Cryptosporiopsis</i> sp. y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 2.....	81
6.4 Bioensayos de hongos endófitos contra <i>Hemileia vastatrix</i>	82
6.4.1 Bioensayo <i>in vitro</i> . Efecto de los hongos endófitos sobre la germinación de las urediniosporas de <i>Hemileia vastatrix</i>	82
6.4.2 Bioensayo de inoculación de los hongos endófitos y <i>Hemileia vastatrix</i> sobre hojas desprendidas.....	83
VII. DISCUSIÓN	86
VIII. CONCLUSIONES	106
IX. LITERATURA CITADA.....	109
X. ANEXOS.....	123

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Hongos endófitos seleccionados por su frecuencia de aislamiento a partir de hojas sanas de <i>C. arabica</i>	32
Tabla 2. Matriz de interacciones entre los hongos endófitos revisadas con el microscopio	57
Tabla 3. Resultados de la comparación de las respuestas o los efectos competitivos entre los hongos endófitos con la prueba de Kruskal-Wallis.....	64
Tabla 4. Resultados del análisis de correlación de Spearman entre las respuestas y los efectos competitivos de los hongos endófitos	65
Tabla 5. Interacciones entre los hongos endófitos a 45 días de iniciado el bioensayo.....	67
Tabla 6. Resultados del bioensayo de captura secundaria de recursos de los hongos endófitos	69
Tabla 7. Resultados de la capacidad de reemplazo de un hongo endófito por otro	71
Tabla 8. Crecimiento de los HE, al ser cultivados en PDA + filtrado del caldo de cultivo de los demás hongos endófitos.....	74
Tabla 9. Porcentaje de colonización de los HE en plantas inoculadas con suspensión de micelio, a diferentes tiempos después de la inoculación (60 segmentos/planta)	78
Tabla 10. Porcentajes de colonización para cada tratamiento de inoculación (20 segmentos por hoja/60 segmentos por tratamiento).....	79
Tabla 11. Sintomatología de las hojas inoculadas con hongos endófitos y <i>H. vastatrix</i> .	84

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Sistema filogenético del Reino Mycota.....	7
Fig. 2. Estructuras y fases de infección de <i>Hemileia vastatrix</i>	23
Fig. 3. Haustorio de <i>Hemileia vastatrix</i>	24
Fig. 4. Técnicas de microcultivo por segmentos o por inmersión en el medio de cultivo.....	36
Fig. 5. Esquema de los bioensayos de inoculación <i>in vivo</i>	43
Fig. 6. Revisión de la colonización de los hongos endófitos.....	45
Fig. 7. Representación gráfica del crecimiento de los hongos endófitos.....	53
Fig. 8. Parámetros de crecimiento de los hongos endófitos en PDA y PDA+EC	55
Fig. 9. Porcentaje de alteraciones en los parámetros de crecimiento de los HE en interacción.....	59
Fig. 10. Porcentaje de los tipos de interacción entre los hongos endófitos.....	60
Fig. 11. Porcentajes de inhibición de los parámetros de crecimiento de los hongos endófitos	66
Fig. 12. Gráfica de los I_D de cada hongo endófito	68
Fig. 13. Ejemplos de la captura secundaria de recursos de los hongos endófitos.....	69
Fig. 14. Gráfica de respuesta competitiva y efecto competitivo de la captura secundaria de los hongos endófitos C2	70
Fig. 15. Ejemplos de la evaluación del reemplazo de un hongo endófito por otro.....	72
Fig. 16. Gráficas de respuesta y efecto de los HE en el bioensayo con los filtrados de los demás hongos.....	75
Fig. 17. Jerarquización de la capacidad competitiva y potencial alelopático de los hongos endófitos.....	77
Fig. 18. Porcentaje de colonización de las hojas por los hongos endófitos (PC_{hoja})	80
Fig. 19. Porcentaje de colonización de las hojas para cada hongo endófito (PC_{hoja})	80
Fig. 20. Porcentajes de colonización de <i>Co. gloeosporioides</i> Gpo. 1 y <i>Cryptosporiopsis</i> sp.	81
Fig. 21. Gráfico de los porcentajes de germinación de las urediniosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> ($g_{urediniosporas}$)	82
Fig. 22. Hojas tratadas con los hongos endófitos y/o con <i>Hemileia vastatrix</i>	83

ABREVIATURAS

AA+EC= Medio de avena con agar y extracto de café

ADE= Agua destilada estéril

ADE+EC= Medio de agua destilada estéril con agar y extracto de café

A_{\neq} = Área de la colonia del micelio antes del contacto

A_{\neq} = Área de la colonia del micelio al final del periodo de medición

C1= Colonizador 1

C2= Colonizador 2

C_{hoja} = Porcentaje de colonización de los HE por hoja

C_{planta} = Porcentaje de colonización de los HE por planta

HE= Hongo endófito

I_D = índice de dominancia

Ma= Millones de años

PD= Caldo de papa-dextrosa

PDA= Papa-dextrosa-agar

PDA+EC= Papa-dextrosa agar con extracto de hojas de café

PI = Porcentajes de inhibición

SC= Suspensión concentrada

TC = Tasa de crecimiento máximo (parámetro de crecimiento)

TC_p = Tasa de crecimiento del bioensayo preliminar

TC_i = Tasa de crecimiento en el cultivo de interacción

TL = Tiempo de latencia (parámetro de crecimiento)

I. RESUMEN

Los hongos endófitos colonizan los tejidos vegetales vivos de forma asintomática, sin embargo, pueden formar asociaciones desde mutualistas hasta antagonistas con sus plantas hospederas. En las plantas leñosas tropicales, los hongos endófitos foliares forman comunidades megadiversas, cuyos miembros despliegan distintas estrategias de crecimiento, propagación e infección, y además, pueden establecer diversas relaciones entre ellos, y con hongos de otro tipo, como los micorrízicos y los fitopatógenos. En el presente trabajo se evaluó el crecimiento de nueve hongos endófitos foliares asociados a *Coffea arabica*, así como los tipos de interacciones que estos hongos establecen *in vitro*, con el fin de determinar si estas interacciones, así como las características del crecimiento de cada hongo, se relacionan con la frecuencia de aislamiento de los hongos a partir de las hojas de café. Asimismo, se determinó la capacidad de colonización de los hongos endófitos y se exploró el posible papel ecológico de los mismos dentro de las hojas. El crecimiento de los hongos endófitos se evaluó mediante cultivos individuales, y las interacciones se evaluaron mediante cultivos pareados, sembrando dos hongos diferentes en extremos opuestos de una caja Petri. En ambas evaluaciones se utilizó medio de cultivo con y sin el extracto de las hojas de los cafetos, lo que mostró que los hongos endófitos no solo poseen estrategias de crecimiento y capacidades competitivas diferentes, sino que ambas se pueden modificar en presencia del extracto de las hojas. Por otro lado, se realizaron dos bioensayos complementarios de interacción: en el primero se evaluó la capacidad de cada hongo endófito para colonizar un sustrato previamente ocupado por otro hongo, en este bioensayo se observó que algunos hongos endófitos actúan como colonizadores primarios y secundarios, mientras que otros son exclusivamente colonizadores primarios; en el segundo bioensayo, cada hongo endófito creció en un medio nutritivo al que se le añadió un filtrado del caldo de cultivo de cada uno de los otros hongos para evaluar el potencial alelopático de cada uno de los hongos estudiados. Los filtrados agregados a los medios de cultivo alteraron el crecimiento de los hongos endófitos, así como sus capacidades para colonizar el sustrato. El análisis de correlación no mostró una relación lineal significativa entre los parámetros de crecimiento de los hongos endófitos y la frecuencia de aislamiento de los mismos a

partir de las hojas de los cafetos. La frecuencia de aislamiento de los hongos tampoco se relacionó significativamente con la sensibilidad de los hongos hacia el extracto de las hojas de *C. arabica*, o con la capacidad competitiva que cada uno mostró en los bioensayos de captura primaria y secundaria de recursos. Por otro lado, se encontró que la respuesta de los hongos endófitos a los alelopáticos de los filtrados de los otros hongos, podría estar relacionada con la presencia de los hongos endófitos dentro de las hojas. La capacidad de colonización de los hongos endófitos se evaluó inoculando hojas de café libres de endófitos con cada hongo; los hongos más frecuentes y los moderadamente frecuentes tuvieron una mayor capacidad para colonizar las hojas que los poco frecuentes, particularmente cuando los primeros desarrollaron esporas y se inocularon en hojas desprendidas de las plantas. Finalmente, se evaluó el efecto de los hongos endófitos sobre la viabilidad e incidencia del fitopatógeno foliar *Hemileia vastatrix*; encontrándose que los hongos endófitos pueden alterar el tiempo de germinación de las urediniosporas de la roya en cultivos *in vitro*; entre los hongos endófitos, *Glomerella cingulata*, fue el único que inhibió de forma significativa la germinación de estas esporas; en contraste, la incidencia de *H. vastatrix*, en hojas desprendidas de la planta de café, no fue reducida por ningún hongo endófito, sino estimulada por algunos de ellos. Fue interesante observar que ciertos hongos endófitos necrosaron las hojas desprendidas, sugiriendo que éstos pueden acelerar el proceso de descomposición de los tejidos vegetales. En general, los resultados encontrados en el presente trabajo revelan que los hongos endófitos de *C. arabica* poseen diversas estrategias competitivas para sobrevivir en su hábitat, y además, pueden desempeñar papeles ecológicos diferentes.

I. SUMMARY

Endophytic fungi colonize living plant tissues asymptotically, however, they could establish with their host plants associations from mutualistic to antagonistic. In tropical woody plants, foliar fungal endophytes create mega-diverse communities whose members display different growth, spread and infection strategies, and they can establish various relationships between them, and with other fungi, including mycorrhizal and plant pathogens. In this work, the growth of nine foliar endophytic fungi associated with *Coffea arabica* was evaluated *in vitro*, as well as the interactions between each other, in order to determine whether these interactions, and also the growth features of each fungus, are related to the isolation frequency of fungi in coffee leaves. In addition, colonization capacity of each fungus was determined, and also their possible ecological role within the leaves. Endophytes growth was evaluated using individual cultures, and the interactions were evaluated by paired cultures, cultivating two different fungi in opposite sides of a Petri dish. In both evaluations culture medium was used with and without coffee leaf extract, which showed that endophytic fungi not only have different growth strategies and competitive capacities, but they can modify these traits in presence of the leaf extract. Additionally, two complementary interaction bioassays were performed, in first place; the capacity of each endophyte to colonize a substrate previously occupied by another fungus was evaluated. This bioassay showed that some endophytes behave as primary or secondary colonizers, whereas others are exclusively primary colonizers. In the second bioassay, each endophyte was grown adding to the culture medium the broth filtrate of each one of the others fungi to evaluate the allelopathic potential of each studied fungus. Filtrates added to culture media altered endophytic fungi growth, as well as their capacities to colonize the substrate. The results of correlation analysis showed that there was no significant linear relationship between each growth parameter of different fungal endophytes and the isolation frequency of them from the coffee tree leaves. The fungi isolation frequency was not significantly related to fungi sensivity to the coffee leaf extract, or to the competitive capacity that each fungus showed in the primary and secondary resource capture bioassays. On the other hand, it was found that the response of the endophytic fungi to the allelopathic compounds of others fungi filtrates could be related to the presence of endophytes in the

leaves. The colonization capacity of endophytic fungi was evaluated by inoculating each one in endophyte-free coffee leaves; the most frequent and moderately frequent fungi had a higher capacity to colonize the leaves than uncommon ones, particularly when the firsts produced spores and were inoculated on detached plant leaves. Finally, the effect of endophytes on the viability and incidence of foliar phytopathogenic fungi *Hemileia vastatrix* was evaluated; it was found that endophytic fungi can alter the germination time of the rust urediniospores in *in vitro* cultures; among endophytic fungi, *Glomerella cingulata* significantly inhibits spores germination; in contrast, the incidence of *H. vastatrix* on detached coffee plant leaves was not diminished by any endophytic fungi but stimulated by some of them. It was interesting to note that some detached leaves inoculated with some endophytic fungi were necrotized, suggesting that these fungi may accelerate the plant tissues decomposition. Overall, results of the present study showed that foliar endophytic fungi of *C. arabica* have different competitive strategies to survive in their habitat, and also these fungi can play different ecological roles.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Reino Mycota

2.1.1 Diversidad

Hawksworth (1991) afirmaba que el reino Mycota, también denominado Fungi o Eumycota, comprendía más de 69,000 especies descritas, sin embargo, basado en la relación entre los hongos conocidos y las especies de plantas vasculares de diferentes regiones, estimó que existían al menos 1.5 millones de especies distribuidas en todos los ecosistemas del planeta. Por su parte, Schmit y Mueller (2007), estimaron un mínimo global de 712,285 especies de hongos, al combinar los resultados de distintos estudios de distribución y diversidad de especies de hongos de diferentes hábitats, incluyendo a las asociadas y no asociadas a otros organismos, así como a aquellas que no habían sido clasificadas en el reino Fungi en épocas anteriores. Un estudio más reciente, basado en la secuenciación de algunas regiones de ARN extraído a partir de muestras ambientales de la micobiota del suelo, reveló una gran cantidad de especies, indicando que posiblemente existen entre 3.5 y 5.1 millones de especies fúngicas (O'Brien *et al.*, 2005; ver revisión de Blackwell, 2011).

2.1.2 Características

Los miembros del reino Mycota son organismos eucarióticos, que en su mayoría presentan un soma o talo constituido por una serie de células filiformes, llamadas hifas, rodeadas por una pared compuesta principalmente de quitina, glucanos y glicoproteínas (Bruns, 2006; Pontón, 2008). Las hifas mantienen una continuidad debido a la ausencia de septos (paredes celulares), o porque éstos, presentan uno o más poros, funcionando como una unidad celular. Las hifas pueden tener más de un núcleo; y de acuerdo con el número de núcleos y la información genética de los mismos, los hongos pueden ser monocarióticos (un núcleo), haploides o diploides; o bien, dicarióticos (dos núcleos genéticamente diferentes), homocarióticos (2 o más núcleos genéticamente semejantes) o heterocarióticos (2 o más núcleos genéticamente diferentes). La manera en como se nutren los hongos es heterótrofa absorptiva, es decir, digieren externamente sus alimentos secretando enzimas y, posteriormente, absorben

las moléculas resultantes de la digestión (Alexopoulos *et al.*, 1996; Webster y Weber, 2007). La reproducción de los hongos incluye fases sexuales y asexuales o somáticas, sin embargo, en diversos hongos solo se conoce el estadio asexual (Hawksworth, 2011). Tanto la reproducción sexual como la asexual, generan estructuras de resistencia y propagación llamadas esporas, aunque la reproducción asexual también se lleva a cabo por fragmentación del talo o soma del hongo (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Algunos hongos miceliares, llamados dimórficos, pueden presentar, además de la morfología filamentosa, una morfología levaduriforme (unicelular) durante una parte de su ciclo de vida; mientras que otros, muestran características particulares como desarrollo de zoosporas, rizoides en lugar de micelio como ocurre en los quitridios, ausencia de pared celular, o paredes celulares con celulosa (Blackwell *et al.*, 2012).

2.1.3 Clasificación

Debido a que un mismo hongo puede presentar distintas morfologías dependiendo del estadio en su ciclo de vida, y a que los caracteres morfológicos no siempre reflejan las relaciones filogenéticas del grupo, el esquema de clasificación de los hongos ha cambiado constantemente. Blackwell *et al.* (2012) incluyen siete Phyla en su sistema filogenético: Neocallimastigomycota, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota (**Fig. 1**). Estos dos últimos, agrupados en el subreino Dikarya, por poseer hifas dicarióticas (Hibbett *et al.*, 2007).

En la reconstrucción filogenética de la **Fig. 1**, también se observa que los Microsporidia, que son parásitos intracelulares obligados de otros eucariotas (Keeling y Fast, 2002), tienen una posición incierta; además se observa a *Olpidium brassicae* y *Rozella* spp., que son hongos conformados por un talo esférico u ovoide y viven como simbioses sobre o dentro de las células de sus hospederos; estos dos hongos han sido separados del Phylum Chytridiomycota del que anteriormente formaban parte (James *et al.*, 2006). *Rozella* conforma además, el clado Rozellida o Cryptomycota, el cual ha sido recientemente reconocido, aunque no formalmente establecido (Jones *et al.*, 2011).

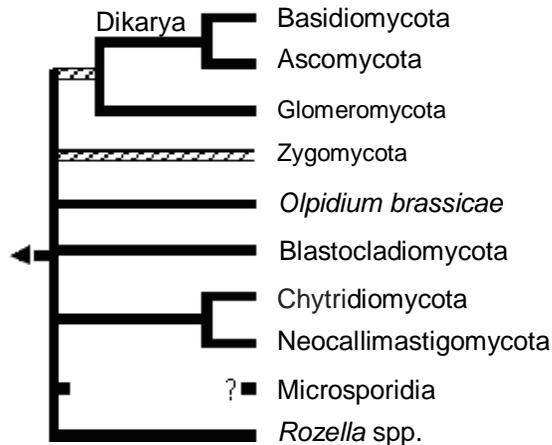


Fig. 1. Sistema filogenético del Reino Mycota. El signo de interrogación (?) indica que la posición filogenética del grupo es incierta y las barras discontinuas (---) que la condición monofilética del grupo es incierta (Blackwell *et al.*, 2012). La explicación general se encuentra en el texto.

Aquellos organismos con características similares a los hongos y que tradicionalmente han sido estudiados por micólogos, pero que no poseen todas las características necesarias para pertenecer al reino, se clasifican dentro del grupo Stramenopila (Oomycota, Hyphochytriomycota y Labyrinthulomycota) (Leipe *et al.*, 1994) o como mohos mucilaginosos (Myxomycota, Plasmodiophoromycota, Dictyosteliomycota, Acrasiomycota) (Blackwell *et al.*, 2012).

2.1.4 Crecimiento de los hongos y colonización del sustrato

Los hongos están presentes en prácticamente todos los ecosistemas, debido en gran medida, a su organización filamentosa (Dighton, 2003). Una gran proporción son organismos modulares que a partir de un propágulo inicial desarrollan diversas hifas las cuales al crecer y ramificarse forman una red denominada micelio. El micelio constituye una colonia, la cual puede generar más micelio desde cualquier parte de su biomasa. Las hifas que conforman el micelio, crecen y se ramifican por su parte apical hacia todas direcciones, pero además, pueden fusionarse entre ellas o con las hifas de otros individuos compatibles (proceso denominado anastomosis) de la misma u ocasionalmente de diferente especie, formando heterocariontes o híbridos vegetativos, en los que dos núcleos genéticamente diferentes coexisten en un mismo citoplasma (Glass *et al.*, 2000; Glass y Kaneko, 2003). Debido a que las hifas son muy delgadas,

los hongos presentan una elevada cantidad de superficie expuesta al ambiente, en relación a su volumen, lo que les permite aprovechar los recursos que los rodean con mayor eficiencia (Alexopoulos *et al.*, 1996). El borde del micelio, contiene ápices hifales jóvenes que degradan y absorben los alimentos, y en el centro, se encuentran las partes más senescentes que acumulan sustancias de reserva que pueden translocar a otras partes del micelio. Esta característica permite la colonización de diversos sustratos, aún los pobres en nutrientes, manteniendo la continuidad del sistema miceliar en un ambiente heterogéneo (Dighton, 2003). Además, algunos hongos forman estructuras compuestas de varias hifas con las que colonizan sustratos hostiles y optimizan el transporte de nutrientes a zonas alejadas (Cairney, 1992). Estas estructuras, llamadas rizomorfos, pueden permanecer latentes durante temporadas adversas y reactivarse bajo condiciones favorables. En la mayoría de los hongos, al crecer el micelio produce esporas sexuales o asexuales con ciertos intervalos y en respuesta a diversos estímulos, lo que permite su dispersión y preservación en el hábitat (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Prácticamente, todos los hongos participan en los procesos ecológicos que se desarrollan en los ecosistemas. Dependiendo del tipo de la especie de hongo y de su historia de vida, pueden regular desde la formación de los suelos hasta la producción primaria y secundaria, ya sea de manera independiente o a través de la asociación con otros organismos (Dighton, 2003).

2.2 Asociaciones planta-hongo

2.2.1 Definición de simbiosis

El término simbiosis, que etimológicamente significa 'vida en común', fue acuñado por De Bary (1879) para describir la vida conjunta de dos organismos distintos. En un principio, se desarrollaron dos variantes en torno a esta definición. La primera, describía las relaciones que benefician a ambos participantes; mientras que la segunda, conservando la connotación original, especificaba una asociación cercana entre dos organismos, independientemente del resultado de la interacción (Wilkinson, 2001). Actualmente, el significado más utilizado es este último, los organismos asociados, llamados simbiontes, pueden establecer relaciones comensales, parásitas o

mutualistas (Louie, 2010). Para llamarse simbiótica, una asociación debe ser íntima y debe establecerse entre dos organismos de diferente especie (Margullis, 1991), tal como ocurre en la interacción planta-hongo, en la que además, se cumple una de las características más comunes en una simbiosis, el hecho de que uno de los simbioses actúe como hospedero, albergando y suministrando recursos al otro (Louie, 2010).

2.2.2 Evolución y diversificación

La asociación entre plantas y hongos tiene una historia muy antigua y de gran relevancia para el proceso evolutivo. Las evidencias datan del periodo Devónico de la era Paleozoica (400 Ma) (Taylor, 1995; Krings *et al.*, 2007), que fue justo el periodo en el que las plantas emergieron del medio acuático y se establecieron en el ambiente terrestre (Pirozynski y Malloch, 1975; Simon *et al.*, 1993). Evidencias fósiles, ubican a diversos hongos de los Phyla Chytridiomycota, Glomeromycota y Ascomycota como simbioses de distintas plantas con las que se presume establecieron relaciones antagonistas, comensales o mutualistas (Taylor *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2004, Taylor y Krings, 2005). Estas últimas posiblemente permitieron que plantas y hongos afrontaran conjuntamente los factores de estrés emergentes en la atmósfera Paleozoica (Rodríguez y Redman, 2008). El hallazgo de algunos hongos similares a los del género *Glomus* en fósiles del periodo Ordovícico (460 Ma), han abierto la posibilidad de un origen más remoto de este sistema simbiote (Redecker *et al.*, 2000).

Distintos descubrimientos posicionan a los hongos micorrízicos como la forma ancestral de la asociación entre plantas y hongos, a partir de la cual, evolucionaron y se diversificaron los diferentes sistemas simbióticos (Provorov, 2009), hasta estar presentes en todos los ecosistemas (Dighton, 2003). Hoy en día, la asociación planta-hongo es ubicua y versátil. Además de los hongos micorrízicos (Brundrett, 2006), se encuentran hongos saprótrofos que se alimentan de exudados y de la materia vegetal muerta; parásitos biótrofos, necrótrofos y hemibiótrofos, obligados y facultativos, con distintos grados de fitopatogenicidad (Oliver e Ipcho, 2004). En los últimos años, se ha explorado una gran variedad de hongos, llamados endófitos, que viven dentro de las plantas sin que se advierta su presencia; estos hongos, posiblemente representen la forma de vida simbiote más remota y cosmopolita (Weiß *et al.*, 2011).

2.3 Hongos endófitos

2.3.1 Definición

El término endófito fue introducido por De Bary (1866) para describir, de manera general, a un organismo encontrado dentro de una planta. Sin embargo, este término ha evolucionado hasta especificar que la forma de infección endófito es asintomática y que puede ser una condición que un microorganismo presenta temporalmente (Wilson, 1995; Hyde y Soyong, 2008). Bajo esta connotación, y para los fines de este trabajo, el vocablo “endófito” se define como: “*un microorganismo que no ocasiona síntomas aparentes de enfermedad en los tejidos vegetales dentro de los que habita, al menos en el momento de su aislamiento*”. Sin embargo, se debe precisar que la condición endófito no es indicativa de los efectos de la infección sobre la planta hospedera en términos de costos y beneficios, pues aunque es asintomática, ocasiona cambios metabólicos, fenotípicos y genotípicos en la hospedera que no son observables ni se pueden determinar a simple vista (Rafiqi *et al.*, 2012). Tales efectos están condicionados por factores endógenos y exógenos a los organismos simbiotes, y por ello, pueden cambiar en prácticamente cualquier interacción planta-hongo (Porras-Alfaro y Bayman, 2011).

2.3.2 Ubicuidad y Diversidad

Los hongos endófitos (HE) están presentes en todos los ambientes naturales, desde áridos y tropicales hasta templados y árticos; en todos los linajes de plantas (Azevedo y Araujo, 2007; Weiß *et al.*, 2011) y en todos los órganos vegetales (Wearn *et al.*, 2012). Su diversidad e incidencia se ven afectadas por la edad y el tipo de órgano vegetal (Wearn *et al.*, 2012), por la ubicación geográfica de la hospedera (Arnold y Lutzoni, 2007), por la interacción con otros microorganismos simbiotes (Eschen *et al.*, 2010) y por el tipo de planta (U'Ren *et al.*, 2012), entre otros factores. Los HE comprenden un grupo filogenéticamente diverso, constituido principalmente por miembros del subreino Dikarya (Phyla: Ascomycota y Basidiomycota) (Guo *et al.*, 2000; Rodriguez y Redman, 2008), y en menor medida del Phylum Zygomycota (Sette *et al.*, 2006).

Los HE se dividen en dos categorías que reflejan las diferencias entre formas de vida fúngica: Clavicipitaceae y no Clavicipitaceae. Los hongos Clavicipitaceos (Clase 1) presentan una limitada biodiversidad y colonizan de forma sistémica algunas monocotiledóneas (Saikkonen *et al.*, 1998; Clay y Holah, 1999; Clay y Shardl, 2002; Saikkonen, 2010) y algunas dicotiledóneas de la Familia Convolvulaceae (Panaccione *et al.*, 2013); en cambio, los hongos no Clavicipitaceos son altamente diversos y pueden colonizar desde briofitas hasta angiospermas y gimnospermas (Schulz *et al.*, 1993; Arnold *et al.*, 2003; Sieber, 2007). Los hongos no Clavicipitaceos han sido subdivididos en tres grupos funcionales de acuerdo a su diversidad, al rango de hospederos que abarcan, a sus patrones de transmisión e infección, y a la función ecológica que desempeñan (Rodríguez *et al.*, 2009). Los HE de Clase 2 colonizan rizomas, raíces y tallos de forma extensiva, y son los únicos HE no Clavicipitaceos que presentan una baja biodiversidad y que se propagan tanto de forma horizontal como vertical, además, brindan beneficios a las plantas, y entre estos beneficios, algunos de ellos les permiten a las plantas adaptarse a los factores abióticos de estrés de un hábitat particular. Los endófitos de Clase 3 son altamente diversos, colonizan la parte aérea de las plantas de forma horizontal y desarrollan infecciones localizadas; en tanto que los HE de Clase 4, que también se transmiten de forma horizontal, colonizan las raíces de las plantas de forma extensiva y todavía se desconoce el grado de diversidad que tienen. Tanto los HE de Clase 3, como los de Clase 4, pueden ejercer un efecto protector en las plantas, pero éste no está relacionado a las presiones ambientales de un hábitat particular. Dentro de los HE Clase 3, se ubican los endófitos foliares o endófilos (de los vocablos griegos: endo = 'dentro', phyllo = 'hoja') de las plantas leñosas, los cuales se caracterizan por ser extremadamente diversos.

2.3.3 Hongos endófitos foliares de plantas leñosas

Los HE foliares que colonizan plantas leñosas son en su mayoría generalistas en cuanto a la selección de su planta hospedera, aunque algunas especies parecen afines a plantas específicas, pues crecen más rápido cuando se agrega en el medio de cultivo el extracto foliar de las plantas de las que éstos se aislan con mayor frecuencia (Arnold, *et al.*, 2003; Arnold y Herre, 2003; Herre *et al.*, 2007).

Los HE se propagan por esporas sexuales y asexuales, y por fragmentos de hifa que se producen en hojas senescentes desprendidas de la planta y se transmiten de forma horizontal hacia los tejidos fotosintéticos de otras plantas por medio de vectores biológicos (Monk y Samuels, 1990; Devarajan y Suryanarayanan, 2006) y físicos, como la lluvia y el viento (Herre *et al.*, 2007). Bajo condiciones propicias, algunas esporas germinan y penetran la cutícula foliar por medio de estructuras especializadas (Stone, 1987) y por liberación de enzimas degradadoras, o bien, se introducen a las hojas a través de los estomas y de heridas infringidas por algunos herbívoros (Osono y Takeda, 1999; Dai *et al.*, 2010) o por ciertas prácticas agrícolas o forestales (Dighton, 2003). Tras la penetración, se producen múltiples infecciones intra e intercelulares localizadas, en las cuales la biomasa de los hongos queda limitada (Arnold *et al.*, 2003; Herre *et al.*, 2007; Arnold y Lutzoni, 2007). Con el tiempo las hojas acumulan nuevas infecciones (Gallery *et al.*, 2007), produciendo un mosaico en el que un solo fragmento foliar de 2 mm² puede albergar desde una especie de hongo (Lodge *et al.*, 1996) hasta decenas de ellas (Herre *et al.*, 2007), y una sola planta puede contener comunidades fúngicas distintas en cada hoja y ser hospedera de cientos de especies (Arnold *et al.*, 2003; Arnold y Herre, 2003). Sin embargo, la acumulación de especies no es indefinida. Conforme la hoja envejece, disminuye la diversidad de especies endófitas y solo permanecen algunos hongos dominantes que saturan los tejidos hasta que la hoja se desprende y muere; es entonces, cuando se presenta la etapa de esporulación y se reinicia el ciclo de propagación (Herre *et al.*, 2007).

Los procesos de germinación y de penetración, son altamente influenciados por las condiciones ambientales. Por ejemplo, Arnold y Herre, (2003) reportaron que plantas de *Theobroma cacao*, libres de endófitos, pueden ser colonizadas casi en su totalidad por hongos distintos en tan solo dos semanas de exposición, principalmente si son colocadas bajo un dosel forestal durante las estaciones húmedas. De manera general, una alta humedad relativa evita la desecación y maximiza la germinación de las esporas de los hongos. En la medida en que se reduce la humedad, también disminuye la germinación (Arauz y Sutton, 1989). Otro factor importante en el proceso de infección es la temperatura, que afecta, entre otros procesos, la producción de enzimas degradadoras de algunos HE (Dai *et al.*, 2010).

2.3.4 Diversidad funcional y papel ecológico

Los HE establecen un *continuum* de estrategias simbióticas con su planta hospedera, abarcando desde el mutualismo hasta el parasitismo, pasando por grados comensales y neutrales (Saikkonen *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 1999), dependiendo del estado fisiológico y de desarrollo de la planta (Schulz y Boile, 2005), el genotipo de ambos organismos y el contexto ambiental (Johnson y Oelmüller, 2009). Para explicar esta variedad de interacciones, se han desarrollado dos sistemas de referencia. El primero, conocido como balance resistencia-virulencia, estipula que los endófitos requieren cierto nivel de virulencia para infectar a sus hospederas, mientras que éstas últimas, deben poseer un mecanismo de resistencia que regule la proliferación de HE. Ambos mecanismos deben mantener un equilibrio para permitir la entrada del HE, y a su vez, evitar la aparición de síntomas de enfermedad (Schulz y Boile, 2005). El segundo sistema, conocido como de 'relación costo-beneficio', propone que los sistemas de compensación (*trade offs*), inherentes a la planta, son a su vez condicionados por la presencia de los HE, ya sea de forma directa o debido al contexto ecológico de la interacción, lo que conduce a costos y beneficios condicionados para ambos organismos en términos de eficacia biológica (Faeth, 2002). Estos costos y beneficios son, por lo general, asimétricos y pueden desestabilizar prácticamente cualquier tipo de interacción (Saikkonen *et al.*, 2004; Partida-Martínez y Heil, 2011).

Dado que las relaciones entre los HE y sus plantas hospederas son dinámicas y polifacéticas, las funciones que los endófitos desempeñan en el ecosistema son igualmente variadas (Saikkonen *et al.*, 1998). Por ejemplo, algunos HE pueden alterar las tasas de descomposición de la materia vegetal antes de que las hojas se desprendan, ya que modifican la calidad de los tejidos vegetales al consumir nutrientes específicos o al manipular el metabolismo de la hospedera, y esta modificación afecta el proceso de colonización de los hongos descomponedores (Purahong y Hyde, 2011). Los HE también pueden actuar directamente como saprófitos cuando las hojas de la planta hospedera envejecen o son dañadas por factores externos (Promputtha *et al.*, 2007). El hecho de que los HE habiten dentro de la planta, favorece que actúen como colonizadores primarios, pudiendo conformar hasta el 92% de las comunidades detritívoras en las etapas tempranas del proceso de descomposición (Osono, 2006).

Por otro lado, una modificación en el HE, en la planta hospedera o en el ambiente, puede desencadenar la fitopatogenicidad del primero. Muchos HE pertenecen a géneros como *Colletotrichum*, *Guignardia* y *Phomopsis*, que incluyen también especies fitopatógenas (Baayen *et al.*, 2002; Hyde y Soyong, 2008), pero incluso una misma especie de HE puede contener variedades no patógenas y patógenas que sólo se distinguen con métodos moleculares específicos, como sucede con algunas especies del género *Colletotrichum* (Rojas *et al.*, 2010), en las que además puede ser posible la transformación de una forma de vida a la otra por la mutación de un solo locus (Freeman y Rodriguez, 1993; Redman *et al.*, 1999). La profunda relación entre HE y hongos fitopatógenos ha llevado a pensar que los primeros proceden de aquellos fitopatógenos que redujeron su grado de virulencia al coevolucionar con su planta hospedera, por lo que actualmente solo ocasionan síntomas de enfermedad cuando la planta se estresa o debilita por factores ajenos al HE; o bien, cuando infectan exitosamente a una planta que no es su hospedera habitual (Sieber, 2007).

Además de que los HE pueden actuar como saprótrofos y fitopatógenos, existen otros HE que actúan como comensales sin ocasionar un efecto adverso o benéfico evidente en sus plantas hospederas (Deckert *et al.*, 2001); sin embargo, también existen HE mutualistas (Rodriguez *et al.*, 2005). Inicialmente, los beneficios aportados por los HE mutualistas se observaron en gramíneas infectadas sistémicamente con hongos Clavicipitaceos (Saikkonen *et al.*, 1998; Clay y Schardl, 2002). Posteriormente, se encontró que algunos hongos no Clavicipitaceos, mejoraban la resistencia de sus hospederas ante algunas condiciones desfavorables, como la sequía (Bae *et al.*, 2009), el calor extremo (Redman *et al.*, 2001), la alta salinidad en el suelo (Redman *et al.*, 2002), la herbivoría y las enfermedades (Boyle *et al.*, 2001; Mejía *et al.*, 2008). En ocasiones, estos efectos responden a una simbiosis adaptativa entre plantas y HE que les permite crecer de forma conjunta en zonas hostiles; la habilidad de estos endófitos está relacionada a las presiones selectivas impuestas por los hábitats de los que son extraídos, y por ello, estos HE son de gran importancia para la permanencia de las comunidades vegetales en ambientes extremos (Redman *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2005).

De manera general, la información disponible sobre HE, demuestra que éstos desempeñan un papel determinante en la estructura y sucesión de las comunidades vegetales, de las microcomunidades de la rizósfera y la filósfera, y en el ensamblaje de herbívoros y fitopatógenos asociados a las plantas (Rudgers y Clay, 2005). Los efectos ejercidos por estos HE no se limitan a sus plantas hospederas, o a las comunidades asociadas íntimamente, y de forma nutritiva con ellas, sino que escalan a otros niveles de organización trófica y ecológica. Por ejemplo, los cambios en la calidad de las hojas que algunos HE ocasionan, afectan la transferencia de materia y energía a lo largo de la cadena alimenticia, desde la planta, hasta los niveles tróficos superiores (Omacini, 2010); mientras que los compuestos metabólicos producidos por otros endófitos, afectan directamente el comportamiento de los depredadores naturales de los herbívoros de sus plantas hospederas (Jani *et al.*, 2010). A nivel ecosistema, la acción conjunta de muchos HE contribuye al reciclaje de nutrientes, y a su disponibilidad para los productores primarios (van der Heijden *et al.*, 2008).

Las comunidades de HE se encuentran en constante cambio, y su estructuración depende de distintos factores abióticos, como la cantidad de luz y la disponibilidad de agua (Botella *et al.*, 2010); de factores inherentes a la planta hospedera, como la edad y química de las hojas (Arnold *et al.*, 2003), pero también parece depender de las interacciones establecidas entre los mismos HE (Hata *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Posada y Vega, 2006; Rakotoniriana *et al.*, 2008).

2.4 Interacciones entre hongos

Entre hongos se establecen diversas interacciones cuya naturaleza es difícil de discernir debido al carácter sedentario, crecimiento indeterminado y plasticidad fenotípica de estos organismos. Un individuo fúngico en estado filamentoso puede establecer relaciones simultáneas con distintos hongos, desplegar varios mecanismos de interacción a la vez, y obtener resultados distintos para cada interacción (Tuininga, 2005). Un mecanismo es todo aquel atributo fenotípico, fisiológico, etc., que determina el proceso por el cual los hongos interactúan, por ejemplo la competencia por basorción de carbono, alelopatía, etc., mientras que los resultados de la interacción, determinan, en términos de costos y beneficios en relación a la eficacia biológica de los hongos (es

decir, en su capacidad para sobrevivir, crecer y desarrollar esporas), la consecuencia parcial o final de cada mecanismo, por ejemplo mutualismo, comensalismo, antagonismo, etc. (Kennedy, 2010). Aunque los mecanismos de una interacción raramente son dilucidados y los resultados no son claros, los patrones morfológicos y las características del crecimiento de los micelios en interacción, sugieren el establecimiento de relaciones benéficas, perjudiciales, neutrales, etc., entre los hongos involucrados que, sin embargo, pueden variar en tiempo y espacio, y en respuesta a los cambios medioambientales (Boddy, 2000; Tuininga, 2005).

2.4.1 Interacciones *in vitro* entre pares de hongos

Las interacciones fúngicas son un factor clave para entender la estructura y el funcionamiento de las comunidades de hongos, dado que determinan en gran medida la distribución espacial de las especies, la organización de los micelios y los patrones de colonización de los sustratos en los ambientes naturales (Stahl y Christensen, 1992; Cano y Bago, 2005) y artificiales (Magan y Lacey, 1984). Sin embargo, estas interacciones son muy complejas y difíciles de estudiar en condiciones naturales, por lo que su estudio se puede simplificar colocando dos hongos distintos en los extremos opuestos de una caja Petri con medio de cultivo. En estos cultivos *in vitro* entre pares de hongos, se monitoriza la dinámica del crecimiento del micelio de cada hongo involucrado y se compara con el observado en otros cultivos (testigos o controles) donde cada uno crece de forma individual (Dowson y Rayner, 1988; Shearer y Zare-Mivan, 1988; Bärlocher, 1991; Wheeler y Hocking, 1993; Shaw *et al.*, 1995; Klepzig y Wilkens, 1997; Guzmán-Franco *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009; Schubert y Schwarze, 2011). Para evitar fuentes de variación entre los cultivos se estandariza el tipo de sustrato, la temperatura y la incidencia de la luz, entre otros factores. La influencia que cada hongo ejerce sobre el otro, altera las tasas de crecimiento (Leong *et al.*, 2011) y los patrones de distribución de ambos micelios antes, durante y después del contacto entre colonias (Donnelly y Boddy, 2001), ya que se modifica la producción enzimática (Baldrian, 2006) y de metabolitos secundarios de los hongos (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008), así como la asignación de nutrientes a las distintas secciones del micelio (Donnelly y Boddy, 2001; Lindahl y Olsson, 2004), entre otros factores.

De acuerdo con Rayner *et al.* (1994), el comportamiento de los micelios en los cultivos *in vitro* podría reflejar una alta probabilidad de encuentros entre los mismos bajo condiciones naturales, sin embargo, las interpretaciones deben realizarse con cautela, pues los resultados obtenidos en los cultivos *in vitro* pueden variar al compararse con los obtenidos en los sustratos naturales de los hongos (Wheeler y Hocking, 1993; Holmer y Stenlid, 1993; Boddy, 2000), aún bajo condiciones controladas (Woods *et al.*, 2005).

Debido a los cambios estructurales de los micelios el resultado de la interacción entre hongos se define, en ocasiones, por las características morfológicas de las colonias fúngicas enfrentadas. Aquí se establece un Índice de interacción o de dominancia, el cual asigna un valor numérico a cada hongo dependiendo de las características morfológicas de la interacción entre ellos, y este valor numérico, aumenta conforme un hongo muestra, aparentemente, un mayor dominio sobre el otro (Shearer *et al.*, 1988). En este caso, la caracterización y clasificación de las interacciones es difícil porque los sistemas establecidos por los investigadores utilizan criterios heterogéneos (Tuinunga, 2005). No obstante, históricamente se han utilizado tres características principales para clasificar las interacciones entre micelios: (1) entremezclado de micelios sin efecto adverso aparente, (2) invasión o reemplazo parcial o total del micelio, en el que un hongo crece sobre otro y (3) antagonismo mutuo o restricción del crecimiento de ambas especies (Porter, 1924; Skidmore y Dickinson, 1976; Shearer y Zare-Maivan, 1988; Stahl y Christensen, 1992; Klepzig y Wilkens, 1997; Boddy, 2000). En otra categoría reportada, el micelio de un hongo inhibe a distancia a otro, sugiriendo que los metabolitos secundarios liberados por el primero afectan el crecimiento miceliar del segundo (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

El análisis del crecimiento y la morfología de los hongos durante la interacción muestra, por lo general, que las relaciones establecidas entre los hongos de una comunidad son dominadas por la competencia, en tanto que la caracterización de las interacciones revela una jerarquización entre las habilidades competitivas de los hongos que componen las comunidades (Shearer y Zare-Maivan, 1988; Stahl y Christensen, 1992; Wheeler y Hocking, 1993; Boddy, 2000; Woods *et al.*, 2005).

La competencia es una de las principales fuerzas de la selección natural que promueven la innovación y diversificación de las formas de vida (Schluter, 1996). Kennedy (2010) define a la competencia entre hongos, como una disminución en el crecimiento del micelio de cada hongo en presencia del otro. Aunque el crecimiento es una característica fenomenológica (aparente) más que mecanicista (que indique los procesos involucrados), se asume que un mayor crecimiento permitirá a un hongo colonizar una mayor cantidad de sustrato, y por ello, representa una ventaja indudable. Se distinguen dos tipos de competencia: (1) Competencia por explotación de recursos y (2) competencia por interferencia. La competencia por explotación de recursos o indirecta, define a la habilidad que éstos tienen para colonizar un sustrato y adquirir sus nutrientes antes de que lo hagan otros hongos. Los hongos que colonizan primero un sustrato perjudican indirectamente a otros hongos porque reducen la cantidad de espacio y nutrientes disponibles, pero no a través de una interacción directa entre ellos (Kennedy, 2010). El éxito de un hongo en este tipo de competencia está determinado por el tipo de dispersión y la viabilidad de los propágulos, la velocidad de germinación de las esporas, la tasa de crecimiento del micelio y la capacidad de aprovechar la materia orgánica intacta, entre otros factores (Shaw *et al.*, 1995; Boddy, 2000).

La competencia directa o por interferencia comprende interacciones antagonistas directas entre los hongos, como consecuencia del inevitable acercamiento y del contacto entre los micelios durante la colonización de un sustrato. En este caso, los hongos utilizan distintas estrategias competitivas como la liberación de aleloquímicos que actúan a distancia, el micoparasitismo y la interferencia hifal, entre otros (Boddy, 2000; Kennedy, 2010). En este tipo de competencia el tamaño del inóculo es un factor determinante, pues en condiciones asimétricas los individuos de gran tamaño obtienen más recursos y pueden inhibir o suprimir el crecimiento del competidor de menor tamaño, lo que aumenta sus probabilidades de invadirlo y desplazarlo (Holmer y Stenlid, 1993).

Otra aproximación teórica sobre la relación entre hongos, denomina 'captura primaria de recursos' al establecimiento del micelio de un hongo en un sustrato en ausencia de competidores, y 'captura secundaria de recursos', al establecimiento que requiere de la invasión y desplazamiento de otros hongos (Boddy, 2000; Davis *et al.*,

2010). Bajo este esquema, el combate o la interferencia entre micelios, funciona como una extensión de la captura primaria de recursos que se enlaza a la captura secundaria de éstos, formando un continuo en el proceso de competencia (Holmer y Stenlid, 1993). La captura secundaria de recursos se puede separar completamente de la captura primaria de recursos, si se suprime esta segunda dentro del sistema de evaluación, es decir, permitiendo que el primer hongo inoculado ocupe completamente el medio de cultivo antes de inocular al otro hongo sobre el micelio del primero (Klepzig y Wilkens, 1997). En todo caso, se considera que el avance del micelio sobre un sustrato va inevitablemente acompañado por la obtención de recursos a partir del mismo, por lo que algunos investigadores no encuentran correcto diferenciar entre competencia por explotación de recursos y por interferencia (Boddy, 2000).

Por otro lado, las interacciones entre hifas individuales determinan en gran medida, el resultado global de la interacción entre micelios. Solo a fina escala se pueden observar las habilidades competitivas de algunos hongos, como los del género *Trichoderma*, cuyas hifas enrollan, estrangulan, fragmentan, rompen y penetran las hifas de otros hongos, o bien, crecen dentro de ellas (Inbar *et al.*, 1996; Howell, 2003; Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008). De igual forma, la susceptibilidad de ciertos hongos solo se observa a nivel microscópico. Por ejemplo, las hifas de algunos hongos en interacción con las hifas de otros, presentan coagulación, vacuolación u otros tipos de degradación citoplásmica que pueden llevar a la lisis celular (Bélanger y Avis, 2004; Woods *et al.*, 2005). Otras estructuras afectadas son los conidios y las fiálides que pueden deformarse o experimentar lisis en presencia de otros hongos (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008). Un tipo particular de interacción es la interferencia hifal, en la que solo las células de las hifas que tienen contacto con las hifas del oponente resultan afectadas debido a la liberación de metabolitos exclusivos del proceso de interacción, con acción restringida a un área local (Boddy, 2000). Los hongos también pueden ser afectados por los metabolitos de otros hongos a nivel hifa (Dennis y Webster, 1971) y colonia (Singh *et al.*, 2009), sin involucrar un contacto directo. Tanto las interacciones hifales como de micelio completo son diversas entre los hongos, por lo que se requiere tanto de la observación macroscópica como de la microscópica de ambos tipos de interacción, para comprender mejor las relaciones establecidas entre ellos.

2.4.2 Interacciones entre hongos endófitos

Como se mencionó anteriormente, los HE foliares de plantas leñosas desarrollan infecciones localizadas que forman comunidades altamente diversas en aparente coexistencia. La existencia de especies poco frecuentes y dominantes dentro de estas comunidades (Neubert *et al.*, 2006), así como los patrones de distribución que presentan, sugieren el establecimiento de interacciones entre sus miembros, pues mientras existe la co-ocurrencia de algunas especies, otras nunca aparecen juntas (Espinosa-García y Langenheim, 1990; Arnold *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2013).

Las interacciones entre pares de HE pueden ser observadas en cajas Petri con diferentes medios de cultivo, como se realiza con los hongos descomponedores de madera (Shearer y Zare-Maivan, 1988; Donnelly y Boddy, 2001), los que habitan en el suelo (Stahl y Christensen, 1992), los que forman simbiosis con insectos (Klepzig y Wilkens, 1997) y los hongos xerófilos extremos (Leong *et al.*, 2011), entre otros. Al igual que en los estudios mencionados, el crecimiento de los micelios de los HE en interacción puede ser desde inhibido hasta estimulado por la influencia del HE copartícipe en los cultivos *in vitro* (Espinosa-García *et al.*, 1996), lo que sugiere que estas distintas relaciones, que aparentan ser desde mutualistas hasta antagonistas, posiblemente se desarrollan dentro de los tejidos vegetales. Otros estudios demuestran que, en ciertos casos, dos HE foliares se distribuyen en distintas secciones de una hoja cuando pertenecen a géneros distintos (Hata *et al.*, 2002; Rakotoniriana *et al.*, 2008), pudiéndose reproducir el mismo efecto antagonista entre las mismas cepas en cultivos *in vitro* (Rakotoniriana *et al.*, 2008), lo que sugiere que las interacciones entre HE son muy importantes para el ensamblaje de las comunidades endófitas fúngicas como sucede en las comunidades de hongos de otros hábitats (Singh *et al.*, 2009; Schubert y Schwarze, 2011). Aunque para el estudio de los HE la intervención de la planta hospedera juega un papel fundamental.

