

200



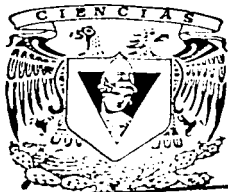
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

RELACION ENTRE EL POTENCIAL ANTAGONICO Y EL POTENCIAL ALELOQUIMICO DE ALGUNOS HONGOS ASOCIADOS A PLANTAS DE LA RESERVA ECOLOGICA, EL EDEN, QUINTANA ROO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: BIOLÓGICA PRESENTA: AURORA SAUCEDO GARCIA



DIRECTORA DE TESIS DRA. ANA LUISA ANAYA LANG



2002

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Relación entre el potencial antagonístico y el potencial aleloquímico de algunos hongos asociados a plantas de la reserva ecológica El Edén, Quintana Roo."

realizado por Saucedo García Aurora

con número de cuenta 09334940-0, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Ana Luisa Anaya Lang

Propietario

Dra. Genoveva García Aguirre

Propietario

Dra. Rocío Cruz-Ortega

Suplente

Dra. Margarita Villegas Ríos

Suplente

M. en C. Guadalupe Vidal Gaona.

Consejo Departamental de

FACULTAD DE CIENCIAS

U.N.A.M.
Biología

Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A Esperanza, Sebastián,

Gabriela, Renata, Mariana y Asheli.

Agradecimientos.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang por todo el apoyo y asesoría que me ha brindado para este proyecto.

A la Dra. Rocío Cruz Ortega por sus acertadas sugerencias.

A la Dra. Genoveva por la revisión y comentarios de esta tesis.

A la Dra. Margarita Villegas por compartir y contagiar su interés por los hongos, así como por la revisión y propuestas para mejorar este trabajo.

Gracias a la M. en C. Guadalupe Vidal por la amable revisión y comentarios a este escrito.

Gracias a Rebeca por su asesoría en la identificación de los géneros de los hongos.

Especial agradecimiento a Andrea, quien me dio la oportunidad de aprender con ella, gracias por tu apoyo y sugerencias.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Blanca, Tere, Tony, Abigail, Fernando, José y la Sra. Lupita, por su apoyo, asesorías y por hacer muy agradable la estancia en el laboratorio.

Gracias a ustedes, por acompañarme, por compartirse, por la tinta roja y negra, por ser los sin nombre, por las conversaciones con sabor a café, por la música, por los encuentros y desencuentros, por los anhelos compartidos, por los intentos, por los silencios, por los colores, por los cuentos, por Cortázar, por los sueños, por las consecuencias...Gracias.

INDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1. Generalidades.....	3
1.2. Tipos de alimentación en hongos.....	3
1.3. Diversidad.....	4
1.2.1. Diversidad de micromicetos asociados con plantas vasculares en los trópicos.....	5
1.2.2. Hongos endófitos.....	5
1.2.3. Hongos fitopatógenos.....	6
1.2.4. Pérdida de la biodiversidad de los hongos.....	6
1.4. Relaciones hongo-hongo.....	7
1.5. Metabolismo secundario.....	9
2. Objetivo.....	12
2.1. Objetivos particulares.....	12
3. Materiales y Métodos.....	13
3.1. Zona de estudio.....	13
3.2. Recolección de material vegetal.....	13
3.3. Aislamiento e identificación de los hongos asociados al material vegetal.....	14
3.4. Bioensayos de antagonismo indirecto.....	14
3.5. Identificación a nivel de especie de <i>Fusarium</i> seleccionado.....	16
3.6. Cultivo de <i>Fusarium sporotrichioides</i> y <i>Pestalotia</i> sp. para la extracción de posibles toxinas.....	17
3.7. Extracción del micelio y del medio de <i>Pestalotia</i> sp. y de <i>F. sporotrichioides</i>	18

3.8. Bioensayos para probar el efecto de los extractos de micelio y medio de <i>F. sporotrichioides</i> y <i>Pestalotia</i> sp. sobre diversos organismos de prueba. 18	
3.8.1. Evaluación de los efectos de los extractos sobre el crecimiento radicular de plantas de prueba.....	19
3.8.2. Bioensayos con hongos.....	20
3.8.3 Pruebas de letalidad sobre larvas de <i>Artemia salina</i>	21
4. Resultados.....	22
4.1. Identificación de los géneros de hongos aislados.....	22
4.2. Bioensayos de antagonismo entre todas las cepas.....	24
4.3. Aislamientos seleccionados para el cultivo y extracción de metabolitos bioactivos.....	39
4.4. Identificación a nivel de especie de el aislamiento 6 del género <i>Fusarium</i>	39
4.5. Resultados de los bioensayos con los extractos de acetato de etilo del medio de cultivo y micelio de <i>Fusarium sporotrichioides</i>	40
4.6. Resultados de los bioensayos con los extractos de acetato de etilo del medio de cultivo y micelio de <i>Pestalotia</i> sp.....	43
4.7. Resultados de los bioensayos con el extracto del medio de cultivo Czapek-Dox sin hongo.....	46
5. Discusión y Conclusiones.....	49
7. Bibliografía.....	57
8. Anexos	
8.1. Anexo 1.....	62
8.2. Anexo 2.....	63

Resumen

Los hongos producen gran variedad de metabolitos secundarios con un amplio rango de actividades biológicas. En la actualidad, muchos estudios están encaminados a la búsqueda de estos metabolitos y a investigar, entre otras cosas, su papel ecológico. En este trabajo se presentan los resultados de una investigación sobre hongos asociados con plantas de la reserva ecológica El Edén, Quintana Roo, en el que se aislaron e identificaron, a nivel de género, 36 aislamientos de hongos asociados con plantas de la selva mediana, la sabana, el tinal y las comunidades secundarias, así como del perifiton de esta Reserva. Los géneros de hongos identificados fueron: *Beltrania* (1 aislamiento), *Diplodina* (1 aislamiento), *Doratomyces* (1 aislamiento), *Fusarium* (7 aislamientos), *Nigrospora* (1 aislamiento), *Pestalotia* (22 aislamientos), *Phlyctaena* (2 aislamientos) y *Verticillium* (1 aislamiento). Se realizaron pruebas *in vitro* buscando relaciones de antagonismo entre estos 36 aislamientos. Como resultado de estas pruebas, se seleccionaron dos aislamientos, uno de *Fusarium sporotrichioides*, obtenido del interior de una rama de *Piper* sp., y uno de *Pestalotia* sp. obtenido de hojas de *Metopium brownei*; ambos aislamientos mostraron un marcado antagonismo indirecto contra los otros. Los dos hongos se cultivaron a mayor escala, en medio líquido, para obtener el extracto de acetato de etilo tanto del micelio como del medio de cultivo. El efecto biológico de ambos extractos se probó sobre el crecimiento y la sobrevivencia de tres tipos de organismos prueba: dos hongos (*Alternaria* sp. y *Curvularia* sp.), tres especies de plantas (*Amaranthus hypochondriacus*, *Lycopersicon esculentum* y *Echinochloa crusgalli*) y larvas de *Artemia salina*. Los resultados demuestran la presencia de metabolitos bioactivos en ambos extractos. Existe un potencial para desarrollar nuevas drogas o agroquímicos que contribuyan a disminuir el impacto negativo de plaguicidas sintéticos sobre el ambiente, a partir de los metabolitos secundarios con actividad biológica que muchos organismos presentan. La presente investigación, forma parte de la exploración de la biodiversidad, tanto en el ámbito biológico como molecular, y del descubrimiento del valor agregado de los recursos bióticos, representado en este caso por los metabolitos secundarios bioactivos de los

hongos asociados a plantas, el cual ayudará a aportar más y mejores argumentos en favor de su conservación.

1. Introducción

1.1. Generalidades

Los hongos, considerados como un reino separado por Whittaker en 1969, pueden definirse de manera general como eucariontes (*eu*=verdadero; *karyon*=núcleo); la mayoría de ellos poseen estructuras somáticas típicamente filamentosas y ramificadas, con una pared celular; presentan nutrición osmotrófica y se reproducen sexual y/o asexualmente produciendo generalmente esporas como producto final (Deacon, 1997).

Los hongos tienen una distribución cosmopolita, aunque ciertas especies presentan distribuciones restringidas; habitan en un amplio rango de ambientes con climas ecuatoriales, tropicales, subtropicales, templados y fríos (cuya temperatura no sea menor a los 0° C); desde el nivel del mar hasta altitudes superiores a 4 000 m, y en lugares húmedos, semidesérticos y desérticos (Herrera y Ulloa, 1990).

1.2. Tipos de alimentación en los hongos.

Por su nutrición heterótrofa, los hongos desempeñan diferentes papeles en el ecosistema: como saprobios, parásitos y mutualistas (Neville y Webster, 1995), por lo que establecen asociaciones con plantas, animales y algunos microorganismos (incluso otros hongos).

Los hongos saprobios son aquellos que se alimentan de materia orgánica no viva, por lo que son fundamentales para el 'metabolismo global'¹ (Margulis y Sagan, 1995), ya que al producir un vasto rango de enzimas degradan muchos tipos de sustratos, tanto orgánicos como inorgánicos, contribuyendo al reciclaje y distribución de los nutrimentos en el ecosistema (Killham, 1994).

Los hongos parásitos son aquellos que obtienen sus nutrimentos a partir de tejidos vivos de un organismo (su hospedero), con el cual viven en íntima asociación, causándole ocasionalmente un daño (Moore-Landecker, 1996). Algunos de estos hongos destruyen las células de su hospedero consumiéndolas después, por lo cual su alimentación es de tipo saprofito

¹ Metabolismo de los ecosistemas, considerando al planeta Tierra como un solo organismo.

(parásitos necrótrofos); mientras que otros (parásitos biótrofos) se alimentan a partir del hospedero vivo (Deacon, 1997).

Los hongos mutualistas son aquellos que se asocian con otros seres vivos incrementando la adecuación de ambos, ejemplos de ellos son los mutualistas de organismos fototróficos como cianobacterias y algas que conforman líquenes, o como micorrizas y endófitos² en plantas vasculares (Moore-Landecker, 1996).

1.3. Diversidad

La diversidad biológica³ en hongos es muy grande, Hawksworth en 1991 estimó que existen más de 1.5 millones de especies de hongos, y aunque May (1991) sugiere un número menor, es indudable que existe una gran cantidad de hongos aún no descritos (Wildman, 1997).

Guzmán (1994) estimó que la diversidad fúngica en México es muy grande debido a la situación biogeográfica de nuestro país, donde señala además que la vegetación tropical, incluyendo la subtropical, es la más rica en especies fúngicas. Este investigador calcula que en México existen aproximadamente 120,000 especies de hongos (Guzmán, 1995).

En hongos resulta difícil medir la biodiversidad debido a que existen diferentes conceptos de especie (unidad de medida en la biodiversidad) y éstos varían considerablemente; además, las bases genéticas que fundamentan estos conceptos, con relación a los hongos, son poco conocidas (Boussienguet, 1991; Colwell, *et al*, 1995; Rossman, 1997).

Los hongos más numerosos y menos conocidos son los microscópicos, a los que comúnmente se les denomina micromicetos, los cuales están representados en muchos grupos taxonómicos; comprendiendo a quitridiomicetos, zygomycetos, la mayoría de los ascomicetos, parte de basidiomicetos y todos los deuteromicetos (Rossman, 1997). El número

² Se consideran endófitos a los microorganismos que viven dentro de las plantas sin causarles síntomas de alguna enfermedad aparente (Carroll, 1988)

³Biodiversidad o diversidad biológica se define como la variedad y variabilidad de los seres vivos y de los complejos ecológicos que ellos integran (Morrone, 2001)

estimado de micromicetos es de 700,000 a 900,000 especies, de las cuales sólo se ha estudiado del 10 al 30% (Rossman, 1994).

1.3.1. *Diversidad de micromicetos asociados con plantas vasculares en los trópicos.*

Los hongos han estado en íntima asociación con las plantas desde el Ordovícico tardío y el Silúrico (hace aproximadamente 400 millones de años) cuando se inició la colonización del ambiente terrestre; desde entonces los hongos establecieron asociaciones endófitas con las primeras plantas (Cooke y Whipps, 1993).

Actualmente los hongos asociados con plantas vasculares vivas pueden presentarse como biótrofos y necrótrofos de hojas, tallos, frutos y semillas; endófitos de hojas, tallos, cortezas y raíces; colonizadores secundarios de tejido vegetal muerto (xilema); o como micorrizógenos. También pueden estar asociados a los exudados de las plantas, sobre las superficies de hojas y frutos, así como asociados con néctares y resinas (Hawksworth, *et al*, 1996).

Aunque Wicklow (1981) rechaza la idea de que la diversidad de hongos conidiales aumenta en latitudes cálidas, y Zak (1993) argumenta que existe una mayor diversidad de especies fúngicas en las regiones tropicales áridas y semiáridas debido a la heterogeneidad ambiental de éstas, los micromicetos tropicales representan un universo inexplorado de biodiversidad y son relativamente poco conocidos (Rossman, 1997). Samuels y Rossman (1992) señalan que pocas especies de hongos son estrictamente tropicales, ya que la mayoría de los géneros son cosmopolitas.