Algunos estudios que han caracterizado las interacciones entre HE *in vitro*, han estudiado, a su vez, la distribución de los mismos en su hábitat natural, encontrando una relación positiva entre la frecuencia de aislamiento de los HE y las capacidades competitivas de los mismos, es decir, cuanto más se aísla un HE a partir de las hojas

de las plantas, por ejemplo de *Theobroma cacao*, tanto más competitivo resulta ser este mismo hongo, en los cultivos de interacción *in vitro* (Arnold *et al.*, 2003).

Considerando los mecanismos de competencia de los hongos en general, los HE podrían influir negativamente en la colonización y establecimiento de otras especies de HE a través de dos mecanismos: (1) interacción directa hongo-hongo, en la que los HE compiten por espacio y recursos a través de la interferencia, liberación de metabolitos secundarios, etc. (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Rakotoniriana *et al.*, 2008), y (2) interacción indirecta hongo-planta-hongo, en la que los HE inducen el sistema de defensa de la planta hospedera, la cual responde bloqueando o inhibiendo la entrada de otros endófitos (Saikkonen *et al.*, 1998). Sin embargo, tales mecanismos directos e indirectos de interacción también podrían beneficiar indirectamente a algunos endófitos, por ejemplo, afectando negativamente a sus principales competidores, y por consiguiente, se podrían formar asociaciones comensales o mutualistas entre los hongos de una comunidad, no obstante, no se ha generado información sobre este último aspecto.

2.4.3 Interacción entre hongos endófitos y hongos fitopatógenos

Como se mencionó, los HE pueden intervenir en la relación que se establece entre su planta hospedera y otros hongos, incluyendo los fitopatógenos. Esto es de gran importancia porque tanto los HE como algunos de sus metabolitos purificados, pueden actuar como inhibidores o estimulantes de los hongos fitopatógenos, y ser utilizados para el control biológico de plantas invasoras a través del aumento de la virulencia de sus fitopatógenos naturales (Kurose *et al.*, 2012), o bien, para el control de hongos fitopatógenos de plantas de importancia ecológica y comercial. En este último aspecto se ha observado, por ejemplo, que algunos HE de *Theobroma cacao* reducen el crecimiento y la incidencia de ciertos hongos o fungoides fitopatógenos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Evans *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2004; Rubini *et al.*, 2005; Tondje *et al.*, 2006; Aneja *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2006). Este efecto atenuante sobre las enfermedades se debe a que los HE pueden inducir la resistencia local o sistémica de la planta (Bailey *et al.*, 2006), o bien, interactuar directamente con el fitopatógeno y excluirlo de los tejidos vegetales (Arnold *et al.*, 2003).

Aunque los resultados de los cultivos pareados *in vitro*, donde los HE destruyen parcial o totalmente a los fitopatógenos, muestran una aproximación del efecto que tendrán los HE sobre los fitopatógenos en las plantas (Arnold *et al.*, 2003; Mejía *et al.*, 2008), el grado de protección de los HE puede variar dentro de los tejidos vegetales debido al genotipo de la planta, el genotipo del fitopatógeno, o a la combinación de ambos genotipos (fitopatógeno y planta), aunados al genotipo del HE (Raghavendra y Newcombe, 2013). Lo anterior es principalmente aplicable en los estudios con hongos biótrofos que no crecen en cultivos artificiales, pues son fitopatógenos altamente especializados que solo se desarrollan en los tejidos vivos de las plantas, con la particularidad de que inducen mínimamente el sistema de defensa de las mismas (Perfect y Green, 2001; Ellis *et al.*, 2009). Entre los hongos biótrofos, se encuentran los causantes de la enfermedad de 'la roya' que comprenden al menos 7000 especies que infectan diversas plantas de importancia comercial (Aime, 2006), entre estos hongos, *Hemileia vastatrix* Berk & Broome, es el causante de 'la roya' en las plantas de café.

2.5 *Hemileia vastatrix* Berk & Broome, hongo causante de la roya del café

2.5.1 Biología

El basidiomiceto, *Hemileia vastatrix*, es un parásito foliar del Orden Pucciniales (Hibbett *et al.*, 2007) (también conocidos como Uredinales), cuyos estadios desarrollan esporas que alternan entre condiciones monocarióticas y dicarióticas (Kolmer *et al.*, 2009). Este fitopatógeno penetra por los estomas del envés de las hojas y genera lesiones cloróticas que posteriormente se vuelven pústulas con gran cantidad de esporas denominadas urediniosporas (urediosporas o uredosporas, esporas asexuales dicarióticas) de color amarillo-naranja (Silva *et al.*, 1999). Con el tiempo el área foliar infectada por estas urediniosporas, sufre necrosis y las hojas se desprenden prematuramente, debilitando paulatinamente a las plantas (Agris, 2005).

El ciclo de vida de *H. vastatrix* es mayoritariamente asexual, pues es sostenido por una producción continua de urediniosporas que funcionan como estructuras de propagación, infección y sobrevivencia. Ocasionalmente, también produce esporas sexuales llamadas teliosporas, las cuales mediante un proceso meiótico dan origen a un fragmobasidio que forma células monocarióticas llamadas meiosporas o

basidiosporas. Sin embargo, no se ha demostrado que las basidiosporas infecten a las hojas del cafeto, ni tampoco, se ha encontrado un hospedero alternativo para estas basidiosporas (Fernandes *et al.*, 2009) por lo que hasta ahora, se considera que la roya completa su ciclo de vida dentro de un mismo hospedero (autoica o autecia).

2.5.2 Fases de infección

El proceso infeccioso asexual de todos los Pucciniales inicia con la adhesión de las urediniosporas a la superficie de las hojas. En el hongo, *Uromyces viciae-fabae*, esta adhesión es mediada por enzimas como la esterasa y la cutinasa, que se liberan desde la superficie de las urediniosporas cuando éstas últimas hacen contacto con la humedad de la superficie de la hoja (Deising *et al.*, 1992). A partir de cada urediniospora adherida, emergen uno o más tubos germinativos que llegan a los estomas dirigidos por respuestas tigmotrópicas, es decir, por la detección a través del tacto de las características topográficas de las hojas (Terhune *et al.*, 1991) (**Fig. 2**).

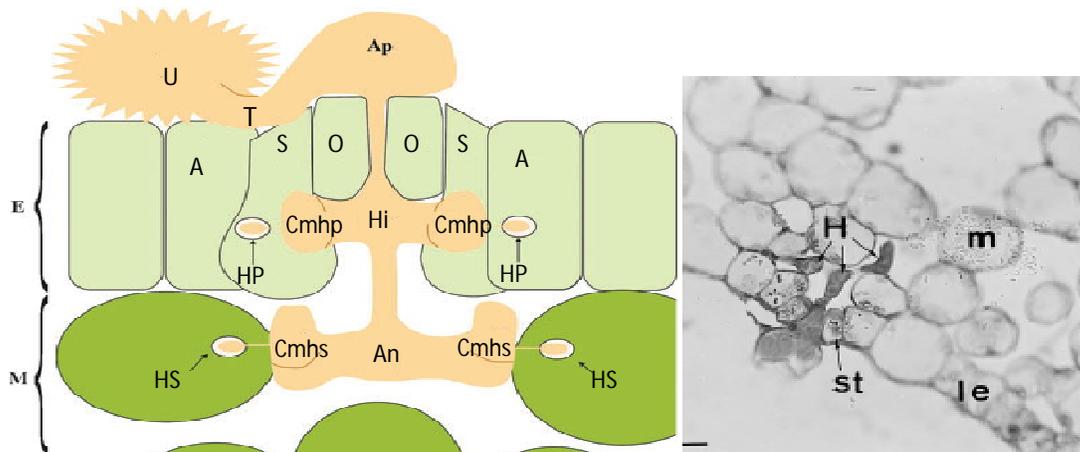


Fig. 2. Estructuras y fases de infección de *Hemileia vastatrix*. *Izquierda*, esquema simplificado: urediniospora (U), tubo germinativo (T), apresorio (Ap), células oclusivas del estoma (O), células subsidiarias (S), células adyacentes (A) hifa de infección (Hi), célula madre haustorial primaria (Cmhp), haustorio primario (HP), hifa en forma de ancla (An), célula madre haustorial secundaria (Cmhs), haustorio secundario (HS). Células de la epidermis (E) y células de mesófilo (M). Tomado y modificado de Ramiro *et al.* (2009). *Derecha*, imagen microscópica: hifa en el espacio intercelular (H), célula del mesófilo (m), células oclusivas de los estomas (st) y epidermis baja (le). Tomada de Silva *et al.* (1999).

Cada tubo germinativo genera una estructura diferenciada llamada apresorio, cuya formación es inducida por señales químicas y físicas como cambios en el pH y en la temperatura. La presión de turgencia del apresorio, aun siendo muy baja, deforma

las células oclusivas (células guarda) de los estomas permitiendo la entrada del hongo (Terhune *et al.*, 1993) (**Fig. 2**). A partir del apresorio se desarrolla la hifa de infección, la cual regula la secreción de enzimas que degradan la pared celular vegetal para la penetración y avance del hongo (Freytag y Mendgen, 1991; Rauscher *et al.*, 1995).

A diferencia de otras royas, la hifa de infección de *H. vastatrix* puede penetrar las células de la epidermis antes de llegar al mesófilo, ya que puede diferenciarse en una célula madre haustorial primaria que atraviesa la pared celular de las células estomáticas y generar en ellas, a los haustorios primarios, mientras la hifa de infección sigue avanzando. Cuando la hifa de infección llega al mesófilo, se diferencia en una estructura en forma de ancla que genera y da soporte a las células madre haustoriales secundarias, las que a su vez originan a los haustorios secundarios dentro de las células del parénquima esponjoso del mesófilo de la hoja (Ramiro *et al.*, 2009) (**Fig. 2**).

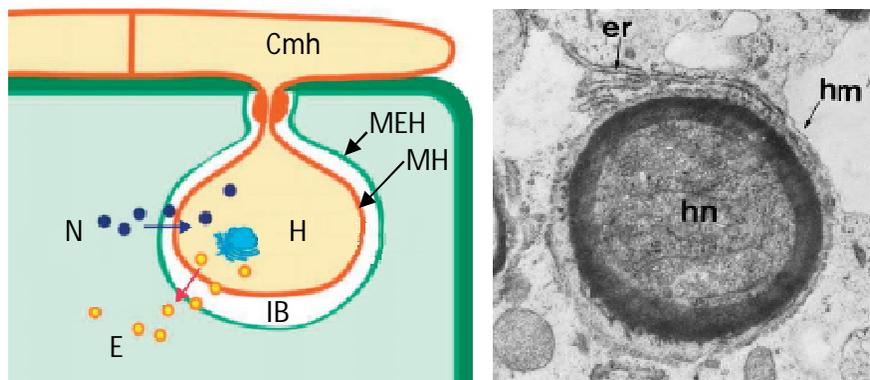


Fig. 3. Haustorio de *Hemileia vastatrix*. Izquierda, esquema simplificado del haustorio: célula madre haustorial (Cmh), haustorio (H), membrana haustorial (MH), membrana extrahaustorial (MEH), nutrientes (N) y efectores (E), interface biotrófica (IB), fragmento adaptado de Rafiqi *et al.* (2012). Derecha, microfotografía del cuello del haustorio de *H. vastatrix* (hn) rodeado por la membrana extrahaustorial (hm) cercana al retículo endoplásmico (er), tomado de Silva *et al.* (1999).

El haustorio, proporciona un contacto más íntimo con la célula hospedera, ya que el citoplasma del haustorio del hongo fitopatógeno solo está separado del citoplasma de la célula vegetal por la membrana haustorial, la matriz o interfase biotrófica y la membrana extra-haustorial (**Fig. 3**). Por esto, los haustorios son estructuras especializadas de gran importancia para la señalización entre el parásito y la planta hospedera, así como para la absorción de nutrientes desde la hospedera hacia el parásito (Voegelé *et al.*, 2009; Rafiqi *et al.*, 2012).

2.6 Importancia económica de la roya del café

La roya del café, ocasionada por *H. vastatrix*, es la enfermedad más dañina para los cafetos y tiene gran importancia económica a nivel mundial. A partir de su aparición en 1861, en el noroeste del continente africano, de donde probablemente es originaria, se diseminó a otras áreas de este continente, avanzó por Asia y en 1970 llegó a Brasil, iniciando su propagación por el continente americano. Actualmente existen al menos 45 variedades de esta roya, y la mayor parte de los países productores de café albergan al menos una variedad de roya en sus cultivos (Várzea y Marques, 2005).

Aunque en América Latina la roya del café ha ocasionado pérdidas que van del 10 al 40% de la producción (Cristancho *et al.*, 2012), en México desde la primera infección localizada en 1981, no se había convertido en un problema importante para el cultivo, sin embargo, en los últimos meses del año 2013, se ha reportado un aumento en la incidencia de este fitopatógeno en el estado de Chiapas, en la zona de la frontera con Guatemala (SAGARPA, 2013). El repentino aumento de la virulencia de *H. vastatrix* tras un periodo de aparente avirulencia, no es un fenómeno aislado, pues ya ha ocurrido en algunas zonas cafetaleras colombianas ocasionando pérdidas graves en la producción de ese país. La virulencia inusual de *H. vastatrix* no responde al origen de una nueva variedad de hongo sino a prácticas agronómicas inadecuadas y al descuido o abandono de los cultivos (Cristancho *et al.*, 2012). Dado que este tipo de roya está presente en el 10% de la superficie cultivada en el territorio nacional (70 mil hectáreas) (SAGARPA, 2013), es importante evitar su proliferación en México.

2.7 Importancia económica del cultivo del café en México

El género *Coffea* comprende alrededor de 100 especies de plantas, pero en la industria comercial las dos especies más importantes son *C. canephora*, y *C. arabica* que representan aproximadamente el 70% de la producción mundial del cultivo. En 1796, el café se introdujo en México como cultivo en los estados de: Veracruz, Morelos, Michoacán y Oaxaca (SAGARPA, 2010). Desde entonces, la producción de café se volvió clave para la economía nacional, y hasta el año 2001, México ocupaba el 5° lugar a nivel mundial, no obstante, en el año 2011 descendió de esta posición hasta colocarse como el décimo productor mundial (FAO, 2011), mientras que como

exportador, ocupa el octavo lugar, con el 3% del volumen de exportaciones mundiales (AMECAFE, 2012). Sin embargo, hasta el año 2010, México era el país con mayor producción de café orgánico en el mundo (SAGARPA, 2010), aunque ahora comparte esta primacía con Perú (AMECAFE, 2012). Actualmente existen 15 estados mexicanos productores de café, entre ellos Veracruz que ocupa el tercer lugar después de Chiapas y Oaxaca. El 97% de la producción mexicana se obtiene de la especie *Coffea arabica*, siendo las variedades Typica, Caturra y Bourbon, las más cultivadas (AMECAFE, 2012).

2.8 Antecedentes. Los hongos endófitos del café

En el género *Coffea*, particularmente en la especie *Coffea arabica*, habitan diversas especies de HE foliares cuyas comunidades pueden variar entre sitios de muestreo, entre individuos y dentro de las hojas de un mismo individuo (Santamaría y Bayman, 2005; Vega *et al.*, 2009). En un estudio realizado con los HE foliares obtenidos a partir de cafetos de distintas plantaciones de Puerto Rico, se evaluó la posible relación entre pares de hongos endófitos, comparando la proporción de hojas infectadas por cada uno de los dos HE con la proporción de hojas infectadas por ambos HE. Se encontró que la presencia de una especie de HE está altamente determinada por la presencia/ausencia de otras especies, lo que indica la existencia de efectos competitivos o antagónicos ejercidos entre especies, o bien, de efectos mutualistas que permiten una asociación favorable entre ciertas especies de HE (Santamaría y Bayman, 2005). En otro estudio se evaluó la diversidad y distribución de los HE foliares de distintas especies de *Coffea* en plantaciones de Colombia, Hawai'i, México y Puerto Rico. En todos los sitios, se encontraron muchas especies de HE que solo se aislaron a partir de un segmento de hoja (llamadas singletons en inglés), mientras que pocas especies fueron muy frecuentes o medianamente frecuentes (Vega *et al.*, 2009). Aunque la diversidad de frecuencias y la dominancia de ciertas especies son características típicas de las comunidades de otros organismos, y pueden ser el resultado de múltiples factores, las distintas frecuencias de aislamiento observadas entre los HE, podrían deberse a las diferencias en la sensibilidad y posible afinidad de los mismos hacia los compuestos que contienen las hojas de café, como fue

observado, aunque no de manera concluyente, para las comunidades de HE de la planta del cacao (*Theobroma cacao*) en cultivos *in vitro* (Arnold *et al.*, 2003).

En el Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM, se estudian las comunidades de HE foliares de *C. arabica* de algunos cafetales del centro del estado de Veracruz con diferentes estrategias de manejo (Saucedo-García *et al.*, en preparación). De los cafetales considerados en este estudio, un cafetal rústico llamado 'El Mirador' y ubicado en Huatusco, Ver., presentó la mayor diversidad de HE foliares. Un cafetal rústico es aquel que tiene distintas especies de árboles nativos del lugar para dar sombra a los cafetos, además de algunas especies selectas (en el caso de 'El Mirador', principalmente leguminosas arbóreas del género *Inga*). En el trabajo de Saucedo-García *et al.* (en preparación) se aislaron tanto HE muy frecuentes, como poco y medianamente frecuentes, a partir de las hojas de los cafetos de 'El Mirador', por lo que se pensó que algunos de estos HE podrían tener mayor afinidad o sensibilidad hacia el cafeto que otros, o bien, que podrían existir distintas interacciones entre ellos, las cuales podrían explicar estos patrones de frecuencia, como han sugerido algunos estudios realizados con los HE de otras plantas (Hata *et al.*, 2002; Rakotoniriana *et al.*, 2008).

Arnold *et al.* (2003) por ejemplo, encontraron que la frecuencia de aislamiento de algunos HE a partir de las hojas de las plantas hospederas está relacionada positivamente con las capacidades competitivas de los mismos observadas *in vitro*, principalmente cuando se agrega extracto foliar de la hospedera al medio de cultivo donde interaccionan los HE; esto sugiere que los HE que más colonizan las hojas son los que poseen una alta capacidad competitiva y que las interacciones entre estos HE cambian con la química foliar de la planta hospedera.

Por esta razón, en el presente trabajo se evaluó tanto el crecimiento individual como la capacidad competitiva de nueve HE que crecieron en medios de cultivo con y sin extracto de hojas de café, con la hipótesis de que el crecimiento de los hongos y las interacciones entre los mismos se modificarían por el extracto de las hojas, y que la capacidad competitiva de los hongos determinaría, en gran medida, la frecuencia de éstos dentro de las hojas de los cafetos de 'El Mirador'.

Asimismo, se realizaron dos bioensayos de interacción complementarios. En el primero se evaluó la capacidad de un HE para colonizar un sustrato previamente ocupado por otro HE, con la hipótesis de que la capacidad competitiva de los HE podría cambiar en este tipo de interacción; en el segundo, se evaluó el efecto que los metabolitos liberados al medio de cultivo por HE podían ejercer sobre otro hongo, sin involucrar una interacción directa entre ellos, con la hipótesis de que el potencial alelopático, al igual que la capacidad competitiva, podía estar involucrado en la frecuencia de los HE dentro de las hojas de los cafetos de 'El Mirador'.

Además, se evaluó la capacidad de cada HE para colonizar las hojas de *C. arabica*, sin la presencia de otros hongos competidores, pues existía la posibilidad de que las diferentes frecuencias de los HE, observadas en las hojas de los cafetos de 'El Mirador', podría deberse a que cada hongo tarda un tiempo diferente en establecerse como endófito, y a que cada HE ocupa una proporción diferente del tejido vegetal.

Como los HE además de interactuar entre si, lo hacen con otros tipos de hongos como los fitopatógenos, a los cuales pueden llegar a excluir de los tejidos vegetales (Arnold *et al.*, 2003), se propuso explorar el posible papel ecológico de algunos HE foliares, representativos de *C. arabica*, como mutualistas defensivos contra *Hemileia vastatrix*, un hongo fitopatógeno foliar que ocasiona la enfermedad de 'la roya del café' (Kolmer *et al.*, 2009).

Varios estudios han demostrado que *H. vastatrix* puede ser parasitado por otros hongos tanto *in vitro* como *in vivo* (Eskes *et al.*, 1991; Canjura-Saravia *et al.*, 2002; Mahfud *et al.*, 2006), y que algunos de estos hongos se pueden establecer como endófitos (Rolz, *et al.*, 2013); asimismo, se sabe que al menos algunas especies de bacterias endófitas de *C. arabica* como *Bacillus lentimorbus* y *Bacillus cereus*, inhiben la germinación de las urediniosporas de este fitopatógeno (Shiomi *et al.*, 2006), por lo que es probable que los HE más frecuentes en hojas de *C. arabica* y con mayor capacidad competitiva puedan alterar la incidencia y el daño ocasionado por la roya.

Con base en lo anteriormente expuesto y debido a la importancia de las relaciones entre los HE y a su significativa influencia sobre las plantas y sobre otros microorganismos asociados con ellas, se formularon las siguientes:

III. HIPÓTESIS

(1) Debido a que la estimulación del crecimiento ocasionado por la adición del extracto de la planta hospedante al medio de cultivo sugiere afinidad hacia ella en algunas especies de HE foliares, se espera que los de *C. arabica* y en especial, las especies más frecuentemente aisladas, modifiquen positivamente la tasa de su crecimiento en el medio con el extracto de la planta, indicando así un mayor grado de afinidad hacia ella.

(2) Si las interacciones entre miembros de la comunidad de hongos endófitos foliares de *C. arabica* son similares a las observadas en las comunidades de hongos de otros hábitats, entonces, se espera observar interacciones desde mutualistas hasta antagonistas entre las especies seleccionadas, las cuales probablemente se modificarán entre los medios de cultivo con y sin extracto de hojas de café. Además, la capacidad competitiva de los hongos endófitos, estará relacionada directamente con su frecuencia de aislamiento a partir de las hojas de los cafetos de 'El Mirador'.

(3) Debido a que algunos estudios han mostrado que la frecuencia de aislamiento está relacionada a la capacidad de colonizar hojas libres de hongos endófitos, o a su capacidad competitiva, entonces los hongos endófitos seleccionados por su mayor frecuencia en las hojas de *C. arabica* de 'El Mirador', tendrán una mayor capacidad para colonizar a las hojas de esta planta, o bien, una mayor capacidad competitiva.

(4) Como ciertos hongos endófitos liberan metabolitos antifúngicos o compiten contra algunos hongos fitopatógenos a través de la interacción directa en las plantas leñosas, algunos HE de *C. arabica* reducirán la germinación de las urediniosporas y la incidencia del hongo fitopatógeno foliar *Hemileia vastatrix*.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el crecimiento de algunos hongos endófitos foliares representativos de *C. arabica* y determinar los diferentes tipos de interacciones entre ellos en cultivos *in vitro* con y sin extracto de hojas de *C. arabica*, evaluando a la vez, su capacidad de colonización en hojas de plantas de café y el efecto que ejercen en la viabilidad e incidencia del fitopatógeno foliar *Hemileia vastatrix*.

4.1 Objetivos específicos

1. Selección de hongos endófitos dependiendo de su frecuencia de aislamiento a partir de hojas de *C. arabica* provenientes de un cafetal rústico ubicado en Huatusco, Veracruz, aislados y determinados taxonómicamente en un estudio previo.
2. Realización de bioensayos para determinar las características del crecimiento de los hongos endófitos seleccionados, tanto en medio nutritivo adicionado con extracto de hojas de café, como libre de éste extracto.
3. Realización de bioensayos de interacción *in vitro* entre pares de hongos endófitos seleccionados, tanto en medio nutritivo adicionado con extracto de hojas de café, como libre de éste extracto.
4. Realización de bioensayos *in vitro*, de captura secundaria de recursos entre pares de hongos endófitos, para identificar aquellos con capacidad de colonizar el sustrato previamente ocupado por otro hongo, y aquellos con capacidad de impedir la invasión por parte de otro hongo al sustrato ocupado previamente por ellos.
5. Realización de bioensayos de crecimiento de los HE seleccionados, agregando al medio de cultivo el filtrado del medio de cultivo de los demás HE, y observar y medir el potencial alelopático del filtrado de cada hongo sobre los demás, sin considerar el efecto de la interacción directa entre los HE.
6. Realización de bioensayos de colonización de los HE seleccionados sobre hojas no colonizadas, tanto desprendidas como unidas a los cafetos, para determinar la capacidad de colonización de los hongos endófitos.
7. Realización de bioensayos de germinación de urediniosporas de *H. vastatrix* en presencia de los hongos endófitos seleccionados, con el fin de detectar aquellos que reduzcan la viabilidad de las urediniosporas de este hongo causante de la roya.
8. Realización de bioensayos de interacción de cada hongo endófito seleccionado vs *H. vastatrix* en hojas desprendidas de las plantas de café para detectar los endófitos que disminuyan la incidencia de la roya.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Selección de los hongos endófitos y obtención de otros materiales biológicos

Los hongos endófitos (HE) utilizados en el presente estudio, se aislaron previamente de hojas aparentemente sanas (sin síntomas de enfermedad) de cafetos cultivados en el cafetal rústico 'El Mirador', ubicado en Huatusco, Veracruz. Este cafetal se escogió porque presentó la mayor diversidad de HE foliares en un estudio previo en el que además se aislaron y determinaron taxonómicamente los HE de otros cafetales con distintas formas de manejo (Saucedo-García *et al.*, en preparación). Para aislar a los HE en dicho estudio, se seleccionaron 10 cafetos de cada cafetal y de cada uno de ellos se seleccionaron 2 ramas de la parte media orientadas al norte. Posteriormente, de cada rama se seleccionó 1 hoja en la parte media de ésta. Las hojas seleccionadas fueron lavadas y esterilizadas superficialmente con la metodología de Gamboa y Bayman (2001); de cada hoja esterilizada se cortaron 6 segmentos de 2 mm de diámetro bajo condiciones estériles: 2 segmentos del ápice, 2 de la parte media y dos del área de la hoja cercana al peciolo. Cada segmento fue colocado en una caja Petri de 5 cm de diámetro con Agar-Avena + cloranfenicol (50 mg/L). De esta forma se obtuvieron para cada cafetal un total de 20 hojas y se sembraron 120 segmentos. La frecuencia de cada HE obtenida en dicho estudio se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia de aislamiento} = \frac{\text{Número de segmentos con HE}}{\text{Número total de segmentos}}$$

A partir de estos resultados, se seleccionaron tres HE foliares frecuentes, tres HE moderadamente frecuentes y tres HE poco frecuentes en *C. arabica*, los cuales se enlistan en la **Tabla 1**. Con estos aislados de HE se realizó el presente trabajo.

En el estudio de Saucedo-García *et al.* (en preparación), *Colletotrichum gloeosporioides* grupo 1 (Gpo. 1) y *Colletotrichum gloeosporioides* grupo 2 (Gpo. 2), se diferenciaron por el tamaño y forma de sus esporas, en tanto que *Glomerella cingulata*, se determinó a partir de micelio en estado sexual, mientras que su micelio asexual no se encontró en dicho estudio.

Los HE seleccionados para el presente estudio, del mismo género o de la misma especie se clasificaron en grupos, para precisar que pertenecen a organismos distintos y que, sin embargo, aún no se ha completado su clasificación.

Tabla 1. Hongos endófitos seleccionados por su frecuencia de aislamiento a partir de hojas sanas de *C. arabica*

Nombre	Frecuencia
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. 1884, grupo 1	0.21 (alta)
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk, in Schrenk & Spaulding (1903).	0.15 (alta)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. 1884, grupo 2	0.13 (alta)
<i>Xylaria</i> grupo 2	0.08 (moderada)
<i>Xylaria</i> grupo 1	0.06 (moderada)
<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	0.04 (moderada)
<i>Cryptosporiopsis corticola</i> (Edgerton) Nannf. 1932.	0.03 (baja)
<i>Paecilomyces</i> sp.	0.03 (baja)
<i>Xylaria</i> grupo 3	0.01 (baja)

Con objeto de coleccionar frutos de café (cerezas), hojas sanas (sin síntomas de enfermedad) y hojas con síntomas de roya, se realizaron posteriormente diversas visitas al cafetal ‘El Mirador’. Se escogieron dos zonas del cafetal para hacer la colecta, una denominada ‘Las Araucarias’, donde domina la variedad *Typica* de *Coffea arabica*, y la otra, ‘Los Pinos’, donde domina la variedad *Bourbon*. Las hojas sanas se coleccionaron de cafetos elegidos al azar en ambas zonas, en cambio, los frutos maduros y las hojas enfermas se coleccionaron de los pocos individuos que las presentaban. Las hojas sanas y las cerezas se desprendieron de las ramas plagiotrópicas de la parte media de los cafetos, y las hojas enfermas de las diferentes partes de las plantas. Todo el material vegetal se guardó en bolsas de papel que se colocaron dentro de bolsas de polietileno. Solamente las hojas, tanto sanas como enfermas (con síntomas de roya), se conservaron en una hielera portátil hasta su procesamiento.

5.2 Bioensayo de crecimiento de los hongos endófitos

En un bioensayo preliminar, se evaluó el crecimiento de siete HE (tres frecuentes, y 3 moderadamente frecuentes y 1 poco frecuente) en cuatro medios de cultivo bajo condiciones estériles: (1) papa-dextrosa-agar (PDA = 200 g de papa natural

+ 20 g de dextrosa J.T.Baker® + 15 g de agar Bioxon® + 1000 mL de agua destilada, Ulloa y Hanlin, 1978); (2) PDA + extracto de hojas de café al 2% (PDA+EC); (3) agar - agua destilada estéril (15 g/L) + EC (ADE+EC); y (4) avena-agar + EC (AA+EC, AA = 20 g de avena Quaker® + 30 g de agar + 1000 mL de agua destilada, Ulloa y Hanlin, 1978) (**ANEXO I**). Para elaborar el extracto de hojas de café agregado a los medios 2, 3 y 4, se utilizaron las hojas sanas de *C. arabica* colectadas en 'El Mirador', las cuales se molieron en una licuadora durante 4 minutos, con agua destilada estéril (ADE) a una concentración del 10% (peso/volumen). El licuado se filtró sobre 12 capas de gasa y la suspensión resultante se agregó a los cuatro medios de cultivo mencionados, en una relación 2/8 (volumen de la suspensión de hojas/volumen del medio de cultivo) (Arnold y Herre, 2003), y se mezcló con un agitador magnético. Utilizando un potenciómetro (pH 210 Microprocessor pH Meter, HANNA Instruments), se ajustó el pH de los medios de cultivo al valor registrado para estos medios sin extracto de hojas de café (pH= 6.18-6.20), añadiendo KOH. Los medios ajustados se esterilizaron en la autoclave por 25 min., y se vaciaron en cajas Petri. A partir de este primer bioensayo se seleccionó el medio de cultivo PDA+EC para realizar otro bioensayo de crecimiento, porque estimuló el crecimiento de los HE (**ANEXO I**), y como testigo (control) se utilizó solamente PDA.

El bioensayo de crecimiento de los HE se realizó con dos finalidades: (1) analizar el crecimiento de cada HE con y sin la presencia del extracto de hojas de café y (2) establecer el orden de inoculación, según la tasa de crecimiento, para los bioensayos de interacción entre los HE. En este segundo bioensayo, se evaluó el crecimiento de los nueve HE seleccionados, ya que se añadieron dos HE con baja frecuencia de aislamiento (*Xylaria* Gpo. 3 y *Paecilomyces* sp.) con el fin de representar la diversidad de frecuencias de la comunidad de HE. Se utilizó el medio de cultivo con el que se obtuvieron los mayores crecimientos miceliares en el bioensayo preliminar: PDA+EC y su contraparte sin extracto de hojas de café, PDA. En este bioensayo, se colocó un inóculo de 4 mm de diámetro de cada HE, proveniente del borde del micelio del correspondiente cultivo en PDA de 8 días de edad, en el centro de cada caja Petri. Las cajas se sellaron con una película de polietileno y se mantuvieron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Las observaciones se realizaron diariamente, marcándose cada vez, el perímetro del micelio del HE en la parte posterior de la caja con un plumón indeleble. Después de 15

días, se escanearon las partes posteriores de las cajas Petri, y cada área de crecimiento marcada se midió con el programa ImageJ (Rasband, 1997-2008). Las curvas de crecimiento obtenidas al graficar el crecimiento de los HE contra el tiempo de medición, se ajustaron utilizando el programa DMFit (©2013 del consorcio ComBase, <http://modelling.combase.cc/DMFit.aspx>) que emplea el modelo primario de Baranyi y Roberts (1994) para determinar los siguientes parámetros de la cinética del crecimiento bacteriano: valor inicial, tiempo de latencia, tasa máxima específica de crecimiento y valor final del crecimiento. El modelo de Baranyi y Roberts (1994) se emplea también para evaluar el crecimiento de hongos (Valík *et al.*, 1999; Meletiadis *et al.*, 2001; Carrillo *et al.*, 2007; Astoreca *et al.*, 2012), utilizando los radios y diámetros de las colonias en crecimiento (Gibson y Hocking, 1997). En el presente trabajo se utilizaron las áreas de crecimiento de los HE y se aplicó el modelo que omite la asíntota superior porque algunos HE no alcanzaron a cubrir el medio de cultivo en las cajas Petri (Marín *et al.*, 2008). Los parámetros de crecimiento analizados fueron dos: (1) el tiempo de latencia (*TL*) y (2) la tasa máxima específica de crecimiento aquí nombrada ‘tasa de crecimiento’ (*TC*), mismos que el programa produjo (**ANEXO II**).

Los parámetros de crecimiento de todos los HE, de acuerdo al medio de cultivo, se analizaron con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) ($\alpha=0.05$), y las medias de los mismos, se compararon con una prueba de Tukey HSD, para determinar si existían diferencias significativas entre el crecimiento de los nueve HE. Los datos de los parámetros que no cumplieron con los supuestos del ANOVA, fueron transformados antes de realizar dicha prueba: los datos de *TL* en PDA y los de *TC* en PDA+EC se dividieron entre la unidad ($x/1$) y los *TL* en PDA+EC se elevaron al cuadrado (x^2). Asimismo, se compararon los parámetros de crecimiento que cada HE tuvo en PDA+EC, con su respectivo testigo (PDA) por medio de una prueba t de Student para datos independientes. Aquí es necesario mencionar que aunque la prueba t de Student se utiliza para comparar dos muestras pequeñas, el número de réplicas utilizadas fue de 3 cajas Petri; sin embargo, fue necesario utilizar dicha prueba, debido a que no fue posible realizar un ANOVA combinando crecimientos en PDA y PDA+EC ya que no se cumplieron los supuestos de normalidad, y a que la prueba de Kruskal-Wallis no mostraba diferencias significativas cuando un mismo HE creció en PDA y en PDA+EC.

Con los parámetros de crecimiento obtenidos con ambos medios de cultivo se obtuvo el grado de sensibilidad y posible afinidad de cada HE hacia el extracto de hojas de café, expresado en porcentaje:

$$P_{\text{sensibilidad}} = \left(\frac{(\text{Parámetro de crecimiento en PDA} + \text{EC}) - \text{Parámetro de crecimiento en PDA}}{\text{Parámetro de crecimiento en PDA}} \right) \times 100$$

Finalmente, se realizó un análisis de correlación de Spearman para determinar si existía una relación entre la frecuencia de aislamiento y el promedio del grado de sensibilidad y posible afinidad de los HE; y entre la frecuencia de aislamiento, y el promedio de los parámetros de crecimiento de los HE en PDA y PDA+EC. En todas las pruebas estadísticas se utilizó el software STATISTICA versión 10.

5.3 Bioensayos de interacción *in vitro* entre los hongos endófitos

5.3.1 Interacción entre los hongos endófitos por captura primaria de recursos

En los bioensayos *in vitro*, se hicieron cultivos pareados en los que cada HE fue inoculado frente a cada uno de los demás, en cajas Petri con PDA o con PDA+EC. En todos los casos, los inóculos sembrados se tomaron del borde de los micelios de cada HE, de 8 días de edad, de los respectivos medios de cultivo. Las interacciones resultantes se examinaron micro y macroscópicamente para ser caracterizadas de acuerdo a los atributos morfológicos de los HE. En la revisión macroscópica se consideraron también algunas características cuantitativas del crecimiento del micelio.

5.3.1.1 Evaluación microscópica de las interacciones

Para observar a detalle las interacciones entre las hifas y los micelios de los HE confrontados, se utilizaron dos técnicas de microcultivo en cajas Petri bajo condiciones estériles. En la primera, se cortaron dos segmentos de PDA o PDA+EC de aproximadamente 1.5 x 1.5 x 2-3 cm (largo/ancho/espesor), y se colocaron sobre un mismo portaobjetos con una separación de 2 cm. En la segunda técnica, se sumergió un portaobjetos en el medio de cultivo para obtener una capa delgada del medio de cultivo correspondiente sobre éste (Stahl y Christensen, 1992).

Cada portaobjetos, ya sea con los dos segmentos o con la capa de medio de cultivo, se colocó sobre un triángulo de vidrio dentro de una caja Petri con papel filtro humedecido con 5 mL de agua destilada estéril (ADE) (**Fig. 4**). Tanto cada segmento como cada capa de medio de cultivo de los portaobjetos, se inoculó con fragmentos de micelio de dos HE diferentes, en extremos opuestos, completando todas las combinaciones entre pares de HE. A uno de los dos segmentos de agar colocados en los portaobjetos, se le colocó un cubreobjetos, con el fin de promover en este último segmento, el desarrollo de micelio sumergido por parte de los HE y evitar el desarrollo de micelio aéreo, mientras que el otro segmento permaneció descubierto.

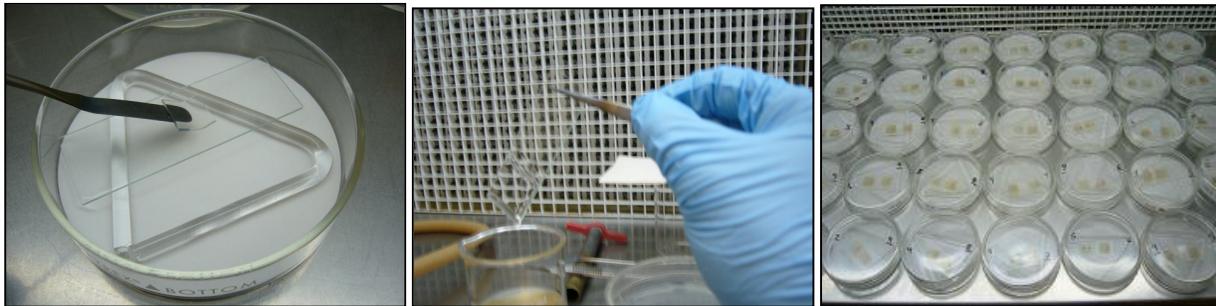


Fig. 4. Técnicas de microcultivo por segmentos o por inmersión en el medio de cultivo.

Los microcultivos se revisaron diariamente y en el momento en que se observó una interacción entre los dos HE, se extrajo el portaobjetos para ser observado en el microscopio (Zeiss, Modelo Axioskop 40). El cubreobjetos de cada portaobjetos se separó para agregar una gota de agua, o de azul de algodón al 0.5%. Se registraron y fotografiaron (programa AxioVision Rel. 4.6) las diferentes respuestas de las hifas de los HE durante la interacción, o bien, de los micelos cuando las hifas estaban demasiado aglomeradas; las respuestas se dividieron en 5 categorías cualitativas: (1) ofensivas, (2) defensivas (3) indeterminadas, (4) de inhibición y (5) de evasión, con base en las respuestas de las hifas y los micelios reportadas en diversos estudios de interacción (Dennis y Webster, 1971; Boddy, 2000; Infante *et al.*, 2009; Leong *et al.*, 2011); aquellas interacciones que producían respuestas no reportadas en la literatura científica, se incluyeron en la categoría de indeterminadas, y las interacciones en las que las hifas de ambos hongos cambiaban de dirección antes de hacer contacto, sin mostrar una respuesta negativa aparente, se colocaron en la categoría de evasión.

5.3.1.2 Evaluación macroscópica de las interacciones

Este bioensayo de interacción entre pares de HE, se realizó en cajas Petri tanto con PDA como con PDA+EC, utilizando inóculos de 4 mm de diámetro de dos HE distintos, que provenían del borde de los micelios de cultivos de 8 días de edad, en los correspondientes medios. Los inóculos se colocaron en los extremos opuestos de una caja Petri (Stahl y Christensen, 1992). Simultáneamente, se cultivó a los HE de forma individual como crecimiento testigo, de dos maneras distintas: (1) colocando un inóculo en el centro de una caja Petri (testigo central) y (2) colocando un inóculo en uno de los extremos de otra caja Petri (testigo lateral), este último, con el fin de colocar el inóculo en la misma disposición espacial que su contraparte en interacción. Se utilizaron estos dos testigos porque ambos han sido utilizados en estudios de interacción entre hongos (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Schubert y Schwarze, 2011). Cada HE se inoculó a diferentes tiempos de acuerdo a su tasa de crecimiento (TC) para que las colonias de ambos HE tuvieran un área similar cuando hicieran contacto y evitar que aquellos con crecimiento más rápido, explotaran los recursos del sustrato anticipadamente (Mejía *et al.*, 2008). Para esto, además de la TC , se estimó el día en el que los dos HE sembrados tendrían contacto entre ellos (Ver **ANEXO III**), utilizando las curvas de crecimiento obtenidas en los bioensayos de crecimiento (ver **Sección 5.2**). Los cultivos se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en la oscuridad, y se registró el crecimiento diario durante 11 días a partir de la siembra del primer HE (el más lento). Todas las pruebas incluyeron 3 repeticiones.

En este bioensayo de interacción por pares, se determinaron tres parámetros de crecimiento para cada HE: (1) el 'área inicial', definida como el área de la colonia del micelio un día antes de hacer contacto con la de alguno de los otros HE (A_i), (2) el área del micelio al final del periodo de medición (A_f) y (3) la tasa de crecimiento en el cultivo de interacción (TC_i). Al igual que en el bioensayo de crecimiento, las TC_i se obtuvieron con el modelo de Baranyi y Roberts (1994) que omite la asíntota, utilizando el programa DMFit (© 2013) (**ANEXO II**). Por otra parte, como el momento del contacto varió entre los HE dependiendo de su TC_i , el A_i tomada para cada HE correspondió a días distintos (edades distintas de los hongos). Asimismo, el momento del contacto varió para cada

HE dependiendo de cuales eran los que estaban interaccionando, por lo que se tomó el A_i de cada HE, el día en que cada uno estuviera a punto de hacer contacto con el primero de los demás HE con los que interaccionó. Los valores de las A_i , de las A_f y de las TC_i de los HE en interacción, se compararon con los de los testigos centrales y laterales correspondientes con un ANOVA de una vía ($\alpha=0.05$); y para identificar las diferencias de las medias de los parámetros de crecimiento entre pares de HE, se utilizó una prueba de Tukey HSD. Finalmente, con el fin de ordenar jerárquicamente a los endófitos por su capacidad competitiva, se obtuvieron los porcentajes de inhibición (PI) de los parámetros de crecimiento (A_i , A_f y TC_i) por medio de la siguiente fórmula:

$$PI = \left(\frac{x \text{ testigo} - x \text{ en interacción}}{x \text{ testigo}} \right) \times 100$$

en donde x corresponde a las A_i , a las A_f ó a las TC_i (modificado de Fokkema, 1973). El PI se obtuvo con cada tipo de testigo (central y lateral). Con el promedio de los PI que cada HE experimentó al crecer con los demás, se obtuvo su respuesta competitiva, mientras que con el promedio de los PI que presentaron los otros ocho HE al ser enfrentados a un mismo HE, se obtuvo el efecto competitivo de este último.

La respuesta competitiva indica el grado de inhibición (o estimulación en su caso) que cada HE experimenta frente a todos los otros hongos evaluados, y por ello, refleja el grado de resistencia (o susceptibilidad) de cada HE a la inhibición ejercida por los demás; mientras mayor sea el porcentaje de inhibición (PI) del HE, menor será su respuesta competitiva o su capacidad de resistir la inhibición. Por otra parte, el efecto competitivo indica la influencia que cada HE tiene sobre los demás, es decir, la capacidad que cada HE tiene para inhibir (o estimular) a los demás, por lo tanto, mientras mayor sea el PI que ocasiona un HE a los demás, mayor será su efecto competitivo.

Los datos se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de los efectos o de las respuestas competitivas entre los HE; asimismo, se evaluó la relación entre las respuestas y los efectos competitivos de los HE con un análisis de correlación de Spearman.

Para incluir las características cualitativas de cada interacción, se determinó el índice de dominancia (I_D), en el que se incluyeron aspectos morfológicos observados en las interacciones, cuando éstas, aparentemente, ya no cambiaban en el tiempo (Magan y Lacey, 1984). Siguiendo el método de Leong *et al.* (2011), se asignó una puntuación de 3:3 a la interacción entre pares de HE que se detuvieron al hacer contacto entre ellos, como un valor inicial para establecer el sistema de clasificación. A este valor inicial se sumaron o restaron puntos, considerando el grado de dominancia de los HE durante la interacción (**ANEXO IV**). La sumatoria de los puntos obtenidos por cada HE al crecer frente a los demás constituyó su índice de dominancia (I_D). Los I_D de los HE se compararon con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$) para determinar si había diferencias significativas entre los HE. De este modo, se evaluaron aspectos cualitativos y cuantitativos de las interacciones entre los HE.

Finalmente se realizó un análisis de correlación de Spearman para determinar si existía una relación entre la frecuencia de aislamiento de los HE y la respuesta competitiva o el efecto competitivo de los mismos obtenidos con los parámetros de crecimiento (A_i , A_f , y TC_i), o con los Índices de dominancia (I_D).

5.4 Bioensayos de interacción complementarios entre los hongos endófitos

Aunque las observaciones macroscópicas y microscópicas permitieron la calificación y, en su caso, cuantificación de las interacciones fúngicas, se realizaron dos bioensayos complementarios. En el primero se evaluó la capacidad de cada HE para colonizar un sustrato ocupado previamente por otro HE; y en el segundo, se hizo crecer a cada HE en PDA al que se le agregó un filtrado obtenido del caldo de cultivo (libre de propágulos infecciosos) de cada uno de los otros HE. A continuación se describen estos bioensayos complementarios.

5.4.1 Interacción entre los hongos endófitos por captura secundaria de recursos y evaluación de la capacidad de reemplazo de cada uno

En el bioensayo de interacción entre los HE por captura primaria de recursos, se equilibraron las tasas de crecimiento de los HE, sembrando los hongos rápidos después de los lentos. Una tasa de crecimiento rápida, representa la principal estrategia

competitiva de algunos hongos que la poseen (Leong *et al.*, 2011), y por ello, se evaluó la habilidad de cada HE para colonizar un sustrato previamente ocupado por cada uno de los otros HE, por medio de un bioensayo de captura secundaria de recursos (Klepzig y Wilkens, 1997).

Se colocaron inóculos de 2 mm de cada HE, provenientes de cultivos en PDA, de 8 días de edad, en el centro de una caja Petri de 5 cm con 8 mL de PDA, y se esperó a que cubrieran totalmente la superficie del medio de cultivo. A estos HE sembrados primero, se les denominó Colonizador 1 (C1). Posteriormente, se colocó un inóculo de otro HE sobre el micelio del C1, en un extremo de la caja Petri que ya estaba cubierta en su totalidad por éste último. A estos HE colocados después se les denominó Colonizador 2 (C2). Se completaron todas las combinaciones necesarias de los HE entre pares de hongos C1 y C2 por triplicado. Las cajas Petri se sellaron con polietileno y se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en la oscuridad. Después de inoculado el C2, se dejó pasar un tiempo que varió para cada HE C2 dependiendo de su *TC* (ver **ANEXO V**), y después, se midió el área abarcada por los micelios (C2) con el programa ImageJ (Rasband, 1997-2008). Las áreas de todos los HE C2 al principio (correspondiente al tamaño del inóculo) y al final del bioensayo fueron comparadas con un ANOVA de una vía ($\alpha=0.05$) y una prueba de Tukey HSD, omitiendo a los C2 que no habían crecido.