1.3.2. *Hongos endófitos.*

La literatura existente sobre los hongos endófitos, no nos permite afirmar que los trópicos tienen una mayor diversidad de especies endófitas, en comparación con los ecosistemas templados; sin embargo, considerando la mayor diversidad de especies de plantas y de tipos de vegetación en los bosques tropicales (Campbell y Hammond, 1989), es lógico pensar que exista también una mayor diversidad de especies fúngicas (Rodrigues y Petrini, 1997).

Las listas de los hongos endófitos aislados a partir de un hospedero determinado son usualmente largas; de esta lista, cuatro o cinco especies son generalmente abundantes y probablemente son específicas de tales hospederos (Rodríguez y Petrini, 1997).

1.3.3. Hongos fitopatógenos.

Shivas y Hyde (1997) estiman que en los trópicos existen 270,000 especies de hongos patógenos de plantas, esta cantidad la calculan con base en cuatro aspectos: i) tres cuartas partes de los géneros de plantas conocidos están en los trópicos; ii) un género de plantas tiene en promedio 50 patógenos fúngicos; iii) la mitad de los patógenos en un hospedero son específicos al género del mismo o a géneros relacionados cercanamente; y iv) comparativamente pocos patógenos fúngicos (5,000) tienen un amplio rango de hospederos que están lejanamente relacionados, es decir se comportan como generalistas.

Las plantas nativas de los bosques tropicales son indudablemente una fuente rica de hongos patógenos (Shivas y Alcorn, 1996); pero las enfermedades de estas plantas han recibido menos atención que las de plantas cultivadas tropicales (Shivas y Hyde, 1997).

1.3.4 Pérdida de la biodiversidad de los hongos.

En la actualidad, al mismo tiempo que aumenta el interés por determinar las especies fúngicas del mundo, el número de éstas disminuye constantemente debido particularmente a la perturbación de sus hábitats y a la contaminación ambiental (Cherfas, 1991). Esta disminución de especies fúngicas constituye una doble tragedia: la pérdida del germoplasma de las especies y la imposibilidad de determinar o documentar su existencia antes de que desaparezcan. Con la pérdida de los bosques tropicales del mundo, cientos de especies se extinguen y con ellos se pierden bancos de material genético que pueden ser extremadamente útiles para la agricultura, medicina e industria (Wildman, 1997).

Los hongos en general son sensibles a la contaminación y a la perturbación, por lo que estos organismos (incluyendo las especies formadoras

de líquenes) son indicadores de la salud del ecosistema, ya que constantemente están señalando condiciones de disturbio en el suelo y de contaminación ambiental (Hawksworth, 1991). Debido a esta sensibilidad, el número de hongos ha disminuido en ciertas regiones, por ejemplo, en Alemania, Austria y los países bajos se ha observado una pérdida local de especies del 40 al 50% durante los últimos 60 años, principalmente de hongos micorrizógenos, debido a la contaminación ambiental (Wilson, 1992).

Desde el punto de vista de su utilidad potencial, algunos hongos son fuente importante para la tecnología en la producción de alimentos (fermentadores, colorantes, enzimas, vitaminas y productos químicos); otros son fuentes potenciales de novedosos componentes útiles para la agricultura (plaguicidas, agentes de control biológico, etc.) y para la industria farmacéutica (antibióticos y drogas en general) (Fox, 1993; Hyde y Hawksworth, 1997; Wildman, 1997).

1.4. Relaciones hongo-hongo

La distribución y actividad de los hongos está determinada parcialmente por la competencia con otros hongos por los recursos (Cooke y Whipps, 1993). La competencia se define como el efecto negativo de un organismo sobre otro al consumir o controlar el acceso a un recurso que es limitado en disponibilidad (Keddy, 1989).

Entre los hongos existen fundamentalmente dos aspectos diferentes de competencia: la competencia por explotación y la competencia por interferencia (Moore-Landecker, 1996).

Competencia por explotación.

Ésta se presenta cuando dos o más organismos requieren el mismo recurso y el organismo que adquiere el recurso de manera más eficiente, desplaza al competidor menos eficiente (Tilman, 1982); al explotar un recurso, un organismo reduce su disponibilidad para otro. En este tipo de competencia no es necesario que los dos organismos establezcan contacto directo (Widden, 1997). Esta competencia ocurre principalmente durante la colonización primaria de un hábitat y se restringe a los primeros estados de desarrollo de la comunidad fúngica, en donde el éxito de una especie y su predominio sobre

otras depende de las oportunidades de llegar y establecerse velozmente, mediante la rápida germinación de sus esporas, un rápido crecimiento micelial, alta capacidad de digerir los nutrimentos disponibles y la habilidad de tolerar factores ambientales prevaecientes (Moore-Landecker, 1996). Sin duda esto depende tanto de la 'habilidad' del hongo para colonizar rápidamente el medio, como de las características particulares de éste.

Competencia por interferencia.

En este tipo de competencia, la interferencia puede ser física, al establecerse un contacto hifal directo que puede ser de diversas formas: 1) formando barreras hifales (proliferación densa de hifas en el punto de contacto), 2) sobre-crecimiento de una colonia sobre otra, y 3) enrollamiento hifal. La interferencia también puede ser química, mediante la producción de compuestos solubles o volátiles que son efectivos a distancia y previenen el crecimiento de las hifas del competidor, o bien se puede ocasionar lisis química de las hifas de un hongo por acción de otro (Widden, 1997).

En condiciones *in vitro* se pueden observar distintas interacciones hongo-hongo cuando dos o más especies se encuentran creciendo juntas. Las hifas de las diferentes especies pueden entrecruzarse sin que se perciba de una manera directa, algún beneficio o desventaja para ellas, aunque es común que se presente cierto grado de intolerancia mutua, y uno de los micelios dejará de crecer después de entrar en contacto con el otro. Un hongo puede responder a la cercanía de otro, construyendo barreras hifales de defensa en el sitio del micelio más cercano al otro micelio, para limitar el avance de las hifas aéreas de éste; esto puede estimular una respuesta en el otro hongo, que entre otras cosas, involucra un aumento en la producción de inhibidores metabólicos como los antibióticos, o bien causa una limitación en el crecimiento como resultado de la competencia por nutrimentos, substrato, oxígeno o espacio. A lo anterior se le define como antagonismo indirecto, ya que no es necesario el contacto de las hifas para que se lleve a cabo la respuesta. De forma contraria, el antagonismo directo se produce cuando existe contacto directo entre las hifas de las diferentes especies, es decir, las hifas del competidor crecen dentro del micelio de la otra y la destruyen por sobre-crecimiento y por interacciones directas hifa-

hifa, este fenómeno incluye al micoparasitismo y a la interferencia hifal (Neville y Webster, 1995).

La relación de antagonismo entre especies de hongos que compiten naturalmente, es un fenómeno que se ha reportado prácticamente en todos los ecosistemas fúngicos que se han estudiado hasta ahora, y se ha propuesto que este tipo de interacción es un factor que determina la composición y patrones de colonización fúngica dentro de los ecosistemas. La competencia y el complejo de patrones en la sucesión fúngica, dependen no sólo de relaciones antagónicas entre ellos, sino también de otros factores: exclusión competitiva, aspectos nutritivos y ambientales (Gloer, 1996).

1.5. Metabolismo secundario

El término metabolismo secundario fue empleado para describir un amplio rango de vías biosintéticas cuyos productos no están directamente implicados en el metabolismo primario (Deacon, 1997). En general, los metabolitos secundarios son productos naturales con estructura química muy diversa, que no forzosamente son necesarios para el crecimiento; se originan a partir del metabolismo primario y muchos de ellos son de distribución taxonómica restringida. Por lo general se producen durante una limitada fase del ciclo celular, y se originan a través de intermediarios metabólicos comunes pero por rutas enzimáticas especiales codificadas por genes específicos (Bennett, 1983). Los hongos producen gran variedad de metabolitos secundarios que tienen un amplio rango de actividades biológicas (Gloer, 1997).

Turner (1971) ,y Turner y Alrige (1983) propusieron una subdivisión de los metabolitos secundarios fúngicos de acuerdo a su origen biosintético:

- Metabolitos secundarios originados del ácido shikímico: Metabolitos secundarios alucinógenos como el ácido licérgico, psilocibina (*Psilocybe*) y muscarina (*Amanita muscaria*).
- Policétidos: Patulina (*Penicillium patulum*), griceofulvina (*Penicillium griseofulvum*) y aflatoxinas (*Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*).

- Metabolitos secundarios del ciclo del ácido tricarbóxico: Rubratoxina (*Penicillium rubrum*) y ácido itacónico (*Aspergillus* spp.).
- Metabolitos secundarios de ácidos grasos: Poliacetilenos (micelio y cuerpos fructíferos de basidiomicetos)
- Terpenos: Micotóxicas de *Fusarium* spp. como toxina T-2 y los tricotecnos, fusicoccina (*Fusicoccum amygdali*), cefalosporinas (*Cephalosporium* spp.) y viridina (*Trichoderma virens*)
- Metabolitos secundarios derivados de aminoácidos: Penicilina (*Penicillium notatum*, *P. chysogenum*) y ácido fusárico (*Fusarium* spp.)
- Miscelánea de metabolitos secundarios.

La producción de los metabolitos secundarios varía entre diferentes aislamientos de las mismas especies de hongos procedentes de distintos hábitats y localidades geográficas, pero poco se conoce de la variabilidad intrínseca que existe en la producción de los metabolitos secundarios de diferentes aislamientos de la misma especie creciendo dentro de un mismo hábitat particular (Wildman, 1995).

Cualquier factor ambiental (extrínseco) capaz de afectar el crecimiento o desarrollo, puede también afectar la expresión de características químicas secundarias (Frank, 1998), y algunos de los factores ambientales que influyen sobre el metabolismo secundario son: pH, composición atmosférica (incluyendo el bióxido de carbono), temperatura y nutrientes (Ostenfeld, 1998).

Los metabolitos secundarios de los hongos desempeñan diversas funciones: participan induciendo enfermedades de plantas y animales al romper el equilibrio químico establecido entre el hongo y su hospedero, tienen acción tóxica sobre diversos animales, confieren resistencia contra la infestación o infección microbiana, son agentes de biocontrol de otros hongos, intervienen en las relaciones antagónicas entre especies y protegen al hongo que los produce contra la fungivoría (Gloer, 1996).

Las toxinas fúngicas comúnmente están implicadas como posibles defensas en un sentido general, pero relativamente pocos estudios han detallado la

estructura química de las mismas, por lo que es necesario realizar investigación cuidadosamente controlada para determinar si estos componentes son realmente significativos en las historias de vida de las especies que los producen (Gloer, 1995).

Los estudios de especies antagónicas, y en general de la ecología de los hongos, proporcionan información útil, no sólo para la ecología fúngica, sino también como un complemento valioso para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos (Gloer, 1996).

2. Objetivo General

Seleccionar los aislamientos de hongos de algunas plantas de la Reserva Ecológica El Edén Quintana Roo, que hayan mostrado mayor potencial antagonico, con el fin de valorar la actividad biológica de sus extractos orgánicos, por medio de bioensayos sobre diversos organismos de prueba como paso preliminar para aislar e identificar los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad biológica.

2.1 Objetivos Particulares

- Aislar e identificar a nivel de género, a los hongos asociados con algunas plantas de distintas comunidades de la reserva ecológica El Edén Quintana Roo, México.
- Realizar bioensayos de antagonismo *in vitro* entre los aislamientos identificados, con el fin de seleccionar aquellos que muestren un mayor antagonismo indirecto sobre los otros, particularmente los que formen halos de inhibición. Cultivar los hongos seleccionados para obtener los extractos orgánicos del micelio y del medio de cultivo de cada uno.
- Evaluar *in vitro* el efecto de los extractos orgánicos de micelio y medio de cultivo, sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*, *Lycopersicon esculentum* y *Echinochloa crusgalli*, el crecimiento radial de *Alternaria* sp. y *Curvularia* sp., y la sobrevivencia de *Artemia salina*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Zona de Estudio

La colecta del material vegetal se realizó en la reserva ecológica "El Edén", situada en la región denominada Yalahau en el norte de Quintana Roo a 21° 13' N y 87° 11' O, con una elevación de 5-10 m. Esta región contiene más de 250,000 ha de ambientes naturales bien preservados que representan los principales ecosistemas de la Península de Yucatán, así como del Caribe. Incluye lagunas y ecosistemas marinos, pastizales marinos, humedales, manglares, sabanas, dunas y diferentes tipos de selvas tropicales, tintales y distintos tipos de vegetación secundaria. La región de Yalahau es considerada como una de las más biodiversas en la Península de Yucatán y posee una gran cantidad de endemismos. La zona fue ocupada por la antigua cultura maya, e incluso hay evidencias de que tuvo una de las mayores poblaciones humanas en tiempos pasados, aunque actualmente sólo habitan en ella un promedio de 4 personas por Km² (Gómez-Pompa, 1998).