Para obtener el efecto competitivo y la respuesta competitiva de cada HE en este bioensayo de captura secundaria de recursos, se obtuvo primero el porcentaje de inhibición de cada uno (*PI*), comparando el crecimiento que cada HE tuvo al crecer sobre los demás (es decir como C2), con respecto del área total de la caja Petri ($\text{áreaTOTAL} = 19.64 \text{ cm}^2$), pues en todos los casos, se dejó crecer a cada HE C2 durante el tiempo en que otro inóculo de esta misma cepa de hongo, pero como C1, había cubierto completamente la superficie del medio de cultivo (**ANEXO V**). La fórmula del *PI* fue la siguiente:

$$PI = \left(\frac{(\text{áreaTOTAL} - \text{áreaC2})}{\text{áreaTOTAL}} \right) \times 100$$

La respuesta competitiva de un HE como C2, se obtuvo al promediar los *PI* que éste mostró al crecer sobre el área de la caja Petri ya ocupada por cada uno de los

demás HE, mientras que con el promedio de los *PI* que todos los HE presentaron al ser sembrados sobre ese mismo HE, se obtuvo el efecto competitivo de este último como C1 (Ver **ANEXO VI**). Los datos se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de los efectos o de las respuestas competitivas entre los HE. Con un análisis de correlación de Spearman se determinó si existía una relación lineal entre las respuestas y los efectos competitivos de los HE, así como entre la frecuencia de aislamiento de los HE y la respuesta competitiva o el efecto competitivo de los mismos.

Al final del periodo de observación, se evaluó si los HE C1 que habían sido invadidos por los C2, eran reemplazados por éstos últimos. Para esto, se tomaron las cajas Petri en las que se presentó este tipo de interacción (captura secundaria), y se cortaron segmentos del medio de cultivo donde el micelio de un HE cubría al del otro, por lo que cada segmento extraído contenía tanto al HE invasor como al invadido. Cuatro de estos segmentos se colocaron, por separado, en el centro de 4 cajas Petri de 5 cm con 8 mL de PDA. De estos cuatro segmentos, dos se colocaron con los micelios hacia abajo y dos con los micelios hacia arriba, con el fin de evaluar la posible ventaja que C1 o C2 tendrían al ser, uno u otro, el que hiciera contacto con el nuevo medio de cultivo antes que el copartícipe. Después de 5 días se observó cual era el HE que crecía en las cajas Petri. Se consideró que un HE como C1 era desplazado y reemplazado, solo cuando el HE C2 (invasor) era el que crecía en la caja Petri; mientras que el crecimiento de ambos HE fue calificado como reemplazo parcial si el hongo C1 (invadido) crecía poco; y fue calificado como entremezclado si crecía de forma habitual, pero junto con el HE C2 (invasor). El crecimiento del hongo C1 sin presencia del invasor, no se consideró como reemplazo.

5.4.2 Bioensayos del potencial alelopático de cada uno de los hongos endófitos sobre el crecimiento de los demás

En matraces Erlenmeyer de 500 mL con 220 mL de caldo de papa-dextrosa (PD) se agregaron, por separado, inóculos de agar de 4 mm de cada uno de los nueve HE provenientes de cultivos en PDA de 8 días de edad. Estos cultivos acuosos inoculados con cada HE, se mantuvieron en agitación (100 rpm, Lab-line Instrument modelo 3527)

por 10 días, y a partir de ellos se obtuvieron filtrados libres de propágulos, haciendo pasar el cultivo acuoso a través de una serie de filtros Whatman (No. 4, 1 y 42), y en su caso, membranas Millipore de abertura de poro cada vez más reducida, sobre embudos Buchner o Millipore (**ANEXO VII**). La pureza de los filtrados se corroboró con cultivos directos de los mismos en cajas Petri con PDA conforme se avanzaba entre filtros.

Cada HE se hizo crecer, de forma individual, en PDA adicionado con los filtrados de cada uno de los demás HE, dentro de cajas Petri de vidrio de 5 cm por triplicado, adaptando la metodología de Singh *et al.* (2008). Se manejaron dos concentraciones del filtrado en PDA, 25 y 50%, para lo cual alícuotas de 2 y 4 mL de los correspondientes filtrados se incorporaron a 6 y 4 mL de PDA respectivamente, haciendo un total de 8 mL de medio de cultivo adicionado con el filtrado de cada HE en ambas concentraciones. Alícuotas de 8 mL de PDA sin filtrado se agregaron a los testigos de cada HE.

Todas las cajas Petri se inocularon con segmentos de agar de 2 mm de cada uno de los HE, provenientes de cultivos en PDA de 8 días de edad, se sellaron con polietileno y se mantuvieron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad en una cámara de crecimiento (Thermo Electron Corporation). Después de 4 días se midió el área de la colonia de cada HE. Los valores obtenidos se analizaron con un ANOVA de dos factores ($\alpha = 0.05$): HE y concentración de filtrado (25 y 50%), y se aplicó una prueba de Tukey HSD para comparar las medias de las áreas de crecimiento entre los HE que crecieron en PDA con filtrado y aquellos que crecieron en PDA sin filtrado.

Con el promedio de los porcentajes de inhibición (PI) de un mismo HE que creció en PDA + el filtrado de cada uno de los demás, se obtuvo la sensibilidad o respuesta de ese HE hacia el efecto alelopático de los filtrados de todos los demás HE, mientras que el promedio de los PI que los demás HE tuvieron al crecer en el filtrado de un mismo HE correspondió al efecto alelopático de este último (**ANEXO VI**). Los datos se compararon con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para observar si había diferencias significativas entre las respuestas a los alelopáticos contenidos en los filtrados de los HE o entre los efectos alelopáticos de los filtrados de los HE. Con un análisis de correlación de Spearman se evaluó la relación entre las respuestas a los

filtrados y los efectos alelopáticos de los mismos sobre los HE, y entre la frecuencia de aislamiento de los HE y la respuesta a los filtrados o al efecto alelopático de los mismos.

5.5 Bioensayos de inoculación de hongos endófitos *in vivo*

Con el objetivo de evaluar la capacidad de colonización de cada HE por separado, se realizaron bioensayos de inoculación tanto en hojas desprendidas como en hojas unidas a las plantas de café libres de hongos endófitos. Como algunos HE utilizados no desarrollaron esporas bajo las condiciones de cultivo, se prepararon inóculos a base de micelio fragmentado para todos los HE; para aquellos HE que sí produjeron esporas, se elaboraron, además, inóculos a base de éstas.

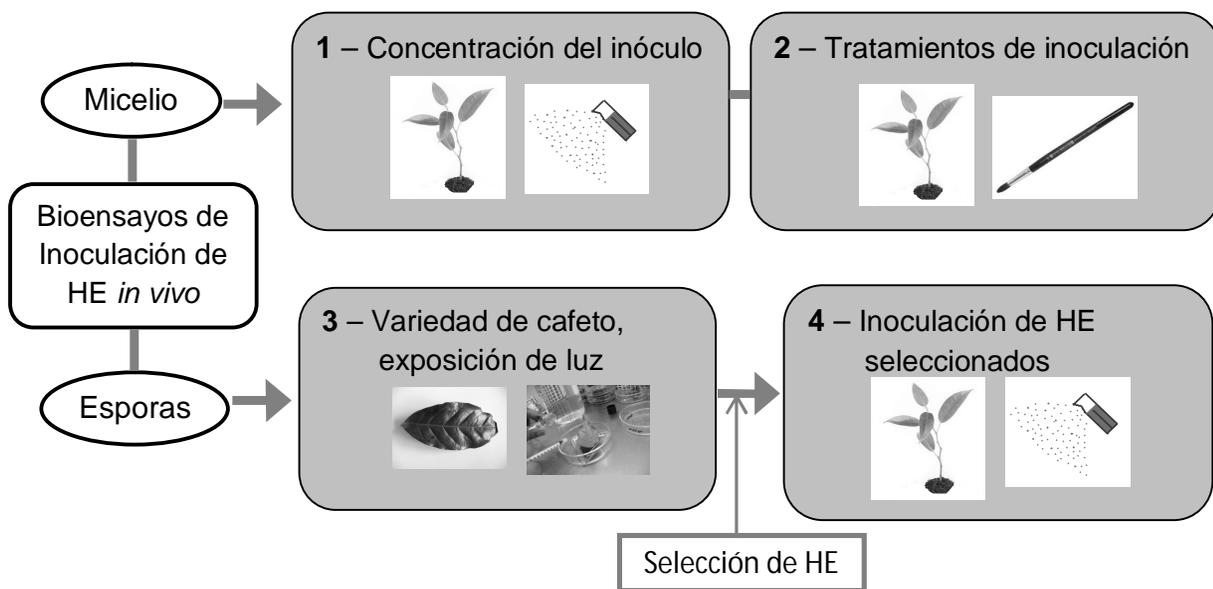


Fig. 5. Esquema de los bioensayos de inoculación *in vivo*. El esquema muestra los bioensayos que fueron realizados con inóculo a partir de micelio o a partir de esporas. Las figuras dentro de cada cuadro, indican si se utilizaron hojas desprendidas o plantas completas, y la forma en que se realizó la inoculación de los HE (con aspersor, con pincel o con aguja de insulina). En el bioensayo 1 se utilizaron dos concentraciones distintas de micelio; en el bioensayo 2 se evaluaron 4 tratamientos de inoculación; en el bioensayo 3 se inocularon esporas en hojas desprendidas de dos variedades de cafeto (Typica y Bourbon) expuestas o no a la luz; y en el bioensayo 4 se inocularon plantas completas con esporas de dos HE que mostraron la mayor capacidad de colonización en los bioensayos anteriores.

En cada bioensayo se preparó un inóculo nuevo y se revisó su viabilidad asperjándolo en cajas Petri con PDA. De los diferentes bioensayos realizados, solo en

cuatro, los hongos inoculados se establecieron como endófitos con una mayor proporción (**Fig. 5**). Antes de realizar los bioensayos de inoculación se obtuvieron plantas de café libres de hongos endófitos. A continuación se describen los procedimientos realizados y los bioensayos de inoculación.

5.5.1 Obtención de plantas libres de hongos endófitos

5.5.1.1 Desinfección de las semillas y condiciones de crecimiento

Las cerezas colectadas en el cafetal 'El Mirador', se pusieron a fermentar en agua por 42 h a temperatura ambiente para retirar con facilidad la pulpa de las semillas. Las semillas se esterilizaron superficialmente, incluyendo la testa, sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 1% (2 min, CLOROX® 20%), etanol al 75% (2 min) y 4 veces en agua destilada estéril (ADE) (modificado de Posada y Vega, 2006); las semillas se secaron con toallas de papel estéril y se sembraron en los semilleros sobre un sustrato compuesto por: musgo *Sphagnum* (peatmoss PREMIER®) (30%), perlita (AGROLITA®) (50%) y arena de río (20%); este sustrato fue previamente mezclado, esterilizado en autoclave (2 h a 120°C y repitiendo este tratamiento por dos días consecutivos) y humedecido con ADE hasta su capacidad de campo. Los semilleros se colocaron en una cámara de crecimiento (Conviro® Modelo-E15) a 28°C en la oscuridad para promover la germinación (Valio, 1980; da Silva *et al.*, 2004) en donde permanecieron durante 15 días; posteriormente, la temperatura se ajustó a 23 ± 2°C y el fotoperiodo a 12/12 h (luz/oscuridad). Durante el periodo de germinación, el sustrato se regó con ADE hasta su capacidad de campo cada tercer día. Las semillas que no germinaron en un periodo de 30 días posterior a la siembra fueron desechadas.

Las plántulas que emergieron se transplantaron a vasos de polietileno de 500 mL (perforados de la base y desinfectados con una solución al 10% de cloro comercial en agua), sobre un sustrato consistente en una mezcla de *Sphagnum* y perlita (1:2) esterilizada en autoclave y humedecida con ADE; al sustrato se le añadió fertilizante (5 g por vaso) de liberación lenta (Osmocote® 15-9-12) (modificado de Bae *et al.*, 2007). Las plantas transplantadas permanecieron en cámaras de crecimiento durante 30 días a 23 ± 2°C y el fotoperiodo a 14/10 h (luz/oscuridad), y después se trasladaron al

invernadero en donde se colocaron dentro de jaulas de malla antiáfidos, cubiertas con vinilo y malla sombra (40-50% de sombra), hasta su utilización experimental. En el invernadero, los vasos se regaron hasta su capacidad de campo una o dos veces por semana y se fertilizaron (5 g por vaso) cada tres meses con (Osmocote® 15-9-12). Cuando las plantas tuvieron 5 o 6 pares de hojas se transplantaron a macetas de polietileno de 3 L, con musgo y perlita (1:2) esterilizada en autoclave y humedecida con ADE. A partir de entonces cada maceta fue fertilizada con 10 g de Osmocote® (15-9-12) cada tres meses y regada hasta su capacidad de campo una vez por semana. La capacidad de campo de las macetas y los otros recipientes se determinó por diferencia de volumen, de la siguiente manera: una muestra de cinco plantas fue regada hasta la saturación, con una cantidad conocida de ADE, cubriendo las perforaciones de la base, y después de 5 min, se destaparon las perforaciones para dejar salir el exceso de agua; éste se midió y se restó a la cantidad de ADE inicial, obteniéndose así la capacidad de campo de los recipientes.

5.5.1.2 Monitoreo de plantas de café libres de hongos endófitos

La presencia/ausencia de HE en las plantas creciendo en el invernadero, se revisó con la técnica de cultivo de segmentos de hoja esterilizados superficialmente. Se escogieron al azar 5 plantas de café y de cada una de ellas, se desprendieron 3 hojas correspondientes a las partes superior, media e inferior de la planta. De las 15 hojas desprendidas se obtuvieron de 6 a 38 segmentos (dependiendo del tamaño de la hoja) de 5 mm de diámetro, los cuales fueron enumerados como se muestra en la **Fig. 6**.

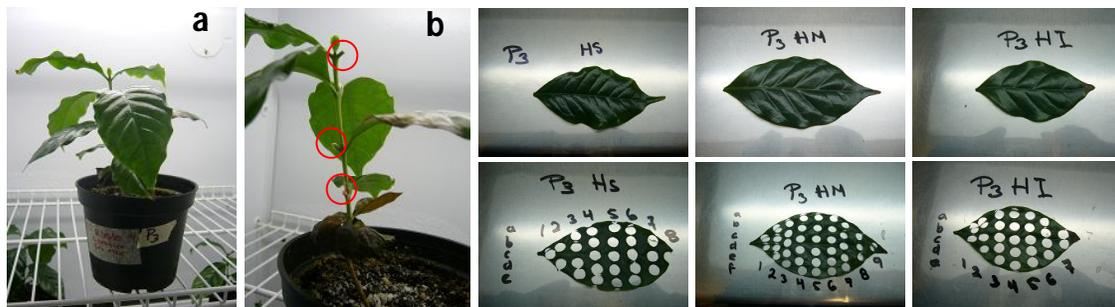


Fig. 6. Revisión de la colonización de los hongos endófitos. Obtención de las hojas de las plantas (a y b), y ordenamiento de sus segmentos: hoja superior (HS), hoja media (HM) y hoja inferior (HI) de la planta 3 (P₃).

Los segmentos obtenidos de las hojas de las plantas, se esterilizaron superficialmente sumergiéndolos en etanol (70%), hipoclorito de sodio (2.6%, CLOROX® 50%), etanol (70%) y ADE (Santamaría y Bayman, 2005). Los segmentos se colocaron, de dos en dos, en cajas Petri de 5 cm con PDA bajo condiciones estériles. La esterilización superficial de la hoja se evaluó mediante la impresión de cada segmento en la orilla del medio de cultivo (Schulz *et al.*, 1999). Las cajas Petri se revisaron regularmente para detectar el desarrollo de los HE y de posibles epífitos.

5.5.2 Elaboración de inóculo a base de micelio

Los 9 HE fueron propagados por separado en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de caldo de PD inoculado con segmentos de agar que contenían el micelio del HE respectivo, provenientes de cultivos en PDA de 8 días de edad. Estos cultivos permanecieron en agitación (100 rpm) a temperatura ambiente. Después de 10 días, se extrajo el micelio que se desarrolló en los cultivos, el cual se filtró y se maceró para elaborar dos suspensiones: (1) suspensión ligera con 0.5 mg de micelio/mL (Ganley *et al.*, 2008), y (2) suspensión concentrada con 2.5 mg de micelio/mL.

5.5.2.1 Bioensayo 1. Inoculación de plantas con dos concentraciones de micelio fragmentado

En este bioensayo se inocularon dos plantas de café de 1 año y dos meses de edad y con 6 a 7 pares de hojas, libres de endófitos, de la var. *Typica*, con cada uno de los HE evaluados y con cada suspensión de micelio (ligera y concentrada), dando un total de 36 plantas. Antes de la inoculación, las plantas se limpiaron con ADE y algodón estéril, y se asperjaron, tanto por el haz como por el envés, con aproximadamente 1.5 mL de las respectivas suspensiones por hoja, utilizando un aspersor de vidrio con un compresor. La superficie del sustrato de la maceta se cubrió con papel aluminio durante la aspersión para evitar escurrimientos. Las plantas inoculadas se cubrieron con bolsas de polietileno y permanecieron en la oscuridad por 42 h. Posteriormente, se mantuvieron en un invernadero, retirando en el octavo día las bolsas de polietileno que cubrían a las plantas. Las plantas fueron regadas cada 4 días. Este procedimiento se realizó en todos los bioensayos que se llevaron a cabo con plantas de café.

La colonización de las hojas por los HE fue revisada a diferentes tiempos después de la inoculación (Ver **sección 5.2.3**), para ello, una de las dos plantas inoculadas con las respectivas suspensiones de cada HE, fue revisada a los 18 y a los 20 días, desprendiendo 3 hojas (superior, media e inferior) de ésta planta, para la revisión de cada periodo (modificado de Arnold *et al.*, 2003); mientras que la otra planta, se revisó a los 60 y a los 90 días después de la inoculación. De cada una de las tres hojas, se obtuvieron y esterilizaron superficialmente 20 segmentos, dando un total de 60 segmentos de hoja por periodo (Ver **sección 5.2.3**), y de 240 segmentos por HE y por suspensión durante todo el experimento. La capacidad de colonización de cada HE se expresó como porcentaje de colonización de segmentos por planta (PC_{planta}), utilizando la fórmula:

$$PC_{planta} = \left(\frac{\text{Número de segmentos con HE de una planta}}{\text{Número total de segmentos de la planta}} \right) \times 100$$

5.5.2.2 Bioensayo 2. Tratamientos de inoculación con micelio en plantas de café

En este bioensayo, se seleccionaron 9 plantas de café libres de endófitos de la var. *Typica*, de 1 año y 4 meses de edad, con 7 a 8 pares de hojas. Cada planta se consideró como una unidad experimental cuyas hojas conformaron las subunidades en las que se observó y evaluó la colonización de cada uno de los 9 HE. En una misma planta se aplicaron 4 diferentes tratamientos o procedimientos de inoculación de un mismo HE, seleccionando al azar 3 hojas de cada planta por cada tratamiento, por lo que se utilizó únicamente una planta por HE. Los tratamientos de inoculación fueron los siguientes: (1) suspensión concentrada de micelio fresco (SC - 2.5 mg/mL) aplicada a hojas intactas, (2) SC + 1% de tween 20 sobre hojas intactas, (3) SC + agar al 0.7% sobre hojas intactas y (4) SC sobre hojas perforadas con una aguja estéril. En el tratamiento 2, se utilizó el surfactante tween 20 para humectar y dispersar el micelio, ya que mejora la separación de los fragmentos de micelio impidiendo su aglomeración.

Después de limpiar las hojas con ADE y algodón estéril, se inocularon por el haz y el envés, con alícuotas de 1.5 mL de la suspensión de cada uno de los tratamientos (tres hojas por cada tratamiento), utilizando un pincel (de pelo de camello), lavado con

hipoclorito de sodio (CLOROX® 25%), etanol (70%) y ADE. Después de 30 días se obtuvieron 20 segmentos esterilizados de cada una de las 3 hojas utilizadas por tratamiento (60 segmentos por tratamiento). Con los HE que emergieron de los segmentos, se calculó el porcentaje de colonización de cada planta (PC_{planta}) por HE y por tratamiento de inoculación.

5.5.3 Elaboración de inóculo a base de esporas

Los 9 HE fueron cultivados en cajas Petri con PDA o AA a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en la oscuridad. Después de 10 días, se añadió a cada caja 1 mL de ADE, y con una espátula se barrió cada caja para arrastrar y suspender las esporas de la superficie de los micelios en el ADE agregada. La suspensión de esporas obtenida se agitó en un vortex y se ajustó a una concentración de 2.2×10^6 esporas/mL de ADE, usando para ello una Cámara de Neubauer mejorada (Marienfield®). Con este procedimiento se elaboró el inóculo de cinco HE: *Cryptosporiopsis* sp., *Cryptosporiopsis corticola*, *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum gloeosporioides* Gpo. 2 y *Paecilomyces* sp., porque los demás no produjeron esporas o éstas fueron insuficientes.

5.5.3.1 Bioensayo 3: Inoculación de hojas desprendidas con suspensión de esporas de los hongos endófitos

Para este bioensayo se desprendieron 60 hojas maduras, seleccionadas de la parte media de cafetos libres de endófitos de 1 año y 5 meses de edad con 8 a 9 pares de hojas, pero en esta ocasión 30 provenían de la var. Typica y 30 de la Bourbon. Esta última variedad se añadió para evaluar si podía ser más o menos colonizada por los HE que la var. Typica. Las hojas de ambas variedades se limpiaron con ADE y algodón estéril, y cada una se colocó, con el envés hacia arriba, sobre un portaobjetos elevado con un triángulo de vidrio dentro de una caja Petri con 10 mL de ADE. Se inocularon seis hojas de cada variedad de café por cada uno de los HE que produjeron las esporas, con alícuotas de 1.5 mL de las respectivas suspensiones de esporas, las cuales fueron distribuidas de manera superficial sobre el envés de las hojas con una jeringa de insulina de 0.5 mL. Las cajas Petri con las hojas inoculadas se sellaron con tres capas de polietileno para mantener la humedad y permanecieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

La mitad de las hojas (15 unidades) de cada variedad de cafeto se puso en la oscuridad y la otra mitad en la luz con fotoperiodo 12:12 h. Los 3 factores considerados para este experimento fueron: el HE, la variedad del cafeto y la exposición a la luz. La colonización de las hojas se revisó después de 18 días, debido a que en bioensayos anteriores se observó que con el inóculo a base de esporas la colonización era más rápida que con el inóculo a base de micelio. Para esta revisión, se obtuvieron 8 segmentos de cada hoja, se esterilizaron superficialmente y se sembraron, de dos en dos, en cajas Petri con PDA. La capacidad de colonización de cada HE se expresó como porcentaje de colonización de segmentos por hoja (PC_{hoja}) utilizando la fórmula:

$$PC_{hoja} = \left(\frac{\text{Número de segmentos de la hoja con HE}}{\text{Número total de segmentos de la hoja}} \right) \times 100$$

Los datos se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre las medianas de los PC_{hoja} de los distintos HE por variedad de cafeto y por exposición de luz, así como para determinar si el PC_{hoja} de un mismo HE era significativamente diferente entre la variedad de cafeto, o entre las condiciones de luz.

A partir de este bioensayo, se seleccionaron los HE que mostraron una mayor capacidad para colonizar las hojas de *C. arabica*; estos fueron *Cryptosporiopsis* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* Gpo. 2, y únicamente con estos HE se realizó el siguiente bioensayo de colonización de plantas de café.

5.5.3.2 Bioensayo 4: Inoculación de plantas de café con suspensión de esporas de *Cryptosporiopsis* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* Gpo. 2

Para este bioensayo se utilizaron 4 plantas de la variedad Typica, de 1 año y 6 meses de edad con 9 y 10 pares de hojas, por cada uno de los dos HE. Cada planta se limpió con ADE y algodón estéril, y se asperjó con aproximadamente 1.5 mL por hoja, de la suspensión de esporas de los HE seleccionados, humedeciendo tanto el haz como el envés (modificado de Arnold *et al.*, 2003), y se cubrieron con bolsas de polietileno. Las plantas inoculadas permanecieron en el invernadero; 8 días después de la inoculación las bolsas de polietileno fueron retiradas.

La colonización de los HE se revisó después de 18 días de realizada la inoculación, desprendiendo tres hojas de las partes superior, media e inferior de cada planta y cultivando 8 segmentos por hoja en cajas Petri con PDA, dando un total de 24 segmentos de hoja por planta y 96 segmentos por HE. En este caso se obtuvo tanto el PC_{hoja}, como el PC_{planta} por cada HE. Los datos presentaron una distribución normal por lo que se analizaron con un ANOVA de una vía ($\alpha = 0.05$) y una prueba de Tukey HSD para determinar si existían diferencias significativas de colonización entre los dos HE, o entre los PC_{hoja} de los mismos, debido a la ubicación de la hoja dentro de la planta (partes superior, media e inferior).

5.6 Bioensayo de hongos endófitos contra *Hemileia vastatrix* Berk & Broome, 1869

5.6.1 Efecto de los hongos endófitos sobre la germinación de las urediniosporas de *Hemileia vastatrix* ‘la roya del café’

Con el objetivo de estudiar el posible papel ecológico de los HE, se evaluó el efecto de cada uno de los 9 HE sobre la germinación de las urediniosporas del fitopatógeno foliar *Hemileia vastatrix* bajo condiciones estériles. Para ello, cada HE fue sembrado en el extremo de dos cajas Petri de vidrio de 9 cm con PDA y se incubó hasta que los HE cubrieron la mitad de las cajas Petri. En el momento de la siembra la otra mitad de las cajas Petri, opuesta al inóculo de cada HE, se cubrió con papel celofán esterilizado en autoclave, para impedir el crecimiento del micelio del HE sobre esta sección de la caja. El papel celofán, ya ha sido utilizado en otros estudios para evaluar el efecto del micelio de un hongo sobre sus esporas o sobre las esporas de otros hongos (Carlile y Sellin, 1963; Dickinson y Skidmore, 1976). Con el micelio de cada HE abarcando la mitad de las cajas Petri, se extrajo el primer papel celofán, y se colocó un segundo segmento de papel celofán del tamaño y forma de un portaobjetos, de tal modo que la mitad de este último papel celofán quedó sobre el micelio del HE y la otra mitad sobre el medio de cultivo libre de micelio. Sobre el segundo segmento de papel celofán, se distribuyó una alícuota de 0.8 mL de una suspensión de urediniosporas de *H. vastatrix* de 1 mg/mL de concentración, de tal forma que la mitad de la alícuota quedó sobre el papel celofán encima del HE y la otra mitad quedó en el área de papel celofán que cubría la parte del medio de cultivo libre de micelio.

Simultáneamente, se distribuyeron alícuotas de urediniosporas sobre otros segmentos de papel celofán en dos cajas Petri con PDA que no tenían HE, a las cuales se les llamó testigos generales. Las cajas Petri se sellaron e incubaron por 6 h (Shiomi, 2006). Posteriormente, se extrajeron los segmentos de celofán y se revisaron al microscopio.

Se obtuvo el número de urediniosporas germinadas a través del conteo de 10 campos del microscopio con el objetivo 40x, tanto en el lado del papel celofán que cubría el micelio del HE como en el lado que cubría el PDA libre de éste, así como en los testigos generales. Se consideraron como germinadas las urediniosporas que presentaron un tubo germinativo de al menos el mismo tamaño que ellas. Los porcentajes de germinación de urediniosporas se obtuvieron con la fórmula:

$$g_{\text{urediniosporas}} = \left(\frac{\text{Número de urediniosporas germinadas}}{\text{Número total de urediniosporas}} \right) \times 100$$

Los datos que presentaron una distribución normal, se analizaron con un ANOVA de dos factores (HE x colocación de las esporas en el celofán) ($\alpha = 0.05$), y se observaron las diferencias entre los porcentajes de germinación de las urediniosporas que permanecieron sobre el celofán que cubría a los HE y las que permanecieron en el celofán sobre el espacio libre de los HE. Además, se hizo la comparación entre los porcentajes de germinación de las esporas que se colocaron con cada HE y las que se colocaron en los testigos generales.

5.6.2 Bioensayo de inoculación de los hongos endófitos y *Hemileia vastatrix* sobre hojas desprendidas

Para este bioensayo se desprendieron 36 hojas de la parte media de 5 cafetos cultivados en el invernadero, de 1 año y 8 meses de edad de la var. *Typica*, libres de HE. Cada hoja se limpió con ADE y algodón estéril, y se colocó con el envés hacia arriba, sobre un portaobjetos elevado con un triángulo de vidrio dentro de una caja Petri con 10 mL de ADE, como cámara húmeda. Los tratamientos aplicados a las hojas fueron 2: (1) la suspensión en ADE del micelio o, en su caso, esporas de cada HE y (2) la suspensión en ADE de las urediniosporas de *H. vastatrix* obtenidas a partir de hojas enfermas de los cafetos de 'El Mirador'.

La suspensión del micelio de cada HE se preparó por separado, a partir de cultivos en caldo de papa-dextrosa-levadura (PDL), que se incubaron en agitación constante por 10 días (100 rpm). La suspensión de micelio de cada HE (Tratamiento 1) se inoculó por separado sobre cuatro hojas, distribuyendo alícuotas de 1.5 mL de propágulos suspendidos en ADE ($6.2 \times 10^6/\text{mL}$), con una aguja de insulina, sobre la superficie del envés de cada hoja. Después de 8 días, la mitad de las hojas inoculadas (2 hojas), con la suspensión de micelio del HE respectivo, se limpiaron con ADE y algodón estéril, y se inocularon con 0.8 mL de una suspensión de urediniosporas de *H. vastatrix* en ADE (1 mg/mL) (Tratamiento 2). La aplicación de los tratamientos generó tres tipos de hoja testigo: (1) sin endófitos y con *H. vastatrix* (-E+H), (2) con endófitos y sin *H. vastatrix* (+E-H) y (3) sin endófitos y sin *H. vastatrix* (-E-H). Todas las hojas se colocaron en cámaras húmedas y se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en la oscuridad durante 2 días, y posteriormente fueron colocadas en condiciones de temperatura y luz ambientales, y se revisaron cada semana hasta observar síntomas de roya. Los síntomas fueron divididos en tres grupos: (1) número de lesiones cloróticas, (2) número de lesiones con urediniosporas y (3) número de lesiones con necrosis. No se realizó ninguna prueba estadística de las distintas lesiones debido a que éstas se presentaron con baja frecuencia y en pocas hojas. Al final del experimento, se obtuvieron y esterilizaron 10 segmentos de cada hoja para corroborar que los HE que las habían colonizado, eran los mismos que habían sido inoculados en ellas.

VI. RESULTADOS

6.1 Bioensayos de crecimiento de los hongos endófitos

Las curvas de crecimiento obtenidas con las áreas de los micelios de los HE, mostraron las características típicas de las curvas de crecimiento de los microorganismos en general, con una fase de latencia y una de crecimiento exponencial bien definidas, tanto en PDA como en PDA+EC. Los nueve HE evaluados formaron un gradiente de crecimiento entre ellos, del más lento al más rápido, en ambos medios de cultivo, tal como se observa en la **Fig. 7**.

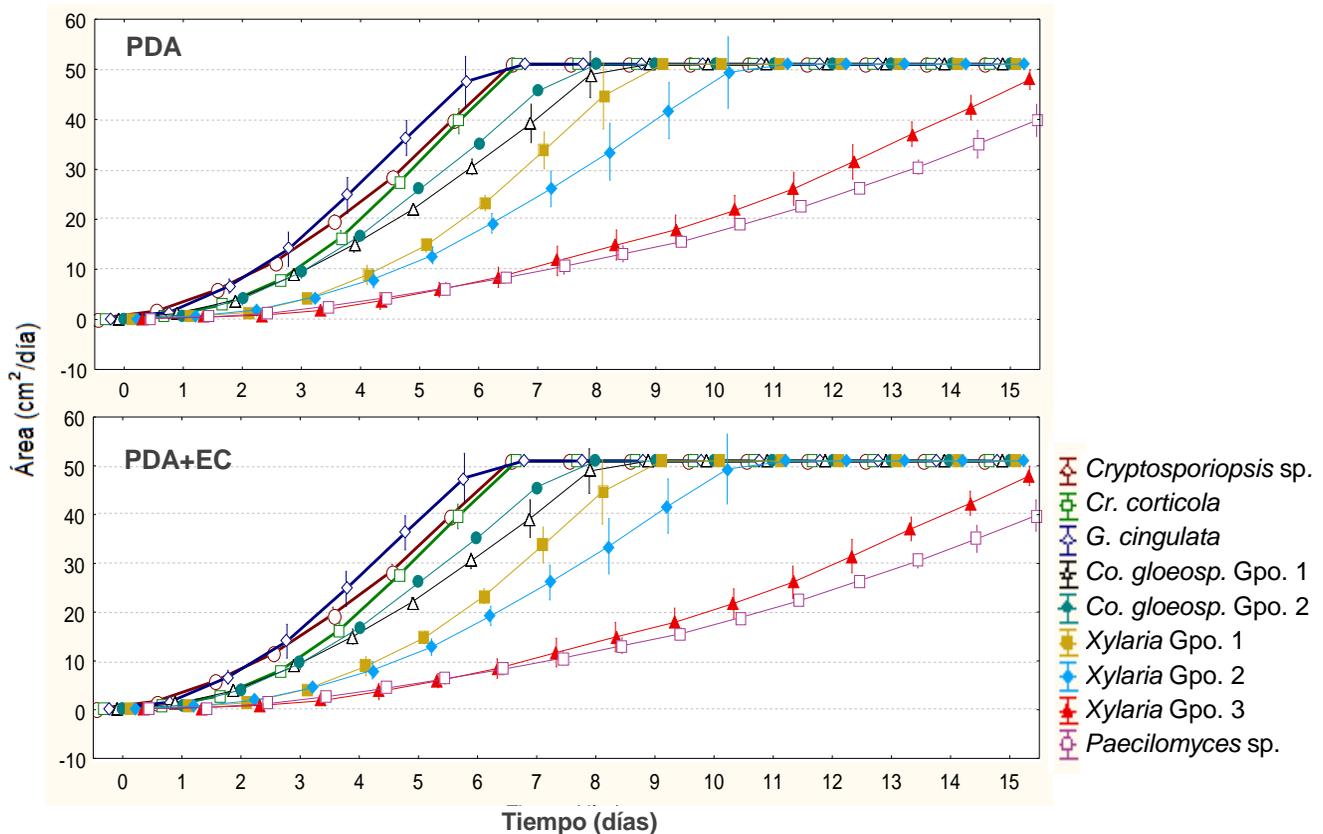


Fig. 7. Representación gráfica del crecimiento de los hongos endófitos. Cada dato de las curvas se presenta con los intervalos de confianza (95%) de las medias de las áreas de los micelios de los HE. Los HE se ordenan de acuerdo a la tasa de crecimiento que presentaron en el bioensayo preliminar de crecimiento (ver ANEXO I).

Las curvas de crecimiento de todos los HE se ajustaron correctamente con el modelo de Baranyi y Roberts (1994) (coeficiente de ajuste o $R^2 \leq 0.985$), por lo que con la descomposición de las curvas realizada por el modelo, se obtuvo tanto el tiempo de latencia (TL), como la tasa de crecimiento (TC) de cada HE.

6.1.1 Comparación de los parámetros de crecimiento entre hongos endófitos, y entre cada hongo endófito cultivado en PDA y PDA+EC

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre las medias de los *TL* de los HE, tanto en PDA como en PDA+EC (ver los datos en la **Fig. 8**). En ambos medios de cultivo, los *TL* más altos correspondieron a *Xylaria* Gpo. 3 y *Paecilomyces* sp., seguidos por *Xylaria* Gpo. 1, *Xylaria* Gpo. 2, los HE del género *Colletotrichum*, *Cr. corticola*, y finalmente, por *Cryptosporiopsis* sp. y *G. cingulata* (**Fig. 8a**). Las *TC* variaron significativamente entre los HE en ambos medios de cultivo, y mostraron un patrón contrario al observado en los *TL*, ya que las *TC* más altas correspondieron a *G. cingulata* y *Cr. corticola*, seguidos por *Cryptosporiopsis* sp., los HE del género *Colletotrichum*, *Xylaria* Gpo. 1 y *Xylaria* Gpo. 2, y finalmente, *Paecilomyces* sp. y *Xylaria* Gpo. 3 mostraron la *TC* más baja en ambos medios de cultivo (**Fig. 8b**).

Siete de los 9 HE mostraron *TL* o *TC* significativamente distintas entre medios de cultivo (PDA y PDA+EC). Los *TL* de los HE fueron, en general, más bajos en PDA que en PDA+EC, aunque esta diferencia solo fue significativa para cinco HE: *Paecilomyces* sp., *Co. gloeosporioides* Gpo. 2, *G. cingulata*, *Xylaria* Gpo. 2 y *Xylaria* Gpo. 1. Ningún HE tuvo un *TL* significativamente más alto en PDA que en PDA+EC. Las *TC* de los HE fueron, en general, más altas en PDA+EC que en PDA, aunque esta diferencia solo fue significativa para cuatro HE: *Xylaria* Gpo. 3, *Co. gloeosporioides* Gpo. 1, *Xylaria* Gpo. 2 y *Co. gloeosporioides* Gpo. 2. Por el contrario, solo *Paecilomyces* sp., mostró una *TC* significativamente menor en PDA+EC que en PDA, mientras que *Cryptosporiopsis* sp. y *Cr. corticola* no mostraron cambios significativos en sus parámetros de crecimiento al crecer en PDA y en PDA+EC (**Figs. 8a y b**). Los cambios en el crecimiento determinaron el porcentaje de sensibilidad de los HE al extracto de las hojas de café (**Fig. 8c**).

Finalmente, el análisis de correlación no mostró una relación significativa entre la frecuencia de aislamiento a partir de las hojas de los cafetos y el promedio de los parámetros de crecimiento obtenidos en PDA y en PDA+EC, tampoco se encontró una correlación lineal significativa entre la frecuencia de aislamiento de los HE y su sensibilidad y posible afinidad a los compuestos de las hojas de café ($p > 0.05$) (Ver datos en **ANEXO IX**).

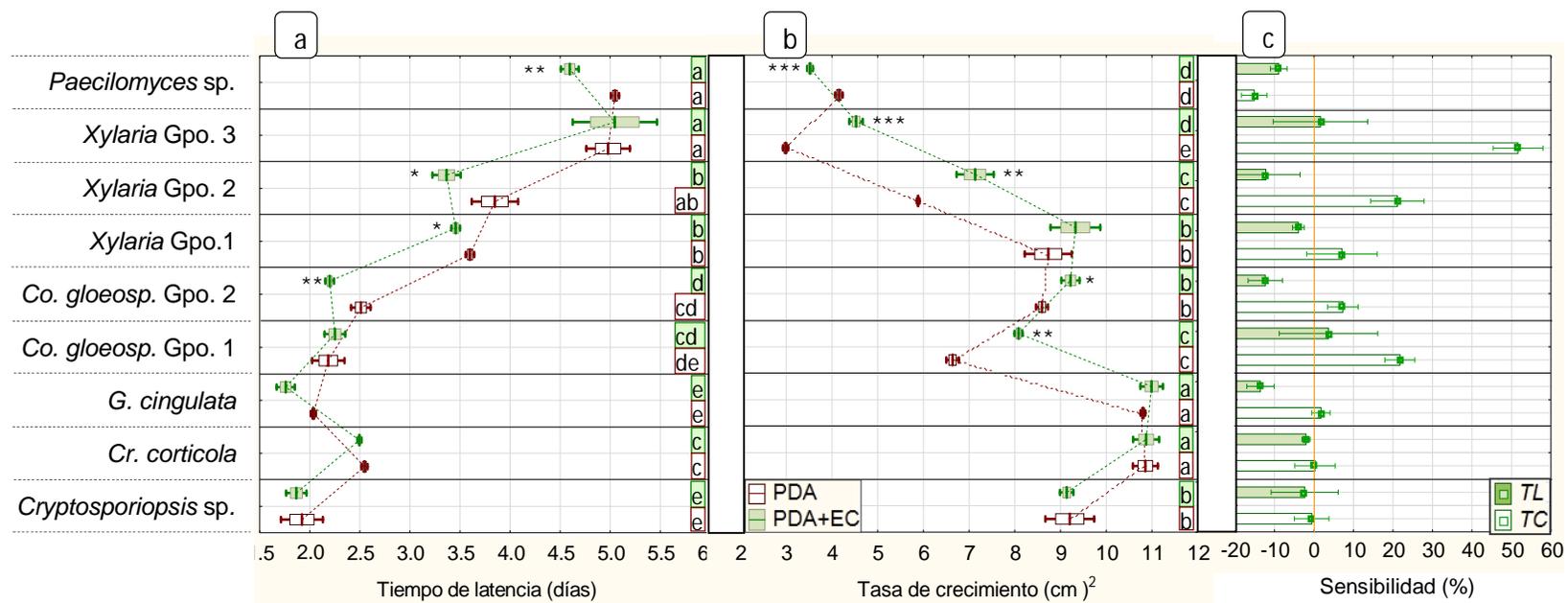


Fig. 8. Parámetros de crecimiento de los hongos endófitos en PDA y PDA+EC. En el eje de las ordenadas (vertical-gráfico invertido) se enlistan los HE y en el eje de las abscisas se muestran: (a) los valores de los tiempos de latencia (*TL*), (b) las tasas de crecimiento (*TC*) y (c) el porcentaje de sensibilidad de los HE hacia el extracto de hojas de café. Los datos se muestran con la desviación estándar de la media (media \pm DS). El ANOVA mostró diferencias significativas entre los *TL* de los HE en PDA ($p= 0.00000$, $F= 90.3$, $gl= 8$) y en PDA+EC ($p= 0.00000$, $F= 178.05$, $gl= 8$); y entre las *TC* de los HE en PDA ($p= 0.00$, $F= 314.4$, $gl= 8$) y en PDA+EC ($p= 0.00000$, $F= 174.7$, $gl= 8$). Las letras a la derecha de los gráficos a y b, indican el grado de similitud entre los parámetros de crecimiento de los HE de acuerdo con la prueba de Tukey HSD) para cada medio de cultivo por separado, los datos en los gráficos no están transformados. Los asteriscos (*) en los gráficos a y b, indican si el parámetro de crecimiento de cada HE cambia entre medios de cultivo (PDA y PDA+EC) de acuerdo a la prueba t de Student: *** $p\leq 0.0005$, ** $p\leq 0.007$, * $p\leq 0.03$. Las líneas discontinuas en los gráficos a y b, indican que los datos contenidos en cada caja y bigote son independientes.

6.2 Bioensayos de interacción *in vitro* entre los hongos endófitos

6.2.1 Interacción entre los hongos endófitos por captura primaria de recursos y evaluación microscópica de las interacciones

El desarrollo de los HE fue diferente entre las dos técnicas de microcultivo, por lo que en conjunto permitieron una observación más amplia de las interacciones entre los HE. En los segmentos de agar a los que se les colocó un cubreobjetos, se observó que las hifas de los HE se sumergieron en el medio de cultivo y crecieron muy poco, por lo que las interacciones fueron escasas; en cambio, en los segmentos sin el cubreobjetos, los HE se expandieron por todo el segmento permitiendo el contacto entre las hifas del micelio aéreo y del micelio sumergido. En las capas delgadas de medio de cultivo que se obtuvieron al sumergir los cubreobjetos, se facilitó la observación del avance de las hifas en la superficie del medio de cultivo.

Como se muestra en la **Tabla 2**, durante la revisión de los segmentos y las capas de medio de cultivo, se observaron diferentes interacciones entre las hifas y los micelios de los HE, aunque se presentaron con baja frecuencia, y además, variaron poco entre los medios de cultivo (PDA y PDA+EC). En general, *G. cingulata* y los HE de los géneros *Cryptosporiopsis* y *Colletotrichum*, presentaron respuestas indeterminadas, defensivas o de inhibición, mientras que los del género *Xylaria* y *Paecilomyces* sp., además de las mencionadas, mostraron diferentes respuestas ofensivas.

El 52.8% de las respuestas observadas en los HE en interacción, fueron indeterminadas, es decir, aparentemente no ejercían algún efecto adverso o benéfico sobre el HE contrario, en comparación con los HE en los que el efecto era más evidente. Estas respuestas indeterminadas incluyeron enlaces entre las hifas de los micelios aéreos de los HE, traslape de hifas y contacto entre las mismas. Todos los HE presentaron estas respuestas, sin embargo, fueron más frecuentes en *G. cingulata* y en los HE de los géneros *Cryptosporiopsis* y *Colletotrichum*. Las siguientes respuestas más observadas fueron las ofensivas (30.56%), presentadas por los HE del género *Xylaria* que desarrollaron micelio invasor y algunos enganches hifales sobre otros micelios, y por *Paecilomyces* sp., que, además de desarrollar enganches hifales, fue el único que enrolló a las hifas de otros HE.

Tabla 2. Matriz de interacciones entre los hongos endófitos revisadas con el microscopio

HE	Medio	Hongo endófito copartícipe (competidor)								
		1 (<i>Cryptosp. sp.</i>)	2 (<i>Cryptosp. corticola</i>)	3 (<i>Glomerella cingulata</i>)	4 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 1</i>)	5 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 2</i>)	6 (<i>Xylaria Gpo. 1</i>)	7 (<i>Xylaria Gpo. 2</i>)	8 (<i>Xylaria Gpo. 3</i>)	9 (<i>Paecilom. sp.</i>)
1	PDA		Ea, T, Eh	Ea, T, Eh	Ea, T	Ea, RBM, D	MS	°	RBM	Ea
	PDA+EC		*	*	*	*	*	°	*	*
2	PDA	Ea, T, Eh		Ea, R	Ea	°	°	°	°	Ea, MD
	PDA+EC	*		*	*	°	°	°	°	*
3	PDA	Ea, G, T, Eh	Ea, R, D		Ea	T	°	°	RBM	Ea
	PDA+EC	*	*		*	Ea, T	°	°	*	°
4	PDA	Ea, G, T, C	Ea	Ea, D		T, MD	°	°	T, RBM y R	°
	PDA+EC	*	*	Ea		T	°	°	RBM	°
5	PDA	Ea, RBM	°	T	T, MD		Ea, T	Ea, MD	V, RBM	°
	PDA+EC	*	°	Ea, T	T, G		* MD	*	R	R
6	PDA	MI	MI	MI	MI, D	Ea, MI		°	°	Ea
	PDA+EC	*	*	*	MI, G	*		°	°	*
7	PDA	MI	MI	MI	MI	Ea, RBM, MI, L	MD		C	°
	PDA+EC	*	*	*	*	MI, Ea, L, E	°		*	°
8	PDA	MI, L	MI	R	MI, T	MI	°	C		
	PDA+EC	*	*	MI	MI	MI, E	°	*		
9	PDA	Ea	Ea	E	EN, R	E, EN	Ea, EN	MD	E	
	PDA+EC	*	*	°	EN	EN	*			

<p>Respuestas ofensivas: E= Enganche de hifas EN= Enrollamiento de 1 hifa. L= liberación de exudado. MI= Micelio invasor</p>	<p>Respuestas defensivas: G= Globulación del ápice de la hifa. MD= Micelio defensivo.</p>	<p>Respuestas indeterminadas: C= Contacto de hifas sin antagonismo evidente Ea= Enlaces en micelio aéreo T= Entremezclado de hifas</p>	<p>Respuestas de inhibición: D= Deformación de las hifas R= Ramificación de hifas RBM= Reducción de la biomasa micelilar V= Vacuolación en las hifas</p>	<p>Respuestas de evasión: Eh= Evasión entre hifas MS= Micelio sumergido *No se observaron interacciones distintas a las de PDA °No se observaron interacciones o respuestas hifales evidentes</p>
---	--	--	---	--

Por otro lado, se detectaron pocas respuestas de inhibición (22.2%), sin embargo, todos los HE las presentaron en algún momento, aunque los más inhibidos fueron los de los géneros *Colletotrichum* y *Cryptosporiopsis*, y *G. cingulata*; entre estas respuestas, la más frecuente fue la reducción de la cantidad de hifas y la ramificación de las hifas cuando estaban cerca del otro HE.

Finalmente, las respuestas menos encontradas fueron las defensivas (8%), a pesar de que casi todos los HE las presentaron al interactuar con al menos uno de los demás. El desarrollo de micelio defensivo (el micelio se hace más abundante en la zona de interacción) fue la respuesta defensiva más común, y solo en algunos HE se globuló el ápice de las hifas, hasta la formación de clamidosporas. En ocasiones, se observaron respuestas particulares en algunos HE, por ejemplo, en ocasiones los hongos del género *Cryptosporiopsis* evitaban el contacto de sus hifas con las de algunos otros HE, cambiando la dirección del crecimiento, o bien, sumergiendo las hifas en el medio de cultivo (**Tabla 2**).

6.2.2 Interacción entre los hongos endófitos por captura primaria de recursos y evaluación macroscópica de las interacciones

El análisis de varianza de los tres parámetros de crecimiento (A_i , A_f y TC_i) mostró diferencias significativas entre los HE en interacción y los cultivos testigo correspondientes (central o lateral), tanto en PDA como en PDA+EC ($p \leq 0.00$) (Ver datos en **ANEXO VIII**). Los valores de las A_f (áreas al final del bioensayo) y de las TC_i (Tasas de crecimiento en la interacción) fueron siempre significativamente mayores en los testigos centrales que en los laterales, por lo que las variaciones significativas atribuidas a la interacción entre los HE, dependieron del tipo de cultivo testigo utilizado en el análisis estadístico. Las variaciones de las A_i (áreas antes del inicio del contacto) entre los cultivos testigo, centrales y laterales, no fueron significativas, pero algunas variaciones observadas en los HE en interacción, también dependieron del tipo de testigo utilizado en el análisis estadístico. El porcentaje total de los HE en interacción, que mostraron alteraciones (inhibición o estimulación) significativas en sus parámetros de crecimiento debido a la presencia de cada uno de los demás HE, tanto en PDA como en PDA+EC, se muestra en la **Fig. 9**.

La principal respuesta de los HE a la interacción con los demás, fue la inhibición de sus parámetros de crecimiento (A_i , A_f y TC_i), sin embargo, también se encontraron algunas respuestas de estimulación. Utilizando los cultivos testigo centrales en el análisis estadístico, se observó un mayor porcentaje de HE con reducciones en sus A_f y en sus TC_i , que al utilizar los testigos laterales; además, solamente utilizando estos últimos, se detectaron HE con ambos parámetros de crecimiento estimulados. En cambio, el A_i de los HE fue el único parámetro con el que se detectaron efectos tanto de inhibición como de estimulación utilizando ambos tipos de cultivos testigo (centrales y laterales), aunque los porcentajes de HE estimulados e inhibidos fueron mucho menores que los obtenidos con las A_f y las TC_i . El porcentaje de HE inhibidos por los demás fue casi siempre menor en PDA que en PDA+EC, contrariamente, el porcentaje de HE estimulados fue mayor en PDA que en PDA+EC, lo cual fue más evidente con los testigos laterales que con los centrales.

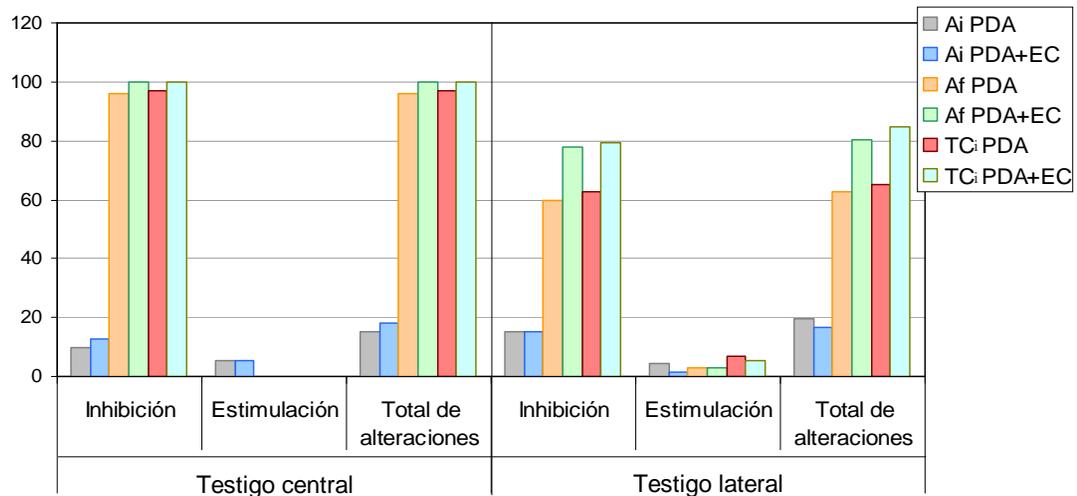


Fig. 9. Porcentaje de alteraciones en los parámetros de crecimiento de los HE en interacción.

Por otro lado, las alteraciones en los parámetros de crecimiento mostraron diversos tipos de interacciones entre las parejas de HE (**Fig. 10**). Aquí también fue interesante observar que únicamente utilizando el testigo central en el análisis estadístico, hubo un gran predominio de interacciones en las que se inhibieron las A_f y las TC_i de ambos HE enfrentados (--); sin embargo, utilizando el testigo lateral, las interacciones se diversificaron, y aunque siguieron predominando las antagonistas,

fueron más frecuentes aquellas en las que se inhibió un solo HE (-+, -0), aunque esto dependió del medio de cultivo.

Cabe destacar que las A_i nunca mostraron que ambos HE enfrentados se inhibieran (--), (relaciones competitivas o coantagónicas de acuerdo con Tuininga, 2005), ni tampoco interacciones en donde uno se inhibiera y el otro se estimulara (-+) (relaciones antagónicas), pues únicamente se observaron interacciones en las que un HE se inhibió o se estimuló, mientras que el otro permaneció inalterado (-0, 0+); sin embargo, con las A_i se detectó una mayor cantidad de interacciones en las que ningún HE fue inhibido o estimulado (00). Finalmente, sorprendió el hecho de que no se encontraron interacciones en las que se estimulara algún parámetro de crecimiento de ambos HE enfrentados (++).

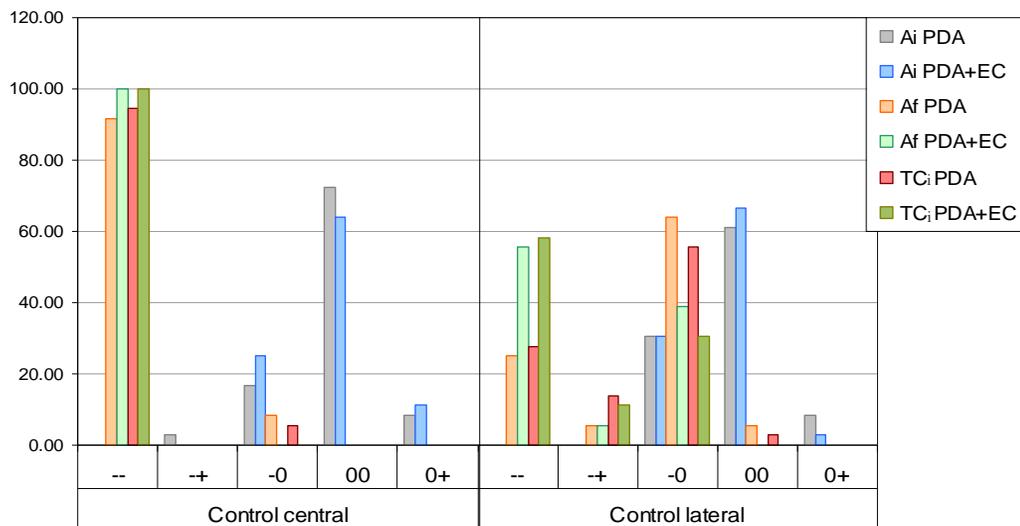


Fig. 10. Porcentaje de los tipos de interacción entre los hongos endófitos. Las interacciones entre HE se ordenaron con base en la inhibición (-), estimulación (+) y falta de ambas alteraciones (0) sobre sus parámetros de crecimiento. No hubo interacciones ‘++’ por lo que no se incluyen en la gráfica.

6.2.2.1 Hongos endófitos con alteraciones en sus áreas de crecimiento antes del contacto con cada uno de los demás (A_i)

Interacciones en PDA. Considerando los testigos centrales, los HE inhibidos por un mayor número de otros HE fueron *Co. gloeosporioides* Gpo. 1, el cual redujo su crecimiento antes de hacer contacto con los tres HE del género *Xylaria*; y *Xylaria* Gpo. 2, el cual redujo su crecimiento antes de hacer contacto con *G. cingulata* y *Co.*

gloeosporioides Gpo. 2. Otros HE inhibidos fueron *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 frente a *Cr. corticola*, y *Cryptosporiopsis* sp. frente a *Xylaria* Gpo. 3. En cambio, *Xylaria* Gpo. 1, fue estimulado por los dos HE del género *Colletotrichum*; *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 por *Cryptosporiopsis* sp.; y *Paecilomyces* sp. por *Xylaria* Gpo. 1.

Cuando se comparó a los hongos endófitos en interacción con los cultivos testigo laterales, se observó un aumento en el número de HE inhibidos por los demás. Entre estos efectos, *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 fue inhibido por 4 HE: *Cr. corticola*, *G. cingulata*, *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 y *Xylaria* Gpo. 1, en tanto que *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 y los tres HE del género *Cryptosporiopsis* redujeron su crecimiento antes de hacer contacto con algunos HE del género *Xylaria*, principalmente con *Xylaria* Gpo. 3. Los HE estimulados fueron *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 frente a *Cryptosporiopsis* sp. y *G. cingulata*; y *Paecilomyces* sp., frente a *Xylaria* Gpo. 1 (**Tablas 7a y b en ANEXO VIII**).

Interacciones en PDA+EC. Considerando solamente los cultivos testigo centrales, los HE inhibidos por un mayor número de HE fueron: *G. cingulata*, que fue inhibido por *Xylaria* Gpo. 1, *Xylaria* Gpo. 3 y por *Paecilomyces* sp., y *Xylaria* Gpo. 3, que fue inhibido por los dos HE de su mismo género, mientras que los HE de los géneros *Colletotrichum* y *Cryptosporiopsis* fueron inhibidos por un solo hongo. Por el contrario, algunos HE fueron estimulados: *Cryptosporiopsis* sp. por *Xylaria* Gpo. 2; *Cr. corticola* por *Xylaria* Gpo. 2 y *Paecilomyces* sp.; y *Xylaria* Gpo. 2 por *Paecilomyces* sp. En relación a los testigos laterales, además de un aumento de los efectos de inhibición detectados en relación a los testigos centrales, se observó que, *Xylaria* Gpo. 2 fue estimulado por *Paecilomyces* sp. (**Tablas 7a y b en ANEXO VIII**).

6.2.2.2 Hongos endófitos con alteraciones en sus áreas de crecimiento medidas al final del periodo de medición (A_f)

Interacciones en PDA. Considerando solamente los testigos centrales, se observó que la mayoría de los HE fueron inhibidos por todos los demás, a excepción de *Xylaria* Gpo. 1 el cual no fue afectado por los del género *Colletotrichum*; y *Paecilomyces* sp., que creció de forma normal frente a *Xylaria* Gpo. 1. En cambio, con respecto de los testigos

laterales, solo *Cryptosporiopsis* sp., *Cr. corticola* y *Co. gloeosporioides* Gpo. 2, redujeron significativamente sus A_f al crecer con todos los demás HE; mientras que otros HE como *Paecilomyces* sp., *Xylaria* Gpo. 2 y *Xylaria* Gpo. 3, fueron inhibidos por pocos HE. *Xylaria* Gpo. 1, no fue inhibido por ningún HE, y además fue estimulado por los dos del género *Colletotrichum* (Tablas 8a y b en ANEXO VIII).

Interacciones en PDA+EC. Con respecto de los cultivos testigo centrales, se observó que todos los HE fueron inhibidos por los demás, en cambio al considerar únicamente los testigos laterales, se observó que los HE del género *Xylaria* crecieron en general sin alteraciones en sus A_f en la mayor parte de las interacciones, excepto al crecer con los HE de su mismo género. Además se detectó que *Xylaria* Gpo. 2 fue estimulado por *G. cingulata* y *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 (Tablas 8a y b en ANEXO VIII).

6.2.2.3 Hongos endófitos con alteraciones en sus tasas de crecimiento en la interacción con los demás (TC_i)

Interacciones en PDA. Considerando solamente los cultivos testigo centrales, se observó que la mayoría de los HE fueron inhibidos por todos los demás, a excepción de *Xylaria* Gpo. 1, que no alteró su TC_i frente a los HE del género *Colletotrichum*. En cambio, en relación a los testigos laterales, únicamente *Cryptosporiopsis* sp., *Cr. corticola* y *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 fueron inhibidos por todos los demás HE. Otros HE inhibidos por algunos de los demás fueron *G. cingulata*, *Co. gloeosporioides* Gpo. 1, *Paecilomyces* sp. y los tres HE del género *Xylaria*. Por otro lado, *Xylaria* Gpo. 1 no fue inhibido por ningún HE, sino estimulado por *Co. gloeosporioides* Gpo. 2. Otro HE estimulado fue *Xylaria* Gpo. 3 al crecer con *Cryptosporiopsis* sp., *G. cingulata*, *Co. gloeosporioides* Gpo. 1, y *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 (Tablas 9a y b en ANEXO VII).

Interacciones en PDA+EC. Considerando el testigo central, todos los HE redujeron su TC_i al crecer con los demás. En cambio, con el testigo lateral, no todos los HE fueron inhibidos por los demás, ya que los del género *Xylaria* se inhibieron principalmente entre ellos mismos. *Xylaria* Gpo. 2 fue el único estimulado al crecer con *Cryptosporiopsis* sp., *Cr. corticola*, y con los del género *Colletotrichum* (Tablas 9a y b en ANEXO VIII).

6.2.2.4 Efectos y respuestas competitivas de los hongos endófitos

La comparación de las respuestas competitivas de los HE, obtenidas con los porcentajes de inhibición de los parámetros de crecimiento (A_i , A_f y TC_i) en relación a los cultivos testigo central y lateral, tanto en PDA como en PDA+EC, mostraron que la mediana de al menos un HE difirió significativamente de las de los otros, excepto en las A_i obtenidas en PDA+EC utilizando el testigo central. Al comparar los efectos competitivos ejercidos por los HE sobre los demás, se encontró que en la mayoría de los casos, la mediana de al menos un HE fue significativamente diferente a la de los demás, excepto en las A_i en PDA+EC para ambos testigos utilizados (central y lateral) (**Tabla 3**).

Las respuestas y los efectos competitivos también dependieron del parámetro de crecimiento y del tipo de cultivo testigo utilizado en el análisis estadístico. Por lo general, los HE del género *Cryptosporiopsis* presentaron las respuestas competitivas más bajas, es decir, resultaron con los mayores porcentajes de inhibición sobre sus parámetros de crecimiento, mientras que los HE menos inhibidos fueron los del género *Xylaria*. Con respecto a los testigos centrales, se observó que *Xylaria* Gpo. 1, *Paecilomyces* sp., *G. cingulata*, y *Cr. corticola* mostraron altas repuestas competitivas al crecer en PDA, pues mostraron A_i más altas que su testigo, al crecer con al menos uno de los demás HE. En cambio, cuando los HE crecieron en PDA+EC, *Cryptosporiopsis* sp., *Cr. corticola*, *Xylaria* Gpo. 2, *Paecilomyces* sp. y *Xylaria* Gpo. 1, tuvieron altas respuestas competitivas; las A_f y las TC_i solo mostraron respuestas de inhibición en todos los hongos. En cambio, con los testigos laterales, todos los parámetros de crecimiento mostraron que algunos HE fueron estimulados. Por lo anterior, las respuestas de inhibición tuvieron valores mucho más altos cuando se obtuvieron a partir de los testigos centrales que de los laterales (**Fig. 11**). Por otro lado, los HE con mayores efectos competitivos, es decir, los que inhibieron más el crecimiento de los demás, fueron *Xylaria* Gpo. 3, *Xylaria* Gpo. 1 y *Xylaria* Gpo. 2, lo cual se observó particularmente con las A_f y las TC_i , mientras que *G. cingulata* y los de los géneros *Cryptosporiopsis* y *Colletotrichum*, presentaron escasos efectos competitivos de inhibición; en contraste, y como ya se mencionó, los efectos competitivos sobre las A_i no variaron entre todos los HE en PDA+EC. Los efectos competitivos, también

mostraron que *Cryptosporiopsis* sp., *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 y *Paecilomyces* sp., estimularon a otros HE antes de hacer contacto con ellos, aunque esto únicamente se observó en PDA; además, de forma similar a lo observado con las respuestas competitivas, los efectos competitivos de inhibición fueron mucho más altos cuando se calcularon a partir de los cultivos testigo centrales que con los laterales.

Tabla 3. Resultados de la comparación de las respuestas o los efectos competitivos entre los hongos endófitos con la prueba de Kruskal-Wallis

M	PC	Testigo	Kruskal – Wallis			
			Respuesta		Efecto	
			H	Valor p	H	Valor p
PDA	A_i	central	20.94180	0.0073 [‡]	20.83598	0.0076 [‡]
		lateral	21.94709	0.0050 ^{**}	20.00000	0.0103 [‡]
	A_f	central	24.52910	0.0019 ^{**}	22.91005	0.0035 [‡]
		lateral	25.06878	0.0015 ^{**}	22.69841	0.0038 [‡]
	TC_i	central	25.16402	0.0015 ^{**}	22.94180	0.0034 [‡]
		lateral	25.03704	0.0015 ^{**}	22.82540	0.0036 [‡]
PDA+EC	A_i	central	21.74603	0.0054	19.04762	0.0146
		lateral	22.52910	0.0040 ^{**}	20.04233	0.0102
	A_f	central	25.16402	0.0015 ^{**}	24.74074	0.0017 ^{**}
		lateral	25.71429	0.0012 ^{***}	24.42328	0.0019 ^{**}
	TC_i	central	24.89947	0.0016 [‡]	24.77249	0.0017 ^{**}
		lateral	25.71429	0.0012 ^{***}	24.80423	0.0017 ^{**}

Valores p de la prueba de Kruskal-Wallis que compara los promedios de los porcentajes de inhibición entre HE: [‡] diferencia significativas entre un par de HE; ^{**} diferencias significativas entre 2 pares de HE; ^{***} diferencias significativas entre 3 pares de HE.

El análisis de correlación de Spearman entre las respuestas competitivas y los efectos competitivos de los HE, mostró una correlación significativa en la mayoría de los casos, excepto entre los efectos y las respuestas sobre las A_i de los HE calculadas a partir de ambos tipos de cultivos testigo, tanto en PDA como en PDA+EC. Todos los índices de correlación (r_s) que mostraron correlaciones significativas tuvieron valores negativos, lo que indica que la respuesta de los HE a la presencia de otro, es inversamente proporcional al efecto que los HE ejercen sobre los demás después de que los micelios se tocan (**Tabla 4**).

Los índices de correlación (r_s) y de determinación (r_s^2) entre las respuestas y entre los efectos competitivos que fueron significativos, fueron muy similares al utilizar tanto los cultivos testigo centrales como los laterales en medio de cultivo PDA, pero variaron entre ambos testigos en PDA+EC, pues en este último medio de cultivo dichos índices fueron mayores utilizando el testigo lateral que al utilizar el central (**Tabla 4**).

Tabla 4. Resultados del análisis de correlación de Spearman entre las respuestas y los efectos competitivos de los hongos endófitos

M	PC	Testigo	Correlación efecto vs respuesta		
			r_s	r_s^2	Valor p
PDA	A_i	central	-0.24	0.057	0.23
		lateral	-0.11	0.012	0.59
	A_f	central	<u>-0.89</u>	<u>0.79</u>	<u>0.000</u>
		lateral	<u>-0.88</u>	<u>0.77</u>	<u>0.000</u>
	TC_i	central	<u>-0.87</u>	<u>0.76</u>	<u>0.000</u>
		lateral	<u>-0.84</u>	<u>0.70</u>	<u>0.000</u>
PDA+EC	A_i	central	0.26	0.067	0.19
		lateral	0.35	0.12	0.07
	A_f	central	<u>-0.70</u>	<u>0.49</u>	<u>0.000</u>
		lateral	<u>-0.84</u>	<u>0.70</u>	<u>0.000</u>
	TC_i	central	<u>-0.75</u>	<u>0.56</u>	<u>0.000</u>
		lateral	<u>-0.84</u>	<u>0.70</u>	<u>0.000</u>

Los índices de correlación (r_s) y de determinación (r_s^2) subrayados indican una relación significativa entre los efectos y las respuestas competitivas de los HE.

Debido a que todos los datos expuestos arriba indicaron que los porcentajes de inhibición (PI) fueron sobreestimados al utilizar el testigo central en la comparación estadística, y por lo tanto, también lo fueron las respuestas y los efectos competitivos calculados a partir de dicho testigo, el análisis de correlación de Spearman entre la frecuencia de aislamiento de los HE y los promedios de las repuestas competitivas o de los efectos competitivos de los mismos, solo se realizó con los datos obtenidos a partir de los testigos laterales; sin embargo, en ningún caso se encontró una relación lineal entre la frecuencia de aislamiento de los HE y las respuestas competitivas o los efectos competitivos de los tres parámetros de crecimiento calculados en la interacción (A_i , A_f y TC_i) ni en PDA, ni en PDA+EC ($p > 0.05$ en todos los casos, ver gráficos de correlación en **ANEXO X**).

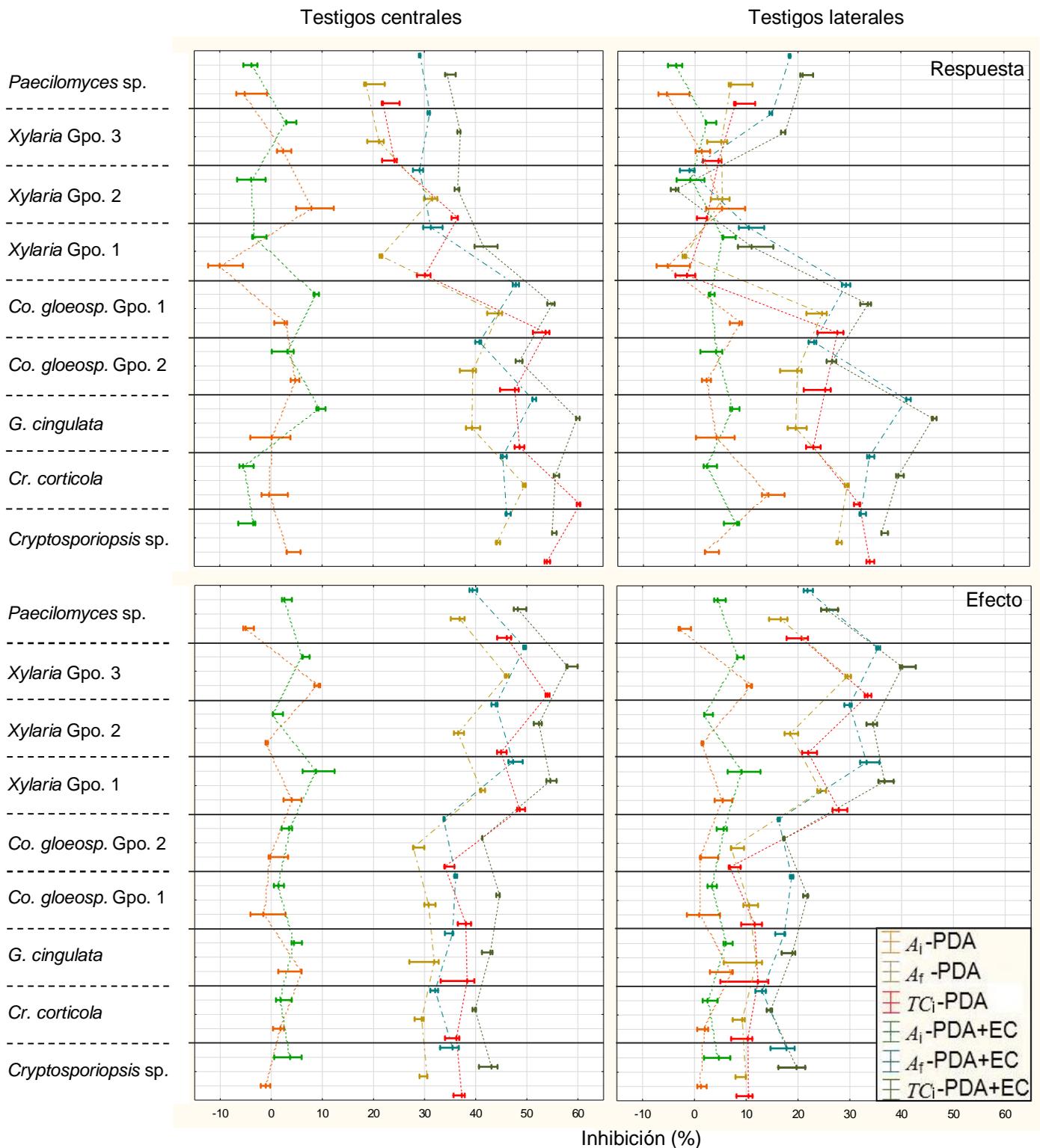


Fig. 11. Porcentajes de inhibición de los parámetros de crecimiento de los hongos endófitos. Los datos muestran las medianas y los cuartiles (25-75%) de los promedios de los porcentajes de inhibición de los parámetros de crecimiento que cada HE experimentó por la presencia de los otros (Respuesta competitiva) o que cada HE ejerció sobre los demás (Efecto competitivo), obtenidos tanto con los testigos centrales como con los laterales. Los valores de cada parámetro de crecimiento de los distintos HE se enlazan con líneas discontinuas para indicar que los datos son independientes. Los valores negativos indican respuestas o efectos de estimulación. Se observan patrones contrarios entre los efectos y las respuestas competitivas.

6.2.2.5 Índices de dominancia

Cada HE interactuó con todos los otros de formas distintas, aunque la interacción mayoritaria fue el bloqueo mutuo, en la que los HE enfrentados se detuvieron al entrar en contacto (interacción 3:3 en la **Tabla 4**). El crecimiento del micelio de algunos HE sobre el de otros (desarrollo de micelio invasor) también fue una respuesta frecuente (interacciones calificadas como 5:2 y 6:1), en tanto que solo pocos HE se inhibieron mutuamente a una distancia mayor de 2 mm (interacción 4:4) cuando crecieron en PDA, por ejemplo *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 con *Co. gloeosporioides* Gpo. 2, *Paecilomyces* sp. con *Co. gloeosporioides* Gpo. 1, y *Paecilomyces* sp. con *Xylaria* Gpo. 3, mientras que esta interacción no fue observada en PDA+EC. Finalmente, solo *Xylaria* Gpo. 2 desarrolló rizomorfos en PDA+EC, los cuales atravesaron el borde (interacción 4:3) o casi en su totalidad (interacción 5:3) a los HE de su mismo género (**Tabla 4**).

Tabla 5. Interacciones entre los hongos endófitos a 45 días de iniciado el bioensayo

		HE B																	
		PDA									PDA + EC								
HE A		1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1								3:3	47.2%									3:3	47.2%
2		3:3						4:4	8.3%		3:3							4:4	0.0%
3		3:3	3:3					4:3	2.8%		3:3	3:3						4:3	8.3%
4		3:3	3:3	3:3				5:3	0.0%		3:3	3:3	3:3					5:3	2.8%
5		3:3	3:3	3:3	4:4			5:2	33.3%		3:3	3:3	3:3	3:3				5:2	11.1%
6		6:2	5:2	5:2	5:2	5:2		6:1	8.3%		6:2	6:2	6:2	6:2	6:2			6:1	30.6%
7		6:2	5:2	5:2	5:2	5:2	3:3				6:2	6:2	5:2	6:2	6:2	4:3			
8		5:2	6:2	5:2	5:2	5:2	3:3	3:3			6:2	5:2	6:2	5:2	5:2	3:3	3:3*		
9		3:3	3:3	3:3	4:4	3:3	3:4*	3:3	4:4		3:3	3:3	3:3	3:3	3:3	3:4*	3:3	3:4	
A vs B		3:3		4:4		4:3		5:3		5:2		6:1							

En las casillas se muestra la moda de los puntos obtenidos por cada HE en las interacciones por pares (A vs B). Los dos recuadros muestran los porcentajes en que se presentó cada tipo de interacción en el total de las interacciones, mientras que los dibujos de la parte inferior de la tabla, ilustran las características morfológicas de cada tipo de interacción (A vs B). *Las colonias de los HE A y B están invertidas.

Pese a que los I_D variaron entre HE, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en PDA, pero sí fueron encontradas en PDA+EC (**Fig. 12**). En ambos medios de cultivo, los HE con mayores I_D fueron los del género *Xylaria*, seguidos por *Paecilomyces* sp. Mientras que los HE de los géneros *Colletotrichum* y *Cryptosporiopsis* sp., así como *G. cingulata*, tuvieron bajos I_D.

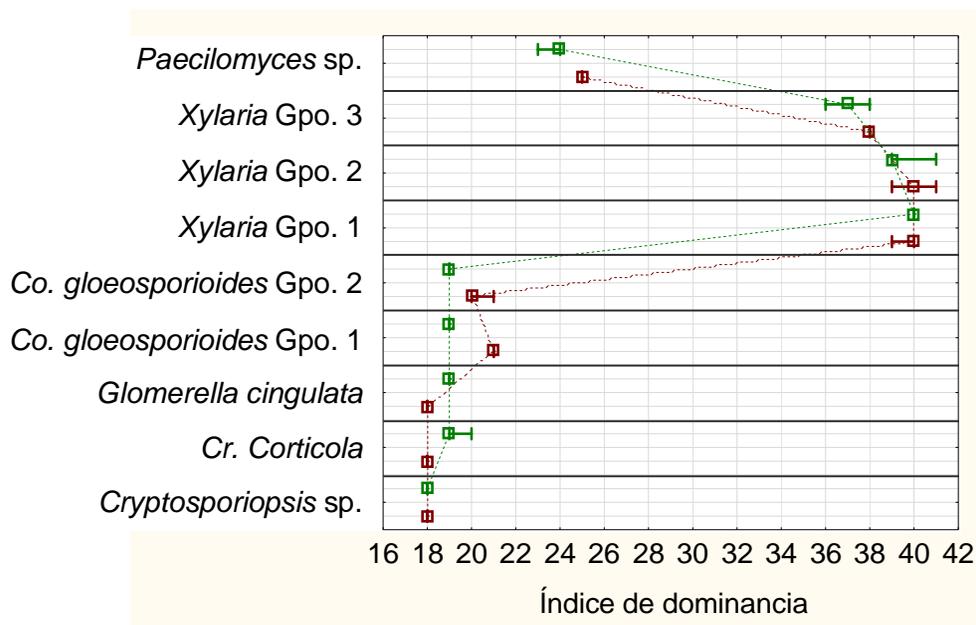


Fig. 12. Gráfica de los I_D de cada hongo endófito. Los datos se muestran con la mediana. El análisis de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los I_D de los HE en PDA. En PDA+EC se encontró que al menos la mediana de 1 HE fue diferente ($H= 25.3$ y $p= 0.0014$). Los I_D de los HE se enlazan con líneas discontinuas para indicar que los datos son independientes.

El análisis de correlación no mostró una relación lineal entre los índices de dominancia de los HE y la frecuencia de aislamiento de los mismos a partir de las hojas de los cafetos de 'El Mirador' ($p \geq 0.05$, ver gráficos de correlación en **ANEXO XIa**) indicando que ambos parámetros son independientes.

6.2.3 Bioensayos de interacción complementarios

6.2.3.1 Bioensayo de captura secundaria de recursos y evaluación de la capacidad de reemplazo

Cuatro de los nueve HE evaluados colonizaron significativamente el área previamente ocupada por otros HE, los 3 del género *Xylaria* y *Paecilomyces* sp.; además, estos 4 HE no fueron invadidos por los demás, ni siquiera, por ellos mismos. En cambio, *G. cingulata*, las dos cepas de *Cryptosporiopsis* y las dos de *Colletotrichum*, no ocuparon el área donde crecieron previamente otros HE, y hubo casos, en los que los inóculos de éstos 3 HE fueron cubiertos por los Colonizadores 1 (C1) (**Tabla 5**). Es importante mencionar, que *Xylaria* Gpo. 2 fue el único HE que colonizó el área ocupada por los HE de los géneros *Glomerella*, *Cryptosporiopsis* y *Colletotrichum*, y frecuentemente, capturó una mayor superficie previamente ocupada por ellos.

Tabla 6. Resultados del bioensayo de captura secundaria de recursos de los hongos endófitos

		Colonizadores 1 (C1)								Total	
		1(<i>Cryptosp. sp.</i>)	2 (<i>Cryptosp. corticola</i>)	3 (<i>Glomerella cingulata</i>)	4 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 1</i>)	5 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 2</i>)	6 (<i>Xylaria Gpo. 1</i>)	7 (<i>Xylaria Gpo. 2</i>)	8 (<i>Xylaria Gpo. 3</i>)		9 (<i>Paecilom. sp.</i>)
C2	1	X	0.58 ± 0.07	0.55 ± 0.05	0.42 ± 0.19	0.61 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.35 ± 0.24
	2	0.61 ± 0.03	X	0.52 ± 0.10	0.31 ± 0.00	0.41 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.22
	3	0.49 ± 0.02	0.52 ± 0.05	χ	0.33 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.29 ± 0.20
	4	0.46 ± 0.03	0.68 ± 0.02	0.52 ± 0.03	χ	0.41 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.39 ± 0.06	0.36 ± 0.22
	5	0.37 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	χ	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.22 ± 0.16
	6	17.83 ± 0.05***	2.05 ± 0.41	12.13 ± 0.80***	13.62 ± 1.38***	6.67 ± 1.06***	χ	0.32 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.47 ± 0.01	6.66 ± 7.02
	7	13.31 ± 0.33***	13.33 ± 4.56***	14.28 ± 1.18***	16.47 ± 3.72***	5.46 ± 2.52***	0.37 ± 0.02	χ	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	7.98 ± 7.08
	8	5.56 ± 0.22***	1.10 ± 0.12	6.04 ± 0.62***	7.15 ± 0.30***	3.79 ± 1.30**	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.00	χ	0.31 ± 0.00	3.05 ± 2.93
	9	2.36 ± 0.10	3.55 ± 1.68*	4.48 ± 2.40***	8.36 ± 0.87***	2.84 ± 0.60	0.00 ± 0.00	1.19 ± 0.43	0.31 ± 0.00	χ	2.89 ± 2.70

Los resultados muestran los crecimientos de los HE como colonizadores secundarios (C2) en cm² (Media ± Desviación Estándar). Los asteriscos (*) indican las diferencias significativas entre el área de los C2 al inicio del bioensayo (tamaño del inóculo= 3.14 mm²) y las áreas obtenidas al final del bioensayo (p≤ 0.00 ver **ANEXO XII**). Los valores menores a 0.31 indican que el inóculo del C2 fue cubierto por el C1.



Fig. 13. Ejemplos de la captura secundaria de recursos de los hongos endófitos. Los números de cada caja Petri (Xⁿ) indican a los HE inoculados, donde: X= C1 y n= C2. El apóstrofe indica que es la réplica 2. (1) *Cryptosporiopsis* sp., (2) *Cr. corticola*, (4) *Co.gloeosporioides* Gpo. 1, (5) *Co. gloeosporioides* Gpo. 2, (6) *Xylaria* Gpo. 1, (7) *Xylaria* Gpo. 2 y (9) *Paecilomyces* sp. La explicación se encuentra en el texto.

Dentro de los HE invadidos, *Cr. corticola*, fue el más resistente, pues solo fue cubierto por *Xylaria* Gpo. 2 y *Paecilomyces* sp. Otro HE resistente fue *Co. gloeosporioides* Gpo. 2, el cual fue invadido por los tres HE del género *Xylaria*, aunque las áreas invadidas fueron menores a las áreas cubiertas de otros HE como *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 y *Cryptosporiopsis* sp. (**Fig. 13**). Los porcentajes de inhibición, mostraron que los HE con mayor respuesta competitiva (principales colonizadores C2 de recursos ocupados por otros HE) fueron, *Xylaria* Gpo. 2, seguido por *Xylaria* Gpo. 1, *Xylaria* Gpo. 3 y *Paecilomyces* sp.; mientras que los HE de los géneros *Colletotrichum*, *Cryptosporiopsis* y *Glomerella* mostraron bajas respuestas competitivas. En cambio, los HE con mayor efecto competitivo (los que como C1 inhibieron más a los C2), fueron los 3 HE del género *Xylaria*, *Paecilomyces* sp., *Cr. corticola* y *Co. gloeosporioides* Gpo. 2; mientras que los HE que mostraron un bajo efecto competitivo, fueron *Cryptosporiopsis* sp., *G. cingulata* y *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 (**Fig. 14**).

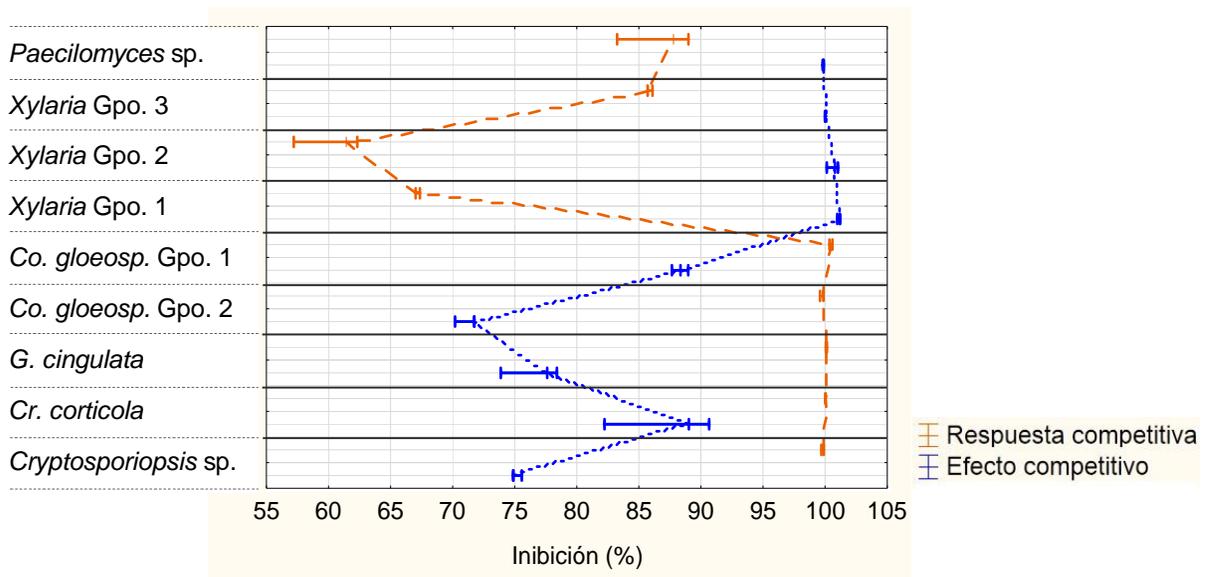


Fig. 14. Gráfica de respuesta competitiva y efecto competitivo de la captura secundaria de los hongos endófitos C2. En el eje de las abscisas (vertical – gráfica invertida) se enlistan los HE y en el de las ordenadas (horizontal), los porcentajes de inhibición (PI) del crecimiento de los HE. Los valores se muestran con los cuartiles del 25 y el 75% de la mediana. La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre las medianas de los HE para el efecto competitivo ($H= 25.28$ y $p= 0.0014$) y para la respuesta competitiva ($H= 25.33$ y $p= 0.014$).

El análisis de correlación de Spearman mostró una relación inversamente proporcional entre las respuestas competitivas y entre los efectos competitivos de los

HE ($r = -0.69$, $p = 0.000073$), pero no mostró una relación lineal entre alguno de estos dos parámetros y la frecuencia de aislamiento de los HE ($p \geq 0.05$, ver gráficos de correlación en **ANEXO Xib**), indicando que son independientes.

Al terminar este bioensayo se hicieron subcultivos a partir de las cajas Petri en las que se había observado una captura secundaria de recursos exitosa, por lo tanto, cada inóculo tomado de éstas cajas contenía el micelio de dos HE (**Fig. 15**): al HE C2 que capturó los recursos ocupados por otros HE (comportándose como un hongo invasor) y al HE C1 que fue invadido por el primero (hongo invadido). Los principales HE invasores lograron desplazar a los invadidos en un 46.25% de los casos. El HE invasor que más reemplazó a otros fue *Xylaria* Gpo. 2, seguido por *Xylaria* Gpo. 1. De los HE invadidos, *G. cingulata* y los del género *Cryptosporiopsis* fueron reemplazados con más frecuencia por los invasores. Por otra parte, en el 17.5% de los casos, algunos HE crecieron antes que el HE invasor (reemplazo parcial - P), por lo que cubrieron primero la caja Petri; sin embargo, a los 20 días, algunos de estos HE ya habían sido cubiertos por el invasor. Todos los HE invasores reemplazaron solo parcialmente a algunos de los hongos que invadieron, pero esto fue mucho más frecuente cuando *Xylaria* Gpo. 3 fue el invasor, principalmente, al crecer con *Cr. corticola* y *G. cingulata* (**Tabla 6**).

Tabla 7. Resultados de la capacidad de reemplazo de un hongo endófito por otro

Colonizador 1	cP	Colonizador 2							
		<i>Xylaria</i> G1		<i>Xylaria</i> G2		<i>Xylaria</i> G3		<i>Paecilomyces</i> sp.	
		↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	1	R	R	R	R	R	R	E	E
	2	R	R	R	R	R	R	E	E
<i>Cr. corticola</i>	1	P	R	R	R	S	P	E	E
	2	P	R	R	R	S	P	E	E
<i>G. cingulata</i>	1	0	R	R	R	S	P	E	E
	2	R	R	R	R	S	P	E	E
<i>Co. gloeosp. Gpo. 1</i>	1	0	0	R	R	P	S	P	P
	2	R	0	R	R	S	S	P	R
<i>Co. gloeosp. Gpo. 2</i>	1	R	R	R	R	S	S	E	R
	2	P	P	S	P	S	P	E	R

Las flechas indican si el inóculo se colocó con el micelio hacia arriba ↑ o hacia abajo ↓, a los 5 días de revisión. R= reemplazo; E= entremezclado; P= reemplazo parcial; S= No hubo reemplazo y 0= No creció ninguno de los dos HE; cP= caja Petri 1 o 2.

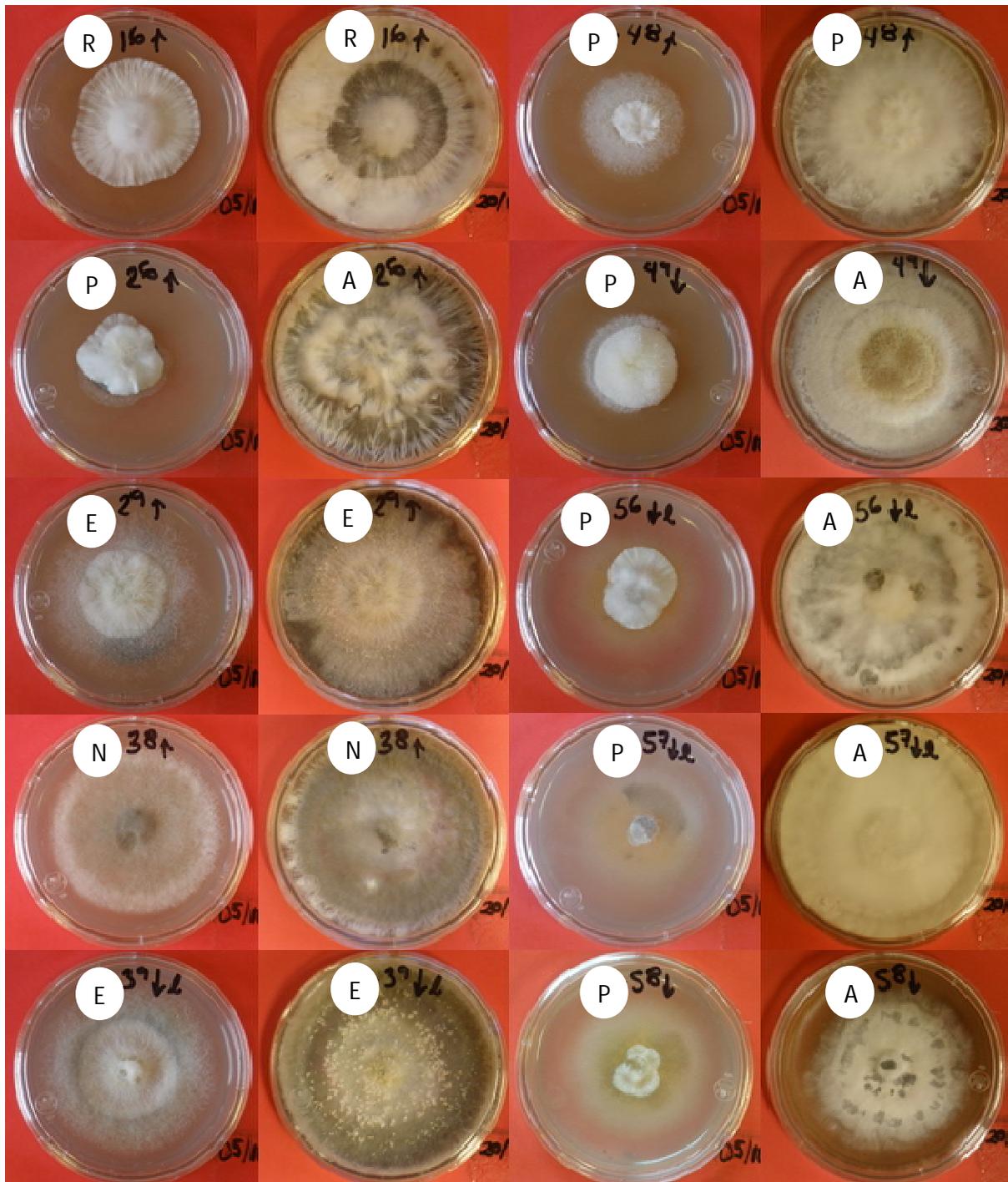


Fig. 15. Ejemplos de la evaluación del reemplazo de un hongo endófito por otro. Los números de las cajas Petri indican qué HE estaban juntos en los cultivos de los que se obtuvieron los inóculos: X^n , donde: X = no. del C1 invadido y n = no. del C2 invasor: (1) *Cryptosporiopsis* sp., (2) *Cr. corticola*, (3) *G. cingulata*, (4) *Co. gloeosporioides* Gpo. 1, (5) *Co. gloeosporioides* Gpo. 2, (6) *Xylaria* Gpo. 1, (7) *Xylaria* Gpo. 2, (8) *Xylaria* Gpo. 3 y (9) *Paecilomyces* sp.; las flechas (↑↓) indican la colocación hacia arriba o abajo del inóculo. Las letras dentro del círculo blanco indican: reemplazo total (R) o parcial (P) del hongo invadido por parte del invasor; entremezclado de los micelios de ambos hongos (E), y el crecimiento normal (N) o anormal (A) del HE a los 20 días. La primera y la tercer columna de fotografías muestran la emersión de los HE a los 10 días, y la segunda y cuarta columna, el estado de las cajas Petri a los 20 días.

Por otro lado, también se presentó un entremezclado entre los micelios en el 17.5% de los casos, lo cual se observó particularmente cuando *Paecilomyces* sp. fue el HE invasor y los HE del género *Cryptosporiopsis*, los invadidos.

Una observación interesante fue que en el 13.75% de los casos, hubo HE que no fueron reemplazados por los invasores, y sólo ellos crecieron en el nuevo medio de cultivo. Sin embargo, a los 20 días ya se habían desarrollado algunos invasores en estas cajas Petri y solo el 6.25% siguieron sin el invasor. Contrario a lo esperado, esta respuesta fue más frecuente cuando *Xylaria* Gpo. 3 fue el HE invasor, ya que en muchos casos solo el invadido creció, particularmente, cuando el invadido era un HE del género *Colletotrichum*, los cuales crecieron primero en el medio, indicando que no fueron reemplazados. Finalmente, hubo una respuesta que no se esperaba, pues en el 5% de los casos ningún HE emergió del inóculo colocado en la caja Petri, pese a que los micelios se veían frescos, y aunque a los 20 días ya había emergido alguno de los dos, en el 3.75% de los casos no creció ninguno a los 20 días.