3.2. Recolecta de Material vegetal

En febrero de 1999, se realizó la colecta de algunas plantas (hojas maduras, pequeñas ramas y en un caso, frutos): especie no identificada de Sapotaceae, *Byrsonima* sp. (Malpighiaceae), *Piper* sp. (Piperaceae), *Metopium brownei* (Jacq.) Urb. (Anacardiaceae), *Eugenia* sp. (Myrtaceae), *Crescentia* sp. (Bignoniaceae), *Jacquinia aurantiaca* W. T. Aiton (Theophrastaceae) y ejemplares de dos algas del género *Nostoc*, laminares y globulares, del perifiton de la sabana de El Edén.

La recolecta del material vegetal se realizó en un transecto de 10 m de ancho, en zigzag, hasta 100 m de longitud. Las muestras vegetales se guardaron en bolsas de plástico para ser transportadas al laboratorio e inmediatamente después se guardaron en el refrigerador a 4° C.

3.3. Aislamiento e identificación de los hongos asociados al material vegetal.

Para el aislamiento de los hongos, se hicieron pequeños cortes de 5 mm² de las hojas, ramas o frutos, tanto en los bordes de lesiones, como en las regiones sanas del material. Estos cortes, así como los correspondientes a las algas del perfiton, se esterilizaron superficialmente sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante un minuto y enjuagándolos posteriormente con agua destilada estéril, según la técnica descrita por Agrios (1997). Tres cortes de cada órgano de las plantas o algas, se transfirieron a una caja de petri con medio de papa-dextrosa-agar (PDA), en condiciones estériles y usando pinzas esterilizadas a la flama. Las cajas de petri con los cortes, por duplicado, se incubaron en un cuarto de cultivo a 23° C.

Después de tres días de incubación, los hongos que crecieron a partir de las muestras se aislaron en nuevas cajas de petri con PDA, realizándose las transferencias de micelio necesarias hasta obtener aislamientos puros de cada hongo.

Los aislamientos puros de los hongos se identificaron hasta género, con base en la morfología de sus conidios y sus características de crecimiento en el medio; se utilizó la clave de identificación de Barnett y Hunter (1972).

3.4. Bioensayos de antagonismo indirecto.

Para realizar los bioensayos de antagonismo indirecto, se eligieron 36 aislamientos de hongos que pudieron ser identificados hasta género; estos aislamientos fueron los siguientes:

1. *Beltrania* (1 aislamiento)
2. *Diplodina* (1 aislamiento)
3. *Doratomyces* (1 aislamiento)
4. *Fusarium* (7 aislamientos)
5. *Nigrospora* (1 aislamiento)
6. *Pestalotia* (22 aislamientos)
7. *Phlyctaena* (2 aislamientos)
8. *Verticillium* (1 aislamiento)

Para estos bioensayos de antagonismo se preparó PDA (Merck) al que se le añadieron 200 mg/L de neomicina. En cada caja de petri se colocaron seis cortes circulares de los distintos aislamientos; uno central y cinco periféricos (Figura No. 1) haciéndose dos repeticiones. Para cortar el micelio, se utilizaron tubos de vidrio estériles de 9 mm de diámetro. Las cajas se incubaron a 24° C en un cuarto de cultivo durante 7 días.

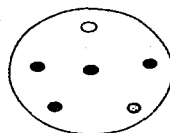


Figura 1 Disposición de los seis aislamientos de hongos en una caja de petri para los bioensayos de antagonismo.

Los resultados de crecimiento e interacción entre los aislamientos, se registraron e interpretaron después de siete días de sembrados los hongos, tomando en cuenta los siguientes criterios con base en la descripción de antagonismo de Neville y Webster (1995): 1) el micelio de un aislamiento crecía encima de otro, 2) crecimiento con contacto; los aislamientos se tocaban pero no se encimaban, ni se observaban cambios aparentes en los micelios; 3) formación de un halo oscuro alrededor de un aislamiento en contacto con otro, 4) formación de un halo de inhibición en un aislamiento contiguo a otro (Figura 2)

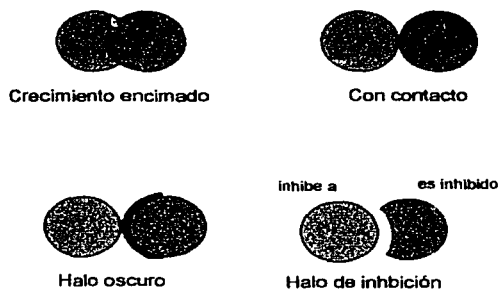


Figura 2. Criterios para interpretar el tipo de interacción entre los diferentes aislamientos de hongos en los bioensayos de antagonismo.

De todos los aislamientos probados en los bioensayos de antagonismo, se seleccionaron dos que mostraron el mayor antagonismo contra los demás: un aislamiento de *Pestalotia* sp., el cual se obtuvo de las hojas de *Metopium brownei*, y otro de *Fusarium* sp., aislado de las ramas de *Piper* sp.

3.5. Identificación a nivel de especie del aislamiento de *Fusarium* seleccionado.

La determinación a nivel de especie del aislamiento de *Fusarium* seleccionado, se realizó según las técnicas de Booth (1971) y Gerlach y Nirenberg (1982), que se basan, para diferenciar especies, en las características morfológicas de los conidióforos y los conidios. El aislamiento se sembró en cajas de petri con dos tipos de medio: 1) papa-sucrosa-agar (PSA) y 2) Syntetischer Nährstoffärmiger agar (SNA), con el objeto de valorar en cual de los dos medios producía mayor cantidad de macroconidios. El primer medio (PSA) tiene una calidad nutritiva mayor que el segundo (SNA), y se utilizan ambos debido a que de las distintas especies de *Fusarium*, algunas forman macroconidios en medios ricos en nutrientes, mientras que otras los forman en medios pobres o bajo estrés luminoso (luz UV). Las cajas se colocaron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo (8 h luz, 16 h oscuridad) con luz UV y a temperatura ambiente (Gerlach y Nirenberg, 1982)

Después de diez días de crecimiento se hicieron preparaciones microscópicas del aislamiento, y se observaron y registraron las características morfológicas para el género *Fusarium* descritas en la clave de Booth (1971) y Gertach y Nirenberg (1982). El aislamiento fue identificado como *F. sporotrichioides*. Éste se mantuvo en viales con medio de peptona-agar con neomicina y cloranfenicol (NCPA), medio modificado a partir del dicloran-cloranfenicol-peptona-agar (DCPA), sugerido por Burgess *et al.* (1988), con el objeto de disminuir las posibilidades de mutación al máximo posible.

3.6. Cultivo de *Fusarium sporotrichioides* y *Pestalotia* sp. para la extracción de posibles toxinas.

Los dos hongos seleccionados se cultivaron masivamente en un medio basal medio líquido de Czapek-Dox suplementado con ácidos-casamino (DIFCO) al 2 % (w/v). En matraces erlenmeyer de 1 L se vaciaron 500 ml de este medio, y por cada 100 ml se añadió un corte circular de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Los cortes de *F. sporotrichioides* se obtuvieron a partir de un cultivo en NCPA de diez días, mantenido a 25° C, en cambio los cortes de *Pestalotia* sp. se obtuvieron simplemente a partir de un cultivo de diez días en PDA mantenido a 25° C.

Tanto los matraces control, únicamente con medio de cultivo sin hongo, como los matraces inoculados con *F. sporotrichioides*, se incubaron con agitación constante a 130 rpm (en un Orbit Environ Shaker), en la oscuridad a 25° C, durante 10 días (Hallmann and Sikora, 1996). Los matraces inoculados con *Pestalotia* sp. se incubaron en las mismas condiciones, excepto por la temperatura que fue de 23° C (Noh, *et al.*, 1999). Posteriormente, se realizaron preparaciones microscópicas de cada uno de los cultivos para determinar si estaban o no contaminados por algún otro microorganismo. Después de verificar que no había contaminación, se separó el micelio del medio de cultivo, filtrándolo a través de cinco capas de gasa en un matraz Büchner, y nuevamente, con papel filtro (Whatman no. 4) al vacío.

3.7. Extracción del micelio y del medio de *F. sporotrichioides* y de *Pestalotia* sp..

Con el fin de extraer los compuestos potencialmente tóxicos, tanto del micelio como del medio de cultivo ya separados, se procedió primero a agregar acetato de etilo a cada uno de los micelios de ambos hongos, hasta cubrirlos totalmente. Se dejaron macerar los micelios en este solvente durante 72 horas en un frasco ámbar. Posteriormente, el acetato de etilo se decantó; el procedimiento de extracción se realizó tres veces. A los dos extractos de acetato de etilo de micelio, se les eliminó el exceso de humedad añadiéndoles sulfato de sodio anhidro en una proporción aproximada de 50 g por litro de extracto. Los extractos de micelio se filtraron con papel filtro (Whatman 4) y se llevaron a sequedad al vacío en un rotavapor Büchi 461 Water Bath en baño María a 40° C.

Para la extracción de los medios de cultivo, se realizó una separación de fases, para lo cual, en un embudo de separación se añadieron 300 ml del medio de cultivo correspondiente y se añadieron 200 ml de acetato de etilo; repitiendo este proceso tres veces. La fase orgánica del acetato de etilo se colectó y llevó a sequedad al vacío en un rotavapor en las mismas condiciones mencionadas.

3.8. Bioensayos para probar el efecto biológico de los extractos de micelio y medio de *F. sporotrichioides* y de *Pestalotia* sp. sobre diversos organismos de prueba.

Para evaluar el efecto biológico de los extractos del micelio y del medio de cultivo de *Pestalotia* sp., se disolvieron éstos en metanol-hexano 2:1 (v/v). Los extractos del micelio y medio de cultivo de *F. sporotrichioides*, se disolvieron en metanol (100 %). La diferencia en el uso de solventes se debe a la diferencia de polaridad de los extractos; el de *Fusarium* requiere solventes muy polares para disolverse, mientras que el de *Pestalotia* se disuelve en solventes de baja polaridad.

Los bioensayos que se realizaron fueron los siguientes:

➤ efecto sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae), *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) y *Echinochloa crusgalli* (Poaceae). Estas semillas fueron seleccionadas por tener una alta viabilidad.

➤ efecto sobre el crecimiento de los hongos: *Alternaria* sp., obtenido de un rosal enfermo, y *Curvularia* sp., aislado de *Crescentia alata*.

➤ pruebas de letalidad sobre larvas de *Artemia salina*.

3.8.1 Evaluación de los efectos de los extractos del micelio y del medio sobre el crecimiento radicular de plantas prueba.

BIOENSAYOS SOBRE PAPEL FILTRO. Para probar el efecto de los extractos sobre el crecimiento radicular de las plantas de prueba, se utilizó una concentración de 100 ppm (concentración estándar comúnmente utilizada para evaluar el efecto biológico de una solución), la cual se obtuvo pesando 2 mg de cada extracto y diluyéndolos en 20 ml del disolvente correspondiente. A cada caja de petri (5 cm) se le colocó un papel filtro Whatman No. 42 y se le añadieron 1.5 ml de la solución respectiva. Se dejó evaporar el disolvente del papel filtro en una campana de extracción. Después de la evaporación, se añadieron 1.5 ml de agua destilada a cada caja. Se prepararon dos controles, uno conteniendo solo agua destilada sobre el papel filtro (control de agua), y otro al cual se le añadió el respectivo disolvente, el cual se dejó evaporar a sequedad, y luego se le añadió agua destilada (control del disolvente). Se colocaron 10 semillas de cada especie, directamente en el papel filtro de cada caja de petri; las cajas se sellaron con parafilm para evitar la evaporación del agua, y se hicieron 4 repeticiones por tratamiento (Anaya, *et al*, 1999). Las cajas con las semillas se colocaron guardaron en una estufa de crecimiento a 27° C, en la oscuridad. Después de 36 h se midió la longitud radicular de las plántulas de *A. hypochondriacus*; las de *E. crusgalli* se midieron a las 48 h, y las de *L. esculentum*, a las 72 h. Los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANVA) de una vía ($p \leq 0.05$), comparando los grupos por medio de un análisis de Tukey.

BIOENSAYOS SOBRE AGAR. Se pesaron 8 mg de cada extracto y se disolvieron en la menor cantidad posible del disolvente correspondiente (± 0.1

ml); después se les añadieron 40 ml de agua destilada para obtener una solución patrón a 200 ppm. Las cajas de petri (5 cm) se limpiaron con alcohol y a cada una se le añadió 3 ml de agar al 2 % (w/v) y 3 ml de la solución patrón, para obtener la concentración de 100 ppm del extracto respectivo. El control se elaboró con 3 ml de agar al 2 % más 3 ml de agua destilada. Una vez solidificado el agar, se colocaron 10 semillas de cada especie en cada caja, y se realizaron 4 repeticiones por tratamiento (Anaya, *et al*, 1999). Se utilizaron las mismas especies de semillas que en el bioensayo sobre papel filtro. El bioensayo se llevó a cabo en las mismas condiciones que el anterior y las longitudes de las radículas de las tres especies se midieron en los mismos tiempos mencionados.

3.8.2 Bioensayos con Hongos.

Para probar los efectos de los extractos sobre el crecimiento radial de los hongos de prueba, se utilizó una concentración de 250 ppm, debido a que los hongos, en general, son más resistentes que las semillas al efecto de un extracto obtenido de una planta o de un hongo (Anaya *et al*, 1999). Se pesaron 15 mg de cada extracto y se diluyeron en la menor cantidad posible del disolvente correspondiente (± 0.1 ml); posteriormente se aforó a un volumen de 30 ml con agua destilada estéril (solución patrón). A cada caja de petri de 5 cm de diámetro se le añadieron 3 ml de la solución patrón y 3 ml de PDA (Merck) estéril (para obtener la concentración final de 250 ppm). Se prepararon dos tipos de control: el del disolvente y el de agua. Se utilizaron como hongos de prueba, *Alternaria* sp. y *Curvularia* sp., los cuales se tomaron de cultivos en PDA de 10 días de edad, incubados en la oscuridad en una estufa de crecimiento a 25° C. Antes de los bioensayos se determinaron las condiciones idóneas de crecimiento de ambos hongos con relación a la presencia de luz y temperatura. *Alternaria* creció adecuadamente con un fotoperíodo 12:12 h de luz:oscuridad a temperatura ambiente, mientras que *Curvularia* creció mejor en la oscuridad y a 25° C; por esta razón se usaron las condiciones mencionadas para cada hongo. Se sembró un corte circular de 5 mm de diámetro del hongo respectivo en el centro de una caja de petri, realizándose 5 repeticiones por tratamiento. El crecimiento radial del micelio se midió a los 3 y 6 días de iniciado el bioensayo; se toman dos medidas perpendiculares del diámetro y se

promedian (Anaya *et al*, 1996). Los datos fueron analizados por medio de ANVA de una vía ($p \leq 0.05$), comparando los grupos con un análisis de Tukey.

3.8.3. Pruebas de letalidad sobre larvas de *Artemia salina*.

OBTENCIÓN DE LAS LARVAS DE *Artemia salina*. Al medio preparado con cloruro de sodio y sulfato de magnesio conteniendo huevecillos de *Artemia salina* (San Francisco Bay Brand INC) se le añadió agua destilada (17.5 g/L) con el fin de cultivar a estos crustáceos. La solución con los huevecillos se mantuvo en baño maría a 30° C con luz constante durante 24 horas, después de las cuales las larvas eclosionaron.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS. Se prepararon soluciones patrón con 20 mg de cada extracto disueltos en 2 ml del disolvente respectivo (10,000 ppm). A partir de estas soluciones, se prepararon tres concentraciones de cada extracto: 10, 100 y 1000 ppm, añadiendo alícuotas de 500, 50 o 5 µL de las soluciones patrón en frascos de vidrio. En el control de disolvente se colocaron 500 µL del disolvente correspondiente. El control de agua no llevaba disolvente. Los disolventes de todos los tratamientos se dejaron evaporar a temperatura ambiente durante 24 horas; posteriormente se añadieron 5 ml de agua salina preparada (36.5 g/L de sal de mar sintética Instant Ocean) a cada frasco y 10 larvas; se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento. El experimento se mantuvo con luz constante por 24 h. Se contó el número de larvas muertas en cada tratamiento y con los datos se determinó la concentración letal media (CL₅₀) utilizando el análisis PROBIT (SPSS 10.0 para Windows) (Anderson *et al*, 1991).

4. Resultados

4.1. Identificación de los géneros de hongos aislados.

De los 42 aislamientos de hongos obtenidos a partir del material vegetal, se lograron determinar 36 aislamientos a nivel de género, identificándose los siguientes: *Beltrania*, *Diplodina*, *Doratomyces*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Pestalotia*, *Phlyctaena* y *Verticillium*.

En la Tabla 1 se presentan las plantas y los órganos de las cuales se obtuvieron los aislamientos de hongos.

Tabla 1. Plantas y algas del perifiton de la Reserva Ecológica El Edén con los hongos aislados.

Tipos de Plantas	Parte de la planta de la que se aisló el hongo	No. de aislamientos de hongos.	Géneros de hongos identificados
Sapotaceae	Rama	3	<i>Pestalotia</i> sp. (1) <i>Pestalotia</i> sp. (2) <i>Pestalotia</i> sp. (3)
Sapotaceae	Hojas	2	<i>Pestalotia</i> sp. (4) <i>Pestalotia</i> sp. (5)
<i>Jacquinia aurantiaca</i> W. T. Aiton (Theophrastaceae)	Rama	6	<i>Fusarium</i> sp. (1) <i>Phlyctaena</i> sp. (1) <i>Phlyctaena</i> sp. (2) <i>Nigrospora</i> sp. <i>Diplodina</i> sp. ND
<i>Jacquinia aurantiaca</i> W. T. Aiton (Theophrastaceae)	Hojas	4	<i>Pestalotia</i> sp. (6) <i>Pestalotia</i> sp. (7) <i>Fusarium</i> sp. (2) ND
<i>Jacquinia aurantiaca</i> W. T. Aiton (Theophrastaceae)	Fruto	3	<i>Fusarium</i> sp. (3) <i>Fusarium</i> sp. (4) <i>Fusarium</i> sp. (5)

<i>Byrsonima</i> sp. (Malpighiaceae)	Rama	1	<i>Pestalotia</i> sp. (8)
<i>Byrsonima</i> sp. (Malpighiaceae)	Hojas	1	<i>Pestalotia</i> sp. (9)
<i>Piper</i> sp. (Piperaceae)	Rama	4	<i>Pestalotia</i> sp. (10) <i>Fusarium</i> sp. (6) <i>Doratomyces</i> sp. ND
<i>Piper</i> sp. (Piperaceae)	Hojas	2	<i>Fusarium</i> sp. (7) ND
<i>Metopium brownei</i> (Jacq.) Urb. (Anacardiaceae)	Rama	4	<i>Pestalotia</i> sp. (11) <i>Pestalotia</i> sp. (12) <i>Pestalotia</i> sp. (13) <i>Pestalotia</i> sp. (14)
<i>Metopium brownei</i> (Jacq.) Urb. (Anacardiaceae)	Hojas	3	<i>Pestalotia</i> sp. (15) <i>Pestalotia</i> sp. (16) ND
<i>Eugenia</i> sp. (Myrtaceae)	Rama	2	<i>Pestalotia</i> sp. (17) <i>Pestalotia</i> sp. (18)
<i>Eugenia</i> sp. (Myrtaceae)	Hojas	3	<i>Pestalotia</i> sp. (19) <i>Pestalotia</i> sp. (20) <i>Verticillium</i> sp.
<i>Crescentia</i> sp. (Bignoniaceae)	Hojas	2	<i>Beltrania</i> sp.
Algas			
<i>Nostoc</i> sp. Laminar		1	<i>Pestalotia</i> (21)
<i>Nostoc</i> sp. Esférica		1	<i>Pestalotia</i> (22)

(En la tabla, los números en paréntesis corresponden a los aislamientos para cada género).

ND = No determinado.

En las ramas de *Jacquinia aurantiaca* se encontró la mayor variedad de géneros de hongos, seguidas por las de *Piper* sp. En otros órganos tales como las ramas y hojas de la Sapotaceae, las de *Metopium brownei* y los frutos de *Jacquinia aurantiaca* solo se obtuvieron aislamientos de un género de hongos. En total se identificaron 36 aislamientos a nivel genérico, siendo *Pestalotia* el más abundante con 22 aislamientos encontrados en la mayoría de las especies

colectadas, estando ausente en *Crescentia* sp.. Después de *Pestalotia*, *Fusarium* fue el género más abundante con 7 aislamientos, seguido por *Phlyctaena* con 2. De los géneros restantes (*Beltrania*, *Diplodina*, *Doratomyces*, *Nigrospora* y *Verticillium*) se obtuvo un aislamiento para cada género (Figura 3).

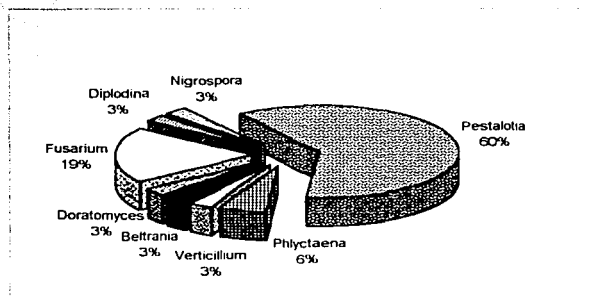


Figura 3. Porcentaje de los géneros de hongos aislados e identificados de las plantas y algas.

4.2. Bioensayos de antagonismo entre todas las cepas

En los bioensayos de antagonismo con cada uno de los ocho géneros aislados, los resultados de crecimiento e interacción entre las cepas, se registraron e interpretaron considerando: 1) el crecimiento de un micelio encima de otro, 2) crecimiento con contacto; 3) formación de un halo oscuro alrededor de un aislamiento en contacto con otro, 4) formación de un halo de inhibición en un aislamiento contiguo a otro (Figura 2).

La Figura 4 muestra los resultados de los bioensayos de antagonismo del aislamiento de *Beltrania*. Como se puede observar, la forma mayoritaria de crecimiento de este género fue el crecimiento de su micelio encima de otros aislamientos (64 %), esto ocurrió en contigüidad con: *Diplodina*, *Nigrospora*, el aislamiento 1 de *Phlyctaena*, el aislamiento 4 de *Fusarium* y los aislamientos 2-11, 13, 15-20 y 22 de *Pestalotia*. Su crecimiento con contacto alcanzó sólo un 6 %, y

ocurrió al crecer en contigüidad con el aislamiento 5 de *Fusarium* y el 14 de *Pestalotia*. *Beltrania* formó un halo oscuro al crecer junto a los aislamientos 2, 3, 6 y 7 de *Fusarium* y el 2 de *Phlyctaena*, lo que representó una forma de crecimiento del 15 %. Presentó halos de inhibición (3 % en su forma de crecimiento) inhibiendo a *Doratomyces*, y fue inhibido por los siguientes aislamientos: *Verticillium*, el aislamiento 1 de *Fusarium*, y los aislamientos 2 y 12 de *Pestalotia*, lo que representó el 12 % en el tipo de crecimiento.

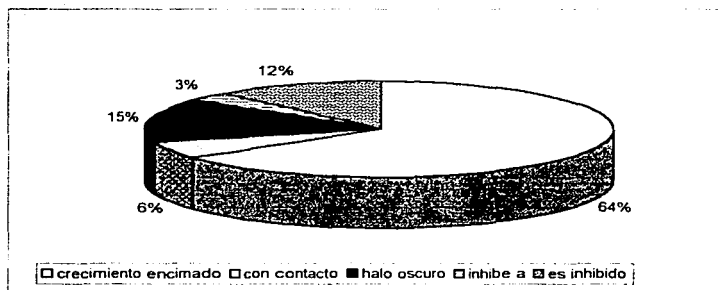


Figura 4. Porcentaje de crecimiento del aislamiento del género *Beltrania*.

En los bioensayos de antagonismo, el género *Diplodina* (Figura 5) mostró un 26 % de crecimiento encima de otros micelios al crecer junto a *Beltrania*, *Doratomyces*, el aislamiento 1 y 2 de *Phlyctaena*, los aislamientos 4 y 5 de *Fusarium* y los 12, 16 y 18 de *Pestalotia*. Tuvo un 29 % de crecimiento con contacto al crecer junto a los aislamientos 2, 3 y 7 de *Fusarium* y los 7-11, 13 y 17 de *Pestalotia*. La forma mayoritaria de crecimiento de *Diplodina* (39 %), se realizó con formación de halo oscuro al crecer junto a *Nigrospora*, *Verticillium*, el aislamiento 6 de *Fusarium*, y los aislamientos 1-6, 15, 19-22 de *Pestalotia*. Finalmente, *Diplodina* fue inhibido por el aislamiento 1 de *Fusarium* y el 14 de *Pestalotia* (6 % en la forma de crecimiento).

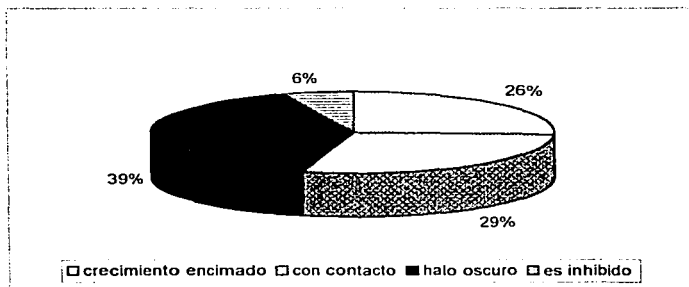


Figura 5. Porcentaje de crecimiento del aislamiento del género *Diplodina*.