6.2.3.2 Bioensayo de crecimiento en PDA con filtrado de medios de cultivo

El filtrado de cada HE añadido al medio de cultivo alteró significativamente el crecimiento de al menos un HE en ambas concentraciones utilizadas (25% y 50%) en comparación con el testigo (PDA) (**Tabla 7**). Con la concentración del 25%, el 41.66% de los HE fue inhibido por los filtrados de algunos HE, y el 4.1% de los HE fue estimulado por ellos. *Xylaria* Gpo. 1 fue inhibido por mayor cantidad de filtrados de los HE, seguido por *Co. gloeosporioides* Gpo. 2, *Cr. corticola* y *Xylaria* Gpo. 3; los HE inhibidos por la menor cantidad de fueron: *Cr. corticola*, *Xylaria* Gpo. 2, *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 y *Paecilomyces* sp. Por el contrario, *Xylaria* Gpo. 3 fue estimulado al crecer con el filtrado de *Paecilomyces* sp., mientras que *Paecilomyces* sp., fue estimulado al crecer con los filtrados de *Cr. corticola* y *Xylaria* Gpo. 2. Con la concentración del 50%, se inhibió significativamente el crecimiento del 73.61% de los HE. En esta concentración, *Co. gloeosporioides* Gpo. 2, fue el único HE inhibido por el filtrado de todos los demás, seguido por *Co. gloeosporioides* Gpo. 1, *Xylaria* Gpo. 1 y *Xylaria* Gpo. 3; mientras que *Paecilomyces* sp., y los HE del género *Cryptosporiopsis* fueron inhibidos por un menor número de filtrados de los HE.

Tabla 8. Crecimiento de los HE, al ser cultivados en PDA + filtrado del caldo de cultivo de los demás hongos endófitos

HE	(Testigo) PDA	Filtrado de HE								
		1 (<i>Cryptosp. sp.</i>)	2 (<i>Cryptosp. corticola</i>)	3 (<i>Glomerella cingulata</i>)	4 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 1</i>)	5 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 2</i>)	6 (<i>Xylaria Gpo. 1</i>)	7 (<i>Xylaria Gpo. 2</i>)	8 (<i>Xylaria Gpo. 3</i>)	9 (<i>Paecilom. sp.</i>)
Concentración 25%										
1	19.13 ± 0.68	X	18.52 ± 0.32	19.02 ± 0.10	19.01 ± 0.14	16.69 ± 0.17***	16.53 ± 0.74***	17.23 ± 0.48**	15.67 ± 0.64***	18.61 ± 0.11
2	18.41 ± 1.33	17.88 ± 1.18	X	19.14 ± 0.10	15.28 ± 0.56	16.33 ± 1.08	16.81 ± 0.43	21.06 ± 0.25	17.18 ± 2.42	16.48 ± 2.35
3	22.35 ± 0.29	17.52 ± 1.26***	15.68 ± 0.28***	X	17.25 ± 0.07***	17.49 ± 0.58***	13.06 ± 0.54***	20.05 ± 0.12**	20.87 ± 1.37	22.34 ± 0.13
4	17.93 ± 0.51	15.93 ± 0.53**	17.36 ± 0.27	16.48 ± 0.16	X	16.59 ± 0.16	16.84 ± 0.88	17.74 ± 1.24	13.51 ± 0.52***	17.62 ± 0.47
5	17.92 ± 0.12	14.68 ± 0.28***	15.31 ± 0.23***	14.56 ± 0.18***	14.30 ± 0.06***	X	15.08 ± 0.08***	18.22 ± 0.18	15.22 ± 0.48***	18.01 ± 0.19
6	17.12 ± 0.93	13.76 ± 0.08***	15.92 ± 0.15	11.48 ± 0.08***	13.51 ± 1.77***	14.13 ± 0.46***	X	14.16 ± 0.40***	14.49 ± 0.12**	15.44 ± 0.25
7	10.14 ± 0.62	9.12 ± 0.52	7.73 ± 0.23***	9.66 ± 0.41	9.26 ± 0.38	10.31 ± 0.07	9.52 ± 0.55	X	9.52 ± 0.50	9.64 ± 0.45
8	6.50 ± 0.40	5.45 ± 0.11***	5.57 ± 0.04***	5.86 ± 0.08**	5.91 ± 0.12*	5.20 ± 0.22***	6.14 ± 0.04	6.81 ± 0.07	X	7.10 ± 0.07*
9	4.31 ± 0.18	4.23 ± 0.08	4.64 ± 0.14*	4.41 ± 0.06	4.52 ± 0.12	4.29 ± 0.03	4.28 ± 0.18	4.88 ± 0.10***	4.45 ± 0.15	X
Concentración 50%										
1		X	17.75 ± 0.07	17.49 ± 0.17*	13.74 ± 0.67***	17.05 ± 0.04**	16.16 ± 0.16***	18.61 ± 0.14	13.58 ± 1.27***	17.03 ± 0.59**
2		15.74 ± 0.59	X	15.68 ± 0.19	11.91 ± 2.89***	12.66 ± 0.52**	13.83 ± 1.52*	20.20 ± 0.35	13.73 ± 2.67*	15.01 ± 0.53
3		18.99 ± 0.27***	18.09 ± 0.20***	X	16.92 ± 0.16***	15.72 ± 0.91***	13.87 ± 0.20***	20.92 ± 0.08	20.80 ± 0.35	22.31 ± 0.29
4		14.82 ± 0.23***	15.00 ± 0.25***	15.75 ± 0.32**	X	14.11 ± 0.06***	15.72 ± 0.06**	18.51 ± 0.21	12.60 ± 0.08***	15.67 ± 1.01**
5		11.44 ± 0.06***	12.04 ± 0.22***	12.03 ± 0.15***	7.49 ± 0.67***	X	12.01 ± 0.04***	16.76 ± 0.32***	15.49 ± 0.17***	16.98 ± 0.13**
6		10.96 ± 0.23***	12.31 ± 1.14***	12.31 ± 0.35***	3.90 ± 0.08***	10.52 ± 0.39***	X	12.59 ± 0.44***	11.82 ± 1.02***	17.88 ± 0.12
7		9.27 ± 0.37	8.91 ± 0.41*	9.62 ± 0.19	5.75 ± 0.10***	8.45 ± 0.26***	7.82 ± 0.07***	X	8.77 ± 0.32**	8.12 ± 0.43***
8		5.19 ± 0.06***	5.16 ± 0.06***	5.44 ± 0.04***	4.48 ± 0.03***	4.50 ± 0.09***	5.52 ± 0.02***	6.51 ± 0.41	X	5.98 ± 0.18*
9		4.18 ± 0.06	4.33 ± 0.09	4.16 ± 0.15	3.43 ± 0.02***	3.80 ± 0.07***	4.02 ± 0.05	4.44 ± 0.06	3.85 ± 0.11***	X

Resultados del ANOVA de una vía ($\alpha = 0.05$) que compara el crecimiento final de cada HE en PDA, con el obtenido en PDA mas el filtrado del medio de cultivo acuoso de los demás HE a dos concentraciones (25 y 50%) ($p \leq 0.00$, ver **ANEXO XIII**). Los valores se presentan con la desviación estándar de la media (media \pm DS). HE= Hongo endófito evaluado; * diferencias significativas con respecto del testigo (PDA) que es el mismo para las dos concentraciones de filtrado utilizadas.

Los porcentajes de inhibición (PI) de la mayoría de los HE fueron dependientes de las dosis de los filtrados añadidos al medio de cultivo (a mayor concentración, mayores PI), tanto en los efectos alelopáticos de los filtrados, como en las respuestas a estos filtrados. Las respuestas a los alelopáticos de los HE mostraron diferencias significativas, dependiendo de los filtrados, en ambas concentraciones de los mismos (**Fig. 16**). Con la concentración del 25%, los HE más inhibidos por los filtrados de los demás fueron *G. cingulata*, *Xylaria* Gpo. 1 y *Co. gloeosporioides* Gpo 2; en cambio los HE menos inhibidos fueron *Cr. corticola*, *Xylaria* Gpo. 3, *Xylaria* Gpo. 2, *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 y *Cryptosporiopsis* sp., con PI menores al 10%. *Paecilomyces* sp. fue el único HE estimulado por los filtrados de algunos otros. Con la concentración del 50%, los HE más inhibidos fueron *Xylaria* Gpo. 1 y *Co. gloeosporioides* Gpo. 2, pues sus crecimientos se redujeron en más del 25%, mientras que el HE menos inhibido por los filtrados, fue *Paecilomyces* sp., con una reducción de su crecimiento menor al 10%.

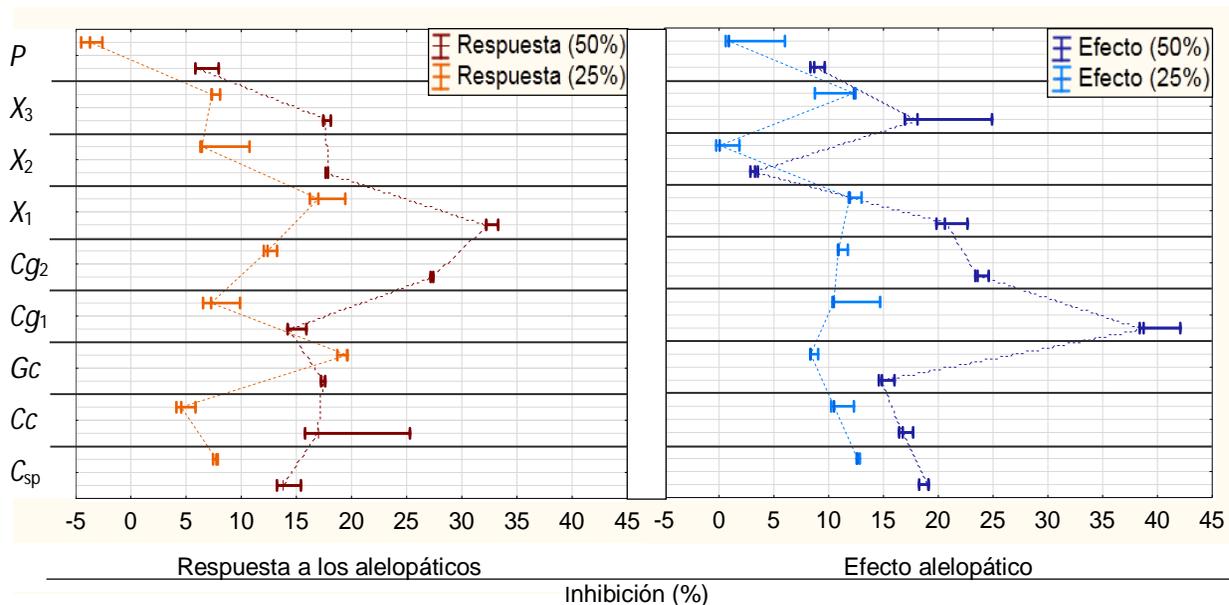


Fig. 16. Gráficas de respuesta y efecto de los HE en el bioensayo con los filtrados de los demás hongos. En el eje de las abscisas (vertical, gráfica invertida) están las iniciales de los HE, y en el de las ordenadas, los porcentajes de inhibición (PI) que cada HE experimentó debido a los filtrados (respuesta a los alelopáticos) o que el filtrado de cada HE ocasionó en los demás HE (efecto alelopático). La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre las medianas de los PI de los HE para los efectos alelopáticos de los filtrados a la concentración del 50% ($H= 24.39$ $p= 0.0020$) y del 25% ($H= 20.49$ $p= 0.0086$), así como en las respuestas de los HE a los filtrados de los demás a la concentración del 50% ($H= 23.75$ $p= 0.0025$) y del 25% ($H= 23.72$ $p= 0.0025$). Las líneas discontinuas indican que los datos enlazados son independientes.

También se encontraron diferencias significativas entre los efectos alelopáticos de los HE en ambas concentraciones de los filtrados. Con la concentración del 25%, la mayoría de los filtrados inhibieron de un 5 a un 10% el crecimiento de los demás, mostrando en general, un bajo efecto alelopático; *Paecilomyces* sp. y *Xylaria* Gpo. 2 mostraron un efecto alelopático cercano a cero. Con la concentración del 50%, el filtrado de *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 mostró el efecto alelopático más alto con un *PI* promedio de 39.7 sobre el crecimiento de otros HE; los filtrados de *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 y *Xylaria* Gpo. 1, inhibieron en 23.9% y 21% el crecimiento de otros HE, y los filtrados de *Cryptosporiopsis* sp., *C. corticola* y *Xylaria* Gpo. 3, inhibieron en 12.7, 11 y 11.1% respectivamente el crecimiento de otros HE; en tanto que los filtrados de *Xylaria* Gpo. 2, *Paecilomyces* sp. y *G. cingulata* fueron los de menor efecto alelopático.

El análisis de correlación, no mostró una relación entre los efectos alelopáticos de los filtrados y las respuestas de los HE hacia los filtrados de los demás en ambas concentraciones (concentración del 50%, $r = 0.211$ y concentración del 25%, $r = 0.427$, $p \leq 0.05$) indicando que el efecto ejercido por el filtrado de cada HE sobre los demás es independiente de la respuesta mostrada por cada HE a los filtrados de los demás. Sin embargo, se encontró una relación lineal significativa entre la frecuencia de aislamiento de los HE y la respuesta de los HE a los alelopáticos de los filtrados con la concentración del 25% ($r_s = 0.78$, $r_s^2 = 0.61$, $p = 0.013$) (ver **ANEXO XI**).

6.2.4 Jerarquización de los hongos endófitos de acuerdo a su desempeño general

Restando el promedio de las respuestas competitivas del promedio de los efectos competitivos que los HE mostraron en los bioensayos de captura primaria y secundaria de recursos; asimismo, considerando el efecto alelopático de los filtrados del medio de cultivo, y la respuesta de cada HE a estos filtrados, se obtuvo la jerarquización del desempeño de los HE (**Fig. 17**).

Los HE que mostraron el mejor desempeño fueron *Xylaria* Gpo. 3, *Xylaria* Gpo. 1, *Xylaria* Gpo. 2 y *Paecilomyces* sp. debido, principalmente, a que mostraron un alto efecto competitivo sobre los otros HE, así como una alta respuesta competitiva o resistencia a la inhibición ocasionada por el micelio de los demás; en contraste, los HE con un desempeño más pobre, fueron *Cr. corticola*, *G. cingulata*, *Co. gloeosporioides*

Gpo. 2, *Cryptosporiopsis* sp. y *Co. gloeosporioides* Gpo. 1, debido a su baja respuesta competitiva o alta susceptibilidad a la inhibición ocasionada por los demás.

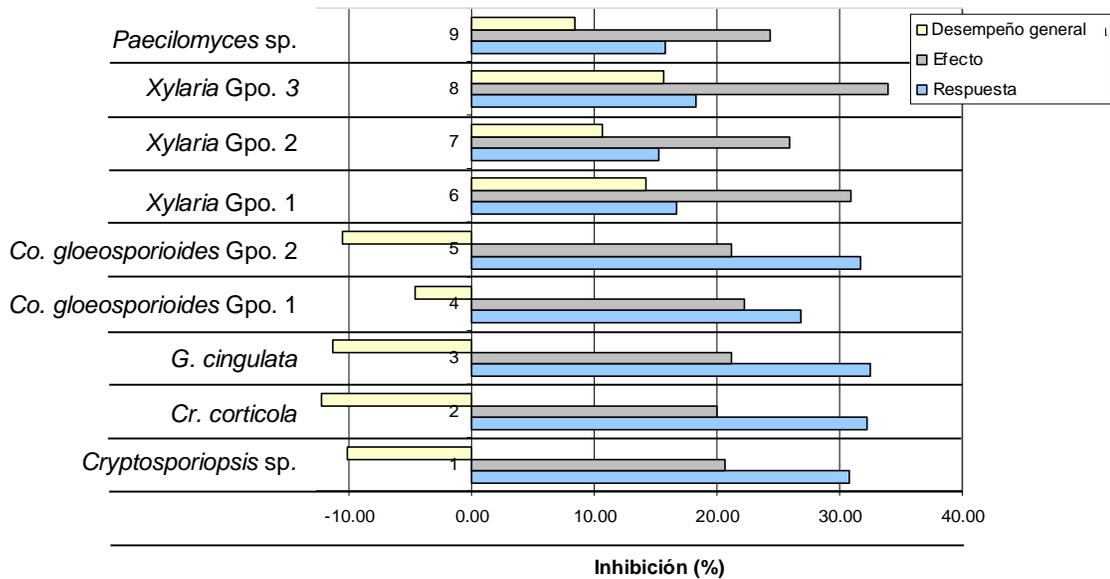


Fig. 17. Jerarquización de la capacidad competitiva y potencial alelopático de los hongos endófitos. Los valores negativos indican una bajo desempeño general de los HE.

6.3 Inoculación de hongos endófitos en hojas de plantas de café

Los bioensayos en los que se inocularon hojas unidas a las plantas con las suspensiones elaboradas con micelio fresco de los HE, mostraron porcentajes de colonización muy bajos, por lo que únicamente se calculó el porcentaje de colonización de las plantas enteras. En cambio, con las suspensiones de esporas se obtuvieron porcentajes de colonización más altos tanto en hojas desprendidas como en hojas unidas a las plantas. Para exponer los resultados de estos bioensayos, se ordenó a los HE de acuerdo al desempeño que mostraron en los bioensayos de interacción (**Fig. 17**).

6.3.1 Colonización de plantas inoculadas con suspensión de micelio

Los HE que emergieron de los segmentos de las hojas inoculadas con la suspensión ligera a base de micelio (25 mg/mL), fueron muy escasos (<0.5%) por lo que no se muestran los resultados, en cambio, con la suspensión concentrada de micelio (50 mg/mL), se recuperaron 5 de los 9 HE inoculados en las hojas de las plantas de café, aunque con diferentes porcentajes de colonización (**Tabla 8**).

Los HE recuperados de los tejidos foliares incluyeron principalmente a los tres hongos del género *Cryptosporiopsis*, y en menor grado a *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 y a *Paecilomyces* sp.; mientras que, contrario a lo esperado, los HE del género *Xylaria*, con mayor capacidad competitiva, no fueron recuperados de los segmentos de hojas, así como tampoco se logró aislar nuevamente a *Co. gloeosporioides* Gpo. 1.

En algunos HE se observó que el porcentaje de colonización en la planta (PC_{planta}) aumentó con el tiempo, aunque en el periodo de 30 días se detectó una baja en la colonización de 4 hongos establecidos como endófitos con relación al periodo de 18 días. Combinando los 4 periodos de revisión, los HE con mayor PC_{planta} fueron *Cryptosporiopsis* sp., seguido de *G. cingulata* y *Cr. corticola*, mientras que *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 y *Paecilomyces* sp., mostraron los menores PC_{planta} .

Tabla 9. Porcentaje de colonización de los HE en plantas inoculadas con suspensión de micelio, a diferentes tiempos después de la inoculación (60 segmentos/planta)

	Días post-inoculación				total
	18	30	60	90	
<i>Xylaria</i> Gpo. 3	0	0	0	0	0.0
<i>Xylaria</i> Gpo. 1	0	0	0	0	0.0
<i>Xylaria</i> Gpo. 2	0	0	0	0	0.0
<i>Paecilomyces</i> sp.	6.9	3.7	5	6.7	5.6
<i>Co. gloeosporioides</i> Gpo. 1	0	0	0	0	0.0
<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	13.2	10	26.7	35	21.2
<i>G. cingulata</i>	10.5	5.1	11.7	21.7	12.3
<i>Co. gloeosporioides</i> Gpo. 2	1.3	0	8.3	10	4.9
<i>Cr. Corticola</i>	5.2	8.1	18.3	15	11.7

6.3.2 Colonización de plantas inoculadas con suspensión de micelio y distintas técnicas de inoculación

Con todos los procedimientos de inoculación se detectó el establecimiento de HE en las hojas de las plantas de café, aunque con diferente eficacia. Con el tratamiento 2 (suspensión concentrada (SC) + tween20 en hojas intactas), se establecieron como endófitos cinco de los nueve evaluados, mientras que con los tratamientos 3 (SC + agar en hojas intactas), 1(SC en hojas intactas) y 4 (SC en hojas perforadas), se detectó

la presencia de 4, 3 y 2 HE distintos respectivamente, sin embargo, los de mayor porcentaje de colonización fueron favorecidos por el tratamiento 1 (**Tabla 9**).

Cryptosporiopsis sp. y *Cr. corticola* fueron los únicos HE que se aislaron de los segmentos de hojas tratadas con todos los tratamientos de inoculación; mientras que *Paecilomyces* sp. se aisló de las hojas con tres de los tratamientos (1, 2 y 3), *G. cingulata* se aisló de dos tratamientos (2 y 3) y *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 de un solo tratamiento (2). En todos los tratamientos de inoculación, *Cryptosporiopsis* sp., fue el HE con mayor porcentaje de colonización seguido por *Cr. corticola*.

Tabla 10. Porcentajes de colonización para cada tratamiento de inoculación (20 segmentos por hoja/60 segmentos por tratamiento)

HE	Tratamientos de inoculación				total
	1	2	3	4	
<i>Xylaria</i> Gpo. 3	0	0	0	0	0
<i>Xylaria</i> Gpo. 1	0	0	0	0	0
<i>Xylaria</i> Gpo. 2	0	0	0	0	0
<i>Paecilomyces</i> sp.	5	3.3	3.3	0	2.9
<i>Co. gloeosporioides</i> Gpo. 1	0	1.7	0	0	0.4
<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	23.3	18.3	11.7	13.3	16.7
<i>G. cingulata</i>	0	3.3	3.3	0	1.7
<i>Co. gloeosporioides</i> Gpo. 2	0	0	0	0	0
<i>Cr. corticola</i>	10	5	3.3	1.7	5

6.3.3 Colonización de hojas desprendidas con suspensión de esporas

La comparación de los porcentajes de colonización de las hojas, considerando por separado cada factor utilizado (var. de cafeto y exposición a la luz), no mostró diferencias significativas entre los nueve HE (**Fig. 18a**); en cambio, combinando estos dos factores, se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de colonización de las hojas de los cinco HE que produjeron esporas (**Fig. 18b**). Entre los 5 HE utilizados, *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 tuvo la mayor capacidad de colonización, seguido por *Cryptosporiopsis* sp. y *G. cingulata*, mientras que *Cr. corticola* tuvo un porcentaje de colonización media, y *Paecilomyces* sp., muy baja (**Fig. 18b**).

Al analizar cada factor por separado (var. de cafeto y exposición a la luz) y considerando a todos los HE, se observó que los porcentajes de colonización de los

mismos fueron mayores en los cafetos de la var. *Typica* que en la *Bourbon*, en tanto que la exposición a la luz no fue determinante en el proceso de colonización (**Fig. 18a**).

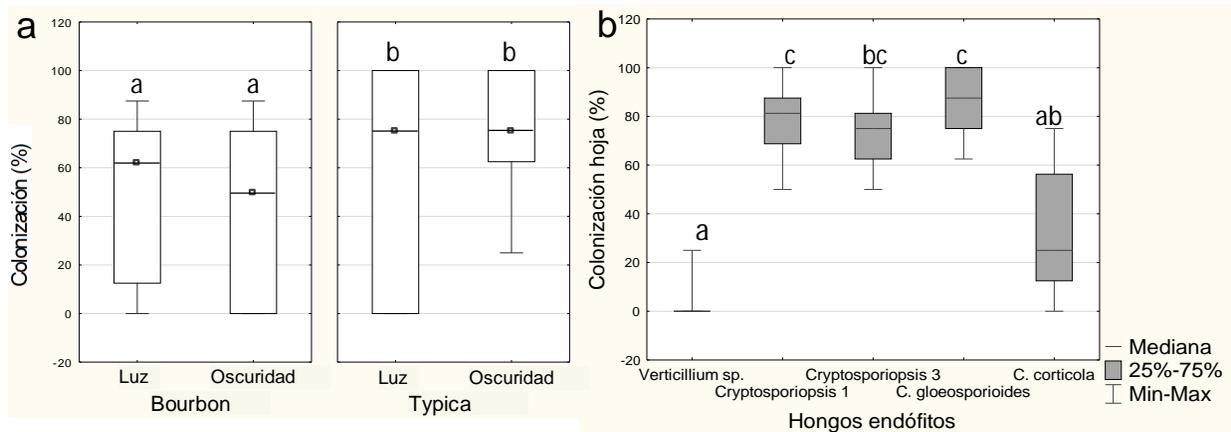


Fig. 18. Porcentaje de colonización de las hojas por los hongos endófitos (PC_{hoja}). (a) no se encontraron diferencias significativas por la exposición de la luz, pero sí por la var. de cafeto ($H= 4.11$ $p= 0.042$). (b) El análisis Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre los 5 HE que produjeron esporas combinando los factores (var. de cafeto y exposición a la luz) ($H= 42.83$ y $p= 0.00000$).

En cambio, al comparar los porcentajes de colonización que cada HE presentó en las distintas condiciones (combinación de los dos factores, efecto de la variedad del cafeto y la exposición a la luz), sobre diferentes aislados de un mismo HE, se encontraron diferencias significativas en dos de los cinco HE inoculados (**Fig. 19**).

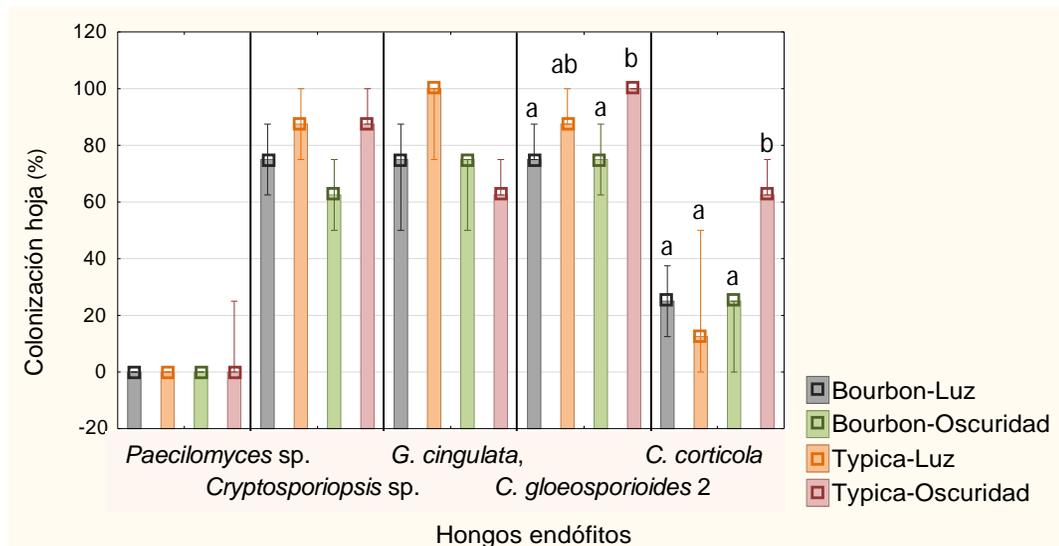


Fig. 19. Porcentaje de colonización de las hojas para cada hongo endófito (PC_{hoja}). El análisis de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre los PC_{hoja} de *Cr. corticola* según la var. de cafeto ($H= 3.97$, $p= 0.96$) y dentro de cada variedad, para la exposición a la luz ($H= 4.09$, $p= 0.43$), mientras que en *Co. gloeosporioides*, el PC_{hoja} solo tuvo diferencias significativas para la var. de cafeto ($H= 4.35$, $p= 0.036$).

Cr. corticola, mostró un mayor porcentaje de colonización en las hojas de los cafetos de la var. Typica comparado con las de la Bourbon, cuando las hojas inoculadas permanecieron en la oscuridad. *Co. gloeosporioides* Gpo. 2, también mostró un mayor porcentaje de colonización en las hojas de la var. Typica que en las de la Bourbon.

6.3.4 Colonización de plantas de café con suspensión de esporas de *Cryptosporiopsis* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* Gpo. 2

Ambos HE fueron detectados en todas las plantas inoculadas, y en general, en las hojas de las tres partes de las plantas (superior, media e inferior); sin embargo, aunque los porcentajes de colonización de los HE aparentemente fueron distintos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (**Fig. 20**).

Aún así, se observaron algunas tendencias en los porcentajes de colonización de los HE. Por ejemplo, de manera general, *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 mostró mayor capacidad de colonización que *Cryptosporiopsis* sp. (**Fig. 20a**), y considerando por separado las hojas de las distintas partes de las plantas, *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 colonizó en mayor grado las hoja medias, mientras que *Cryptosporiopsis* sp., colonizó mayoritariamente las hojas inferiores. Por lo anterior, *Cryptosporiopsis* sp. se estableció de manera más homogénea entre las distintas partes de las plantas (**Fig. 20b**), y fue el único HE que se recuperó de las tres partes de una misma planta.

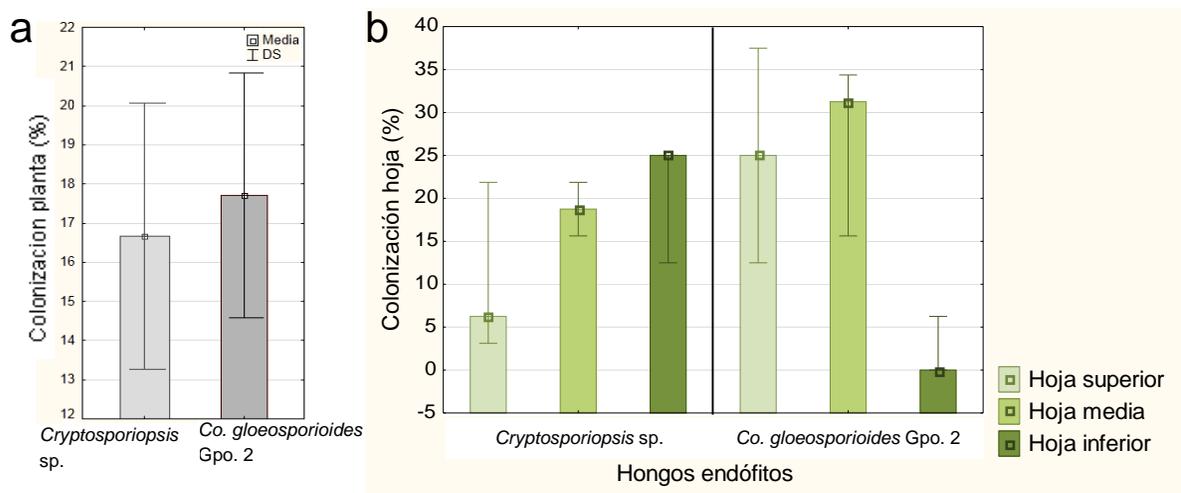


Fig. 20. Porcentajes de colonización de *Co. gloeosporioides* Gpo. 1 y *Cryptosporiopsis* sp. En la planta (*Izquierda*) y en las hojas unidas a las plantas (*Derecha*). El ANOVA no mostró diferencias significativas entre los porcentajes de colonización de los HE en la planta completa ($F= 0.030$ y $p= 0.86$), ni por la posición de las hojas dentro de las plantas ($F= 1.18$ y $p= 0.33$).

6.4 Bioensayos de hongos endófitos vs *Hemileia vastatrix*

6.4.1 Bioensayo *in vitro*. Efecto de los hongos endófitos sobre la germinación de las urediniosporas de *Hemileia vastatrix*

Algunos HE evaluados tendieron a inhibir la germinación de las urediniosporas de *H. vastatrix*, mientras que otros tendieron a estimularla; sin embargo, la mayor parte de los efectos observados no fueron estadísticamente significativos (**Fig. 21**).

La comparación de los porcentajes de germinación de las urediniosporas que se colocaron sobre el papel celofán de las cajas Petri donde los HE crecían, en relación al Testigo general (caja Petri sin HE), mostró que solo la presencia de *G. cingulata*, redujo o inhibió significativamente el porcentaje de germinación de las mismas.

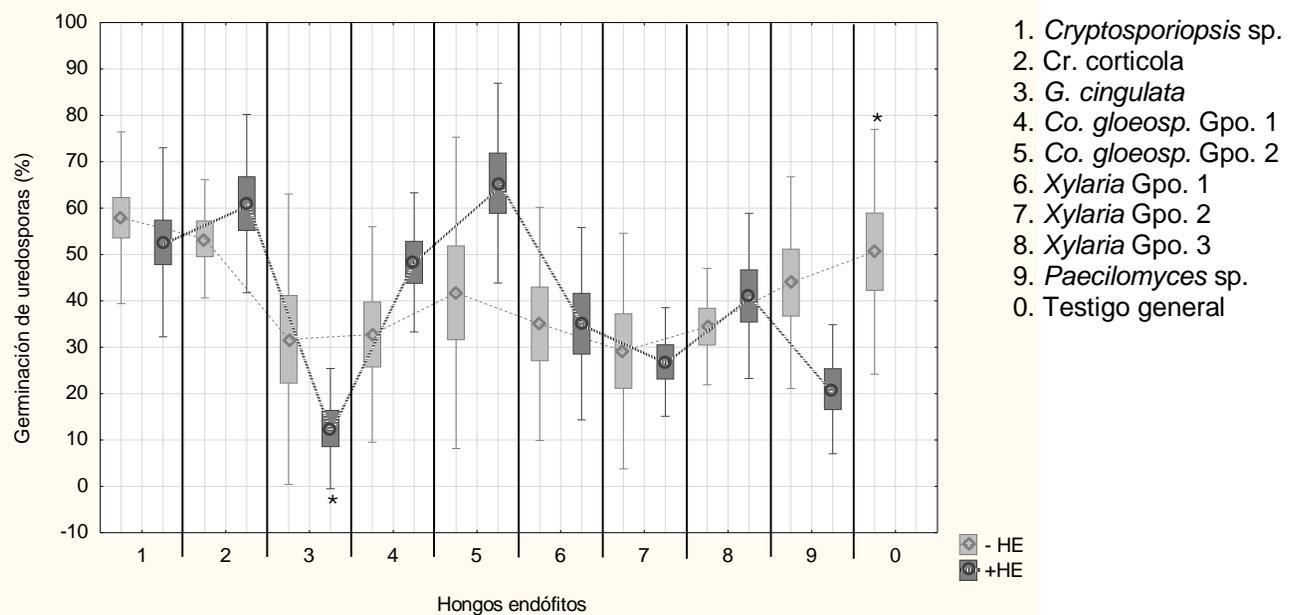


Fig. 21. Gráfico de los porcentajes de germinación de las urediniosporas de *Hemileia vastatrix* ($g_{\text{urediniosporas}}$). Los datos muestran la desviación estándar de la media. El ANOVA de dos factores mostró diferencias significativas entre los $g_{\text{urediniosporas}}$ de los diferentes HE ($F= 8.70$, $p=0.0000$), pero no entre la germinación de las esporas que crecieron sobre los HE y las que crecieron sobre la zona libre de éstos ($F= 0.017$, $p= 0.89$). *Indica las diferencias significativas entre la germinación de todos los tratamientos y el Testigo general (caja Petri sin HE). Las líneas discontinuas indican que los datos son independientes.

Por otro lado, aunque los porcentajes de germinación de las urediniosporas fueron aparentemente diferentes entre los HE evaluados, no se encontraron diferencias significativas entre las urediniosporas que germinaron sobre el papel celofán que estaba encima de los respectivos HE, y las que se colocaron sobre el celofán que se

encontraba en el área libre de micelio. Aquí, es importante mencionar que aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los casos, *G. cingulata* y *Paecilomyces* sp., tendieron a inhibir la germinación de las urediniosporas que estaban sobre ellos, mientras que los HE del género *Colletotrichum*, tendieron a estimular la germinación de las urediniosporas (**Fig. 21**).

6.4.2 Bioensayo de inoculación de los hongos endófitos y *Hemileia vastatrix* sobre hojas desprendidas

Catorce de las 40 hojas utilizadas en este bioensayo, se necrosaron completamente antes de que los síntomas de roya pudieran aparecer en las hojas inoculadas con las urediniosporas (necrosis prematura). Once de estas catorce hojas habían sido inoculadas tanto con un respectivo HE como con las urediniosporas de *H. vastatrix*, y posteriormente experimentaron necrosis, sin embargo, cuatro de las hojas necrosadas solo habían sido inoculadas con los HE (**Tabla 10**).

Otras dos hojas inoculadas solo con HE, sufrieron necrosis en al menos el 50% de su tejido y otras seis en el 20% de su tejido. De las hojas inoculadas solo con endófitos que presentaron lesiones, las más dañadas fueron las inoculadas con *G. cingulata*, *Cr. corticola*, y particularmente con *Cryptosporiopsis* sp. (**Fig. 22**); sin embargo, en casi todas las hojas, únicamente inoculadas con los distintos HE, se desarrollaron lesiones, excepto en las inoculadas con propágulos de *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 y *Xylaria* Gpo. 3.

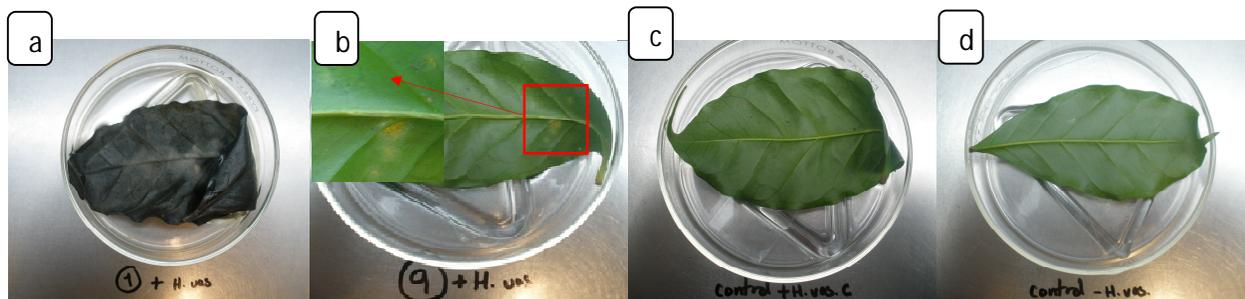


Fig. 22. Hojas tratadas con los hongos endófitos y/o con *Hemileia vastatrix*. (a) Hoja inoculada con *Cryptosporiopsis* sp.+ *H. vastatrix*; (b) Hoja inoculada con *Paecilomyces* sp. + *H. vastatrix*; (c) Hoja inoculada solo con *H. vastatrix* y (d) Hoja sin HE y sin *H. vastatrix* (Testigo) inoculada únicamente con agua destilada estéril.

Tabla 11. Sintomatología de las hojas inoculadas con hongos endófitos y *H. vastatrix*

HE	Hv	Rev.	Otros síntomas (%)			No. de lesiones (roya)				Comentario	HEi	HENi	B
			CI	N	M	Inicio (días)	CI	Pu	N				
0	-	64	0	0	0	-	-	-	-	Hoja sana	-	0	1
	-	64	0	0	0	-	-	-	-	Hoja sana	-	0	1
	+	64	25	15	0	0	0	0	0	Sin roya	-	1	1
	+	64	0	0	0	0	0	0	0	Hoja sana	-	1	1
1	-	50	20	100	15	-	-	-	-	N prematura	5	1	1
	-	20	0	100	25	-	-	-	-	N prematura	3	1	1
	+	20	0	100	30	-	-	-	-	N prematura	1	1	1
	+	20	0	100	15	-	-	-	-	N prematura	5	1	1
2	-	30	0	100	0	-	-	-	-	N prematura	3	1	1
	-	64	20	60	20	-	-	-	-		1	1	1
	+	64	0	95	75	-	-	-	-	N prematura	0	1	1
	+	30	0	100	0	-	-	-	-	N prematura	2	1	1
3	-	64	10	25	10	-	-	-	-		1	1	1
	-	30	0	100	0	-	-	-	-	N prematura	0	1	1
	+	64	0	0	0	0	0	0	0	Hoja sana	0		1
	+	30	0	100	0	-	-	-	-	N prematura	1	1	1
4	-	64	0	0	0	-	-	-	-	Hoja sana	0	1	1
	-	64	10	25	0	-	-	-	-		0	1	1
	+	64	0	35	0	43	1	2	4	Hoja con roya	0	1	1
	+	40	0	100	30	-	-	-	-	N prematura	0	1	1
5	-	64	0	0	0	-	-	-	-	Hoja sana	3	1	1
	-	64	0	0	0	-	-	-	-	Hoja sana	6	0	1
	+	64	0	0	0	0	0	0	0	Hoja sana	3	1	1
	+	64		5	2	35	2	4	0	Hoja con roya	4	1	1
6	-	64	10	20	15	-	-	-	-		0	0	1
	-	64	15	35	10	-	-	-	-		0	0	1
	+	40	0	100	0	-	-	-	-	N prematura	0	1	1
	+	64	5	35	35	0	0	0	0		0	1	1
7	-	64	5	50	35	-	-	-	-		0	1	1
	-	64	5	35	20	-	-	-	-		0	1	0
	+	20	0	100	0	-	-	-	-	N prematura	0	1	0
	+	20	0	100	0	-	-	-	-	N prematura	0	1	0
8	-	64	0	0	35	-	-	-	-		0	1	1
	-	64	0	0	20	-	-	-	-		0	1	1
	+	64	5	15	0	43	5	6	0	Hoja con roya	0	1	0
	+	64	0	100	0	-	-	-	-	N prematura	0	1	0
9	-	64	0	0	0	-	-	-	-	Hoja sana	2	1	1
	-	64	10	20	0	-	-	-	-		0	1	1
	+	50	0	100	0	-	-	-	-	N prematura	4	1	1
	+	64	0	0	0	35	9	12	5	Hoja con roya	0	1	1

La tabla se divide en 4 secciones principales: (1) tratamientos: HE= Hojas no inoculadas (0) o inoculadas con cada uno de los 9 hongos endófitos (1-9) y Hv= hojas no inoculadas (-) o inoculadas (+) con *Hemileia vastatrix*. (2) Porcentaje de tejido foliar con síntomas de daño observados antes de la aparición de los síntomas de la roya: Rev. = Número de días en los que se revisó y registró la condición de las hojas después de inoculadas con los hongos endófitos (seguimiento de 4 semanas); CI= Clorosis; N= Necrosis; M= Presencia de micelio epífito. (3) Síntomas o lesiones de roya: Inicio (días)= Número de días en los que se observó la aparición de síntomas de roya después de la inoculación de las urediniosporas en las hojas; CI= Clorosis; Pu= Pústulas con urediniosporas; N= Lesiones necrosadas. (4) Recuperación de HE inoculados: HEi= HE inoculados; HENi= HE no inoculados; B= desarrollo de bacterias.

Las hojas inoculadas tanto con HE como con urediniosporas de *H. vastatrix* comenzaron a experimentar clorosis y necrosis con mayor rapidez y en una mayor área foliar, no obstante, las lesiones eran distintas a la sintomatología de la roya; en este caso, al menos una de las hojas inoculada con cada HE y con la roya, sufrió el 100% de necrosis, excepto aquellas inoculadas con *C. gloeosporioides* Gpo. 2. Las 4 hojas que no fueron inoculadas ni con HE ni con *H. vastatrix*, permanecieron completamente sanas, mientras que 3 de las 4 hojas inoculadas solo con urediniosporas permanecieron sanas; la cuarta hoja, presentó lesiones en el 25% de su tejido pero aparentemente distintas a las ocasionadas por roya.

Por otro lado, los primeros síntomas de roya aparecieron a los 35 días después de inoculadas las urediniosporas y a los 43 días de inoculados los HE, sin embargo, debido al alto porcentaje de hojas necrosadas y sanas, únicamente cuatro hojas mostraron síntomas de roya. Contrario a lo esperado cada hoja que mostró síntomas de roya había sido previamente inoculada con alguno de estos HE: *Colletotrichum gloeosporioides* Gpo. 1, *Colletotrichum gloeosporioides* Gpo. 2, *Xylaria* Gpo. 3 y *Paecilomyces* sp.; por el contrario, ninguna de las hojas inoculadas solamente con las urediniosporas de *H. vastatrix* mostró síntomas de roya.

Finalmente, solo cinco HE, *Cryptosporiopsis* sp., *Cr. corticola*, *G. cingulata*, *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 y *Paecilomyces* sp., fueron recuperados de las hojas de café al final del bioensayo, tanto de aquellas inoculadas con roya como de las no inoculadas con este fitopatógeno.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se seleccionaron nueve hongos endófitos (HE) foliares de *C. arabica* de una plantación rústica, 'El Mirador', situada en Huatusco, Ver., y que fueron aislados y determinados taxonómicamente en un estudio previo (Saucedo-García, *en preparación*), con la finalidad de identificar distintas características que pudieran estar involucradas en la estructura de las comunidades de HE foliares, así como el posible papel ecológico que éstos desempeñan dentro de la planta. Para incluir, en la medida de lo posible, la diversidad de los HE del cafeto, se seleccionaron tres HE frecuentes, tres moderadamente frecuentes y tres poco frecuentes.

En vista de que diversos estudios han mostrado que la composición de las comunidades de HE puede variar entre plantas distintas (Eschen *et al.*, 2010; Sette *et al.*, 2006), y que la química de las hojas afecta el crecimiento de los HE (Arnold *et al.*, 2003), se consideró que los HE seleccionados tendrían distintos grados de sensibilidad y posible afinidad hacia los compuestos químicos de las hojas de café, por lo que uno de los planteamientos de la hipótesis del presente trabajo, fue que el crecimiento de los HE sería modificado por la composición química foliar del cafeto y que la frecuencia de aislamiento de éstos, estaría relacionada directamente con la sensibilidad y posible afinidad de los HE hacia los compuestos de las hojas.

Para evaluar dicha hipótesis se hizo crecer a cada HE en cajas Petri con PDA o con PDA+EC y se calcularon el tiempo de latencia (*TL*) y la tasa de crecimiento (*TC*) de cada HE en ambos medios, considerando que los HE sensibles y posiblemente afines a los compuestos foliares serían estimulados en PDA+EC. Los resultados obtenidos apoyan la primera parte de esta hipótesis, ya que los parámetros de crecimiento de 7 de los 9 HE se modificaron entre medios de cultivo: el *TL* de 4 HE fue reducido por el extracto de las hojas de café (*Co. gloeosporioides* Gpo. 2, *Xylaria* Gpo. 1, *Xylaria* Gpo. 2 y *Paecilomyces* sp.), y el de los demás no se vio afectado. En cuanto a la *TC*, 4 HE fueron estimulados en PDA+EC (*Co. gloeosporioides* Gpo. 1, *Co. gloeosporioides* Gpo. 2, *Xylaria* Gpo. 2 y *Xylaria* Gpo. 3), y uno fue inhibido (*Paecilomyces* sp.); esto sugiere que los HE son sensibles a la química foliar del cafeto, y que, algunos HE se ven favorecidos en alguno de sus parámetros de crecimiento y otros no.

Es importante mencionar que los parámetros de crecimiento tienen un significado biológico. El *TL* define el retraso en la respuesta de una población microbiana ante un cambio ambiental, y representa el tiempo en el que ésta población se adapta al ambiente hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial bajo condiciones constantes (Buchanan y Klawitter, 1991; Swinnen *et al.*, 2004). En hongos filamentosos, el *TL* varía muy poco del tiempo en el que el micelio es visible después de que un inóculo es colocado sobre el medio nutritivo (Marín *et al.*, 2008). Por otra parte, la *TC*, que se asume constante mientras las condiciones no cambien, define el crecimiento de una población por unidad de tiempo. Como ambos parámetros son susceptibles a los cambios ambientales, incluyendo aquellos por los que atraviesa una cepa durante su historia, pueden reflejar el efecto de los factores ambientales inmediatos, así como las propiedades intrínsecas de los microorganismos (Zwietering *et al.*, 1994; Whiting y Bagi, 2002; Astoreca *et al.*, 2012). Lo anterior es importante porque los cambios en los parámetros de crecimiento de los HE entre los dos medios de cultivo (PDA y PDA+EC), sugieren un proceso de adaptación a los metabolitos de *C. arabica*, lo que destaca que de los 9 HE, uno solo disminuyó su *TC*, pero también su *TL*, debido a la presencia de estos metabolitos; si consideramos que las hojas de *C. arabica* contienen alcaloides y polifenoles (flavonoides y taninos) fitotóxicos (Chou y Waller, 1980), antibacteriales (Nayeem *et al.*, 2011) y antifúngicos (Arora y Ohlan, 1996), entonces los HE utilizados en este trabajo parecen estar adaptados a estos compuestos.

Es necesario considerar que algunos de estos compuestos químicos de las hojas de *C. arabica* se pueden destruir al esterilizar el extracto en la autoclave, ya que la exposición de tejidos de otras plantas, como la piel del fruto de la vid (*Vitis vinifera*), a temperaturas mayores de 100°C reduce la cantidad de distintos compuestos, principalmente los fenólicos, como los taninos condensados (Larrauri *et al.*, 1997). Asimismo, la exposición del extracto acuoso de *Camellia sinensis* a temperaturas de 85 a 120°C en la autoclave, disminuye la concentración de algunas catequinas en dicho extracto; sin embargo, los compuestos volátiles que contiene, como ciertos terpenos, pueden disminuir o aumentar dependiendo de su tipo (Kim *et al.*, 2007).

Lo anterior muestra que aunque la concentración de compuestos químicos se modifica con la esterilización en la autoclave, estos no son destruidos en su totalidad.