El género *Doratomyces*, creció mayoritariamente (71 %) encima de los siguientes aislamientos: *Diplodina*, *Nigrospora*, *Verticillium*, los 2 aislamientos de *Phlyctaena*, el aislamiento 3 de *Fusarium*, y los aislamientos 1-8, 10-14, 16-18, 20-22 de *Pestalotia*, como se muestra en la Figura 6. En cambio, sólo mostró un 3 % en la forma de crecimiento con contacto, en contigüidad con el aislamiento 1 de *Fusarium*; y formó un halo oscuro al crecer con los aislamientos 5 y 7 de *Fusarium*, lo que significó el 6 % en las formas de crecimiento. *Doratomyces* se inhibió al crecer junto a *Beltrania*, los aislamientos 2, 4 y 6 de *Fusarium* y los aislamientos 9 y 15 de *Pestalotia* (20 % de las formas de crecimiento).

Debido a que *Doratomyces* fue la cepa que presentó el mayor porcentaje de crecimiento encima de los otros micelios, se decidió incubarla junto a un aislamiento de *Pestalotia* (sobre la cual creció encima), para observar su comportamiento y características tanto macroscópicas como microscópicas. En una caja de petri con PDA, se colocó en un extremo un disco de 5 mm de diámetro del micelio de *Doratomyces* y en el otro extremo un disco de 5 mm de diámetro del micelio de *Pestalotia*, los cuales se incubaron en una estufa a 24°C. A los 4 días de crecimiento, el micelio de *Doratomyces* se había encimado ya al de *Pestalotia*. En las preparaciones microscópicas de ambos micelios no se observaron cambios en el diámetro de las hifas de ambos hongos, ni daño aparente en las hifas del

aislamiento de *Pestalotia*. Este hecho sugiere que *Doratomyces* no actúa como un micoparásito al crecer encima de *Pestalotia*.

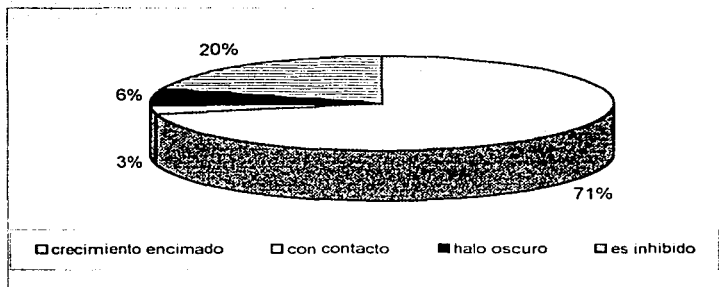


Figura 6. Porcentaje de antagonismo del aislamiento del género *Doratomyces*.

El aislamiento de *Nigrospora* (Figura 7) mostró 20 % de crecimiento encima de otros micelios: *Beltrania*, *Doratomyces*, los aislamientos 3, 5 y 6 de *Fusarium* y los 5 y 6 de *Pestalotia*. El menor porcentaje de crecimiento fue con contacto (9 %) al crecer junto a el aislamiento 2 de *Fusarium* y los 11 y 20 de *Pestalotia*. *Nigrospora* creció principalmente formando halos oscuros (40%) al crecer junto a *Diplodina*, *Verticillium*, los aislamientos 1, 4 y 7 de *Fusarium*, y los aislamientos 2, 4, 12-14, 17, 19, 21 y 22 de *Pestalotia*. Por otro lado, creció formando halos de inhibición en un 31 % al inhibir a 2 aislamientos de *Phlyctaena* y a los aislamientos 1, 3, 7-10, 15, 16, y 18 de *Pestalotia*.

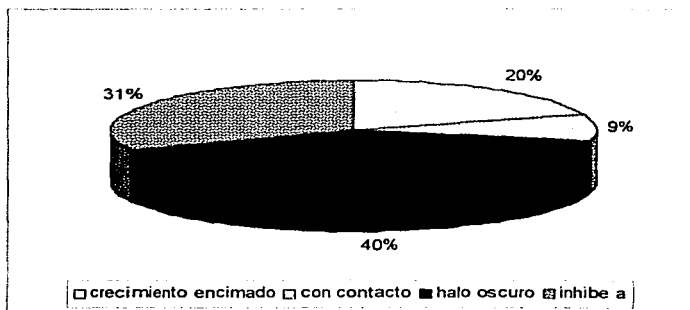


Figura 7. Porcentaje de antagonismo del aislamiento del género *Nigrospora*.

En la Figura 8, podemos observar que *Verticillium* creció encima de otros aislamientos en 41 % de los casos, en contigüidad a *Doratomyces* y los aislamientos 3, 5, 8-10, 12, 14-19 y 22 de *Pestalotia*; mostró 9 % de crecimiento con contacto, junto a los aislamientos 5, 6 y 7 de *Fusarium*; formó un 38 % de halos oscuros, junto a *Diplodina*, *Nigrospora*, el aislamiento 1 de *Phlyctaena*, los aislamientos 2, 3 y 4 de *Fusarium*, y los 2, 4, 6, 7, 11, 13 y 20 de *Pestalotia*. Formó halos de inhibición (6 %), al inhibir a *Beltrania* y al aislamiento 1 de *Pestalotia*; y por otro lado, creció inhibida (6 %) en contigüidad con el aislamiento 1 de *Fusarium* y el 2 de *Phlyctaena*.

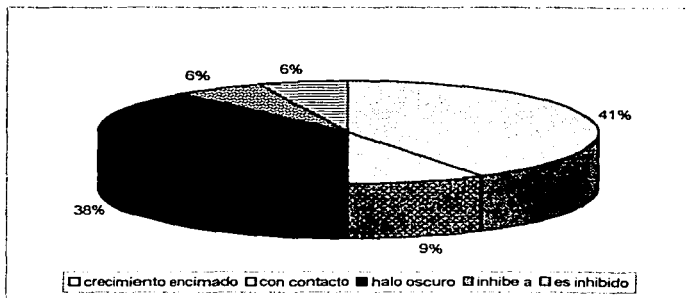


Figura 8. Porcentaje de antagonismo del aislamiento del género *Verticillium*.

En la Figura 9 se observa el porcentaje de antagonismo o formas de crecimiento del aislamiento 1 del género *Phlyctaena*, el cual presentó un 31 % de crecimiento encima de los siguientes micelios: *Beltrania*, *Diplodina*, *Doratomyces*, el aislamiento 2 de *Phlyctaena* y los 6, 9, 12, 15, 16, 18 y 19 de *Pestalotia*. Creció formando halos oscuros en 58 % de los casos, al crecer con *Verticillium*, los aislamientos 1, 3-5 de *Fusarium* y los 1-5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 17, 20-22 de *Pestalotia*; fue inhibido en 11 % por *Nigrospora* y los aislamientos 2, 6 y 7 del género *Fusarium*.

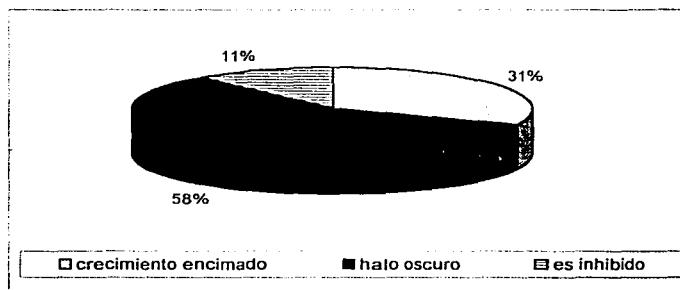


Figura 9. Porcentaje de formas de crecimiento del aislamiento No. 1 de *Phlyctaena*.

El aislamiento 2 de *Phlyctaena* (Figura 10) creció encima de otros aislamientos en 23 % de los casos, al crecer con *Diplodina*, *Doratomyces*, el aislamiento 1 de *Phlyctaena*, los 3 y 5 de *Fusarium* y los 4, 12 y 19 de *Pestalotia*. Mostró un crecimiento con contacto en 14 % de los casos, al crecer con el aislamiento 4 de *Fusarium* y los 5-7 y 10 de *Pestalotia*; formó halos oscuros (57%) al crecer con *Beltrania*, los aislamientos 1, 2, 6 y 7 de *Fusarium* y los 1-3, 8, 9, 11, 13-18, 20-22 de *Pestalotia*; y finalmente, creció presentando halos de inhibición (3 %) al inhibir a *Verticillium*, y fue inhibido por el aislamiento de *Nigrospora* (3 % de su forma de crecimiento).

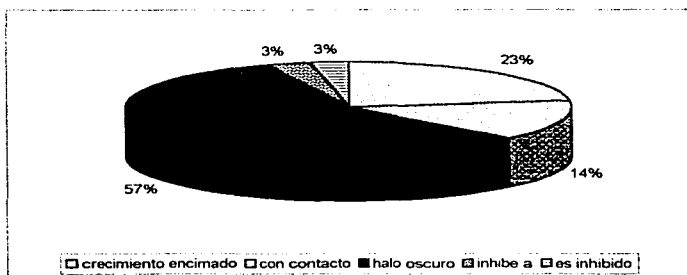


Figura 10. Porcentaje de formas de crecimiento del aislamiento No. 2 de *Phlyctaena*.

En la Figura 11 se muestran las formas de crecimiento de los 7 aislamientos del género *Fusarium* en las pruebas de antagonismo.

Fusarium 1 creció encima (9 % de su forma de crecimiento) de los aislamientos 13, 15 y 16 de *Pestalotia*. Mostró un crecimiento con contacto (37 %) al crecer junto a *Doratomyces*, los aislamientos 6- 8, 10, 11, 14, 17 y 20 de *Pestalotia* y los 3 y 5 de *Fusarium*. Formó halos oscuros (11 %) al crecer contiguo a *Nigrospora*, el aislamiento 3 de *Pestalotia* y los 2 de *Phlyctaena*; e inhibió (43 % de los casos) el crecimiento de *Beltrania*, *Diplodina*, *Verticillium*, los aislamientos 1, 2, 4, 5, 9, 18, 21 y 22 de *Pestalotia* y los aislamientos 2, 4, 6 y 7 de *Fusarium*.

Fusarium 2 presentó un crecimiento encimado (3 % de los casos) únicamente al desarrollarse junto al aislamiento 8 de *Pestalotia*. El crecimiento con contacto (40 % de su forma de crecimiento) lo mostró al crecer contiguo a *Diplodina*, *Nigrospora*, los aislamientos 4, 9, 10, 12-16 y 19 de *Pestalotia* y los 3, 5 y 6 de *Fusarium*. Formó halo oscuro (9 %) al crecer con *Verticillium*, *Beltrania* y el aislamiento 2 de *Phlyctaena*. Su forma mayoritaria de crecimiento fue formando halos de inhibición (48 %) al crecer junto a *Doratomyces*, el aislamiento 1 de *Phlyctaena*, los 2-7, 11, 17, 18 y 20-22 de *Pestalotia* y los 1, 4 y 7 de *Fusarium*.

Fusarium 3 creció encima de otros micelios en 14 % de los casos al desarrollarse junto a *Doratomyces*, *Nigrospora*, el aislamiento 2 de *Phlyctaena* y

los 7 y 21 de *Pestalotia*; el crecimiento con contacto lo presentó en 31 % de los casos, al crecer junto a *Diplodina*, los aislamientos 1 y 2 de *Fusarium* y los 2, 5, 9, 13, 14, 16, 19 y 22 de *Pestalotia*. Mostró halos oscuros al crecer contiguo a *Beltrania*, *Verticillium* y el aislamiento 1 de *Phlyctaena*, lo que representó 9 % en su forma de crecimiento. Finalmente presentó halos de inhibición (46 %) al inhibir a los aislamientos 4-7 de *Fusarium* y los 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 18, 20 de *Pestalotia*.

Fusarium 4 creció encima de *Diplodina*, *Beltrania*, y los aislamientos 1, 7, 18 y 19 de *Pestalotia* (17 % en su formas de crecimiento). Su crecimiento con contacto lo presentó en 20 % de los casos junto al aislamiento 2 de *Phlyctaena* y los 10, 11, 13, 17, 20 y 22 de *Pestalotia*. Formó halos oscuros junto a *Nigrospora*, *Verticillium* y el aislamiento 1 de *Phlyctena* (9 % de sus formas de crecimiento). Inhibió a *Doratomyces*, los aislamientos 1-3 y 5-7 de *Fusarium* y los aislamientos 2-6, 8, 9, 12, 14-16 y 21 de *Pestalotia* (54 % de sus formas de crecimiento).

Fusarium 5 creció encima de otros aislamientos (17 % de los casos) junto a *Diplodina*, *Nigrospora*, el aislamiento 2 de *Phlyctaena* y los 2, 21 y 22 de *Pestalotia*. Presentó crecimiento con contacto (43 %) junto a *Beltrania*, *Verticillium*, los aislamientos 1, 2 y 7 de *Fusarium* y los 4-8, 10, 13, 16-18 de *Pestalotia*. Los halos oscuros los formó en 6 % de los casos al crecer junto a *Doratomyces* y el aislamiento 1 de *Phlyctaena*. Finalmente, formó halos de inhibición (34 %), inhibiendo a los aislamientos 3, 4 y 6 de *Fusarium* y los 1, 3, 9, 11, 12, 14, 15, 19 y 20 de *Pestalotia*.