Además, nuestros resultados, así como los de otros estudios, demuestran que aún esterilizando el extracto de los tejidos vegetales, éste puede modificar el crecimiento fúngico cuando se añade al medio de cultivo (Arnold y Herre, 2003; Arnold *et al.*, 2003), por lo que sin duda, algunos compuestos foliares, que son los responsables de modificar el crecimiento, permanecen en el extracto. Sin embargo, la composición química del extracto de hojas de café esterilizado, así como los mecanismos involucrados en la respuesta de los HE a este extracto, quedan aún por investigar.

Pese a la sensibilidad y posible afinidad de los HE hacia los compuestos foliares de *C. arabica*, observadas en el presente estudio, no se encontró una correlación lineal entre esta sensibilidad al extracto y la frecuencia de aislamiento de los HE a partir de las hojas de café; tampoco una correlación lineal entre la frecuencia de aislamiento y los parámetros de crecimiento de los HE que se desarrollaron tanto en PDA como en PDA+EC. Esto sugiere que estas respuestas observadas en el crecimiento de los HE, no son indicativas de la frecuencia de estos HE dentro de las hojas del cafeto, ni lo es, el grado de sensibilidad y posible afinidad hacia los compuestos químicos de las mismas, al menos en la forma en que dicha sensibilidad fue evaluada en este estudio.

Otros investigadores han reportado que la mayoría de los HE foliares más frecuentemente aislados de una planta, son más estimulados con el extracto foliar de esta planta, que con los extractos de otras plantas de las que son aislados con menor frecuencia (Arnold y Herre, 2003; Arnold *et al.*, 2003), sugiriendo que algunos HE poseen cierta afinidad hacia una química foliar específica, mientras que otros no la poseen aún siendo HE frecuentemente aislados de las plantas correspondientes. Por ello, los resultados del presente estudio sugieren que existe un grado de afinidad a la química foliar, sin embargo, esto podría ser un atributo tanto de HE generalistas como de especialistas, por lo que se deben combinar ambos enfoques: (1) evaluar el efecto de los extractos de diversas plantas que conviven en un hábitat y (2) utilizar HE con diferentes frecuencias de aislamiento, de las distintas plantas de las que se obtenga el extracto, con el fin de investigar la afinidad y posible especificidad de los HE a la química de las hojas, en caso de que ésta sea una realidad.

El efecto que el extracto de las hojas de café tuvo sobre el crecimiento de algunos HE en el presente estudio, así como las distintas frecuencias de aislamiento de éstos, utilizadas como criterio de selección de los mismos, nos llevaron a pensar que entre los HE se establecían distintas interacciones que podían ser sensibles a los compuestos químicos foliares, y que posiblemente, estas interacciones estarían relacionadas con la frecuencia de aislamiento de los HE a partir de las hojas de los cafetos. Para explorar esta hipótesis se realizaron bioensayos de captura primaria de recursos entre pares de HE, evaluando, cualitativa y cuantitativamente las interacciones entre ellos tanto en PDA como en PDA+EC. En la evaluación cuantitativa, se determinaron tres parámetros de crecimiento: área antes del contacto entre micelios (A_i), área al final del bioensayo (A_f), y la tasa de crecimiento en la interacción (TC_i). Antes del contacto entre los micelios no se observaron efectos negativos en la mayoría de los HE, por lo que las relaciones entre ellos fueron neutrales (00), o bien, solo uno de los dos HE alteró su crecimiento, generando, de acuerdo a la clasificación propuesta por Tuininga (2005), posibles relaciones temporales comensales (0+) o amensales (-0) entre ellos, lo que sugiere que ciertos HE pueden detectar a sus competidores a distancia y responder a los compuestos liberados por ellos. Como estas alteraciones se presentaron en el 33% de las interacciones en PDA y en el 35% de las interacciones en PDA+EC, y además varios de los HE involucrados modificaron su crecimiento en uno u otro medio de cultivo, se dedujo que los compuestos foliares pueden modificar las características de las interacciones, antes de que los micelios hagan contacto.

El retardo del crecimiento del micelio de un hongo ocasionado por otro hongo, a distancia, se ha observado entre ascomicetos de otros hábitats (Bärlocher *et al.*, 1991; Leong *et al.*, 2011), y aunque en HE ha sido poco estudiado, se sabe que algunos de ellos inhiben a distancia tanto a otros HE (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008) como a varios hongos fitopatógenos (Mejía *et al.*, 2008), y en ciertos casos, los metabolitos responsables de esta inhibición han sido identificados (Peláez *et al.*, 2000). Macías-Rubalcava *et al.* (2008), por ejemplo, mostraron que el HE *Edenia gomezpompae* aislado de la planta *Callicarpa acuminata* inhibe el crecimiento de los HE *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp. y *Guignardia manguiifera*, y de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*, cuando son enfrentados en cultivos *in vitro*. En dicho

estudio, a partir del extracto orgánico del micelio de *E. gomezpompae* se aislaron cuatro metabolitos (naftoquinonas espirocetales) algunos de los cuales, al ser añadidos al medio de cultivo (100µ/mL), inhibieron el crecimiento de los cinco hongos mencionados, demostrando que los metabolitos secundarios fueron responsables de los efectos sobre el crecimiento del micelio. Por lo anterior, el retardo en el crecimiento de algunos HE antes de hacer contacto con los otros, observado en el presente estudio, puede deberse a los metabolitos liberados por los hongos contrarios, que aunque afectan el crecimiento, lo hacen de forma temporal, lo que sugiere que estas relaciones entre HE no son altamente competitivas o que el gran número de encuentros entre ellos en la naturaleza, ha propiciado el desarrollo de mecanismos de resistencia o de tolerancia hacia estos metabolitos, sin embargo, esto queda aún por investigar.

La estimulación a distancia del crecimiento del micelio de un HE por otro, también ha sido observada en las relaciones entre otros HE, por ejemplo, entre algunos aislados de las hojas de *Sequoia sempervirens* (Espinosa-García *et al.*, 1996). Asimismo entre los HE foliares de *C. acuminata*, el crecimiento de *E. gomezpompae* fue estimulado al ser enfrentado con *Phomopsis* sp. y *G. manguiifera* (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008), desafortunadamente los metabolitos implicados en esta respuesta estimulante no han sido identificados, y ya que el crecimiento del micelio es un atributo fenomenológico o aparente (Kennedy, 2010), no se puede afirmar que esta respuesta represente *per se* un efecto benéfico para el HE que la muestra, sino que puede ser el resultado de una alta presión competitiva ejercida por el HE contrario.

Aunque es necesario investigar lo anterior para conocer las razones que determinan los efectos de unos hongos sobre otros, es indudable que la tasa de crecimiento del micelio de un hongo, antes de hacer contacto con otros, determina la cantidad de sustrato disponible que éste va a capturar sin tener que contender con otros hongos (Klepzig y Wilkens, 1997), por lo que el retardo o la estimulación de este crecimiento, ocasionado por otro hongo a distancia, tiene un impacto sobre la cantidad de recursos que serán capturados. Esto es de gran importancia porque la captura primaria de recursos influye en el futuro desempeño de un hongo, tanto para capturar más recursos (Lindahl y Olsson, 2004) como para competir en el momento de una interacción (Holmer y Stenlid, 1993).

Es importante señalar que a partir del contacto entre los micelios de los HE (determinado por las A_f y las TC_i), los efectos de inhibición aumentaron mucho, por lo que dominaron las interacciones coantagonistas (--), antagonistas (-+) y amensales (-0), clasificación que propone Tuininga (2005). El alto porcentaje de HE con tasas de crecimiento inhibidas concuerda con lo reportado por Espinosa *et al.* (1996), quienes encontraron pocos efectos de estimulación y una alta frecuencia de efectos de inhibición, al enfrentar de dos en dos a ocho HE asociados a *Sequoia sempervirens*, dando un total de 68% de alteración en los HE al enfrentarse con los demás, lo cual es similar al porcentaje obtenido en el presente estudio (62.5%) en medio PDA y utilizando el cultivo testigo sembrado lateralmente en el análisis estadístico. Sin embargo, utilizando el testigo central, se elevó al 90% o al 100% el número de HE inhibidos.

Lo anterior destaca un resultado importante, las alteraciones encontradas en los parámetros de crecimiento cambiaron dependiendo del tipo de cultivo testigo utilizado en el análisis estadístico, pues estos parámetros de crecimiento cambiaron entre los testigos centrales y los laterales, lo que muestra que la posición del inóculo en el cultivo testigo determina el tipo de interacción fúngica, si se toma como base el crecimiento del micelio. Al utilizar un testigo central se sobreestima la influencia que un HE ejerce sobre otro, debido a que con este testigo no se considera el límite impuesto por la caja Petri en una interacción. Sin embargo, pocos estudios han manejado cultivos testigo laterales (Schubert y Schwarze, 2011), mientras que muchos emplean solo testigos centrales (Macías-Ruvalcaba *et al.*, 2008) o no lo informan con precisión (Stahl y Christensen, 1992; Klepzig y Wilkens, 1997; Singh *et al.*, 2009; Leong *et al.*, 2011).

Conforme a lo esperado, las interacciones después del contacto entre los micelios de los HE también cambiaron entre medios de cultivo (PDA y PDA+EC). Acorde con lo reportado en estudios anteriores (Arnold *et al.*, 2003; Mejía *et al.*, 2008), el número de HE inhibidos por los demás fue mayor utilizando el medio de cultivo con extracto de hojas de la planta hospedera (PDA+EC) que el medio sin el extracto (PDA) (21% más en las A_f y 18% en las TC_i), por lo que aumentó el porcentaje de relaciones antagónicas (-+) y coantagónicas (--). En ocasiones los HE que no habían sido inhibidos en un medio de cultivo, fueron inhibidos en el otro, aunque cualitativamente solo cambiaron pocas interacciones, y la revisión microscópica no mostró cambios

importantes entre medios de cultivo. A nivel cualitativo, las interacciones más frecuentes en ambos medios de cultivo fueron el bloqueo mutuo entre HE (calificado como 3:3) y el crecimiento del micelio de un HE sobre el de otro (calificado como 5:2 o 6:1). El bloqueo mutuo mostró la misma frecuencia en ambos medios de cultivo, en cambio, se observó con más frecuencia, que los HE que desarrollaron micelio invasor, cubrieron por completo a los HE invadidos cuando crecieron en PDA+EC que cuando lo hicieron en PDA. Asimismo, únicamente en este último medio de cultivo, ciertos HE invadieron con micelio el borde de otros, o bien, desarrollaron rizomorfos que atravesaron parcialmente a algunos de los demás. Se identificaron como rizomorfos, porque desarrollaron una corteza dura y pigmentada, y utilizando el microscopio, se observó que las hifas habían perdido su individualidad (Ulloa y Hanlin, 2012).

El predominio de las interacciones en las que ambos hongos detienen su crecimiento al tocarse, ha sido reportado para hongos de las comunidades de otros hábitats o de sustratos específicos (Shearer y Zare-Maivan, 1988; Shaw *et al.*, 1995; Stahl y Christensen, 1969; Leong *et al.*, 2011), lo que ha llevado a pensar que, en general, el micelio muestra, primordialmente, un comportamiento territorial para defender los recursos capturados (Boddy, 2000); no obstante, como acertadamente señala Tuininga (2005), este resultado puede ser producido por distintos mecanismos de interacción que no son evidentes al observar el crecimiento del micelio.

Se ha demostrado que distintos hongos pueden reconocerse cuando sus micelios hacen contacto, y en muchos de estos casos, los micelios se rechazan como resultado de las diferencias genéticas entre ambos organismos (Saupe *et al.*, 2000). Este fenómeno conocido como incompatibilidad somática o vegetativa (Stenlid, 2008), se manifiesta morfológicamente por la separación clara de los micelios de los distintos hongos, manteniendo la individualidad de cada uno, tal como sucede en un bloqueo mutuo. Se cree que este sistema de incompatibilidad representa un mecanismo de defensa que evita el traspaso de agentes infecciosos (micovirus) o material genético nocivo, provenientes de las hifas del hongo contrario (Ikeda *et al.*, 2011), sin embargo, el verdadero significado biológico de este fenómeno todavía no ha sido esclarecido, y no se puede asegurar que éste sea el mecanismo responsable del bloqueo mutuo observado entre algunos HE de *C. arabica*.

El crecimiento del micelio de un HE sobre el de otros también ha sido observado en las comunidades fúngicas de otros hábitats (Boddy, 2000), pero a diferencia del bloqueo mutuo, no es muy común en algunas de ellas (por ej. en hongos acuáticos, Bärlocher *et al.*, 1991). Se considera que los hongos que poseen la habilidad de crecer sobre otros, están especializados en la competencia por interferencia (Kennedy, 2010), y según Holmer y Stenlid (1993), en este fenómeno interviene alguno de estos dos mecanismos: (1) micoparasitismo selectivo o (2) reemplazo no selectivo, lo que podría corresponder a lo propuesto por Tuininga (2005), quien separa al hongo invasor que mantiene relaciones nutritivas con el hongo invadido, del hongo invasor que no mantiene dichas relaciones nutritivas. Con base en lo anterior, en el presente trabajo, de los 4 HE que se comportaron como invasores a nivel macroscópico, las 3 cepas del género *Xylaria*, al ser observadas con el microscopio, no mostraron interacciones hifales similares a las reportadas para los hongos micoparásitos; en cambio, *Paecilomyces* sp. fue el único HE que, además de mostrar enganches hifales, enrolló con sus hifas, las hifas de algunos de los demás HE. No obstante que el enrollamiento hifal observado en *Paecilomyces* sp. fue poco frecuente, mostró la posibilidad de que dicho hongo actúe como parásito de algunos HE, pues se ha observado que las hifas de otros hongos de este género como *Paecilomyces fumosoroseus*, pueden colonizar y enrollar las hifas del hongo *Sphaerotheca fuliginea*, y con ello, reducir la incidencia de este último en una planta (Kavková y Curn, 2005).

Por otro lado, el hecho de que los efectos de inhibición aumentaron de forma cuantitativa, más que cualitativa, en PDA+EC, en relación a lo observado en PDA, especialmente después del contacto entre micelios; y además, que en PDA+EC se aceleró el crecimiento de los hongos invasores sobre los invadidos, es una muestra de que las diferencias en las interacciones entre medios de cultivo se debieron principalmente a los cambios en los parámetros de crecimiento (*TL* y *TC*) observados al añadir el extracto de las hojas de café al medio de cultivo. Es evidente que la estimulación del crecimiento causada por dicho extracto, representó una ventaja para los HE que desarrollaron micelio invasor, sin embargo, para aquellos que interactuaron por medio de un bloqueo mutuo, la estimulación causada por el extracto de hojas de café, se reflejó en una mayor inhibición del crecimiento de estos HE en interacción, en

comparación con los que crecieron en PDA, y en relación con los respectivos cultivos testigo tanto laterales como centrales. Lo anterior prueba que se produce un error de medición que debe evitarse en experimentos futuros: como la mayor parte de los efectos de inhibición observados fueron efectos de restricción física, en los que cada HE impidió con su micelio el avance de los otros, aparentemente se observó una mayor inhibición después del contacto entre micelios en el medio con extracto de hojas de café; este error podría corregirse comparando el crecimiento de cada hongo en interacción con el crecimiento de sus respectivos cultivos testigo laterales, justo cuando los dos hongos participantes tienen el primer contacto entre ellos.

Pese a lo anterior, los cambios en la totalidad de las interacciones, antes y después del contacto entre micelios, aunadas a los cambios cualitativos comparativos que se observaron en los micelios que crecieron en ambos medios de cultivo, indican que tanto las características del crecimiento del micelio como los compuestos contenidos en el extracto de las hojas de café, pueden mediar las interacciones entre los HE, y sugiere que éstas podrían darse dentro de las hojas e influir en la integración de las comunidades endófitas. Para explorar esta posibilidad, se realizó un análisis de correlación entre la frecuencia de aislamiento de los HE (utilizado como criterio de selección) y la capacidad competitiva (respuesta competitiva y efecto competitivo por separado) de cada uno de ellos, considerando tanto las mediciones cuantitativas como las observaciones cualitativas. Contrario a lo esperado, no se encontró una relación lineal directa entre las respuestas competitivas o los efectos competitivos de los HE y la frecuencia de aislamiento de los mismos a partir de las hojas, indicando que la capacidad competitiva defensiva u ofensiva, evaluada al enfrentar a los HE en cultivos *in vitro*, no refleja la frecuencia de los HE dentro de las hojas en condiciones naturales.

El resultado anterior nos llevó a suponer que las interacciones entre HE podían modificarse de acuerdo al tiempo de llegada de un HE al sustrato, ya que aquellos HE que crecen rápido (bajo *TL* y alta *TC*) podrían competir con mayor éxito si colonizaban antes el sustrato; también se pensó que los HE que desarrollaron micelio invasor, podrían estar tomando y translocando nutrientes a partir del medio de cultivo que colonizaron por captura primaria (libre de otros micelios), y que por esto, seguían creciendo, invadiendo el micelio de los otros HE, lo cual es una estrategia de distintos

hongos para colonizar sustratos hostiles (Lindahl y Olsson, 2004). Por ello, se realizó un bioensayo de captura secundaria de recursos (Klepzig y Wilkens, 1997), evaluando a la vez la capacidad de los HE para reemplazar a un competidor.

Los resultados de los bioensayos de captura secundaria, mostraron que la mayoría de los HE que habían interactuado por bloqueo mutuo con otros, también mostraron una nula capacidad para colonizar el medio de cultivo previamente ocupado por el otro HE, lo que sugirió que estos HE (*Glomerella cingulata* y los de los géneros *Colletotrichum* y *Cryptosporiopsis*) deben colonizar el sustrato antes que otros HE para poder establecerse, y para defender más eficazmente los recursos capturados, antes de la llegada de los hongos que pueden desarrollar micelio invasor. Sin embargo, fue interesante observar que *Paecilomyces* sp., que había interactuado por bloqueo mutuo con todos los otros HE en el bioensayo de captura primaria de recursos, fue capaz de capturar el sustrato previamente ocupado por la mayoría de los demás hongos, lo que pudiera indicar que algunos HE pueden cambiar su estrategia competitiva dependiendo de las circunstancias en que se presente una interacción.

Los HE que habían invadido a los demás en el bioensayo de captura primaria de recursos (los del género *Xylaria*) fueron capaces de colonizar el sustrato previamente ocupado en su totalidad por los otros HE en este bioensayo, a pesar de ello, al ser colocados como Colonizadores 2 (C2), el crecimiento del micelio invasor de dichos hongos fue restringido en al menos un 60% por la presencia del micelio de los C1 a los que invadieron. Al revisar con el microscopio el crecimiento de estos hongos, se observó que las hifas de los HE invasores eran más delgadas (1.3-1.7 μm) que las de los invadidos (1.9-3.3 μm); sin embargo, no se observó un comportamiento semejante a un micoparasitismo, como lisis y coagulación del citoplasma o penetración de las hifas del hongo contrario (Howell, 2003; Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008), por lo que al parecer los micelios de los HE invasores ejercen una competencia por explotación de recursos, y son insensibles a los metabolitos liberados por los HE a los que invaden; esto sucede, posiblemente, porque a excepción de *Xylaria* Gpo. 2, los demás HE no siempre reemplazaron a la especie invadida, lo que es de gran importancia, ya que sugiere que un HE invadido puede permanecer activo sobre el sustrato nutritivo, y además, puede escapar del micelio invasor de otro hongo si posee una alta tasa de crecimiento.

En resumen el bioensayo de captura secundaria de recursos, mostró que algunos HE pueden modificar sus estrategias competitivas dependiendo de las circunstancias de la interacción; además, que el tiempo de llegada de algunos HE al sustrato define el éxito de su establecimiento, particularmente en aquellos hongos que no son capaces de colonizar el sustrato cuando ha sido ocupado previamente por otro hongo; o bien, que el alcance de la estrategia competitiva de un HE, en este caso el desarrollo de micelio invasor, puede disminuir su eficacia si el otro HE, susceptible a ser invadido, ocupa previa y completamente el sustrato.

En el segundo bioensayo complementario de interacción, se evaluó el potencial alelopático que el filtrado del medio de cultivo acuoso de cada HE tenía sobre el crecimiento de los demás, con el fin de determinar si la presencia de un HE podía afectar químicamente a otro, sin involucrar una interacción directa entre ellos. En este caso, los HE fueron principalmente inhibidos con respecto a la dosis (dosis-dependiente), y fue muy interesante observar que en este bioensayo, los filtrados de los HE con mayor capacidad inhibitoria o potencial alelopático, fueron los de *Colletotrichum gloeosporioides* Gpo. 1 y *Colletotrichum gloeosporioides* Gpo. 2, los cuales se seleccionaron en este trabajo por presentar la mayor frecuencia de aislamiento a partir de las hojas del cafeto, y que además, mostraron una baja capacidad competitiva en los bioensayos anteriores. También fue interesante observar que el HE más inhibido fue *Xylaria* Gpo. 1, el cual mostró una alta capacidad competitiva en los bioensayos anteriores (captura primaria y secundaria de recursos), principalmente debido al desarrollo de micelio invasor y a una alta tasa de crecimiento en relación con los otros HE que desarrollaron micelio invasor.

Al igual que en el presente estudio, Singh *et al.* (2009), demostraron que el filtrado del medio de cultivo acuoso en el que crecieron algunos hongos aislados del suelo, podía inhibir el crecimiento de varios hongos dermatofitos cuando era agregado al medio de cultivo. Entre los hongos que más inhibieron a dichos dermatofitos se encontró precisamente una variedad de *Co. gloeosporioides*. Por su parte, Macías-Rubalcava *et al.* (2008), demostraron que el extracto orgánico del medio de cultivo acuoso (en papa-dextrosa) del HE *Edenia gomezpompae*, inhibió el crecimiento de otros HE y fitopatógenos, y que su acción inhibitoria sobre el crecimiento de la mayoría

de estos hongos, fue más fuerte que la que presentó el extracto orgánico del micelio de *E. gomezpompae*, o que la que se observó en los cultivos *in vitro* entre pares de hongos. Dado que el filtrado del medio de cultivo de un hongo con capacidad antibiótica o alelopática puede ocasionar lesiones a nivel hifa (vacuolación, coagulación del citoplasma y lisis) (Dennis y Webster, 1971), y así inhibir el crecimiento del micelio, es probable que la inhibición del crecimiento de los HE de *C. arabica* sea el resultado de la acción de los metabolitos secundarios liberados al medio de cultivo por los HE; esto sugiere que si un HE permanece en un sustrato por un tiempo prolongado, puede modificar la química de este sustrato, y de esta manera, afectar el proceso de colonización de otros HE.

Cabe mencionar que en este bioensayo complementario, la respuesta de cada HE a los filtrados de los demás, no fue inversamente proporcional al efecto de sus filtrados sobre los demás, como ocurrió al evaluar el crecimiento de los micelios en interacción antes de que hicieran contacto. Esto sugiere, que la producción de metabolitos que afectan a distancia a otros HE no está relacionada de forma lineal con la capacidad que tienen estos hongos para resistir la inhibición ejercida por los metabolitos de los demás HE. En cambio, después del contacto entre los micelios (lucha y captura secundaria de recursos), la capacidad de limitar o restringir el crecimiento de los demás hongos está directamente relacionada con la capacidad de resistir la limitación o restricción ejercida por los demás.

Los efectos de los filtrados sobre el crecimiento fúngico en este bioensayo complementario, podrían representar un mecanismo de defensa 'preventivo' contra el establecimiento y desarrollo de otros hongos, que se produce en los HE que crecieron de forma individual en el medio de cultivo acuoso del cual se obtuvo el filtrado; este mecanismo posiblemente 'preventivo', sería el resultado de los diversos encuentros entre los hongos bajo condiciones naturales, lo que pudiera representar una de las estrategias de vida de los hongos. Aunque lo anterior queda por investigar, es indiscutible que el efecto de los filtrados es alelopático, pues los metabolitos liberados por un HE afectan negativa o positivamente a otros. El término alelopatía, propuesto por Molisch en 1937 (citado en Rice, 1984), proviene del griego *allelon* que significa 'uno al otro' y *pathos* que significa 'sufrimiento'; tomado en sentido literal, significaría el efecto

perjudicial entre dos organismos, sin embargo Molisch definió a la alelopatía como la interacción bioquímica, dañina o benéfica entre todo tipo de plantas y microorganismos. Después del Primer Congreso Mundial de Alelopatía, celebrado en Cádiz, España en 1996, la definición de alelopatía se refiere a “cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias u hongos que influya sobre el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos” (Rice, 1974, 1984; Rizvi *et al.*, 1992; Anaya, 2003; Anaya *et al.*, 2003; Anaya *et al.*, 2005; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Macías-Rubalcava *et al.*, 2010).

A excepción del bioensayo realizado con los filtrados de los medios de cultivo, de los HE, en los demás bioensayos de interacción realizados en el presente trabajo (captura primaria y captura secundaria de recursos), los HE del género *Xylaria* mostraron la mayor capacidad competitiva debido a que desarrollaron micelio invasor. Aquí es importante mencionar que el crecimiento del micelio invasor de *Xylaria* Gpo. 3, fue ‘dirigido’ directamente hacia el hongo copartícipe, el cual es un comportamiento importante, porque parece responder a la presión y/o presencia del hongo contrario, y se presentó, principalmente, cuando el hongo opositor era de menor tamaño. Este último comportamiento, ha sido observado entre pares de basidiomicetos descomponedores al crecer tanto en medio nutritivo como en madera (Holmer y Stenlid, 1993), lo que indica que es probable que esta conducta se mantenga cuando los hongos crecen en los sustratos naturales.

La alta capacidad competitiva de los hongos del género *Xylaria* ha sido demostrada en otros estudios, pues estos hongos han logrado invadir y reemplazar parcial o totalmente a distintas especies de basidiomicetos descomponedores, en cultivos *in vitro* (Boddy *et al.*, 1985; Griffith y Boddy, 1991; Fukasawa *et al.*, 2009). Asimismo, se ha observado que ciertos hongos de este género colonizan, como endófitos, las ramas de algunas angiospermas (Griffith y Body, 1990) en las que pueden llegar a ser dominantes, como sucede en el árbol de la haya (*Fagus crenata*) (Osono y Mori, 2003); también pueden ser dominantes en las comunidades de HE foliares de la planta herbácea *Centella asiatica* (Rakotoniriana *et al.*, 2008). Aunque no se conoce con precisión cual es el mecanismo que utilizan los hongos del género *Xylaria* en una interacción, se piensa que la pigmentación del micelio es uno de sus

principales atributos competitivos (Fukasawa *et al.*, 2009), que probablemente puede conservarse dentro de los tejidos vegetales, pues al menos en la madera, el micelio melanizado de estos hongos forma una masa conocida como placa de pseudoesclerocios, que evita que otros hongos se acerquen (Griffith y Boddy, 1990).

Sin embargo, contrariamente a la hipótesis propuesta en el presente estudio, en la mayoría de los casos, las capacidades de los HE para inhibir a los demás o resistir la inhibición ejercida por los otros, lo que se observó en los bioensayos de interacción complementarios (respuesta competitiva y efecto competitivo en la captura secundaria de recursos; potencial alelopático y capacidad de resistir la inhibición por alelopatía de los filtrados del medio de cultivo) tampoco mostraron una relación lineal significativa con la frecuencia de aislamiento de estos HE a partir de las hojas de los cafetos de 'El Mirador'. Esto sugiere que ni la capacidad competitiva de los HE, ni la habilidad que tienen para inhibir alelopáticamente a los demás o resistir la inhibición ejercida por los otros, son indicativas de la frecuencia de éstos hongos dentro de las hojas de los cafetos; asimismo, el grado de dominancia en las interacciones *in vitro*, directas o indirectas, solo explican parcialmente la distribución de los hongos dentro de las hojas. La única excepción de estas afirmaciones, se encontró en la respuesta de los HE a los filtrados del medio de cultivo de los demás (a la concentración del 25%), la cual mostró una relación lineal directa significativa con la frecuencia de aislamiento, lo que quiere decir que la respuesta de los HE al efecto alelopático ejercido por el filtrado de los demás a una concentración del 25% explica, aproximadamente en un 61%, la frecuencia de aislamiento de los HE a partir de las hojas. No obstante, dado que la relación directa entre estos parámetros indica que mientras mayor sea el porcentaje de inhibición del crecimiento de un HE, o sea que tiene menor capacidad de resistir la inhibición alelopática, también será mayor su frecuencia en las hojas. Esta relación directa parece reflejar, más que un carácter causal, un sistema de compensación entre las estrategias de los HE para colonizar las hojas.

El resultado anterior nos llevó a pensar que posiblemente los HE tenían distintas capacidades para colonizar las hojas de *C. arabica* y establecerse como endófitos, aún sin la presencia de otros hongos, y que como se observó en el bioensayo de captura secundaria de recursos, el tiempo de llegada a un sustrato (en este caso la

hoja) podía influir en el grado de colonización de los hongos; por esta razón se realizaron los bioensayos de colonización de cada HE por separado en hojas de café libres de HE, utilizando inóculos a base de micelio para todos los HE, y de esporas para aquellos que las desarrollaron. En estos bioensayos, la hipótesis planteada fue que los HE seleccionados por presentar una mayor frecuencia de aislamiento a partir de las hojas de los cafetos de 'El Mirador', tendrían una mayor capacidad de colonizar las hojas de café que los menos frecuentes, o bien, que los HE de mayor capacidad competitiva aumentarían su grado de colonización si se inoculaban en hojas libres de HE. Sin embargo, los resultados mostraron que los HE solo penetraron las hojas del cafeto cuando fueron inoculados por medio de sus esporas, dado que las hojas inoculadas con el micelio fragmentado de los hongos que no produjeron esporas bajo las condiciones de cultivo, nunca fueron colonizadas. Desafortunadamente, los HE con mayor capacidad competitiva (los tres del género *Xylaria*), no desarrollaron esporas en los cultivos *in vitro*, ni tampoco las desarrolló *Co. gloeosporioides* Gpo. 1, que fue seleccionado por presentar la mayor frecuencia de aislamiento a partir de las hojas de los cafetos; por ello, no fue posible inocular las hojas de los cafetos libres de endófitos con estos hongos y, por lo tanto, no se pudo corroborar la hipótesis planteada para estos bioensayos. Aunado a esto, los HE con mayor capacidad de colonización por medio de sus esporas, fueron los de menor capacidad competitiva, *Co. gloeosporioides* Gpo. 2 y *Cryptosporiopsis* sp., mientras que *Paecilomyces* sp., que mostró una mayor capacidad competitiva, mostró porcentajes de colonización muy bajos, lo que sugiere nuevamente, que la capacidad competitiva de los HE no está directamente relacionada con su capacidad de colonizar las hojas.

Acorde con el presente estudio, otros HE foliares del género *Colletotrichum*, particularmente, *Co. gloeosporioides*, mostraron la mayor capacidad de colonización al ser inoculados en plantas de *Theobroma cacao*, mientras que los hongos del género *Xylaria* nunca fueron recuperados de los tejidos de esta planta, pese a que fueron inoculados por medio de sus esporas (Arnold *et al.*, 2003; Mejía *et al.*, 2008).

Lo mencionado anteriormente sugiere que la alta capacidad competitiva de un HE, lejos de ser un mecanismo que promueva la frecuencia de estos hongos dentro de las hojas de los cafetos, al parecer está involucrada dentro de un 'sistema de

compensación (*trade off*), que está en equilibrio con la habilidad que debe tener un hongo para penetrar los tejidos vegetales y establecerse como endófito, es decir, que a medida que sea mayor la capacidad competitiva de un HE para la lucha o la defensa en sus interacciones con otros hongos, menor será su capacidad de colonizar las hojas de café. Se ha observado, al menos en una comunidad de basidiomicetos descomponedores, que los hongos más frecuentemente aislados de los sustratos naturales, pueden ser invadidos y reemplazados por varios de sus competidores de menor frecuencia, al crecer en cultivos *in vitro* (Holmer y Stenlid, 1993) lo que concuerda con nuestros resultados; aunque este “sistema de compensación” contradice lo sugerido por otros estudios con HE y micorrizógenos (Arnold *et al.*, 2003; Mejía *et al.*, 2003; Kennedy, 2010).

Finalmente, en el presente estudio, se evaluó el efecto de los nueve HE sobre la viabilidad y la incidencia del fitopatógeno foliar y biótrofo *H. vastatrix*, planteando como hipótesis que algunos HE reducirían ambos parámetros del fitopatógeno. Para evaluar el efecto de los HE sobre la viabilidad de la roya, se evaluó *in vitro* el efecto de éstos sobre la germinación de las urediniosporas del fitopatógeno. Los resultados mostraron que solamente la cepa de *G. cingulata* evaluada en el presente trabajo, inhibió significativamente la germinación de las urediniosporas. Este resultado sugiere que *G. cingulata* puede ser un fuerte competidor de *H. vastatrix*, que utiliza la inhibición de las esporas de este fitopatógeno como estrategia competitiva y/o alelopática contra él, lo que lo coloca como un posible simbionte mutualista de *C. arabica*, y un probable candidato para el control biológico de la roya del café. Los demás HE no afectaron a las urediniosporas, e incluso algunos mostraron una tendencia a aumentar la viabilidad de las mismas. El hecho de que en este bioensayo las urediniosporas no estuvieron en contacto directo con los HE, sino que permanecieron en un papel celofán sobre el micelio de los mismos, parece indicar que los causantes de esta inhibición (o estimulación) sobre la germinación de las urediniosporas, fueron los metabolitos volátiles liberados por los HE, ya que este mecanismo ha sido reportado para otros HE, como *Muscodor yucatanensis*, aislado de la planta *Bursera simaruba* (palo mulato), el cual inhibe el crecimiento de otros HE y de hongos fitopatógenos liberando compuestos volátiles (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010).

Para evaluar el efecto de los HE sobre la incidencia de *Hemileia vastatrix*, se inocularon los HE sobre hojas desprendidas de los cafetos, y posteriormente, estas hojas fueron inoculadas también con urediniosporas de *H. vastatrix*. En contradicción con algunos estudios que han demostrado que las habilidades competitivas de algunos HE, evaluadas *in vitro*, contra distintos fitopatógenos foliares, pueden operar en un ambiente *in vivo* (Arnold *et al.*, 2003; Mejía *et al.*, 2008); en el presente estudio los HE evaluados no disminuyeron el daño ocasionado por *H. vastatrix* en las hojas de café, sino que por el contrario, los síntomas de roya aumentaron con la presencia de algunos HE; estos resultados son consistentes con lo reportado por Kurose *et al.* (2012), quien demostró que dentro de la comunidad de HE de una planta puede haber tanto hongos que suprimen el crecimiento de los fitopatógenos foliares biótrofos, como especies que no muestran efecto alguno y otras que promueven la incidencia de la enfermedad. Además, es importante considerar que en el presente estudio, las hojas inoculadas fueron desprendidas previamente de las plantas de café, lo cual puede determinar cambios significativos en la colonización tanto de HE como de fitopatógenos, en relación a las hojas no desprendidas.

Los estudios sobre el efecto que los microorganismos endófitos ejercen sobre los hongos causantes de la roya del café, son mínimos. La mayoría se enfocan a bacterias endófitas, algunas de las cuales pueden inhibir la germinación de las urediniosporas en cultivos *in vitro* y la incidencia de la roya en las hojas de los cafetos (Shiomi *et al.*, 2006), lo que presumiblemente está determinado por los metabolitos que las bacterias liberan al exterior (Haddad *et al.*, 2003). El estudio de Silva *et al.* (2012) es el único que muestra que la incidencia de *H. vastatrix* no es afectada por la inoculación previa de diecisiete HE aislados de *C. arabica*. No obstante, tal estudio no menciona las especies o los géneros de los HE utilizados, ni los criterios de selección, por lo que no se sabe qué especies fueron utilizadas. Es probable, que las diferencias entre las formas de vida de los HE y las de *H. vastatrix*, evite que traslapen sus nichos dentro de las hojas de café, dado que *H. vastatrix* crece y avanza dentro de las hojas desarrollando haustorios, que son estructuras especializadas en la obtención de nutrientes a partir de la célula vegetal (Ramiro *et al.*, 2009), mientras que la mayoría de los HE están restringidos a un pequeño espacio dentro de la hoja (Herre *et al.*, 2007).

Aunque la mayoría de los HE evaluados por separado, no desempeñaron un papel defensor contra la roya del café, es probable que diversos HE en conjunto puedan reducir el daño ocasionado por este fitopatógeno, como lo demostró Arnold *et al.* (2003) contra un fitopatógeno foliar de la planta del cacao, *Phytophthora* sp., pues una mayor diversidad de especies ocupa distintos nichos dentro de la hoja, lo que aumenta la posibilidad de restringir la entrada de otra forma de vida. Aquí es importante recordar que en el estudio de Arnold *et al.* (2003) las hojas permanecieron unidas a las plantas de *Theobroma cacao*, mientras que en el presente trabajo, las hojas evaluadas fueron desprendidas de las plantas del café, lo que posiblemente modificó la interacción entre los hongos endófitos y los tejidos vegetales. Al respecto, Shiomi *et al.* (2006) demostraron que el efecto ejercido por algunas cepas de bacterias endófitas sobre la incidencia de *H. vastatrix* puede variar dependiendo del uso de segmentos de hoja, hojas desprendidas u hojas unidas a las plantas de café.

Es importante mencionar, que la mayoría de las hojas desprendidas, utilizadas para evaluar el efecto de los HE sobre la incidencia de *H. vastatrix*, se necrosaron después de ser inoculadas con algunos de los HE y antes de que las hojas inoculadas con las urediniosporas de la roya presentaran los síntomas de esta enfermedad, incluyendo las hojas que solo fueron inoculadas con los HE, principalmente con *G. cingulata* y con los de los géneros *Cryptosporiopsis* y *Xylaria*; esto sugiere que estos HE pudieran permanecer latentes cuando las hojas están sanas y unidas a las plantas de café, pero pueden actuar como saprótrofos cuando las hojas se desprenden de las plantas; también pudiera ser que si los HE son inoculados individualmente, la falta de otros HE dentro de las hojas, podría desequilibrar el comportamiento de algunos hongos, lo que les permitiría cambiar su forma de vida y con ello dañar los tejidos de la planta.

Lo anterior es consistente con algunos estudios que han demostrado que los HE foliares pueden afectar las tasas de descomposición de la materia vegetal, modificando la calidad de los tejidos fotosintéticos antes de que las hojas se desprendan de las plantas, o bien, actuando directamente como saprótrofos cuando éstas se desprenden (Korkama-Rajala *et al.*, 2008; Purahong y Hyde, 2011). Los compuestos degradados por estos endófitos incluyen carbohidratos solubles, polifenoles, lignina y holocelulosa, entre otros (Fukasawa *et al.*, 2009). Además, existe evidencia de que algunos HE pueden

permanecer en las hojas hasta las etapas tardías del proceso de descomposición de las mismas, dependiendo de las condiciones microambientales, del ciclo de vida y de la habilidad que tengan para aprovechar la materia orgánica (Osono, 2006). Ciertos HE presentan patrones morfológicos, filogenéticos y enzimáticos prácticamente idénticos a los que muestran algunos hongos saprótrofos en el mismo tejido vegetal, cuando éste entra en descomposición (Promputtha *et al.*, 2007; Promputtha *et al.*, 2010), por lo que algunos HE, como *Phomopsis sp.*, pueden liberar enzimas con las que forman cavidades en la superficie de las hojas de sus hospederas, y así, acelerar la descomposición de las mismas (Dai *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere la posibilidad de que los HE que necrosaron las hojas en el presente estudio, hayan actuado como saprótrofos, no obstante, se requiere más investigación para validar esta hipótesis.

En conjunto, las diferentes estrategias mostradas por los HE evaluados, parecen reflejar distintas formas de vida que se conjugan en una comunidad que comparte un mismo hábitat dentro de los tejidos vegetales vivos (Herre *et al.*, 2007), pero que parece no limitarse a este hábitat particular. Al parecer existe un grado de afinidad de los HE con la planta, pues colonizan los tejidos fotosintéticos y pueden ser estimulados por los extractos foliares, sin embargo, el estado filamentoso y los patrones de crecimiento radial de los hongos cultivables *in vitro*, reflejan la existencia de una alta flexibilidad y versatilidad en la colonización de diversos sustratos (Singh, 2003). Asimismo, las distintas tasas de crecimiento y las capacidades competitivas mostradas por los HE en el presente estudio, abren la posibilidad de que cada uno pueda expresar estrategias similares a las observadas *in vitro*, dentro y fuera de los tejidos de las plantas hospederas bajo circunstancias particulares.

Sin embargo, no se puede asegurar que los efectos y las respuestas observadas en los cultivos *in vitro* se pueden presentar en el ambiente natural, aunque los resultados obtenidos en estos cultivos pueden revelar probables comportamientos particulares dentro de un abanico de posibilidades. Justamente por esto, los resultados obtenidos en sistemas *in vitro* ayudan a conocer y entender algunos procesos biológicos, aun cuando los sistemas de estudio son complejos y dinámicos, como lo son las comunidades de HE foliares de plantas leñosas. Aún excluyendo la variación ambiental, la gran diversidad de especies que contienen estas comunidades (Herre *et*

al., 2007), incluyendo a los HE no cultivables, aumenta la complejidad de su investigación, sin ignorar que la intervención de la planta hospedera, la cual es prácticamente suprimida en los cultivos *in vitro*, también juega un papel preponderante porque modifica significativamente las condiciones de crecimiento de los hongos.

Es indudable que para entender el complejo sistema simbiótico entre los HE y sus plantas hospederas, se requiere de un enfoque integral que permita visualizar el conjunto de factores que intervienen en este sistema. La teoría de la evolución del hologenoma, por ejemplo, plantea que los microorganismos asociados a otros organismos, en este caso a las plantas, forman con ellos un holobionte, que conjuga la información genética de la hospedera y de sus microorganismos simbiotes (Rosenberg y Rosenberg, 2008; 2011). La diversidad genética de los microorganismos se traduce en diferentes formas de comunicación con la planta y en múltiples rutas de mecanismos de acción que les permiten alterar el desempeño de ésta, en caso de que se presente algún factor de estrés biótico o abiótico, con el consecuente impacto sobre la hospedera en términos evolutivos (Yuan *et al.*, 2010). Es por esto que, además de los estudios que intentan entender el papel de las comunidades endófitas, caracterizando por separado a cada miembro de estas comunidades, como se hizo en el presente estudio, se deben establecer marcos de referencia que permitan observar el fenómeno de manera holobiótica. Quizá, al estudiar las partes de este sistema simbiote, así como la suma e interacción de las mismas, encontremos respuestas que en apariencia no son evidentes, ni aun con métodos de estudio convencionales.

VIII. CONCLUSIONES

- Los extractos de las hojas de *Coffea arabica*, pueden modificar las características del crecimiento de algunos hongos endófitos, particularmente estimulando su crecimiento, lo que sugiere que éste es influenciado por los metabolitos que contienen los extractos foliares y que los hongos endófitos que son estimulados están adaptados a ellos.
- El grado de sensibilidad y posible afinidad de un hongo endófito a los compuestos de las hojas del café, no está directamente relacionado con su frecuencia dentro de ellas, y por esto, los hongos endófitos con distintas frecuencias de aislamiento pueden o no mostrar sensibilidad y, posiblemente, afinidad a los compuestos químicos de las hojas de café.
- Las relaciones *in vitro* entre los hongos endófitos foliares de *C. arabica*, antes de que sus micelios hagan contacto, son mayoritariamente neutras, lo que sugiere que la lucha entre muchos de ellos, a través de compuestos químicos, no es muy evidente cuando se encuentran cerca uno del otro; sin embargo, algunos de estos hongos endófitos liberan metabolitos secundarios al medio de cultivo en el que se han desarrollado, y éstos, por si mismos, pueden retardar o estimular el crecimiento de otros hongos endófitos que se encuentran conviviendo con ellos y, por lo tanto, modificar la captura primaria de recursos de estos últimos.
- Después del contacto entre los micelios de los hongos endófitos, aumenta el número de interacciones antagonistas y competitivas, principalmente porque estas interacciones son dominadas por el bloqueo mutuo entre micelios y por el desarrollo de micelio invasor por parte de algunos de los hongos endófitos enfrentados.
- La respuesta competitiva de cada hongo endófito a la influencia ejercida por los demás, antes del contacto entre los micelios, no está relacionada con el efecto que en ese momento, cada uno de ellos tiene sobre los demás. Después del contacto entre los micelios, se presenta una relación proporcional entre la respuesta y el efecto, lo que indica que la capacidad de limitar el crecimiento de los demás hongos está directamente relacionada con la capacidad de resistir la inhibición o limitación ocasionada por los demás, solo después del contacto entre los micelios.

- Las interacciones entre hongos endófitos pueden ser modificadas cualitativa y cuantitativamente por los compuestos de las hojas de café, principalmente a través del efecto que estos compuestos tienen sobre el crecimiento de los hongos.
- Dos hongos endófitos de *C. arabica* que interactúan entre sí a través de un bloqueo mutuo en cultivos *in vitro* de captura primaria de recursos, por lo general, no pueden colonizar el área totalmente ocupada por el endófito contrario, cuando se realiza un bioensayo de captura secundaria de recursos con ambos hongos.
- El crecimiento de un hongo endófito que realiza una captura secundaria de recursos *in vitro*, puede ser retardado o limitado por el hongo que colonizó previamente el sustrato y lo ocupó totalmente, lo que sugiere que un hongo endófito susceptible a ser invadido, puede defender mejor sus recursos contra los hongos invasores si actúa como colonizador primario.
- El HE *Paecilomyces* sp., fue el único hongo endófito que interactuó por bloqueo mutuo con los demás hongos en la captura primaria de recursos *in vitro*, que pudo desarrollar micelio invasor cuando el sustrato fue ocupado por completo por algunos de los otros hongos, lo que sugiere que algunos hongos endófitos pueden modificar su estrategia competitiva en respuesta a las circunstancias de una interacción.
- El desarrollo de micelio invasor por parte de un hongo endófito que realiza una captura secundaria de recursos puede o no reemplazar al hongo endófito invadido, aunque este último, esté completamente cubierto por el micelio del primero, lo que muestra que un hongo endófito puede permanecer vivo bajo el micelio de otro hongo.
- La capacidad competitiva de un hongo endófito contra otros hongos endófitos *in vitro*, en relación a la defensa del sustrato o la lucha directa en una captura primaria o secundaria de recursos, no está relacionada directamente con la frecuencia de aislamiento de este hongo a partir de las hojas de los cafetos.
- El filtrado del medio acuoso del cultivo de los hongos endófitos agregado al medio de cultivo sólido, puede afectar el crecimiento de otros hongos endófitos de manera dependiente de la dosis del filtrado. Esto sugiere que un hongo endófito que permanece en un sustrato artificial por un tiempo prolongado, modifica la química de

este sustrato, y de esta manera, puede afectar el crecimiento de otros hongos endófitos que lleguen después a este sustrato.

- La respuesta de cada hongo endófito al efecto alelopático de los filtrados de otros hongos endófitos, no está relacionada de forma lineal con el efecto de sus propios filtrados sobre los demás hongos endófitos; esto sugiere que la producción de metabolitos que afectan a otros hongos endófitos, no se relaciona con la capacidad de este hongo de resistir el efecto causado por los alelopáticos de los demás hongos.
- El potencial o efecto alelopático de los hongos endófitos evaluados no está relacionado directamente con la frecuencia de aislamiento de los mismos a partir de las hojas de café, sin embargo, la respuesta de los hongos endófitos a los filtrados, a la concentración del 25%, se relaciona directamente con dicha frecuencia de aislamiento, sugiriendo una asociación no causal entre ambos parámetros.
- La capacidad competitiva de los hongos endófitos evaluados no mostró ser indicativa de la capacidad de colonización de los mismos en hojas libres de endófitos.
- Los hongos endófitos pueden modificar la viabilidad y la incidencia de *Hemileia vastatrix*, sin embargo, en este trabajo, solo *Glomerella cingulata*, redujo la germinación de las urediniosporas del fitopatógeno, lo que sugiere que, bajo ciertas circunstancias, *G. cingulata* podría desempeñar un papel ecológico como mutualista defensivo del cafeto.
- Los HE de *Coffea arabica*, a excepción de *Colletotrichum gloeosporioides* Gpo. 2 y *Xylaria* Gpo. 3, aceleran el proceso de descomposición de las hojas cuando éstas se desprenden de los cafetos, sugiriendo que estos hongos endófitos son saprótrofos latentes cuando viven en las hojas sanas y unidas a las plantas de café, y actúan como saprótrofos ya que las hojas envejecen o se desprenden de las plantas.