Fusarium 6 se desarrolló encima de *Nigrospora* y del aislamiento 6 de *Pestalotia* (6 % en su forma de crecimiento); en 20 % de los casos creció con contacto, al desarrollarse junto a *Verticillium*, *Fusarium 2* y los aislamientos 12, 15 y 17-19 de *Pestalotia*. Mostró halos oscuros (9 %) al crecer junto a *Diplodina*, *Beltrania* y *Phlyctaena 2*. Principalmente formó halos de inhibición (65 % de los casos), inhibiendo a *Doratomyces*, *Phlyctaena 1*, los aislamientos 1, 3-5 y 7 de *Fusarium* y los 1-5, 7-11, 13, 14, 16, 20-22 de *Pestalotia*.

Fusarium 7 creció encima del aislamiento 19 de *Pestalotia* (3 % de su forma de crecimiento). Se desarrollo con contacto (43 % de los casos) al crecer junto a

Diplodina, *Verticillium*, el aislamiento 5 de *Fusarium* y los 5-7, 9, 12, 14, 16-18, 20-22 de *Pestalotia*. Los halos oscuros los formó en 20 % de los casos al crecer contiguo a *Beltrania*, *Doratomyces*, *Nigrospora*, *Phlyctaena* 2 y los aislamientos 3, 4 y 11 de *Pestalotia*. Finalmente inhibió a *Phlyctaena* 1, *Fusarium* 1-4 y 6 y los aislamientos 1, 2, 8, 10, 13 y 15 de *Pestalotia*, lo que representó 34 % de sus formas de crecimiento.

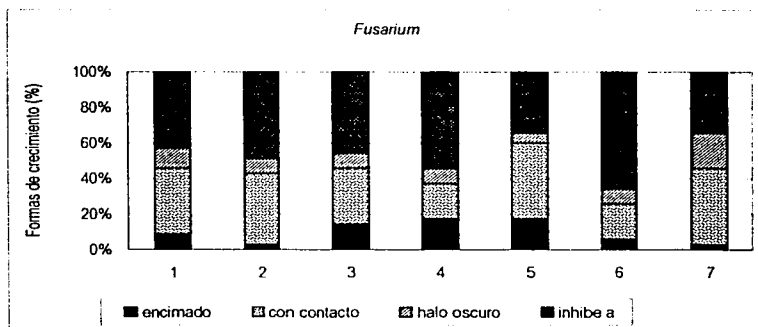


Figura 11. Porcentaje de antagonismo de cada uno de los siete aislamientos del género *Fusarium*.

En la Figura 12 se muestran las formas de crecimiento de cada uno de los 22 aislamientos del género *Pestalotia* en los bioensayos de antagonismo.

Pestalotia 1 creció encima de *Doratomyces*, *Fusarium* 4 y los aislamientos 10-12, 14, 21 y 22 de *Pestalotia*, lo que representó 23 % de su forma de crecimiento. El 25 % de su crecimiento se desarrolló con contacto junto a los aislamientos 2-5, 7, 9, 13, 15 y 20 de *Pestalotia*. Formó halos oscuros en 23 % de los casos al crecer junto a *Diplodina*, *Phlyctaena* 1 y 2, y los aislamientos 8, 16-19 de *Pestalotia*. Formó halos de inhibición (6 % en su forma de crecimiento) al crecer junto a *Beltrania* y *Pestalotia* 6. Finalmente, fue inhibido por *Nigrospora*, *Verticillium* y los aislamientos 1-3, 5-7 de *Fusarium*, lo que representó 23 % en su forma de crecimiento.

Pestalotia 2 creció encima de otros micelios en 32 % de los casos, junto a *Beltrania*, *Doratomyces*, *Fusarium* 5 y los aislamientos 8-11, 14, 16, 17 y 21 de *Pestalotia*. Mostró 26 % de crecimiento con contacto al crecer junto a *Fusarium* 3 y los aislamientos 1, 3, 5, 12, 13, 19, 20 y 22 de *Pestalotia*. Los halos oscuros los formó en 17 % de los casos al crecer contiguo a *Diplodina*, *Nigrospora*, *Verticillium*, *Phlyctaena* 1 y 2 y *Pestalotia* 15. Creció formando halos de inhibición en un 11 %, al desarrollarse con los aislamientos 4, 6, 7 y 18 de *Pestalotia*. Fue inhibido por los aislamientos 1, 2, 4, 6 y 7 de *Fusarium*, lo que representó 14 % de sus formas de crecimiento.

Pestalotia 3 presentó un crecimiento encimado (29 %) junto a *Beltrania*, *Doratomyces*, *Verticillium* y los aislamientos 11, 12, 18, 19 y 21 de *Pestalotia*; mostró un 37 % de crecimiento con contacto junto a los aislamientos 1, 2, 4-9, 17-19, 21 y 22 de *Pestalotia*; formó halos oscuros (17 %) junto a *Diplodina*, los dos aislamientos de *Phlyctaena*, *Pestalotia* 15 y los aislamientos 1 y 7 de *Fusarium*. Fue inhibido en 17 % de los casos por *Nigrospora* y los aislamientos 2-6 de *Fusarium*.

Pestalotia 4 mostró 23 % de crecimiento encimado junto a *Beltrania*, *Doratomyces*, *Phlyctaena* 2 y los aislamientos 11, 12, 18, 19 y 21 de *Pestalotia*; el crecimiento con contacto (26 %) lo presentó con *Fusarium* 2 y 5, y los aislamientos 1, 3, 9, 14, 17, 20 y 22 de *Pestalotia*. Formó halos oscuros (17 % de los casos) al crecer junto a *Diplodina*, *Nigrospora*, *Verticillium*, *Phlyctaena* 1, *Fusarium* 7 y *Pestalotia* 10. Los halos de inhibición los mostró en 23 % de los casos contiguo a los aislamientos 2, 5-8, 13, 15 y 16 de *Pestalotia*; mientras que fue inhibido (11 % de los casos) por los aislamientos 1, 3, 4 y 6 de *Fusarium*.

Pestalotia 5 presentó un crecimiento encimado del 17 % en contigüidad con *Nigrospora*, *Doratomyces*, *Verticillium*, *Beltrania*, y los aislamientos 19 y 21 de *Pestalotia*. Su crecimiento con contacto fue de 46 % junto a *Phlyctaena* 2, los aislamientos 3, 5 y 7 de *Fusarium* y los 1-3, 6-9, 12, 14, 16, 18 y 22 de *Pestalotia*; formó halos oscuros (6 %) con *Diplodina* y *Phlyctaena* 1. Los halos de inhibición los mostró en 20 % de los casos, inhibiendo a los aislamientos 4, 10, 11, 13, 15,

17 y 20 de *Pestalotia*; y finalmente, se inhibió en 11 % de los casos al crecer contiguo a los aislamientos 1,2,4 y 6 de *Fusarium*.

Pestalotia 6 creció encima (23 %) de *Beltrania*, *Doratomyces*, *Nigrospora*, *Phlyctaena* 1, *Fusarium* 6 y los aislamientos 19, 21 y 22 de *Pestalotia*; presentó crecimiento con contacto en 42 % de los casos junto a *Phlyctaena* 2, *Fusarium* 1, 5, 7 y los aislamientos 3, 5, 8, 9, 11-14, 17, 18 y 20 de *Pestalotia*. En 9 % de los casos, formó halos oscuros al crecer junto a *Diplodina*, *Verticillium* y *Pestalotia* 10. Formó halos de inhibición en 17 % de los casos al inhibir a los aislamientos 1, 2, 4, 7, 15 y 16 de *Pestalotia* y fue inhibido (9 % en su forma de crecimiento) por los aislamientos 2, 3 y 4 de *Fusarium*.

Pestalotia 7 creció encima de otros aislamientos en 23 % de los casos, al crecer contiguo a *Beltrania*, *Doratomyces*, *Fusarium* 3, 4 y los aislamientos 12, 17, 19 y 21 de *Pestalotia*; su crecimiento con contacto se presentó en un 51 % de los casos, al desarrollarse junto a *Diplodina*, *Phlyctaena* 2, los aislamientos 1, 5 y 7 de *Fusarium* y los 1, 3, 5, 8, 10, 11, 13-16, 18, 20 y 22 de *Pestalotia*. Formó halos oscuros en 6 % de los casos junto a *Verticillium* y *Phlyctaena* 1; los halos de inhibición los formó inhibiendo a *Pestalotia* 2, 4, 6 y 9 lo que representó 11 % de su forma de crecimiento, y finalmente fue inhibido (9 % de los casos) por *Nigrospora* y *Fusarium* 2 y 6.

Pestalotia 8 creció encima de *Beltrania*, *Doratomyces*, *Verticillium*, *Fusarium* 2 y los aislamientos 2, 14, 21 y 22 de *Pestalotia*, lo que representó 23 % de su forma de crecimiento; creció con contacto en 31 % de los casos al desarrollarse junto a *Diplodina*, *Fusarium* 1, 5 y los aislamientos 3, 5-7, 10, 17, 18 y 20 de *Pestalotia*; creció formando halos oscuros (9 %) con *Pestalotia* 1 y *Phlyctaena* 1 y 2. Mostró halos de inhibición (23 %), inhibiendo a los aislamientos 4, 9, 11-13, 15, 16 y 19 de *Pestalotia*, y finalmente fue inhibido (14 % de los casos) por *Nigrospora* y los aislamientos 3, 4, 6, y 7 de *Fusarium*.

Pestalotia 9 presentó un crecimiento encimado del 17 %, al desarrollarse junto a *Beltrania*, *Verticillium*, *Phlyctaena* 1 y los aislamientos 2, 12 y 16 de *Pestalotia*; mostró un crecimiento con contacto (49 %) junto a *Diplodina*, los aislamientos 2, 3, 7 de *Fusarium* y los 1, 3-6, 11, 13, 14, 17-19, 21 y 22 de

Pestalotia. Formó halos oscuros (3 %) únicamente con *Phlyctaena* 2, mientras que los halos de inhibición los formó en 17 % de los casos, al inhibir a *Doratomyces* y los aislamientos 7, 8, 10, 15 y 20 de *Pestalotia*; y finalmente se inhibió en 14 % de los casos junto a *Nigrospora* y los aislamientos 1, 4, 5 y 6 de *Fusarium*.

Pestalotia 10 creció encima de *Beltrania*, *Doratomyces*, *Verticillium* y los aislamientos 1-3, 19 y 21 de *Pestalotia*, lo que representó 23 % de su crecimiento; el crecimiento con contacto (38 %) lo mostró junto a *Diplodina*, *Phlyctaena* 2, los aislamientos 1, 2, 4, 5 de *Fusarium* y los 7, 8, 12, 13, 17, 18 y 22 de *Pestalotia*. Formó halos oscuros (17 %) junto a *Phlyctaena* 1 y los aislamientos 4, 6, 14, 16 y 20 de *Pestalotia*; presentó halos de inhibición (11 %), inhibiendo a los aislamientos 5, 9, 11 y 15 de *Pestalotia*, y en cambio fue inhibido (11 %) por *Nigrospora* y los aislamientos 3, 6 y 7 de *Fusarium*.

Pestalotia 11 creció encima de *Beltrania*, *Doratomyces*, los aislamientos 1-4, 12, 13, 19, 21 y 22 de *Pestalotia* (32 % de su forma de crecimiento); creció con contacto (32 %) al desarrollarse junto a *Diplodina*, *Nigrospora*, los aislamientos 1 y 4 de *Fusarium*, y los 6, 7, 9, 14, 16-18 de *Pestalotia*; formó halos oscuros (11 %) contiguo a *Verticillium*, *Fusarium* 7 y los dos aislamientos de *Phlyctaena*. Presentó halos de inhibición (14 % de los casos), inhibiendo a los aislamientos 5, 8, 10, 15 y 21 de *Pestalotia*, y finalmente, fue inhibido (11 %) por *Fusarium* 2, 3, 5 y 6.

Pestalotia 12 presentó un crecimiento encima de otros micelios en 41 % de los casos, al desarrollarse junto a *Diplodina*, *Doratomyces*, *Verticillium*, *Phlyctaena* 1, 2 y los aislamientos 1, 3, 4, 7, 9, 11, 13, 14 y 18 de *Pestalotia*. Su crecimiento con contacto (38 %) lo presentó junto a los aislamientos 1, 2, 6 y 7 de *Fusarium* y los 2, 5, 6, 10, 16-18, 20 y 22 de *Pestalotia*. Formó halos oscuros (6 %) con *Nigrospora* y *Pestalotia* 15; mostró halos de inhibición (6 %), inhibiendo a *Beltrania* y *Pestalotia* 8, y se inhibió (9 %) frente a los aislamientos 3, 4 y 5 de *Fusarium*.