IX. LITERATURA CITADA

- Agrios GN. (2005). Plant Pathology, 5a ed. Elsevier, Academic Press, California USA, pp. 576-577.
- Aime MC. (2006). Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience*, 47:112–122.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. (1996). Introduction mycology (4 ed.). John Wiley & sons, INC., New York, NY, EUA, pp. 26-60.
- Anaya AL, Macías-Rubalcava M, Cruz-Ortega Rocío, García-Santana C, Sánchez-Monterrubio PN, Hernández-Bautista BE, Mata R. (2005). Allelochemicals from *Stauranthus perforates*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, México. *Phytochemistry*, 66:487–494.
- Anaya AL, Torres-Barragán A, Hernández-Bautista BE, Cruz-Ortega R, Saucedo-García A, Flores-Carmona MC, Gómez-Pompa A. (2003). Bioprospection studies at El Eden: From plants to fungi. En: Gómez-Pompa A, Allen MF, Fedick SL, Jiménez-Osornio JJ (Eds.). The Lowland Maya Area: Three millenia at the human-wildland interfase. Food Products Press, The Haworth Press, Inc. New York, pp. 447-460.
- Anaya AL. (2003). Ecología Química. Instituto de Ecología, UNAM y Plaza y Valdés Editores, México. ISBN: 970-722-113-5, p. 255.
- Aneja M, Gianfagna T, Hebbar P. (2006). *Trichoderma* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67:304–307.
- Arauz LF, Sutton TB. (1989). Temperature and wetness duration requirements for apple infection by *Botryosphaeria obtuse*. *Phytopathology*, 79:440–444.
- Arnold AE, Herre EA. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process on *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*, 95(3):388–398.
- Arnold AE, Lutzoni F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88:541–549.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS. (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees patterns of abundance and diversity. *Mycological Research*, 105(12):1502–1507.
- Arnold AE, Mejía LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(26):15649–15654.
- Arora DS, Ohlan D. (1996). *In vitro* studies on antifungal activity of tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) against wood-rotting fungi. *Journal of Basic Microbiology*, 37(3):159–165.
- Astoreca A, Vaamonde G, Dalcero A, Ramos AJ, Marín S. (2012). Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *International Journal of Food Microbiology*, 156:60–67.
- Azevedo JL, Araujo WL. (2007). Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. Capítulo 12 en: FUNGI: Multifaceted Microbes. Ganguli BN, Deshmukh SK, (eds.). Anamaya Publishers, New Delhi, India, pp. 198-207.

- Baayen RP, Bonants PJM, Verkley G, Carroll GC, van der Aa HA. (2002). Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*, 92:464–477.
- Bae H, Kim S-H, Kim MS, Sicher RC, Lary D, Strem MD, Natarajan S, Bailey BA. (2007). The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation of genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46:174–188.
- Bae H, Sicher RC, Kim MS, Kim S-H, Strem MD, Melnick RL, Bailey BA. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11):3279–3295.
- Bailey BA, Bae H, Strem MD, Roberts DP, Thomas SE, Crozier J, Samuels GJ, Choi I-Y, Holmes KA. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*, 224:1449–1464.
- Baldrian P. (2004). Increase of laccase activity during interspecific interaction of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 50:245–253.
- Baranyi J, Roberts TA. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal Food Microbiology*, 23:277–294.
- Bärlocher F. (1991). Intraspecific hyphal interactions among aquatic hyphomycetes. *Mycologia*, 83(1):82–88.
- Bélanger RR, Avis TJ. (2004). Ecological processes and interaction occurring in leaf surface fungi. Capítulo 13 en: *Phyllosphere Microbiology*, 2a ed. Lindow SE, Hecht-Poinar, Elliot VJ (eds.). APS Press, Minnesota, USA, 193-208.
- Blackwell M, Vilgalys R, James TY, Taylor JW. (2012). Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc. Version 30 enero 2012. <http://tolweb.org/Fungi/23377/2012.01.30>, en: The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3):426–438.
- Boddy L, Gibbon OM, Grundy MA. (1985). Ecology of *Daldinia concentrica*: effect of abiotic variables on mycelial extension and interspecific interaction. *Transaction of the British Mycological Society*, 85:201–211.
- Boddy L. (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, 31:185–194.
- Botella L, Santamaría O, Diez JJ. (2010). Fungi associated with the decline of *Pinus halepensis* in Spain. *Fungal Diversity*, 40:1–11.
- Boyle C, Götz M, Dammann-Tugend U, Schultz B. (2001). Endophyte–host interaction. III. Local vs. systemic colonization. *Symbiosis*, 31:259–281.
- Brundrett MC. (2006). Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. Capítulo 16 en: *Microbial Root Endophytes*, Schulz C, Boyle TN, Sieber S (eds.). Springer-Verlag, Germany, pp. 281–298.
- Bruns T. (2006). Evolutionary biology: a kingdom revised. *Nature*, 443(7113):758–61.

- Buchanan RL, Klawitter LA. (1991). Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 12:235–246.
- Cairney JWG. (1992). Traslocation of solutes in ectomycorrhizal and saprotrophic rhizomorphs. *Mycological Research*, 96:135–141.
- Canjura-Saravia EM, Sánchez-Garita V, Krauss U, Somarriba E. (2002). Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásita de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 66:13–19.
- Cano C, Bago A. (2005). Competition and substrate colonization strategies of tree polyxenically grown arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 97(6):1201–1214.
- Carlile MJ, Sellin MA. (1963). An endogenous inhibition of spore germination in fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(1):15-18.
- Carrillo ML, Zavala D, Alvarado B. (2007). Modelado del efecto de la temperatura, actividad de agua y pH sobre el crecimiento de *Rhizopus oryzae*. *Información Tecnológica*, 18(4):57–62.
- Chou C-H, Waller GR. (1980). Possible allelopathic constituents of *Coffea arabica*. *Journal of Chemical Ecology*, 6(3):643–654.
- Clay K, Holah J. (1999). Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science*, 285:1742–1744.
- Clay K, Shardi CL. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophytes symbiosis with grasses. *American Naturalist*, 160:S99–S127.
- Cristancho MA, Rozo Y, Escobar C, Rivillas CA, Gaitán AL. (2012). Outbreak of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in Colombia. *New Disease Reports*, 25:19.
- Da Silva EAA, Toorop PE, van Aelst AC, Hilhorst HWM. (2004). Abscisic acid Controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta*, 220:251–261.
- Dai CC, Chen Y, Tian LS, Shi Y. (2010). Correlation between invasion by endophytic fungus *Phomopsis* sp. and enzyme production. *African Journal of Agricultural Research*, 5(11):1324–1330.
- Davis TS, Hofstetter RW, Klepzig KD, Foster JT, Keim P. (2010). Interactions between multiple fungi isolated from two bark beetles, *Dendroctonus brevicomis* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1(7):118–126.
- De Bary A. (1866). En: *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten*. En: Toofanee SB, Dulymamode R. (2002). Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. *Fungal Diversity*, 11:169–175.
- De Bary A. (1879). Die Erscheinung der Symbiose, en: Trubner KJ, ed. *Vortrag auf der Versammlung der Naturforscher und Ärzte zu Cassel*. Strassburg, Germany: Verlag.
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182:314–330.
- Deckert RJ, Melville LH, Peterson RL. (2001). Structural features of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic life cycle in the foliage of *Pinus strobes*. *Mycological Research*, 105:991-997.

- Deising H, Nicholson RL, Haug M, Howard RJ, Mendgen K. (1992). Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the cuticle. *The Plant Cell*, 4:1101–1111.
- Demain AL (1981). Industrial microbiology. *Science*, 214:987–944.
- Dennis C, Webster J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. *Transactions fo the British Mycological Society*, 57(3):363–369.
- Devarajan PT, Suryanarayanan TS. (2006). Evidence for the role of phytophagous insects in dispersal of non-grass fungal endophytes. *Fungal Diversity*, 23:111–119.
- Dickinson CH, Skidmore AM. (1976). Interactions between germinating spores of *Septoria nodurum* and phylloplane fungi. *Transaction of the British Mycological Society*, 66(1):45–56.
- Dighton J. (2003). Fungi in ecosystem processes. Volumen 17 en: Bennet JW, Lemke PA (Eds.), *Micology series*. Marcer Dekker, Inc. New York, USA.
- Donnelly DP, Boddy L. (2001). Mycelial dynamics during interactions between *Stropharia caerulea* and other cord-forming, saprotrophic basidiomycetes. *New Phytologist*, 151:691–704.
- Dowson CG, Rayner ADM. (1988). Inoculation of mycelial cord-forming basidiomycetes into woodland soil and litter. *New Phytologist*, 109:335–348.
- Ellis JG, Rafiqi M, Gan P, Chakrabarti A, Dodds PN. (2009). Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:399–405.
- Eschen R, Hunt S, Mykura C, Gange AC, Sutton BC. (2010). The foliar endophytic fungal community composition in *Cirsium arvense* is affected by mycorrhizal colonization and soil nutrient content. *Fungal Biology*, 114:991–998.
- Eskes A., Mendes M, Robbs C. (1991). Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. *Café Cacao Thé*, 35:275–282.
- Espinosa-García FJ, Langenheim JH. (1990). The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population. Diversity and spatial patterns. *New Phytologist*, 116:89–97.
- Evans HC, Holmes KA, Thomas SE. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cacao diseases. *Mycological Progress*, 2:149–160.
- Faeth SH. (2002). Are endophytic fungi defensive defensive plant mutualists? *Oikos*, 98:25–36.
- Fernandes RC, Evans HC, Barretos RW. (2009). Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. *Tropical Plant Pathology*, 34:108–113.
- Fokkema NJ. (1973). The rôle of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. *Physiological Plant Pathology*, 3:195–205.
- Freeman S, Rodriguez RJ. (1993). Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science*, 260(5104):75–78.
- Freytag S, Mendgen K. (1991). Surface carbohydrates and cell wall structure of *in vitro* induced uredospore infection structures of *Uromyces viciae-fabae* before and after treatment with enzymes and alkali. *Protoplasma*, 161:94–103.

- Fukasawa Y, Osono T, Takeda H. (2009). Microfungus communities of Japanese beech logs at different stages of decay in a cool temperate deciduous forest. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(8):1606–1614.
- Gallery RA, Dalling JW, Arnold AE. (2007). Diversity, host affinity and distribution of seed-infecting fungi: a case study with *Cecropia*. *Ecology*, 88:582–588.
- Gamboa, MA, Bayman P. (2001). Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). *Biotropica*, 33 352-360.
- Ganley RJ, Brunsfeld SJ, Newcombe G. (2004). A community of unknown endophytic fungi in western white pine. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 101:10107–12.
- Gibson AM, Hocking AD. (1997). Advances in the predictive modeling of fungal growth in food. *Trends in Food Science & Technology*, 8:353–358.
- Glass NL, Jacobson DJ, Shiu PKT. (2000). The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics*, 34:165-86.
- Glass NL, Kaneko I. (2003). Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell*, 2(1):1–8.
- Griffith GS, Boddy L. (1990). Fungal decomposition of attached angiosperm twigs. I. Decay community development in ash, beech and oak. *New Phytologist*, 116:407–415.
- Griffith GS, Boddy L. (1991). Fungal decomposition of attached angiosperm twigs. IV. Effect of water potential on interactions between fungi on agar and in wood. *New Phytologist*, 117:633–641.
- Guo B, Wang Y, Sun X, Tang K. (2008). Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2):136–142.
- Guo LD, Hide KD, Liew ECY. (2000). Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist*, 147:617–630.
- Guzmán-Franco AW, Clark SJ, Alderson PG, Pell JK. (2009). Competition and co-existence of *Zoophtora radicans* and *Pandora blunckii*, two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth *Plutella xylostella*. *Mycological Research*, 113:1312-1321.
- Haddad F, Saraiva RM, Mizubuti ESG, Romeiro RS, Maffia LA. (2013). Antifungal compounds as a mechanism to control *Hemileia vastatrix* by antagonistic bacteria. *Tropical Plant Pathology*, 38(5):398–405.
- Hata K, Atari R, Sone K. (2002). Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. *Mycoscience*, 43:369-373.
- Hawksworth DL. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude significance, and conservation. *Mycological Research*, 95:641–655.
- Hawksworth DL. (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *MycoKeys*, 1:7–20.
- Herre EA, Mejía LC, Kyllö DA, Rojas E, Maynard Z, Butler A, Van Bael SA. (2007). Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 88:550–558.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell

- MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai Y-C, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson K-H, Lichtwardt R, Longcore J, Miądlikowska J, Miller A, Moncalvo J-M, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schuüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao Y-J, Zhang N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111:509–547.
- Holmer L y Stenlid J. (1993). The importance of inoculum size for competitive ability of wood decomposing fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 12:169–176.
- Holmes KA, Schroers HJ, Thomas SE, Evans HC, Samuels GJ. (2004). Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress*, 3:199–210.
- Howell CR. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1):4–10.
- Hyde KD, Soyong K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal diversity*, 33:163–173.
- Ikeda K, Inoue k, Hakamura H, Hamanaka T, Ohta T, Kitazawa H, Kida C, Kanematsu S, Park P. (2011). Genetic analysis of barrage line formation during mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Fungal Biology*, 115:80–86.
- Inbar J, Menendez A, Chet I. (1996). Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(6):757–763.
- Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1): 14-21.
- James TY, Kauff F, Schoch C, Matheny PB, Hofstetter V, Cox C, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung G-H, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüßler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkman-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett D, Lutzoni F, McLaughlin D, Spatafora J, Vilgalys R. (2006). Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature*, 443:818–822.
- Jani AJ, Faeth SH, Gardner D. (2010). Asexual endophytes and associated alkaloids alter arthropod community structure and increase herbivore abundances on a native grass. *Ecology Letters*, 13:106–117.
- Johnson JM, Oelmüller R. (2009). Mutualism or parasitism: life in an unstable continuum. What can we learn from the mutualistic interaction between *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*? *Endocytobiosis and Cell Research*, 19:81–111.
- Jones MDM, Forn I, Gadelha C, Egan MJ, Bass D, Massana R, Richards TA. (2011). Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature*, 474:200–203.

- Kavková M, Curn V. (2005). *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). *Mycopathologia*, 159:53–63.
- Keeling PJ, Fast NM. (2002). MICROSPORIDIA: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology*, 56:93-116.
- Kennedy P. (2010). Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence, mechanisms, and future research directions. *New Phytologist*, 187:895–910.
- Kim ES, Liang YR, Jin J, Sun QF, Lu JL, Du YY, Lin C. (2007). Impact of heating on chemical compositions of green tea liquor. *Food Chemistry*, 103:1263-1267.
- Klepzig KD, Wilkens RT. (1997). Competitive interactions among symbiotic fungi of the southern pine beetle. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2):621–627.
- Kolmer JA, Ordonez ME, Groth JV. (2009). The Rust Fungi. En: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0021264].
- Korkama-Rajala T, Müller MM, Pennanen T. (2008). Decomposition and fungi of needle litter from slow- and fast-growing Norway Spruce (*Picea abies*) Clones. *Microbial Ecology*, 56:76–89.
- Krings M, Taylor TN, Hass H, Kerp H, Dotzler N, Hermsen EJ. (2007). Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist*, 174:648–657.
- Kurose D, Furuya N, Tsuchiya K, Tsushima S. (2012). Endophytic fungi associated with *Fallopia japonica* (Polygonaceae) in Japan and their interactions with *Puccinia polygoni-amphibii* var. *tovariae*, a candidate for classical biological control. *Fungal Biology*, 116:785–791.
- Larrauri JA, Rupérez P, Saura-Calixto F. (1997). Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4):1390–1393.
- Lau M, Arnold AE, Johnson NC. (2013). Factors influencing communities of foliar fungal endophytes in riparian woody plants. *Fungal Ecology*, 6(5):365–378.
- Leipe DD, Wainright PO, Gunderson JH, Porter D, Patterson DJ, Valois F, Himmerich S, Sogin ML. (1994). The straminopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labyrinthula minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. *Phycologia*, 33:369–377.
- Leong SL, Petterson OV, Rice T, Hocking AD, Schnürer J. (2011). The extreme xerophilic mould *Xeromyces bisporus* – Growth and competition at various water activities. *International Journal of Food Microbiology*, 145:57–63.
- Lindahl BD, Olsson S. (2004). Fungal translocation – creating and responding to environmental heterogeneity. *Mycologists*, 18(2):79–88.
- Lodge DJ, Fisher PJ, Sutton BC. (1996). Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia*, 88:733–38.
- Louie AH. (2010). Relational Biology of Symbiosis. *Axiomathes*, 20:495–509.
- Macías-Rubalcava ML, Hernández-Bautista BE, Jiménez-Estrada M, González MC, Glenn AE, Hanlin RT, Hernández-Ortega S, Saucedo-García A, Muria-González JM, Anaya AL. (2008). Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry*, 69:1185–1196.

- Magan N, Lacey J. (1984). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(1):83–93.
- Mahfud MC, Mior Ahmad ZA, Meon S, Kadir J. (2006). *In vitro* and *in vivo* tests for parasitism of *Verticillium psalliotae* treschow on *Hemileia vastatrix* Berk. and Br. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1):45–50.
- Margullis L. (1991). Symbiogenesis and symbioticism. Capítulo 1 en: .Margullis L, Fester R, (eds.), *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*, 1a ed, MIT Press, Cambridge, pp. 1–12.
- Marín S, Cuevas D, Ramos AJ, Sanchis V. (2008). Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. *International Journal of Food Microbiology*, 121:139–149.
- McMeekin TA, Ollen J, Ratkowsky DA, Ross T. (2002). Predictive microbiology: toward the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 73:395–407.
- Mejía LC, Rojas EI, Maynard Z, Van Bael S, Arnold AE, Hebbar P, Samuels GJ, Robbins N, Herre EA. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46:4–14.
- Meletiadiis J, Meis JFGM, Mouton JW, Verweij PE. (2001). Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *Journal of Clinical Microbiology*, 39:478–484.
- Monk KA, Samuels GJ. (1990). Mycophagy in grasshoppers (*Orthoptera, Acrididae*) in Indo-Malayan rain forest. *Biotropica*, 22:16–21.
- Morales H, Sanchis V, Coromines J, Ramos AJ, Marín S. (2008). Inoculum size and intraspecific interactions affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Food Microbiology*, 25:378–385.
- Nayeem N, Denny G, Mehta SC. (2011). Comparative phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant activity of the methanolic extracts of the leaves of *Coffea arabica* and *Coffea robusta*. *Der Pharmacia Lettre*, 3(1):292–297.
- Neubert K, Mendgen K, Brinkmann H, Wirsal SGR. (2006). Only a few fungal species dominate highly diverse mycofloras associated with the common reed. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:1118–1128.
- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R. (2005). Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:5544–5550.
- Oliver R, Ipcho SVS. (2004). Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens, *Molecular Plant Pathology*, 5(4):347–352.
- Omacini M, Chaneton EJ, Ghera CM, Müller CB. (2010). Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interactions webs. *Nature*, 409:78–81.
- Osono T, Mori A. (2003). Colonization of Japanese beech leaves by Phyllosphere fungi. *Mycoscience*, 44:437–441.
- Osono T, Takeda H. (1999). Decomposing ability of interior and surface fungal colonizers of beech leaves with reference to lignin decomposition. *European Journal of Soil Biology*, 35(2):51–56.

- Osono T. (2006). Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(8):701–16.
- Panaccione DG, Beaulieu WT, Cook D. (2013). DEFENSIVE SYMBIOSIS: Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. *Functional Ecology*, doi:10.1111/1365-2435.12076.
- Partida-Martínez LP, Heil M. (2011). The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science*, 2(100):1–16.
- Peláez F, Cabello A, Platas G, Diez MT, del Val AG, Basilio A, Martan I, Vicente F, Bills GF, Giacobbe RA, Schwartz RE, Onishi JC, Mainz MS, Abruzzo GK, Flattery AM, Kong L, Kurtz MB. (2000). The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Systematic and Applied Microbiology*, 22:1185–1195.
- Perfect SE, Green JR. (2001). Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 2:101–108.
- Pirozynski KA, Malloch DW. (1975). The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *BioSystems*, 6:153–164.
- Pontón J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25:78–82.
- Porrás-Alfaro A, Bayman P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49:291–315.
- Porter CL. (1924). Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi. *American Journal of Botany*, 11:168–188.
- Posada F, Vega, FE. (2006). Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycoscience*, 47:284–289.
- Prompttha I, Hyde KD, McKenzie EHC, Peberdy JF, Lumyong S. (2010). Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? *Fungal Diversity*, 41(1):89–99.
- Prompttha I, Lumyong S, Dhanasekaren V, McKenzie EHC, Hyde KD, Jeewon R. (2007). A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*, 53:579–590.
- Provorov NA. (2009). Plant-microbe symbioses as an evolutionary continuum. *Zhurnal Obshchei Biologii*, 70(1):10–34.
- Purahong W, Hyde KD. (2011). Effects of fungal endophytes on grass and non-grass litter decomposition rates. *Fungal Diversity*, 47:1–7.
- Quiroz-Sarmiento VF, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Lara Hernández ME. (2008). Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología*, 26:27–34.
- Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici VA, Hardham AR, Dodds PN. (2012). Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:477–482.

- Raghavendra AKH, Newcombe G. (2013). The contribution of foliar endophytes to quantitative resistance to *Melampsora rust*. *New Phytologist*, 197(3):909–918.
- Rakotoniriana EF, Munaut F, Decock C, Randriamampionona D, Andriambololoniaina M, Rakotomalala T, Rakotonirina EJ, Rabemanantsoa C, Cheuk K, Ratsimamanga SU, Mahillon J, El-Jaziri M, Quetin-Leclercq J, Corbisier AM. (2008). Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93(1-2):27–36.
- Ramiro DA, Escoute J, Petitot A-S, Nicole M, Maluf MP, Fernandez D. (2009). Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology*, 58:944–955.
- Rasband W. (1997-2008). ImageJ 1.34s. National Institutes of Health USA [en línea] <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>
- Rauscher M, Mendgen K, Deising H. (1995). Extracellular proteases of the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Experimental Mycology*, 19:26–34.
- Rayner ADM, Griffith GS, Howard GW. (1994). Induction of metabolic and morphogenetic changes during mycelial interactions among species of higher fungi. *Biochemical Society Transactions*, 22:389–394.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289(5486):1920–1921.
- Redman RS, Dunigan DD, Rodriguez RJ. (2001). Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist*, 151:705–716.
- Redman RS, Freeman S, Clifton DR, Morrel J, Brown GS, Rodriguez RJ. (1999). Biochemical analyses of plant protection afforded by a non-pathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna* (teleomorph *Glomerella magna*; Jenkins and Winstead, 1964). *Plant Physiology*, 119:795–803.
- Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM. (2002). Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298:1581.
- Rizvi SJH, Haque H, Singh VK, Rizvi V. (1992). A discipline called allelopathy. Allelopathy. Capítulo 1 en: Rizvi JH, Rizvi V (Eds.), *Allelopathy*, Chapman & Hall, London, pp. 1–10.
- Rodriguez R, Redman R, Henson JM. (2004). The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9:261–272.
- Rodriguez R, Redman R, Henson JM. (2005). Symbiotic lifestyle expression by fungal endophytes and the adaptation of plants to stress: Unraveling the complexities of intimacy. Capítulo 34 en: *The Fungal Community*, 3a ed. Dighton J, Oudemans P, White J (eds.). Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 683–695.
- Rodriguez R, Redman R. (2008). More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 59(5):1109–1114.
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182:314–330.
- Rojas EI, Rehner SA, Samules GJ, Van Bael SA, Herre EA, Cannon P, Chen R, Pang J, Wang R, Zhang Y, Peng Y-Q, Sha T. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with

- Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*, 102:1318–38.
- Rolz Asturias CE, De León Fajardo LR, Paniagua O. (2013). Evidencia de un antagonismo *in vitro* de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (roya del café). *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*, 25:61–65.
- Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWV, Maki CS, Araújo WL, dos Santos DR, Azevedo JL. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1:24–33.
- Rudgers JA, Clay K. (2005). Fungal endophytes in terrestrial communities and ecosystems. Capítulo 21 en: *The Fungal Community*, 3a ed. Dighton J, Oudemans P, White J (eds.). Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 423–442.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ. (1998). FUNGAL ENDOPHYTES: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systems*, 29:319–43.
- Saikkonen K, Saari S, Helander M. (2010). Defensive mutualism between plants and endophytic fungi. *Fungal Diversity*, 41:101–113.
- Saikkonen K, Wali P, Helander M, Faeth SH. (2004). Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9:275–280.
- Santamaría J, Bayman P. (2005). Fungal epiphytes and endophytes of Coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, 50:1–8.
- Saupe SJ, Clavé C, Bégueret J. (2000). Vegetative incompatibility in filamentous fungi: *Podospora* and *Neurospora* provide some clues. *Current Opinion in Microbiology*, 3:608–612.
- Schluter D. (1996). Ecological causes of adaptive radiation. *The American Naturalist*, 148:S40–S64.
- Schmit JP, Mueller GM. (2007). An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation*, 16:99–111.
- Schubert M, Schwarze FW. (2011). Evaluation of the interspecific competitive ability of the bioincising fungus *Physisporinus vitreus*. *Journal of Basic Microbiology*, 51:80–88.
- Schulz B, Boyle C. (2005). The endophytic continuum. *Micological Research*, 109:661–686.
- Schulz B, Rommert AK, Dammann U, Aust HJ, Strack D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Micological Research*, 10:1275–1283.
- Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust H-J. (1993). Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 97:1447–1450.
- Sette LD, Passarini MRZ, Delarmelina C. (2006). Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22:1185–1195.
- Shaw TM, Dighton J, Sanders FE. (1995). Interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on agar and in association with seedlings of lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Mycological Research*, 99(2):159–165.
- Shearer CA, Zare-Maivan H. (1988). *In vitro* hyphal interactions among wood- and leaf- inhabiting ascomycetes and fungi imperfecti from freshwater habitats. *Mycologia*, 80(1):1–37.

- Shiomi HF, Silva HSA, de Melo IS, Nunes FV, Bettiol W. (2006). Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola*, 63(1):32–39.
- Sieber T. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they Mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21:75–89.
- Silva HSA, Tozzi JPL, Terrasan CRF, Bettiol W. (2012). Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biological Control*, 63:62–67.
- Silva MC, Nicole M, Rijo L, Geiger JP, Rodrigues CJ. (1999). Cytochemical aspects of the plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv Caturra)-*Hemileia vastatrix* (race III). *International Journal of Science*, 160(1):79–91.
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, 363:67–69.
- Singh I, Dixit AK, Kushwaha RKS. (2009). Antagonism of *Microsporium* species by soil fungi. *Mycoses*, 53:32–39.
- Singh LP, Gill SS, Tuteja N. (2011). Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signalling & Behavior*, 6(2):175–191.
- Skidmore AM, Dickinson CH. (1976). Colony interactions and hyphal interference between *Septoria Nodorum* and *phylloplane* fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(1):57–64.
- Stahl PD, Christensen M. (1992). *In vitro* mycelial interactions among members of a soil micro-fungal community. *Soil Biology and Biochemistry*, 24:309–316.
- Stenlid J. (2008). Chapter 6. Population biology of forest decomposer basidiomycetes. Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. *British Mycological Society Symposia Series*, 28:105–122.
- Stone JK. (1987). Fine structure of latent infection by *Rhizoctonia parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells. *Canadian Journal of Botany*, 66:45–54.
- Swinnen IAM, Bernaerts K, Dens EJJ, Geeraerd AH, Van Impe JF. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:137–159.
- Taylor TN, Hass H, Kerp H. (1999). The oldest fossil ascomycetes. *Nature*, 399:648.
- Taylor TN, Klavins SD, Krings M, Taylor EL, Kerp H, Hass H. (2004). Fungi from the Rhynie chert: a view from the dark side. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh, Earth Sciences*, 94:457–473.
- Taylor TN, Krings M. (2005). Fossil microorganisms and land plants: Associations and Interactions. *Symbiosis*, 40:119–135.
- Taylor TN. (1995). Fossil arbuscular mycorrhizae from the early Devonian. *Mycologia*, 87(4):560–573.
- Terhune BT, Allen EA, Hoch HC, Wergin WP, Erbe EF. (1991). Stomatal ontogeny and morphology in *Phaseolus vulgaris* in relation to infection structure initiation by *Uromyces appendiculatus*. *Canadian Journal of Botany*, 69:477–484.
- Terhune BT, Bojko RJ, Hoch HC. (1993). Deformation of stomatal guard cell lips and microfabricated artificial topographies during appressorium formation by *Uromyces*. *Experimental Mycology*, 17:70–78.

- Tondje PR, Hebbbar PK, Samuels G, Bowers JH, Weise S, Nyemb E, Begoude D, Foko J, Fontem D. (2006). Bioassay of *Geniculosporium* species for *Phytophthora megakarya* biological control on cacao pod husk pieces. *African journal of biotechnology*, 5(8):648–652.
- Tuininga AR. (2005). Interspecific Interaction Terminology: From Mycology to General Ecology. En: Dighton J, Oudemans P, White J (eds.), *The Fungal Community*, 3a ed., Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 265-283.
- U'ren JM, Lutzoni F, Miadlikowska J, Laetsch D, Arnold E. (2012). Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *American Journal of Botany*, 99(5):898–914.
- Ulloa M, Hanlin RT. (1978). *Atlas de Micología Básica*. Editorial Concepto, S.A. México D.F.
- Ulloa M, Hanlin RT. (2012). *Illustrated Dictionary of Mycology*. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA, pp. 394, 549.
- Valík L, Baranyi J, Görner F. (1999). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, 47:141–146.
- Valio IFM. (1980). Inhibition of germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo) by the endocarp. *Journal of Seed Technology*, 5:32–39.
- van der Heijden MGA., Bardgett RD, van Straalen NM. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11:296–310.
- Várzea VMP, Marques DV. (2005). *Population variability of Hemileia vastatrix Against Durable Resistance*. En: Zambolim L, Zambolim E, Varzea VMP (Eds.), *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*, Universidad Federal de Vicosa, Vicosa, Brasil, p. 305.
- Vega FE, Simpkins A, Aime MC, Posada F, Peterson SW, Rehner SA, Infante F, Castillo A, Arnold AE. (2009). Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology*, 3:122–138.
- Voegelé RT, Hahn M, Mendgen K. (2009). The Uredinales: cytology, biochemistry, and molecular biology. En: *The Mycota*, 5. Plant Relationships. Deising HB (ed). Springer, Berlin, pp. 69-98.
- Wearn JA, Sutton BC, Morley NJ, Gange AC. (2012). Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *Journal of Ecology*, 5(100):1085–1092.
- Webster J, Weber R. (2007). *Introduction to fungi*. 3a Edición. Cambridge, UK. 841 p.
- Weiß M, Sýkorova Z, Garnica S, Riess K, Martos F, Krause C, Oberwinkler F, Bauer R, Redecker D. (2011). Sebaciniales everywhere: Previously overlooked ubiquitous fungal endophytes. *PLOS One*, 6(2):1–7.
- Wheeler KA, Hocking AD. (1993). Interactions among xerophilic fungi associated with dried salted fish. *Journal of Applied Bacteriology*, 74:164–169.
- Whiting RC, Bagi LK. (2002). Modelling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 73:291–295.
- Wilkinson DM. (2001). At cross purposes. *Nature*, 412:485.
- Wilson D. (1995). Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73 274–276.

- Woods CM, Woodward S, Redfern DB. (2005). *In vitro* interactions in artificial and wood-based media between fungi colonizing stumps of Sitka spruce. *Forest Pathology*, 35(3):213–229.
- Yuen TK, Hyde KD, Hodgkiss IJ. (1999). Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microbial Ecology*, 37:257–262.
- Zwietering MH, de Wit JC, Cuppers HGAM, Van't Reit K. (1994). Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:204–213.

Páginas web de organismos nacionales e internacionales consultadas

- AMECAFE (2012). Plan Integral de Promoción del café de México. Recuperado el día 30 de noviembre de <http://amecafe.org.mx/backup/pcm2012.pdf>
- FAO. (2011). Food and agricultural commodities production. Recuperado el día 10 de enero de <http://faostat.fao.org>.
- SAGARPA. (2010). Escenario actual del café. Dirección General de Operaciones Financieras Dirección de Estudios y Análisis de Mercados. Recuperado el día 30 de noviembre de <http://www.aserca.gob.mx>.
- SAGARPA. (2013). México, pionero en el control de la roya del cafeto con innovación y transferencia de tecnología orgánica. Boletín. Recuperado el día 29 de julio de 2013.

X. ANEXOS

ANEXO I

En el bioensayo preliminar para obtener la tasa de crecimiento (TC_p) de los HE, se colocó un inóculo de cada hongo en cajas Petri con diferentes medios de cultivo: papa-dextrosa-agar (PDA), PDA + extracto de hojas de café (PDA+EC), Agar-Avena + EC (AA+EC) y Agar-Agua + EC (ADE+EC). Después de la siembra de los hongos endófitos se midió diariamente el área de crecimiento de los mismos durante siete días. En este caso, se determinó la TC_p de cada hongo endófito a partir del valor de la pendiente resultante de una regresión lineal simple, donde la variable dependiente fue el área de crecimiento del micelio y la independiente el tiempo de cada medición. A partir de los valores de las pendientes se caracterizó el crecimiento de cada hongo como lento, medio o rápido (Yuen *et al.*, 1999) (**Tabla 1**).

Tabla 1. TC_p de los HE en diferentes medios de cultivo y caracterización final del crecimiento

Nombre	Velocidad de Crecimiento (cm ² /día)				C	No.
	PDA	AA+EC	ADE+EC	PDA+EC		
<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	7.07	9.138	8.956	9.083	Rápida	1
<i>Co. gloeosporioides</i> Gpo. 1	6.70	7.261	7.932	8.058	Medio	4
<i>G. cingulata</i>	7.07	8.767	8.832	8.903	Rápida	3
<i>Xylaria</i> Gpo. 1	5.06	7.456	7.125	7.197	Lento	6
<i>Xylaria</i> Gpo. 2	4.46	5.962	5.453	5.243	Lento	7
<i>Co. gloeosporioides</i> Gpo. 2	5.45	7.575	7.812	7.773	Lento	5
<i>Cr. corticola</i>	8.62	8.236	7.343	9.519	Rápida	2

C= Caracterización de la tasa de crecimiento; No.= Número ordinal de acuerdo a la TC_p del HE.

Los resultados mostraron que la TC_p de los HE aumentó en los medios adicionados con extracto de hojas de café, principalmente con el medio PDA+EC, por lo que éste fue seleccionado para realizar los bioensayos de crecimiento y de interacción *in vitro* en el presente trabajo.

ANEXO II

Modelos y el significado de los parámetros de crecimiento.

Los parámetros calculados por el programa DMFit (©2013) que utiliza el modelo completo de Baranyi y Roberts (1994) son: (1) **Valor inicial**, que es el logaritmo inicial del crecimiento, en este caso del micelio, en cm^2 ; (2) **Tiempo de latencia (lag time)**, esta parte de la curva se define comúnmente como la intersección entre la recta tangente de la fase de crecimiento exponencial y el valor inicial (unidades: días u horas), (3) **Tasa máxima de crecimiento**, que como su nombre lo indica es la fase de crecimiento máximo de las colonias (unidades: $\text{cm}^2/\text{días}$) y (4) **Valor final**, que es el logaritmo final del crecimiento en cm^2 . El modelo incompleto omite la asíntota del valor final (fase estacionaria), por lo que únicamente calcula los 3 primeros parámetros. La **Fig. 1** ilustra gráficamente los modelos utilizados y sus parámetros.

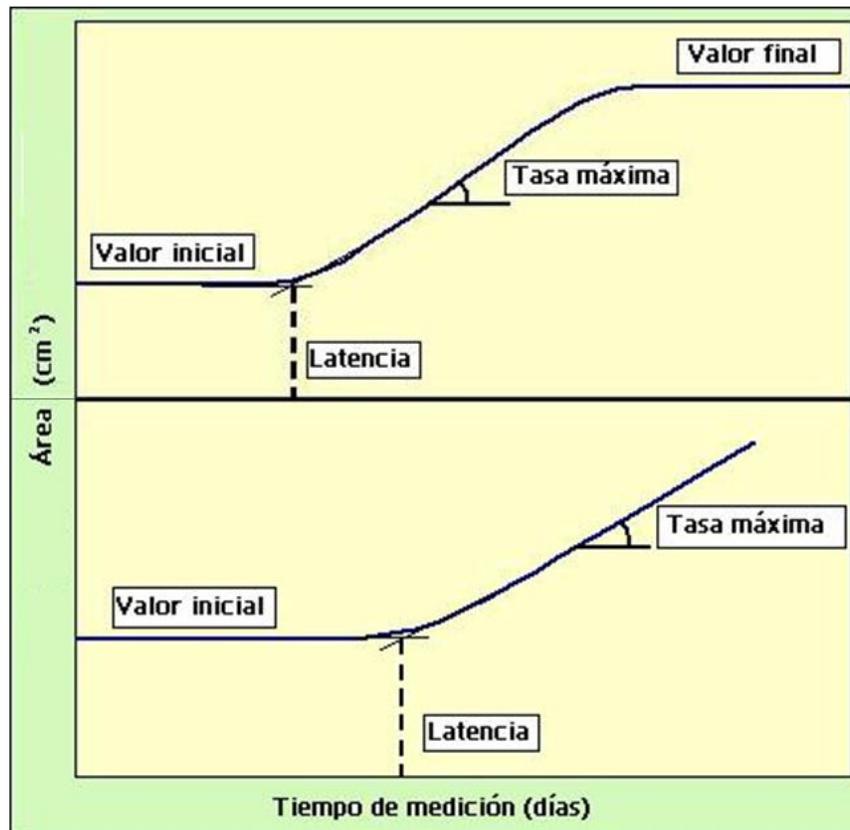


Fig. 1. Modelo de Baranyi y Roberts. Arriba, modelo completo y abajo modelo incompleto (sin asíntota). Adaptado de la página DMFit Web Edition <http://modelling.combase.cc/HelpDMFit/ModelsDMFit.aspx>.

ANEXO III

En los bioensayos de interacción *in vitro*, los HE se sembraron en las cajas Petri de acuerdo a su tasa de crecimiento. Como la separación entre los dos inóculos fue de 4 cm, se dedujo que la mitad de esta distancia sería la zona de interacción de los dos HE al ser enfrentados; por lo tanto, se obtuvo el tiempo de contacto (t_c), es decir, el número de días en los que el micelio de cada HE alcanzó un área aproximada de 12.57 cm², correspondiente a 2 cm de radio o a 4 cm de diámetro (**Fig. 2**). Las áreas por día se tomaron de la tabulación que produjo el programa DMFit (©2013), al ajustar cada curva de crecimiento. Con el promedio de las tres réplicas se calculó el t_c , de cada HE.

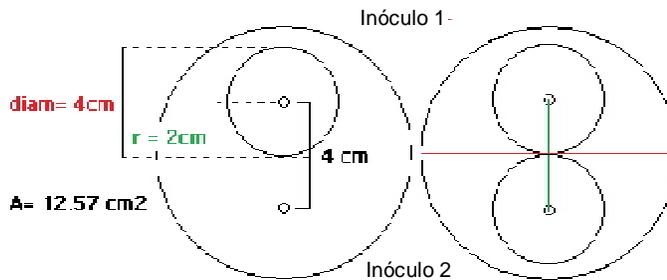


Fig. 2. Esquema del cálculo de la zona de interacción entre HE dentro de las cajas Petri.

Con el t_{int} y con base en el crecimiento del HE más lento (T_0), se calculó el tiempo de la inoculación para cada uno de los otros 8 hongos, con la fórmula: $T_{iHE} = T_0 - T_x$. Donde, T_{iHE} o tiempo de inoculación de cada HE, es la diferencia entre el tiempo en el que el HE más lento alcanzó la zona de interacción (T_0) y el tiempo en el que cada uno de los otros HE alcanzaron dicha zona (T_x). Tomando como día cero la inoculación del HE más lento, el orden de inoculación quedó como muestra la **Tabla 2**.

Tabla 2. Orden de inoculación de los hongos endófitos (A= área aproximada)

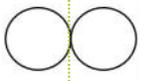
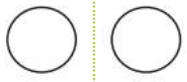
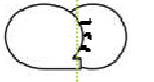
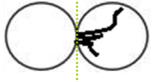
No.	Hongo endófito	Número de días (A ≈ 12.57 cm ²)								Día de siembra
		1	2	3	4	5	6	7	8	
1	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.			X						5
2	<i>Cr. corticola</i>			X						5
3	<i>G. cingulata</i>			X						5
4	<i>Co. gloeosporioides</i> Gpo. 1				X					4
5	<i>Co. gloeosporioides</i> Gpo. 2				X					4
6	<i>Xylaria</i> Gpo. 1					X				3
7	<i>Xylaria</i> Gpo. 2						X			2
8	<i>Xylaria</i> Gpo. 3							X		0
9	<i>Paecilomyces</i> sp.							X		0

ANEXO IV

Tabla 3. Características para la adición o sustracción de puntos a cada hongo endófito en una interacción

+1	<ul style="list-style-type: none"> • Por presentar una zona de inhibición mayor de 2 mm. • Por cubrir con su micelio o con rizomorfos el borde de la colonia del hongo copartícipe.
+2	<ul style="list-style-type: none"> • Por cubrir con su micelio, por lo menos una tercera parte de la colonia del otro hongo. • Por atravesar parcial o totalmente por medio de rizomorfos la colonia del hongo copartícipe.
+3	<ul style="list-style-type: none"> • Por cubrir totalmente con su micelio la colonia del hongo copartícipe.
-1	<ul style="list-style-type: none"> • Por ser cubierto parcialmente por el micelio del hongo copartícipe .
-2	<ul style="list-style-type: none"> • Por ser cubierto totalmente por el micelio del hongo copartícipe.

Tabla 4. Sistema de clasificación de interacciones fúngicas (Adaptado de Magan y Lacey, 1984; Wheeler y Hocking, 1993, y Leong *et al.*, 2011)

Puntuación A:B	A vs B	Descripción de la interacción
3:3		Bloqueo mutuo. Ambos hongos detienen su crecimiento al hacer contacto entre ellos. Con un espacio entre ellos igual o menor a 2 mm.
4:4		Permanece una zona de inhibición mayor o igual a 2 mm entre ambos hongos sin que se determine cual la ocasiona.
4:3		Después del contacto entre colonias, la colonia A invade el borde de la B, con micelio o rizomorfos.
5:3		Después del contacto entre colonias, la colonia A atraviesa a la B con rizomorfos (al menos el 30% de la colonia).
5:2		Después del contacto entre colonias, la colonia A crece sobre la B hasta cubrirla parcialmente (30-85%).
6:1		La colonia A crece sobre la B hasta cubrirla por completo. La colonia B detiene su crecimiento al contacto con la A.

ANEXO V

En los bioensayos de colonización o captura secundaria de recursos, se inoculó a cada Colonizador 1 (C1) al mismo tiempo en el centro de distintas cajas Petri y se esperó a que cubrieran las cajas.

Cuando los C1 cubrieron la caja Petri se colocó a cada C2 (Colonizador 2) en un extremo de la caja, sobre el micelio del C1 correspondiente, completando todas las combinaciones posibles entre C1 y C2. A cada C2 se le dejó crecer durante el tiempo en el que el C1 de su misma especie había cubierto la caja Petri, y después de ese tiempo, se midió el perímetro del crecimiento de estos C2. De esta forma cada HE C2 tuvo el tiempo necesario para cubrir la caja Petri como si estuviera en ausencia de competidores antes de ser medido; por lo tanto, para obtener el porcentaje de inhibición (PI) de cada C2 se tomó como Testigo el área total de la caja Petri (áreaTOTAL). En la **Tabla 5** se muestra el tiempo en que los HE cubrieron por completo las cajas Petri de 5 cm, que fue el mismo día en que se inocularon todos los HE como C2 sobre los C1.

Tabla 5. Tiempo en el que los HE C1 tardaron en cubrir la caja Petri

No	Hongo endófito	Tiempo en días											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.				X								
2	<i>Cr. corticola</i>				X								
3	<i>G. cingulata</i>				X								
4	<i>Co. gloeosporioides</i> Gpo. 1					X							
5	<i>Co. gloeosporioides</i> Gpo. 2					X							
6	<i>Xylaria</i> Gpo. 1					X							
7	<i>Xylaria</i> Gpo. 2							X					
8	<i>Xylaria</i> Gpo. 3									X			
9	<i>Paecilomyces</i> sp.												X

ANEXO VI

Cálculo de las respuestas competitivas y de los efectos competitivos

Las respuestas competitivas se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\text{Respuestas competitivas} = (Plab + Plac + Plad \dots + Plan) / (n - 1)$$

Donde $Plax$ es el porcentaje de inhibición del hongo 'a' al interactuar con los demás hongos 'x' (b, c, d...n), y n es el número total de hongos. En el bioensayo de captura secundaria de recursos, el hongo 'a' corresponde al Colonizador 2, y los hongos 'x' a los Colonizadores 1 sembrados antes que el hongo 'a'.

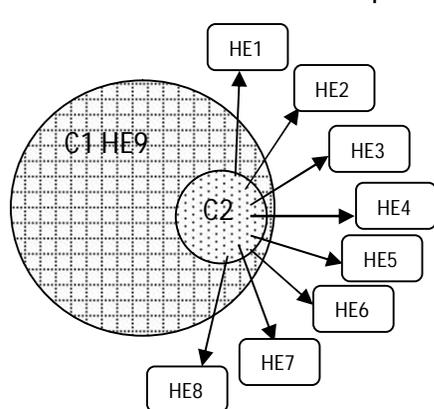
Los efectos competitivos se calcularon con la fórmula:

$$\text{Efectos competitivos} = (Plba + Plca + Plda \dots + Plna) / (n - 1)$$

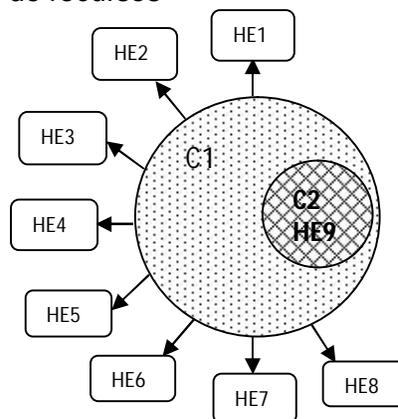
Donde $Plxa$ es el porcentaje de inhibición de los otros hongos 'x' (b, c, d...n) que interactuaron con el hongo 'a', y n es el número total de hongos. En el bioensayo de captura secundaria de recursos el hongo 'a' corresponde al Colonizador 1, y los hongos 'x' a los Colonizadores 2 que se inocularon sobre el hongo 'a'.

Captura secundaria de recursos

Efecto competitivo

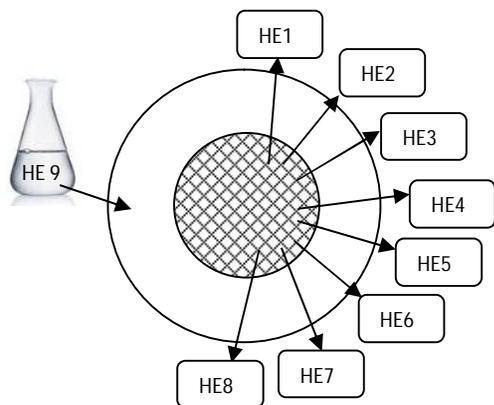


Respuesta competitiva



Crecimiento de los HE con filtrado del medio de cultivo de los demás HE.

Efecto alelopático



Respuesta a los alelopáticos

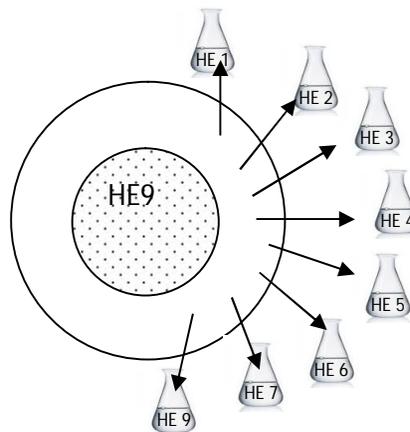


Fig 3. Esquema de obtención de los efectos competitivos y las respuestas competitivas en los bioensayos complementarios. Se utiliza como ejemplo el HE no. 9.