Pestalotia 13 creció encima de *Beltrania*, *Doratomyces*, *Fusarium* 1 y los aislamientos 3, 11, 12 y 14 de *Pestalotia*, lo que representó 21 % de su forma de crecimiento; su crecimiento con contacto (52 %) lo presentó junto a *Diplodina*, *Fusarium* 2-5 y los aislamientos 1, 2, 6, 7, 9, 10, 15-20 y 22 de *Pestalotia*; mostró halos oscuros (12 %) contiguo a *Verticillium* y *Phlyctaena* 1 y 2. Formó halos de

inhibición (9 % de los casos), al inhibir a los aislamientos 4, 5 y 8 de *Pestalotia*, mientras que fue inhibido (6 %) por *Fusarium* 6 y 7.

Pestalotia 14 creció encima de otros micelios en 32 % de los casos, al desarrollarse junto a *Doratomyces*, *Verticillium* y los aislamientos 1-3, 8, 12, 13, 15, 19 y 22 de *Pestalotia*; creció con contacto (44 %) en contigüidad con *Beltrania*, los aislamientos 1-3 y 7 de *Fusarium* y los 4-7, 9, 11, 16-18 y 20 de *Pestalotia*. Formó halos oscuros (12 %) con *Nigrospora* y los dos aislamientos de *Phlyctaena*. Mostró halos de inhibición (3 %), al inhibir únicamente a *Diplodina*, y fue inhibido (9 %) por los aislamientos 4, 5 y 6 de *Fusarium*.

Pestalotia 15 creció encima de *Beltrania*, *Verticillium*, *Phlyctaena* 1, *Fusarium* 1 y *Pestalotia* 14 (15 % de su forma de crecimiento); creció con contacto en 26 % de los casos en contigüidad a los aislamientos 2 y 6 de *Fusarium* y los 1, 7, 13, 17-19 y 22 de *Pestalotia*. Presentó halos oscuros (18 %) con *Diplodina*, el aislamiento 2 de *Phlyctaena* y los 2, 3, 12 y 16 de *Pestalotia*. Formó halos de inhibición (26 % de los casos), inhibiendo a *Doratomyces* y a los aislamientos 4-6, 8-11 y 20 de *Pestalotia*; por último, fue inhibido por *Nigrospora* y los aislamientos 3, 4, 5 y 7 de *Fusarium* (15 % en su forma de crecimiento).

Pestalotia 16 creció encima de otros aislamientos en 29 % de los casos al desarrollarse junto a *Beltrania*, *Diplodina*, *Doratomyces*, *Verticillium*, *Phlyctaena* 1, *Fusarium* 1 y los aislamientos 2, 3, 9 y 19 de *Pestalotia*; creció con contacto en 41% de los casos junto a los aislamientos 2, 3, 5, y 7 de *Fusarium* y los 5, 7, 11-14, 17, 18, 20 y 22 de *Pestalotia*. Formó halos oscuros con *Phlyctaena* 2 y los aislamientos 1, 10 y 15 de *Pestalotia*, lo que representó 12 % de su forma de crecimiento; los halos de inhibición los mostró en 9 % de los casos al inhibir a los aislamientos 4, 6 y 8 de *Pestalotia*, y finalmente, fue inhibido por *Nigrospora* y *Fusarium* 4 y 6, lo que representó 9 % en su forma de crecimiento.

Pestalotia 17 creció encima de *Beltrania*, *Doratomyces*, *Verticillium* y los aislamientos 2, 7, 18 y 19 de *Pestalotia* (21 % en su forma de crecimiento); su crecimiento con contacto (58 %) lo presentó al desarrollarse junto a *Diplodina*, los aislamientos 1, 4, 5, 6, y 7 de *Fusarium* y los 3, 4, 6, 8-16, 20 y 22 de *Pestalotia*. Formó halos oscuros (12 % de los casos) contiguo a *Nigrospora*, los dos

aislamientos de *Phlyctaena* y *Pestalotia* 1. Mostró halo de inhibición (3 %), al inhibir a *Pestalotia* 5, y finalmente fue inhibido (6 % de los casos) por los aislamientos 2 y 3 de *Fusarium*.

Pestalotia 18 creció encima de otros aislamientos en 29 % de los casos al desarrollarse junto a *Beltrania*, *Diplodina*, *Doratomyces*, *Verticillium*, *Phlyctaena* 1, *Fusarium* 4 y los aislamientos 4, 17, 19 y 21 de *Pestalotia*; creció con contacto en 50 % de los casos, contiguo a los aislamientos 5, 6 y 7 de *Fusarium* y los 3, 5-16 y 20 de *Pestalotia*; mostró halos oscuros (6 %) junto a *Pestalotia* 1 y *Phlyctaena* 2. Los halos de inhibición (3 % de los casos) los formó inhibiendo a *Pestalotia* 2, y por último, fue inhibido (12 %) por *Nigrospora* y *Fusarium* 1, 2 y 3.

Pestalotia 19 creció encima de *Beltrania*, *Verticillium*, *Phlyctaena* 1 y 2, los aislamientos 4 y 7 de *Fusarium* y los 4-7, 10-12, 14, 16-18 de *Pestalotia*, lo que representó 50 % de su forma de crecimiento; creció con contacto en 32 % de los casos junto a los aislamientos 1-3 y 6 de *Fusarium* y los 2, 3, 9, 13, 15, 20 y 22 de *Pestalotia*; formó halos oscuros (9 %) junto a *Diplodina*, *Nigrospora* y *Pestalotia* 1. Los halos de inhibición (6 %) los mostró inhibiendo a *Pestalotia* 8 y *Doratomyces*; y finalmente, fue inhibida (3 % de los casos) por *Fusarium* 5.

Pestalotia 20 creció encima de otros aislamientos en 9 % de los casos, al desarrollarse junto a *Beltrania*, *Doratomyces* y *Pestalotia* 3; creció con contacto (55 %) en contigüidad con *Nigrospora*, los aislamientos 1, 4 y 7 de *Fusarium* y los 1, 2, 4, 6-8, 12-14, 16-19, 21 y 22 de *Pestalotia*. Formó halos oscuros (14 % de los casos) junto a *Diplodina*, *Verticillium*, *Phlyctaena* 1 y 2 y *Pestalotia* 10. Los halos de inhibición los formó en 11 % de los casos, inhibiendo a los aislamientos 5, 9, 11 y 15 de *Pestalotia*, y finalmente fue inhibido por los aislamientos 2, 3, 5 y 6 de *Fusarium* (11 %).

Pestalotia 21 creció encima de *Doratomyces*, los aislamientos 3, 5 de *Fusarium*, y los 1, 2, 4-8, 10, 11, 18 y 22 de *Pestalotia*, lo que representó 55 % de su forma de crecimiento. Creció con contacto en 15 % de los casos junto a *Fusarium* 7 y los aislamientos 3, 9 y 20 de *Pestalotia*. Formó halos oscuros en contigüidad con *Diplodina*, *Nigrospora* y *Phlyctaena* 1 y 2 (15 % de su crecimiento)

y finalmente, fue inhibido en 15 % de los casos al crecer con los aislamientos 1, 2, 4 y 6 de *Fusarium*.

Pestalotia 22 creció encima de otros aislamientos en 29 % de los casos al desarrollarse junto a *Beltrania*, *Doratomyces*, *Verticillium*, *Fusarium* 5 y los aislamientos 1, 6, 8, 11, 14 y 21 de *Pestalotia*. Creció con contacto contiguo a los aislamientos 3, 4 y 7 de *Fusarium* y los 2-5, 7, 9, 10, 12, 13, 15-17, 19 y 20 de *Pestalotia*, representando el 50 % de su forma de crecimiento. Formó halos oscuros (12 % de los casos) junto a *Diplodina*, *Nigrospora* y *Phyctaena* 1 y 2. Fue inhibida por *Fusarium* 1, 2 y 6, lo que representó 9 % de esta forma de crecimiento.

Un caso interesante se presentó con los aislamientos *Pestalotia* 3, 21 y 22 que fueron aquellos de este género que no inhibieron a ningún otro, intra e interespecificamente, en los bioensayos de antagonismo.

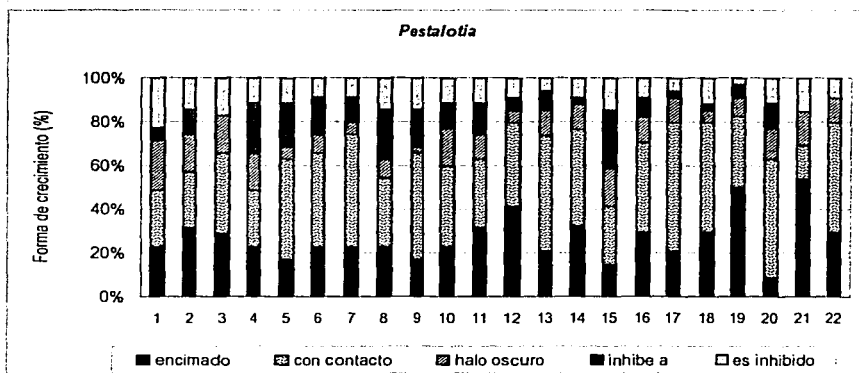


Figura 12. Porcentaje de antagonismo de cada uno de los 22 aislamientos del género *Pestalotia*.

4.3. Aislamientos seleccionados para el cultivo y extracción de metabolitos bioactivos.

Con base en los resultados anteriores, y considerando por un lado, la gran abundancia de los aislamientos de *Pestalotia*, y por el otro la actividad inhibitoria en las pruebas de antagonismo, se seleccionaron dos aislamientos para su cultivo y obtención de sus extractos orgánicos con mayor actividad biológica:

1. el aislamiento *Pestalotia* 15, obtenido de una hoja de *Metopium brownei*.
2. el aislamiento *Fusarium* 6, aislado del tallo de *Piper* sp.

4.4. Identificación a nivel de especie de el aislamiento 6 del género *Fusarium*.

El hongo identificado a nivel de especie fue el aislamiento número 6 del género *Fusarium* y se determinó como *Fusarium sporotrichioides* Sherb, sección *Sporotrichiella*. Este hongo creció en los medios PDA, PSA Y SNA a temperatura ambiente con fotoperíodo de luz UV. A los 7 días de incubación en PDA creció 8.5 cm de diámetro, el micelio aéreo fue de color blanco y en el centro de color morado. En medio PSA creció 8 cm de diámetro a los 7 días, mientras que en SNA 7 cm, en ambos medios el micelio aéreo fue de color rosa y la parte central del micelio de color morado tenue. En los medios PSA y SNA se produjo la mayor cantidad de macroconidios. Este aislamiento de *Fusarium* presentó microconidios de dos formas: clavados 4.4-5.3 x 3-4.4 μm y elipsoides; éstos últimos aseptados 5.8 x 1.5 (2.9) μm y con un septo (4.4) 5.8 (7.3) x (1.5) 2.9 μm . Los microconidios se produjeron a partir de polifiálides⁴ en forma de árbol 9.2 (14.6) x 2.9 μm . Los macroconidios presentaron de 1 a 4 septos (7.3) 14.2 (21.9) x 3 (4.4) μm y al igual que los microconidios se produjeron a partir de fiálides 11.2 x 2.9 μm . Este aislamiento formó clamidosporas⁵ intercalares y apicales, observándose comúnmente en cadenas.

⁴ Fiálide: Gr. phiale = vaso. Una célula terminal de un conidióforo que produce conidios de forma basipétala.

⁵ Clamidospora: Gr. *chlamydos* = capa, *sporos* = espora. Una espora no sexual y de pared gruesa; es una célula hifal transformada.

4.5. Resultados de los bioensayos con los extractos de acetato de etilo del medio de cultivo y micelio de *Fusarium sporotrichioides*.

- Bioensayos con semillas

En la figura 15 se muestran los resultados de los bioensayos realizados con los extractos de acetato de etilo del micelio y del medio de cultivo de *F. sporotrichioides* a 100 ppm, para evaluar su efecto sobre el crecimiento radicular (mm) de amaranto, jitomate y *Echinochloa crusgalli*.

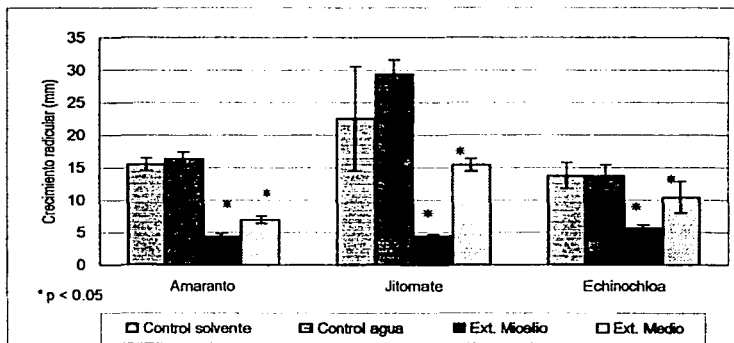


Figura 15. Crecimiento radicular (mm) de las plantas diana con los extractos de acetato de etilo (100 ppm) del micelio y del medio de cultivo de *F. sporotrichioides*.