ANEXO VII

TABLA 6. Secuencia de filtros para obtener filtrados libres de propágulos de cada HE

Hongos endófitos	Tipo de filtro y abertura en μm				
	Whatman 4	Whatman 1	Whatman 42	Whatman (fibra de vidrio)	Millipore
	20-25	11	2,5	0,7	0,45
<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	X	X	X		
<i>Cryptosporiopsis corticola</i>	X	X	X	X	
<i>Glomerella cingulata</i>	X	X	X	X	
<i>Colletotrichum gloeospor.</i> Gpo. 1	X	X	X		
<i>Colletotrichum gloeospor.</i> Gpo. 2	X	X	X	X	
<i>Xylaria</i> Gpo. 1	X	X	X		
<i>Xylaria</i> Gpo. 2	X	X	X	X	
<i>Xylaria</i> Gpo. 3	X	X	X		
<i>Paecilomyces</i> sp.	X	X	X	X	X

ANEXO VIII

Tabla 7a. Área antes del contacto (A_i) de los hongos endófitos en interacción y de forma individual

HE	Tc	TI	Hongos endófitos (Efecto)								
			1 (<i>Cryptosp. sp.</i>)	2 (<i>Cryptosp. corticola</i>)	3 (<i>G. cingulata</i>)	4 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 1</i>)	5 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 2</i>)	6 (<i>Xylaria Gpo. 1</i>)	7 (<i>Xylaria Gpo. 2</i>)	8 (<i>Xylaria Gpo. 3</i>)	9 (<i>Paecilom. sp.</i>)
PDA											
1	9.61 ± 0.38	9.49 ± 0.40	X	8.65 ± 0.65	8.58 ± 0.11	9.89 ± 0.49	9.5 ± 0.17	9.31 ± 0.16	9.86 ± 0.35	7.92 ± 0.59 [°]	10.09 ± 0.88
2	7.71 ± 0.71	9.02 ± 0.68	9.39 ± 0.35	X	7.63 ± 0.75	8.13 ± 0.40	8.21 ± 0.51	6.87 ± 0.15	5.80 ± 0.38 [°]	5.68 ± 0.14 [°]	9.73 ± 1.82
3	8.76 ± 0.19	9.13 ± 0.16	8.98 ± 0.18	9.59 ± 0.03	X	9.15 ± 0.92	8.11 ± 0.15	8.25 ± 0.87	9.72 ± 0.38	7.47 ± 0.45 [°]	8.83 ± 0.13
4	11.75 ± 0.28	11.45 ± 0.07	12.66 ± 0.08 ^{*°}	12.18 ± 0.14	12.27 ± 0.12 [°]	X	11.23 ± 0.11	10.21 ± 0.39 ^{*°}	10.80 ± 0.13 [*]	9.15 ± 0.13 ^{*°}	11.07 ± 0.59
5	10.93 ± 0.27	11.65 ± 0.18	10.69 ± 0.46	9.86 ± 0.10 ^{*°}	10.5 ± 0.19 [°]	10.26 ± 0.33 [°]	X	10.35 ± 0.01 [°]	11.69 ± 0.40	11.03 ± 0.71	11.20 ± 0.23
6	7.97 ± 0.22	8.33 ± 0.30	7.88 ± 0.14	9.00 ± 0.08	8.13 ± 0.21	9.23 ± 0.89 [*]	9.15 ± 0.62 [*]	X	9.02 ± 0.28	8.50 ± 0.16	8.81 ± 0.13
7	7.94 ± 0.69	7.71 ± 0.37	6.76 ± 0.52	6.86 ± 0.40	6.60 ± 0.45 [*]	7.31 ± 0.45	6.21 ± 0.024 ^{*°}	8.02 ± 0.48	X	8.03 ± 0.40	8.38 ± 0.20
8	13.71 ± 0.40	13.56 ± 0.23	13.45 ± 0.36	13.71 ± 0.27	12.86 ± 0.89	13.47 ± 0.34	12.8 ± 0.43	13.02 ± 0.16	13.55 ± 0.49	X	14.01 ± 0.56
9	10.35 ± 0.05	10.32 ± 0.01	10.4 ± 0.30	10.31 ± 0.21	10.50 ± 0.002	10.21 ± 0.003	10.65 ± 0.58	12.36 ± 1.60 ^{*°}	10.36 ± 0.08	11.19 ± 0.10	X
PDA + EC											
1	5.14 ± 0.43	5.80 ± 0.014	X	5.80 ± 0.079	5.64 ± 0.07	5.33 ± 0.24	5.76 ± 0.086	5.52 ± 0.55	6.07 ± 0.057 [*]	4.59 ± 0.36 [°]	4.24 ± 0.026 ^{*°}
2	7.53 ± 0.35	8.13 ± 0.50	7.31 ± 0.69	X	6.11 ± 0.06 ^{*°}	8.43 ± 0.77	7.61 ± 0.12	8.46 ± 0.32	8.91 ± 0.37 [*]	7.41 ± 0.42	9.04 ± 0.33 [*]
3	5.74 ± 0.60	6.10 ± 0.03	5.62 ± 0.53	6.32 ± 0.057	X	5.85 ± 0.069	6.40 ± 0.54	4.95 ± 0.059 ^{*°}	5.95 ± 0.032	4.92 ± 0.07 ^{*°}	5.15 ± 0.54 ^{*°}
4	8.60 ± 0.44	8.85 ± 0.06	8.64 ± 0.48	9.00 ± 0.31	8.88 ± 0.25	X	8.63 ± 0.19	8.66 ± 0.22	8.18 ± 0.45	7.68 ± 0.10 ^{*°}	8.68 ± 0.022
5	8.17 ± 0.66	8.32 ± 0.10	8.23 ± 0.025	8.22 ± 0.041	7.82 ± 0.019	8.39 ± 0.19	X	8.70 ± 0.62	8.36 ± 0.44	8.08 ± 0.42	6.70 ± 0.86 ^{*°}
6	10.78 ± 0.13	11.80 ± 0.31	11.74 ± 0.13	10.24 ± 0.27 [°]	11.31 ± 1.04	11.65 ± 0.96	10.65 ± 0.33	X	11.08 ± 0.50	10.99 ± 0.27	10.84 ± 0.43
7	12.25 ± 0.04	12.61 ± 0.13	12.36 ± 0.80	13.01 ± 0.82	12.07 ± 0.07	12.70 ± 0.25	11.47 ± 0.25	11.64 ± 0.81	X	13.59 ± 0.18	14.89 ± 0.90 ^{*°}
8	11.19 ± 0.06	11.09 ± 0.08	10.24 ± 0.17	11.12 ± 0.40	10.99 ± 0.13	10.91 ± 0.32	10.87 ± 0.19	9.84 ± 0.52 ^{*°}	9.81 ± 0.076 ^{*°}	X	11.45 ± 0.28
9	8.15 ± 0.19	8.16 ± 0.04	8.52 ± 0.16	8.28 ± 0.073	8.56 ± 0.24	8.45 ± 0.39	8.47 ± 0.066	8.19 ± 0.15	8.69 ± 0.27	8.64 ± 0.26	X

Cada casilla contiene el valor del A_i de cada HE (filas numeradas) al crecer con los demás HE (columnas enumeradas), tanto en PDA como en PDA+EC. Los valores se muestran con la desviación estándar de la media (media ± DS). La comparación de las A_i entre los HE en interacción y sus respectivos crecimientos Testigo (central-Tc y lateral-TI) con el ANOVA de una vía ($\alpha = 0.05$) mostró diferencias entre los HE ($p \leq 0.00$). HE= Hongo endófito evaluado; * diferencias significativas con respecto del Testigo central; ° diferencias significativas con respecto del Testigo lateral.

Tabla 7b. Resultados ANOVA: Área antes del contacto (A_i) de los hongos endófitos en interacción y de forma individual

No.	Hongo endófito	F	valor p	gl
PDA				
1	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	6.35	0.00295	9
2	<i>Cryptosporiopsis corticola</i>	10.410	0.000008	9
3	<i>Glomerella cingulata</i>	6.81	0.000183	9
4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 1	10.410	0.000008	9
5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 2	9.06	0.000024	9
6	<i>Xylaria</i> Gpo. 1	5.03	0.001285	9
7	<i>Xylaria</i> Gpo. 2	8.680	0.000033	9
8	<i>Xylaria</i> Gpo. 3	<u>2.25</u>	<u>0.062548</u>	<u>9</u>
9	<i>Paecilomyces</i> sp.	4.36	0.002931	9
PDA+EC				
1	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	14.45	0.000001	9
2	<i>Cryptosporiopsis corticola</i>	11.699	0.000003	9
3	<i>Glomerella cingulata</i>	10.79	0.000006	9
4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 1	6.12	0.000374	9
5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 2	6.80	0.000186	9
6	<i>Xylaria</i> Gpo. 1	2.77	0.027719	9
7	<i>Xylaria</i> Gpo. 2	10.20	0.000010	9
8	<i>Xylaria</i> Gpo. 3	13.63	0.000001	9
9	<i>Paecilomyces</i> sp.	2.73	0.029611	9

La tabla muestra el valor de Fisher (F) y los valores p con los grados de libertad (gl) obtenidos al comparar las A_i de los HE en interacción con cada uno de los demás y sus respectivos Testigos (central y lateral) por medio de un ANOVA de una vía ($\alpha= 0.05$), tanto en PDA como en PDA+EC. La comparación de las A_i de los HE mostró diferencias significativas en la mayor parte de los HE ($p \leq 0.00$).

Tabla 8a. Áreas finales (A_f) de los hongos endófitos en interacción y de forma individual

HE	Tc	TI	Hongos endófitos opositores								
			1 (<i>Cryptosp. sp.</i>)	2 (<i>C. corticola</i>)	3 (<i>G. cingulata</i>)	4 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 1</i>)	5 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 2</i>)	6 (<i>Xylaria Gpo. 1</i>)	7 (<i>Xylaria Gpo. 2</i>)	8 (<i>Xylaria Gpo. 3</i>)	9 (<i>Paecilom. sp.</i>)
PDA											
1	37.00 ± 0.07 [#]	28.55 ± 0.27 [#]	X	21.64 ± 1.11 ^{*°}	22.94 ± 0.65 ^{*°}	21.92 ± 0.26 ^{*°}	21.35 ± 0.14 ^{*°}	19.04 ± 0.71 ^{*°}	21.58 ± 0.75 ^{*°}	15.27 ± 0.46 ^{*°}	20.96 ± 1.20 ^{*°}
2	42.32 ± 1.13 [#]	30.24 ± 0.14 [#]	25.31 ± 1.09 ^{*°}	X	23.01 ± 0.24 ^{*°}	19.93 ± 0.12 ^{*°}	22.63 ± 0.81 ^{*°}	17.6 ± 0.77 ^{*°}	20.72 ± 0.19 ^{*°}	16.17 ± 0.86 ^{*°}	25.12 ± 0.07 ^{*°}
3	33.93 ± 0.56 [#]	25.59 ± 0.39 [#]	20.84 ± 0.72 ^{*°}	22.9 ± 0.93 [*]	X	20.86 ± 1.91 ^{*°}	21.08 ± 2.10 ^{*°}	18.38 ± 0.26 ^{*°}	20.99 ± 0.84 ^{*°}	17.65 ± 1.26 ^{*°}	21.54 ± 0.59 ^{*°}
4	35.43 ± 1.12 [#]	26.75 ± 0.32 [#]	23.96 ± 1.24 [*]	24.44 ± 0.77 [*]	24.70 ± 1.57 [*]	X	22.75 ± 0.20 ^{*°}	18.51 ± 1.95 ^{*°}	20.79 ± 0.22 ^{*°}	17.54 ± 0.63 ^{*°}	20.56 ± 0.20 ^{*°}
5	37.55 ± 0.09 [#]	27.64 ± 0.61 [#]	22.23 ± 0.29 ^{*°}	22.59 ± 1.58 ^{*°}	20.83 ± 0.58 ^{*°}	22.09 ± 0.07 ^{*°}	X	18.57 ± 1.38 ^{*°}	22.31 ± 1.03 ^{*°}	18.45 ± 1.20 ^{*°}	21.04 ± 1.16 ^{*°}
6	34.80 ± 3.26 [#]	26.75 ± 0.73 [#]	25.18 ± 1.76 [*]	29.29 ± 1.45 [*]	27.05 ± 1.93 [*]	32.12 ± 2.33 [°]	33.31 ± 2.13 [°]	X	24.78 ± 1.17 [*]	21.58 ± 0.02 [*]	25.09 ± 1.21 [*]
7	37.1 ± 1.35 [#]	26.82 ± 0.43 [#]	27.26 ± 1.22 [*]	24.97 ± 0.64 [*]	27.64 ± 1.22 [*]	28.44 ± 1.14 [*]	26.98 ± 0.34 [*]	21.84 ± 0.83 ^{*°}	X	22.85 ± 0.36 ^{*°}	23.73 ± 0.11 ^{*°}
8	27.84 ± 0.78 [#]	23.14 ± 0.10 [#]	24.40 ± 0.56 [*]	23.83 ± 0.22 [*]	22.97 ± 2.43 [*]	21.33 ± 0.46 [*]	22.04 ± 0.50 [*]	20.12 ± 0.14 ^{*°}	20.36 ± 0.08 ^{*°}	X	21.6 ± 0.59 [*]
9	25.65 ± 0.02 [#]	22.45 ± 0.11 [#]	20.11 ± 0.33 [*]	19.26 ± 0.09 ^{*°}	20.33 ± 0.12 [*]	20.55 ± 0.09 [*]	22.27 ± 2.02 [*]	23.05 ± 2.04	19.24 ± 0.15 ^{*°}	19.96 ± 0.13 [*]	X
PDA + EC											
1	41.49 ± 1.01 [#]	32.98 ± .20 [#]	X	26.95 ± 0.10 ^{*°}	23.15 ± 0.28 ^{*°}	22.94 ± 0.19 ^{*°}	25.18 ± 0.58 ^{*°}	19.00 ± 1.34 ^{*°}	22.27 ± 0.31 ^{*°}	17.38 ± 0.24 ^{*°}	21.32 ± 0.34 ^{*°}
2	36.14 ± 0.26 [#]	29.87 ± 0.99 [#]	20.25 ± 1.23 ^{*°}	X	18.81 ± 1.10 ^{*°}	21.07 ± 1.39 ^{*°}	20.66 ± 0.73 ^{*°}	18.51 ± 0.76 ^{*°}	19.51 ± 0.46 ^{*°}	16.55 ± 0.25 ^{*°}	22.25 ± 1.09 ^{*°}
3	50.69 ± 0.11 [#]	41.98 ± 0.25 [#]	26.63 ± 0.37 ^{*°}	29.89 ± 0.53 ^{*°}	X	26.17 ± 0.90 ^{*°}	27.85 ± 0.04 ^{*°}	18.95 ± 0.82 ^{*°}	25.48 ± 0.58 ^{*°}	18.27 ± 0.31 ^{*°}	23.79 ± 0.56 ^{*°}
4	39.34 ± 0.59 [#]	30.29 ± 0.59 [#]	24.12 ± 0.06 ^{*°}	25.23 ± 0.88 ^{*°}	24.61 ± 0.54 ^{*°}	X	24.74 ± 0.32 ^{*°}	21.82 ± 0.38 ^{*°}	21.34 ± 1.04 ^{*°}	19.86 ± 0.06 ^{*°}	25.04 ± 0.28 ^{*°}
5	43.17 ± 1.91 [#]	31.82 ± 0.81 [#]	22.66 ± 0.44 ^{*°}	25.52 ± 0.79 ^{*°}	21.91 ± 0.52 ^{*°}	22.58 ± 0.65 ^{*°}	X	21.15 ± 0.81 ^{*°}	22.53 ± 0.98 ^{*°}	20.59 ± 0.46 ^{*°}	22.89 ± 1.02 ^{*°}
6	44.66 ± 1.38 [#]	34.27 ± 0.79 [#]	32.90 ± 3.75 [*]	35.36 ± 0.68 [*]	30.04 ± 2.82 [*]	32.21 ± 2.67 [*]	34.43 ± 0.63 [*]	X	25.94 ± 1.70 ^{*°}	23.83 ± 0.24 ^{*°}	29.81 ± 0.74 [*]
7	39.90 ± 0.82 [#]	28.00 ± 0.35 [#]	30.06 ± 0.48 [*]	29.81 ± 1.35 [*]	31.23 ± 0.49 ^{*°}	30.98 ± 0.27 ^{*°}	29.48 ± 0.85 [*]	22.78 ± 1.61 ^{*°}	X	24.92 ± 0.49 ^{*°}	27.76 ± 0.60 [*]
8	39.76 ± 1.60 [#]	32.23 ± 0.75 [#]	28.77 ± 1.13 [*]	28.21 ± 0.38 ^{*°}	31.12 ± 1.87 [*]	29.17 ± 1.25 [*]	27.99 ± 0.27 ^{*°}	22.95 ± 1.01 ^{*°}	23.08 ± 1.35 ^{*°}	X	28.38 ± 2.29 [*]
9	27.13 ± 0.26 [#]	23.56 ± 0.24 [#]	20.54 ± 0.18 ^{*°}	19.66 ± 0.28 ^{*°}	20.34 ± 0.68 ^{*°}	19.15 ± 0.95 ^{*°}	19.74 ± 0.67 ^{*°}	17.69 ± 0.21 ^{*°}	18.83 ± 0.53 ^{*°}	17.85 ± 0.45 ^{*°}	X

Cada casilla contiene el valor del A_f de cada HE (filas numeradas) al crecer con los demás HE (columnas numeradas), tanto en PDA como en PDA+EC. Los valores se muestran con la desviación estándar de la media (media ± DS). La comparación de las A_f entre los HE en interacción y sus respectivos crecimientos Testigo (central-Tc y lateral-TI) con el ANOVA de una vía ($\alpha = 0.05$) mostró diferencias entre los HE ($p \leq 0.00$). HE= Hongo endófito evaluado; # diferencias significativas entre cultivos Testigo, central y lateral * diferencias significativas con respecto del Testigo central; ° diferencias significativas con respecto del Testigo lateral.

Tabla 8b. Resultados ANOVA: Áreas finales (A_f) de los hongos endófitos en interacción y de forma individual

No.	Hongo endófito	F	valor p	gl
PDA				
1	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	230.77	0.00	9
2	<i>Cryptosporiopsis corticola</i>	370.49	0.00	9
3	<i>Glomerella cingulata</i>	50.51	0.000000	9
4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 1	370.49	0.00	9
5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 2	104.42	0.000000	9
6	<i>Xylaria</i> Gpo. 1	16.550	0.000000	9
7	<i>Xylaria</i> Gpo. 2	70.70	0.000000	9
8	<i>Xylaria</i> Gpo. 3	20.12	0.000000	9
9	<i>Paecilomyces</i> sp.	14.77	0.000001	9
PDA+EC				
1	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	428.37	0.00	9
2	<i>Cryptosporiopsis corticola</i>	130.02	0.000000	9
3	<i>Glomerella cingulata</i>	1115.75	0.00	9
4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 1	294.44	0.00	9
5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 2	169.17	0.000000	9
6	<i>Xylaria</i> Gpo. 1	27.241	0.000000	9
7	<i>Xylaria</i> Gpo. 2	86.83	0.000000	9
8	<i>Xylaria</i> Gpo. 3	38.30	0.000000	9
9	<i>Paecilomyces</i> sp.	95.88	0.000000	9

La tabla muestra el valor de Fisher (F) y los valores p con los grados de libertad (gl) obtenidos al comparar las A_f de los HE en interacción con cada uno de los demás y sus respectivos Testigos (central y lateral) por medio de un ANOVA de una vía ($\alpha= 0.05$), tanto en PDA como en PDA+EC. La comparación de las A_f de los HE mostró diferencias significativas en todos los casos ($p \leq 0.00$).

Tabla 9a. Tasas de crecimiento (TC_i) de los hongos endófitos en interacción y de forma individual

HE	Cc	CI	1 (<i>Cryptosp. sp.</i>)	2 (<i>C. corticola</i>)	3 (<i>G. cingulata</i>)	4 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 1</i>)	5 (<i>Co. gloeosp. Gpo. 2</i>)	6 (<i>Xylaria Gpo. 1</i>)	7 (<i>Xylaria Gpo. 2</i>)	8 (<i>Xylaria Gpo. 3</i>)	9 (<i>Paecilom. sp.</i>)
PDA											
1	9.02 ± 0.16 [#]	6.28 ± 0.06 [#]	X	4.53 ± 0.20 ^{*°}	4.94 ± 0.20 ^{*°}	4.37 ± 0.02 ^{*°}	4.36 ± 0.07 ^{*°}	3.66 ± 0.14 ^{*°}	4.24 ± 0.13 ^{*°}	2.93 ± 0.04 ^{*°}	4.13 ± 0.26 ^{*°}
2	12.22 ± 0.40 [#]	7.10 ± 0.15 [#]	5.63 ± 0.17 ^{*°}	X	5.32 ± 0.06 ^{*°}	4.35 ± 0.04 ^{*°}	5.03 ± 0.21 ^{*°}	3.87 ± 0.19 ^{*°}	5.10 ± 0.03 ^{*°}	3.66 ± 0.29 ^{*°}	5.57 ± 0.34 ^{*°}
3	8.40 ± 0.17 [#]	5.60 ± 0.09 [#]	4.41 ± 0.17 ^{*°}	4.85 ± 0.18 [*]	X	4.41 ± 0.40 ^{*°}	4.55 ± 0.68 ^{*°}	3.74 ± 0.10 ^{*°}	4.29 ± 0.17 ^{*°}	3.72 ± 0.31 ^{*°}	4.55 ± 0.19 ^{*°}
4	7.09 ± 0.43 [#]	4.96 ± 0.08 [#]	4.09 ± 0.26 ^{*°}	4.27 ± 0.17 [*]	4.30 ± 0.41 [*]	X	4.06 ± 0.03 ^{*°}	3.16 ± 0.43 ^{*°}	3.56 ± 0.09 ^{*°}	3.04 ± 0.11 ^{*°}	3.57 ± 0.04 ^{*°}
5	8.52 ± 0.13 [#]	5.45 ± 0.15 [#]	4.35 ± 0.10 ^{*°}	4.55 ± 0.44 ^{*°}	3.94 ± 0.23 ^{*°}	4.31 ± 0.01 ^{*°}	X	3.38 ± 0.32 ^{*°}	4.17 ± 0.30 ^{*°}	3.32 ± 0.25 ^{*°}	3.89 ± 0.28 ^{*°}
6	6.67 ± 1.00 [#]	4.59 ± 0.12 [#]	4.30 ± 0.49 [*]	5.09 ± 0.36 [*]	4.64 ± 0.51 [*]	5.68 ± 0.36	5.99 ± 0.36 [°]	X	4.07 ± 0.21 [*]	3.49 ± 0.06 [*]	4.10 ± 0.21 [*]
7	5.86 ± 0.14 [#]	3.80 ± 0.04 [#]	4.10 ± 0.13 ^{*°}	3.62 ± 0.09 [*]	4.24 ± 0.13 ^{*°}	4.19 ± 0.13 ^{*°}	4.20 ± 0.07 ^{*°}	3.08 ± 0.08 ^{*°}	X	3.19 ± 0.03 ^{*°}	3.31 ± 0.04 ^{*°}
8	3.20 ± 0.10 [#]	2.54 ± 0.03 [#]	2.81 ± 0.08 [*]	2.69 ± 0.02 [*]	2.57 ± 0.28 [*]	2.31 ± 0.03 [*]	2.43 ± 0.11 [*]	2.20 ± 0.01 ^{*°}	2.18 ± 0.05 ^{*°}	X	2.38 ± 0.05 [*]
9	2.91 ± 0.03 [#]	2.46 ± 0.01 [#]	2.18 ± 0.03 [*]	2.06 ± 0.04 ^{*°}	2.20 ± 0.02 [*]	2.28 ± 0.01 [*]	2.48 ± 0.25 [*]	2.53 ± 0.18 [*]	2.08 ± 0.02 ^{*°}	2.10 ± 0.02 ^{*°}	X
PDA + EC											
1	9.93 ± 0.49 [#]	7.00 ± 0.05 [#]	X	5.52 ± 0.06 ^{*°}	4.64 ± 0.06 ^{*°}	4.57 ± 0.03 ^{*°}	5.09 ± 0.18 ^{*°}	3.64 ± 0.27 ^{*°}	4.27 ± 0.07 ^{*°}	3.33 ± 0.09 ^{*°}	4.44 ± 0.07 ^{*°}
2	9.75 ± 0.30 [#]	7.14 ± 0.40 [#]	4.54 ± 0.29 ^{*°}	X	4.34 ± 0.37 ^{*°}	4.56 ± 0.35 ^{*°}	4.64 ± 0.21 ^{*°}	3.98 ± 0.22 ^{*°}	4.13 ± 0.12 ^{*°}	3.52 ± 0.10 ^{*°}	4.76 ± 0.39 ^{*°}
3	12.32 ± 0.02 [#]	9.20 ± 0.06 [#]	5.46 ± 0.05 ^{*°}	6.09 ± 0.13 ^{*°}	X	5.25 ± 0.23 ^{*°}	5.67 ± 0.05 ^{*°}	3.74 ± 0.23 ^{*°}	5.06 ± 0.09 ^{*°}	3.47 ± 0.07 ^{*°}	4.71 ± 0.05 ^{*°}
4	7.68 ± 0.03 [#]	5.38 ± 0.14 [#]	4.12 ± 0.03 ^{*°}	4.32 ± 0.16 ^{*°}	4.11 ± 0.05 ^{*°}	X	4.24 ± 0.10 ^{*°}	3.68 ± 0.11 ^{*°}	3.52 ± 0.19 ^{*°}	3.36 ± 0.02 ^{*°}	4.26 ± 0.07 ^{*°}
5	8.86 ± 0.56 [#]	5.99 ± 0.20 [#]	4.01 ± 0.10 ^{*°}	4.65 ± 0.20 ^{*°}	4.00 ± 0.15 ^{*°}	3.98 ± 0.11 ^{*°}	X	3.66 ± 0.13 ^{*°}	3.95 ± 0.15 ^{*°}	3.53 ± 0.04 ^{*°}	4.19 ± 0.11 ^{*°}
6	8.65 ± 0.15 [#]	5.68 ± 0.13 [#]	5.45 ± 0.88 [*]	6.17 ± 0.11 [*]	4.77 ± 0.47 [*]	5.21 ± 0.55 [*]	5.97 ± 0.07 [*]	X	4.15 ± 0.29 ^{*°}	3.67 ± 0.04 ^{*°}	4.79 ± 0.08 [*]
7	6.52 ± 0.23 [#]	3.99 ± 0.07 [#]	4.49 ± 0.01 ^{*°}	4.26 ± 0.10 [*]	4.73 ± 0.12 ^{*°}	4.61 ± 0.03 ^{*°}	4.51 ± 0.21 ^{*°}	3.43 ± 0.15 ^{*°}	X	3.43 ± 0.17 ^{*°}	3.71 ± 0.07 [*]
8	4.63 ± 0.24 [#]	3.53 ± 0.09 [#]	3.04 ± 0.08 [*]	2.99 ± 0.09 ^{*°}	3.41 ± 0.18 [*]	3.12 ± 0.11 [*]	2.94 ± 0.07 ^{*°}	2.44 ± 0.09 ^{*°}	2.43 ± 0.18 ^{*°}	X	3.01 ± 0.34 ^{*°}
9	2.99 ± 0.07 [#]	2.48 ± 0.02 [#]	2.13 ± 0.07 ^{*°}	2.00 ± 0.04 ^{*°}	2.07 ± 0.09 ^{*°}	1.96 ± 0.11 ^{*°}	2.03 ± 0.10 ^{*°}	1.78 ± 0.02 ^{*°}	1.94 ± 0.07 ^{*°}	1.65 ± 0.14 ^{*°}	X

Cada casilla contiene el valor de la TC de cada HE (filas numeradas) al crecer con los demás HE (columnas numeradas), tanto en PDA como en PDA+EC. Los valores se muestran con la desviación estándar de la media (media ± DS). La comparación de las A_i entre los HE en interacción y sus respectivos crecimientos Testigo (central-Cc y lateral-CI) con el ANOVA de una vía ($\alpha = 0.05$) mostró diferencias entre los HE ($p \leq 0.00$). HE= Hongo endófito evaluado; # diferencias significativas entre cultivos Testigo, central y lateral * diferencias significativas con respecto del Testigo central; ° diferencias significativas con respecto del Testigo lateral.

Tabla 9b. Tasas de crecimiento (TC_i) de los hongos endófitos en interacción y de forma individual

No.	Hongo endófito	F	valor p	gl
PDA				
1	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	392.07	0.00	9
2	<i>Cryptosporiopsis corticola</i>	242.23	0.00	9
3	<i>Glomerella cingulata</i>	62.197	0.000000	9
4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 1	362.68	0.00	9
5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 2	108.27	0.000000	9
6	<i>Xylaria</i> Gpo. 1	14.599	0.000001	9
7	<i>Xylaria</i> Gpo. 2	204.35	0.00	9
8	<i>Xylaria</i> Gpo. 3	25.42	0.000000	9
9	<i>Paecilomyces</i> sp.	21.04	0.000000	9
PDA+EC				
1	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	301.62	0.00	9
2	<i>Cryptosporiopsis corticola</i>	124.218	0.000000	9
3	<i>Glomerella cingulata</i>	1502.88	0.00	9
4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 1	433.68	0.00	9
5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Gpo. 2	160.18	0.000000	9
6	<i>Xylaria</i> Gpo. 1	39.020	0.000000	9
7	<i>Xylaria</i> Gpo. 2	131	0.000000	9
8	<i>Xylaria</i> Gpo. 3	40.95	0.000000	9
9	<i>Paecilomyces</i> sp.	65.57	0.000000	9

La tabla muestra el valor de Fisher (F) y los valores p con los grados de libertad (gl) obtenidos al comparar las TC_i de los HE en interacción con cada uno de los demás y sus respectivos Testigos (central y lateral) por medio de un ANOVA de una vía ($\alpha= 0.05$), tanto en PDA como en PDA+EC. La comparación de las TC_i de los HE mostró diferencias significativas en todos los casos ($p \leq 0.00$).

ANEXO IX

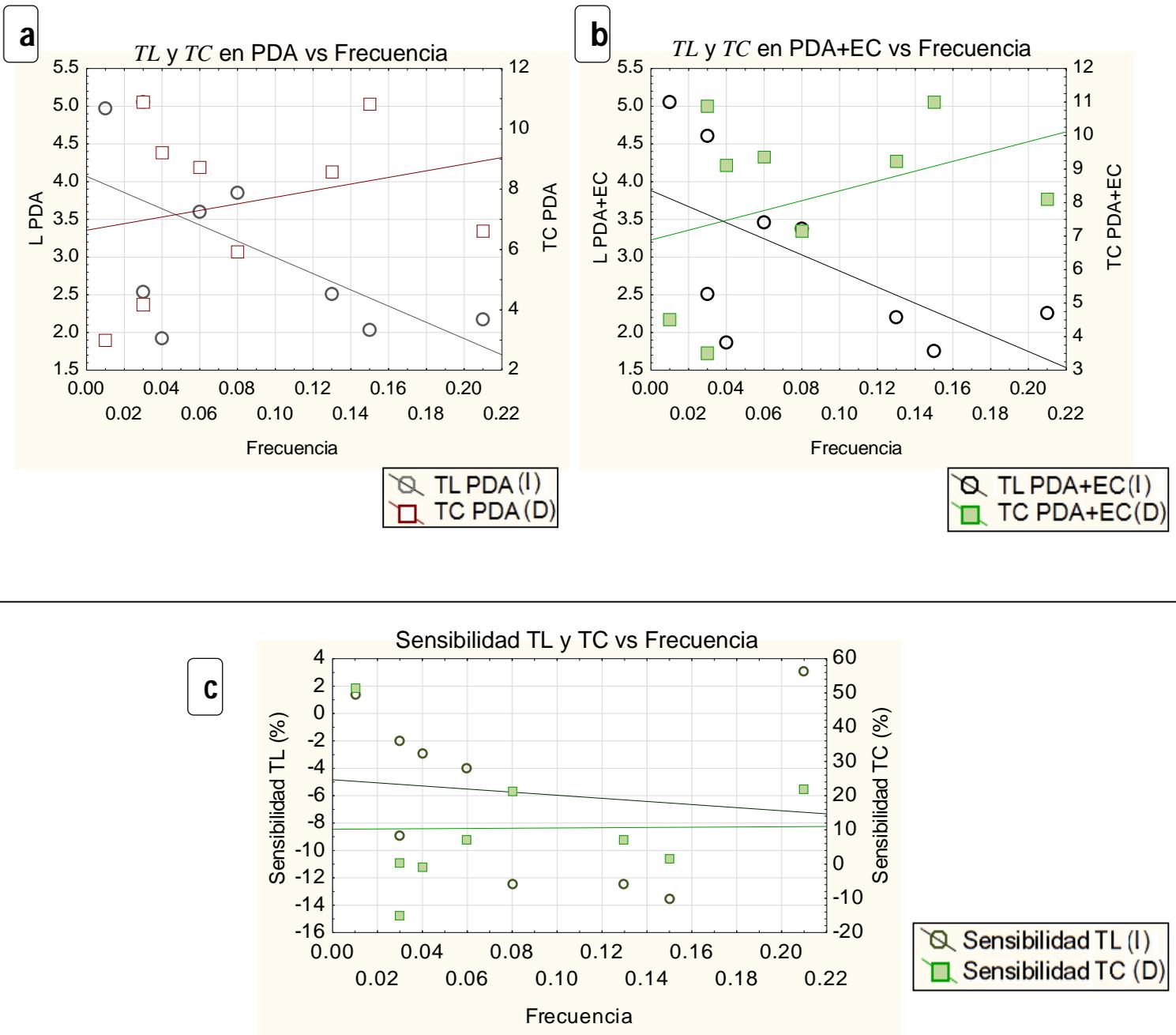


Fig 4. Gráficos de correlación. a y b) entre la frecuencia de aislamiento de los HE y los parámetros de crecimiento obtenidos en PDA (*TL*: $r_s = -0.59$ $p = 0.09$; *TC*: $r_s = 0.24$ $p = 0.51$) o en PDA+EC (*TL*: $r_s = -0.66$ $p = 0.052$; *TC*: $r_s = 0.38$ $p = 0.32$); y c) entre la frecuencia de aislamiento de los HE y su sensibilidad a los compuestos de las hojas de café (*TL*: $r_s = -0.31$ $p = 0.42$; *TC*: $r_s = 0.25$ $p = 0.51$).

ANEXO X

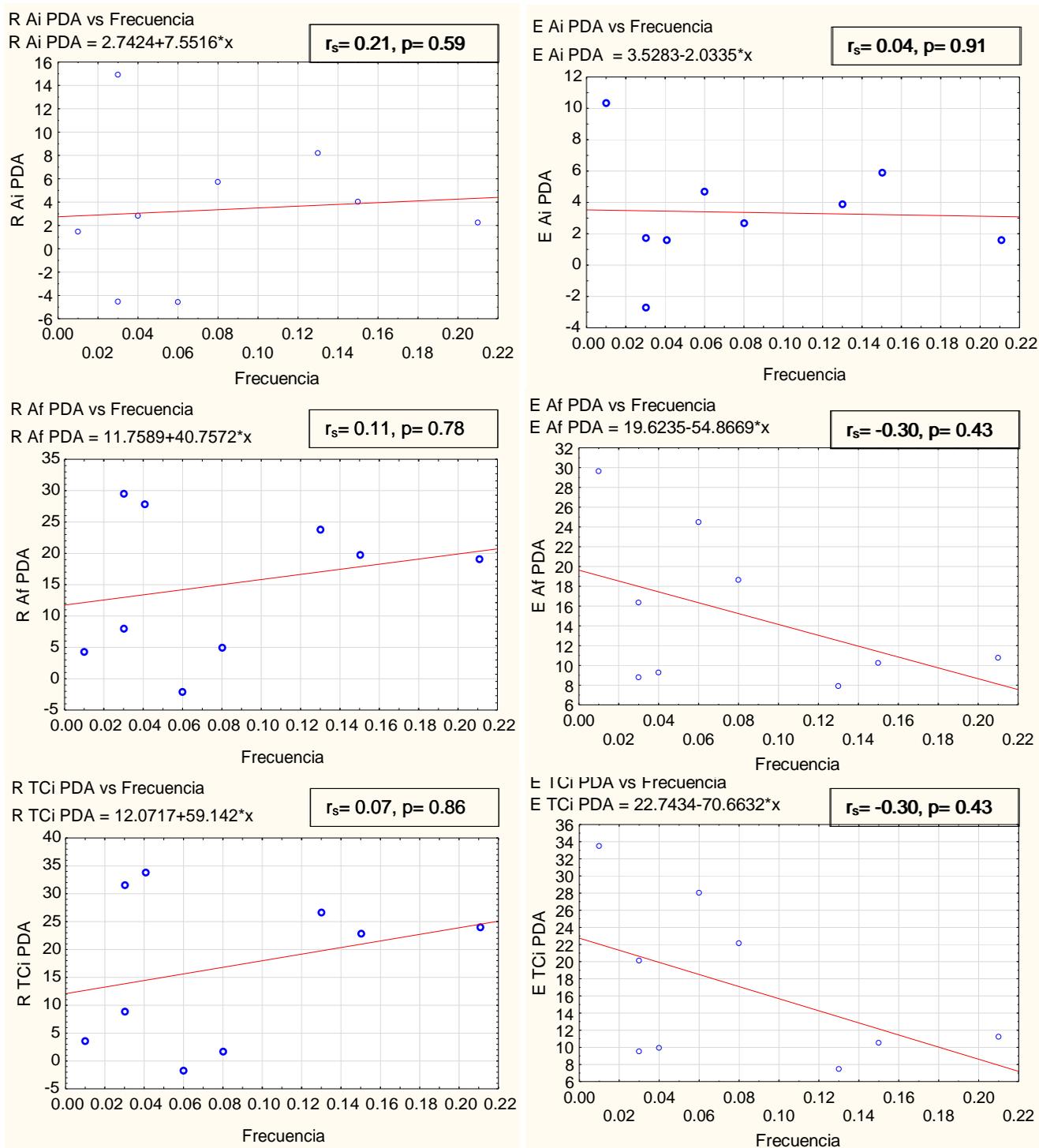


Fig. 5. Gráficos de correlación entre la frecuencia de los HE y sus parámetros de crecimiento en interacción. Las letras 'R' o 'E' en el título de cada gráfica indican las respuestas competitivas o los efectos competitivos para los parámetros A_i (Área antes del contacto), A_f (área al final del bioensayo) y TC_i (Tasa de crecimiento) en PDA. Se agrega la ecuación de la recta, el índice de correlación (r_s) y el valor p que en todos los casos fue mayor a 0.05.

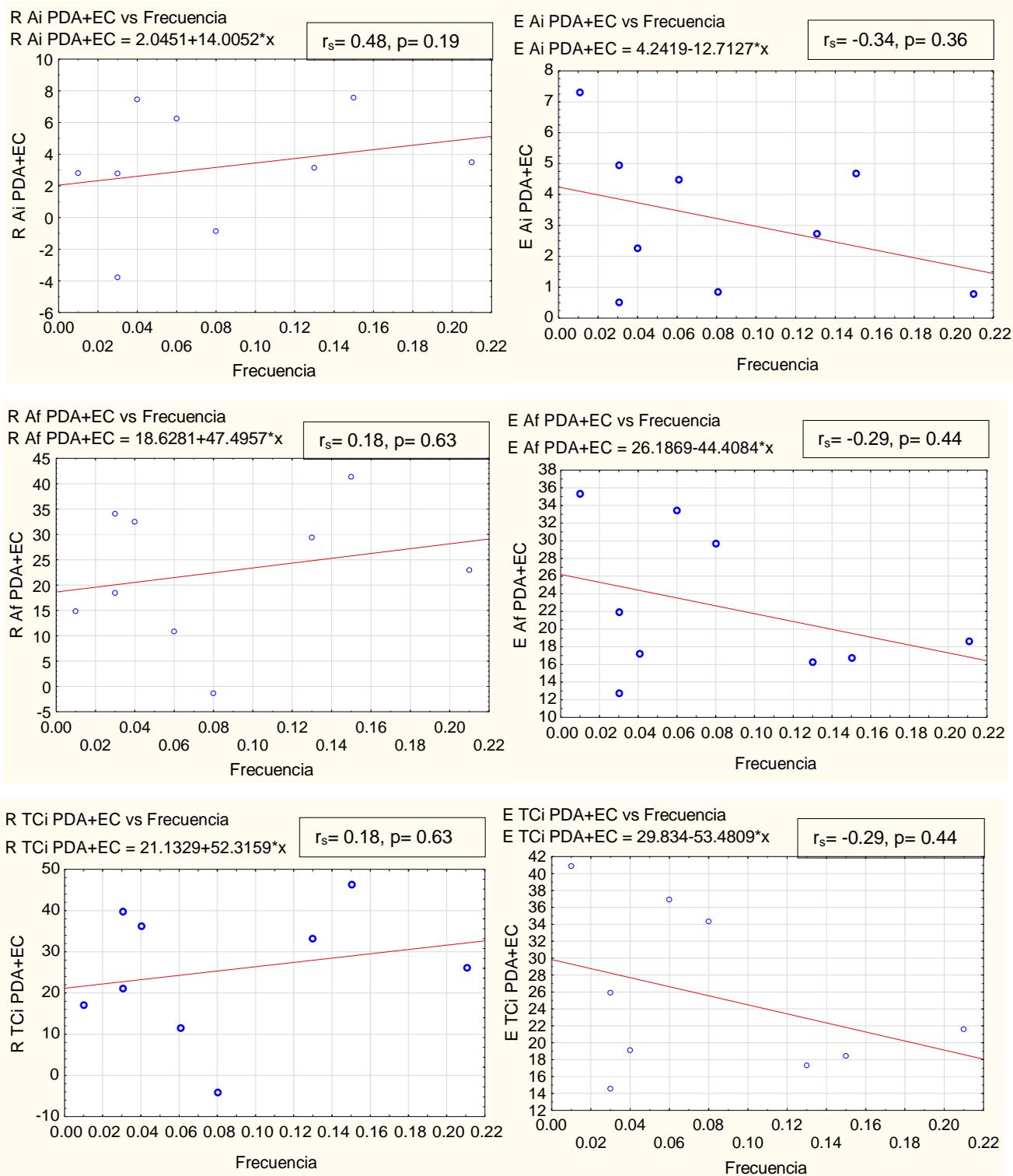
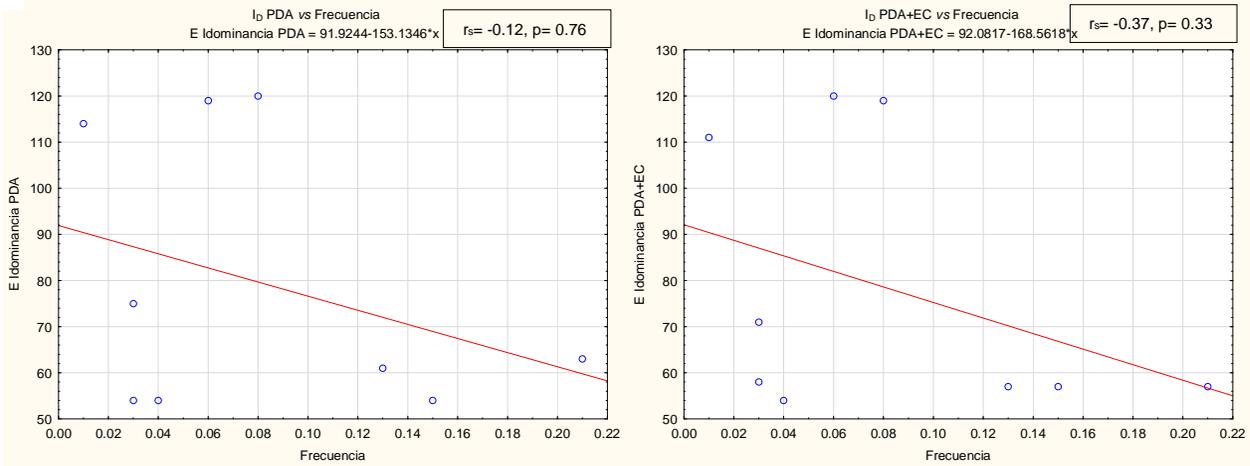


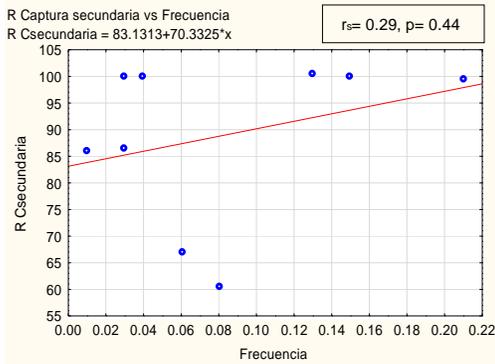
Fig. 5. Gráficos de correlación entre la frecuencia de los HE y sus parámetros de crecimiento en interacción. Las letras 'R' o 'E' en el título de cada gráfica indican las respuestas competitivas o los efectos competitivos para los parámetros A_i (Área antes del contacto), A_f (área al final del bioensayo) y TC_i (Tasa de crecimiento en interacción) en PDA+EC. Se agrega la ecuación de la recta, el índice de correlación (r_s) y el valor p que en todos los casos fue mayor a 0.05.

ANEXO XI

a



b



c

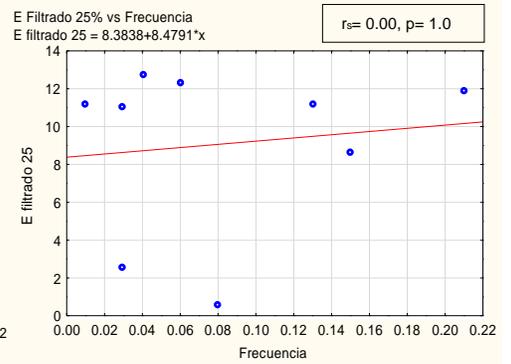
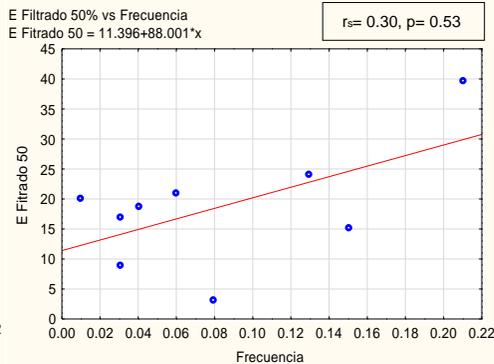
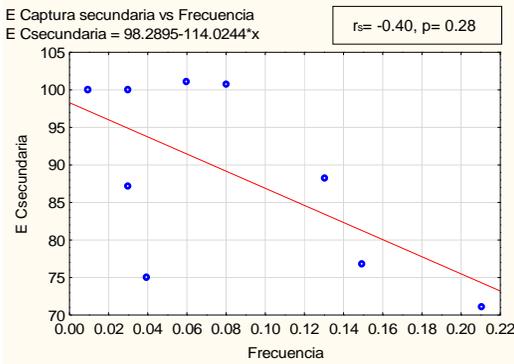
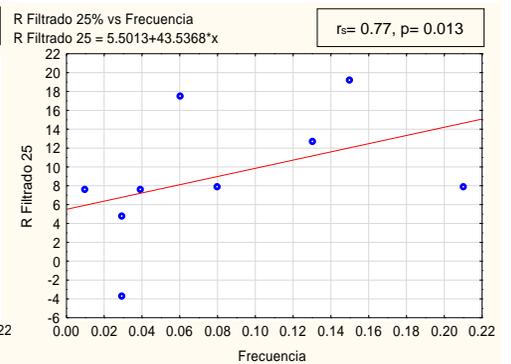
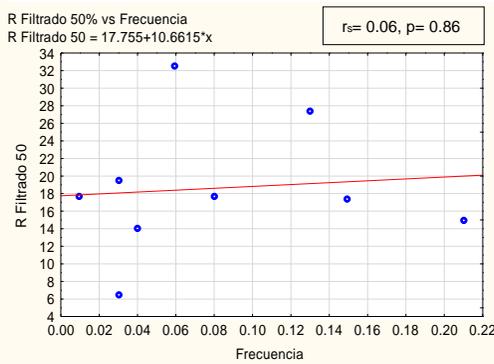


Fig. 6. Gráficos de correlación entre la frecuencia de los HE y la capacidad competitiva de los HE. (a) Índices de dominancia en PDA y PDA+EC (I_D); (b) Captura secundaria de recursos (Csecundaria) y (c) Filtrado de medios de cultivo acuoso al 25 y 50% (Filtrado). Las letras 'R' o 'E' en el título de cada gráfica indican, respectivamente, las respuestas competitivas o los efectos competitivos para los parámetros. Se agrega la ecuación de la recta y el índice de correlación junto con el valor p que en la mayoría de los casos fue mayor a 0.05, excepto en la respuesta competitiva de los HE expuestos al filtrado del medio de cultivo de los demás hongos al 25%.