Los resultados de la Figura 15 muestran que el extracto con mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento radicular de las plantas de prueba, es el del micelio, el cual causó una inhibición de la raíz de amaranto de 72 %; de 80.5 % en el jitomate y de 59 % en *Echinochloa*. También el extracto del medio inhibe

significativamente, pero en menor grado, el crecimiento radicular de amaranto (55 %), el de jitomate (32 %) y el de *Echinochloa* (24 %).

- Bioensayos con hongos

En la figura 16 se muestra el efecto de los extractos de acetato de etilo del micelio y del medio de cultivo de *F. sporotrichioides* a 250 ppm, sobre el crecimiento radial (mm) de *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp.

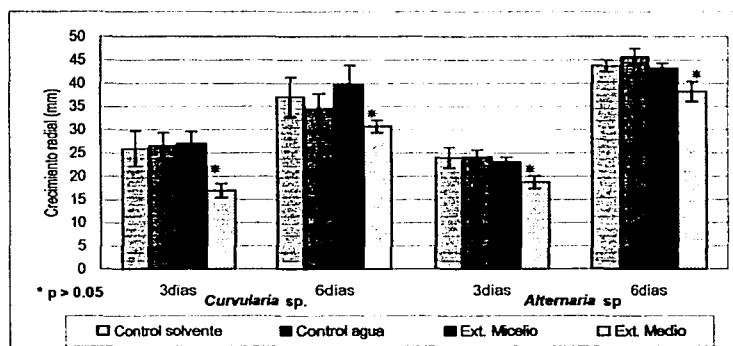


Figura 16. Crecimiento radial (mm) de *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp. con los extractos de acetato de etilo (250 ppm) del micelio y del medio de cultivo de *F. sporotrichioides*.

Los resultados de la Figura 16 indican que el único extracto con efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de los hongos, fue el del medio de cultivo, el cual inhibió en mayor grado a *Curvularia*, 35 % a los tres días y 17 % a los 6 días. En el caso de *Alternaria*, la inhibición fue de 22 % y 13 % a los 3 y 6 días respectivamente. El hecho de que la mayor inhibición del extracto del medio se presentara a los 3 días y disminuyera a los 6, habla de que, probablemente, los

dos hongos de prueba tienen la capacidad de metabolizar el extracto y con ello, su efecto tóxico disminuye.

- Bioensayos con *Artemia salina*

La Tabla 3 muestra los resultados de los bioensayos realizados para evaluar el efecto de los extractos de acetato de etilo del micelio y del medio de cultivo de *F. sporotrichioides* sobre la sobrevivencia de *Artemia salina* (evaluación a las 24 h).

Tabla 3. Efecto de los extractos de acetato de etilo sobre la sobrevivencia de 30 larvas de *Artemia salina* tratadas.

Tratamiento	Extracto del micelio	Extracto del medio de cultivo
	No. de muertes	
Control solvente	0	0
Control agua	1	1
10 ppm	0	0
100 ppm	1	3
1000 ppm	25	1

La dosis letal media del extracto de acetato de etilo del micelio, calculada por la prueba de Probit, indicó una LD₅₀ de 451.5 ppm, y mayor a 1000ppm para el extracto del medio. Esto indica que el único extracto que resultó con una bioactividad significativa fue el del micelio, como puede observarse en la Tabla 3.

4.6. Resultados de los bioensayos con los extractos de acetato de etilo del medio de cultivo y micelio de *Pestalotia* sp.

- Bioensayos con semillas

En la figura 17 se muestran los resultados de los bioensayos realizados para evaluar el efecto de los extractos de acetato de etilo del micelio y del medio de cultivo de *Pestalotia* sp. a 100 ppm, sobre el crecimiento radicular (mm) de amaranto y jitomate.

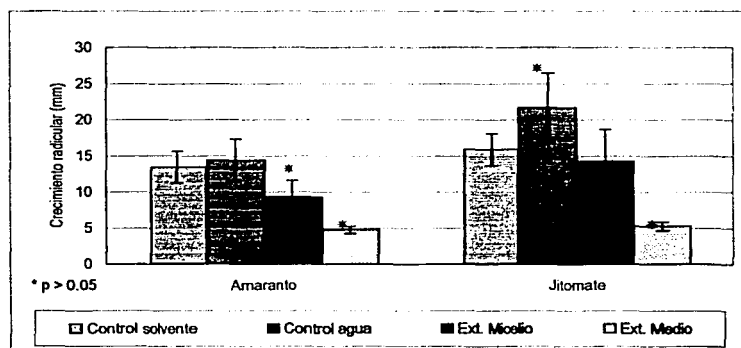


Figura 17. Crecimiento radicular (mm) de las plantas de prueba con los extractos de acetato de etilo (100 ppm) del micelio y del medio de cultivo de *Pestalotia* sp

La Figura 17 muestra que los extractos de acetato de etilo del medio de cultivo de *Pestalotia* sp., fueron los que tuvieron mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular de las plantas de prueba, a diferencia de *F. sporotrichioides* cuyo extracto más activo fue el del micelio. Amaranto fue inhibido 65 % y jitomate un 67 % por el extracto del medio de *Pestalotia*. El extracto de micelio sólo inhibió significativamente a la raíz de amaranto (31 %). En esta Figura 17 se

observa también que la mezcla de solventes utilizados para el control correspondiente (cloroformo: hexano 2:1) resultaron tóxicos para el jitomate, por esta razón el control de solvente inhibió un 27 % el crecimiento radicular de esta planta.

- Bioensayos con hongos

La figura 18 muestra el efecto de los extractos de acetato de etilo del micelio y medio de cultivo de *Pestalotia* sp. a 250 ppm, sobre el crecimiento radial (mm) de *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp.

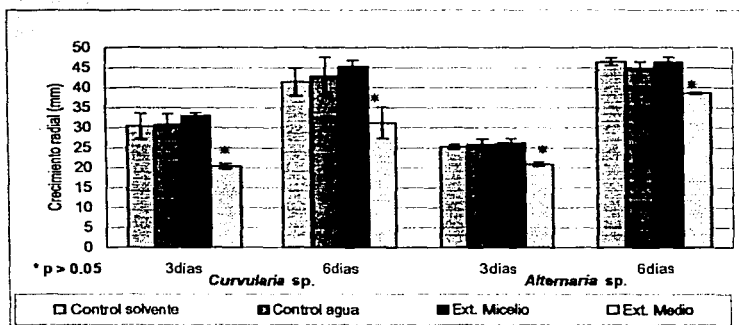


Figura 18. Crecimiento radial (mm) de *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp. con los extractos de acetato de etilo (250 ppm) del micelio y del medio de cultivo de *Pestalotia* sp.

El extracto del medio de *Pestalotia* sp. causó una inhibición significativa sobre el crecimiento radial de los hongos de prueba, al igual que en el caso de *F. sporotrichioides*. El crecimiento de *Curvularia*, la especie más afectada, fue inhibido 33 % a los tres días y 25 % a los 6 días. El de *Alternaria* fue inhibido 18 % y 17 % a los 3 y 6 días respectivamente. La inhibición causada por el extracto

de acetato de etilo del medio de cultivo de *Pestalotia*, tiende a disminuir con el tiempo en el caso de *Curvularia*; este efecto se presenta también con el extracto de acetato de etilo de *F. sporotrichioides* sobre los dos hongos de prueba.

- Bioensayos con *Artemia salina*

La Tabla 4 muestra los resultados de los bioensayos realizados para evaluar el efecto de los extractos de acetato de etilo del micelio y del medio de cultivo de *Pestalotia* sp., sobre la sobrevivencia de *Artemia salina*.

Tabla 4. Efectos de los extractos de acetato de etilo del micelio y del medio de cultivo de *Pestalotia* sp. sobre la sobrevivencia de 30 larvas de *Artemia salina*.

Tratamiento	Extracto del micelio.	Extracto del medio de cultivo.
	No. de muertas	
Control solvente	0	0
Control agua	0	0
10ppm	0	0
100ppm	0	0
1000ppm	1	27

Contrariamente al caso de *F. sporotrichioides*, el extracto de acetato de etilo de *Pestalotia* sp. que mostró mayor actividad sobre *Artemia*, fue el del medio de cultivo. El análisis Probit indicó un LD₅₀ de 492 ppm para este extracto.

4.7. Resultados de los bioensayos con el extracto del medio de cultivo Czapek-Dox sin hongo.

- Bioensayos con semillas

En la Figura 19 se muestran los resultados de los bioensayos realizados para evaluar el efecto del extracto de acetato de etilo del medio de cultivo Czapek-Dox sin hongos, a 100 ppm, sobre el crecimiento radicular (mm) de amaranto, jitomate y *Echinochloa crusgalli*.

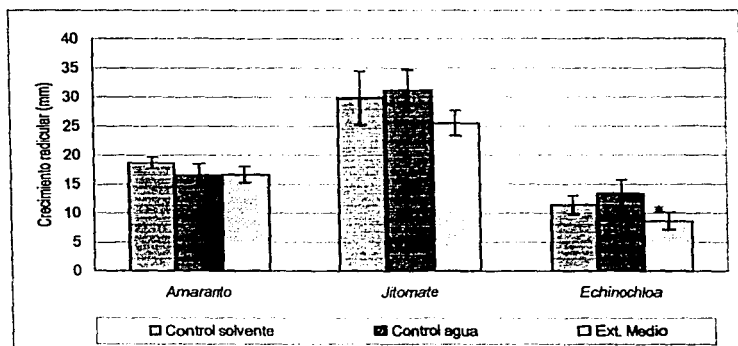


Figura 19. Crecimiento radicular (mm) de las plantas de prueba con los extractos de acetato de etilo (100 ppm) del medio de cultivo Czapek-Dox sin hongo.

El extracto de medio de Czapek-Dox cultivado sin hongo, no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento radicular de amaranto y jitomate; inesperadamente, el crecimiento radicular de *Echinochloa* se inhibió 24% con este tratamiento.

- Bioensayos con hongos

En la Figura 20 se muestra el efecto del extracto de acetato de etilo del medio de cultivo Czapek-Dox sin hongo a 250ppm sobre el crecimiento radial (mm) de *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp.

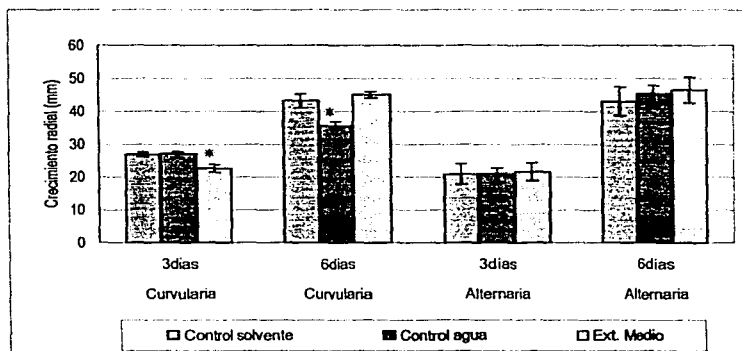


Figura 20. Crecimiento radial (mm) de *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp. con los extractos de acetato de etilo (250 ppm) del medio de cultivo. Czapek-Dox sin hongo.

En este experimento (Figura 20) se obtienen dos inhibiciones inesperadas, la del control de agua que a los 6 días inhibe significativamente (16 %) el crecimiento de *Curvularia*, y la del extracto del medio que inhibe significativamente (16 %) el crecimiento de este mismo hongo a los tres días. Cabe señalar que aunque hubo un efecto inhibitorio en el crecimiento radial de *Curvularia* a los 3 días de crecimiento con el extracto del medio sin hongo, éste es muy bajo, comparado con el causado por los extractos del medio de cultivo de los hongos, e igual que el efecto inhibitorio del control de agua. La inhibición a los 3 días con el extracto del medio de *F. sporotrichioides* fue del 35 % y la del medio de *Pestalotia* sp. de 33 %, lo que indica que la inhibición causada por los

extractos de los hongos está determinada por la presencia en ellos de metabolitos secundarios producidos por estos organismos, y no por el extracto del medio Czapek-Dox. Estos resultados indican que al parecer, *Curvularia* es especialmente sensible a las condiciones del medio en el que se encuentra creciendo *in vitro*.

- Bioensayos con *Artemia salina*

La Tabla 5 muestra los resultados de los bioensayos realizados para evaluar el efecto del extracto de acetato de etilo del medio de cultivo Czapek-Dox sin hongo, sobre la sobrevivencia de *Artemia salina*.

Tabla 5. Efectos del extracto de acetato de etilo del medio de cultivo Czapek-Dox sin hongo, sobre la sobrevivencia de 30 larvas de *Artemia salina*.

Tratamiento	Extracto del medio de cultivo sin hongo No. de muertas/No de tratadas
Control del disolvente	0
Control agua	0
10 ppm	0
100 ppm	0
1000 ppm	9

Como se esperaba, la DL_{50} del extracto del medio de cultivo Czapek-Dox sin hongo sobre *Artemia salina*, fue mayor a 1000ppm; un efecto no significativo.

5. Discusión y Conclusiones

Los hongos aislados en el presente trabajo no constituyen la totalidad de hongos asociados a las plantas colectadas; para ello, se hubiera requerido, entre otras cosas, realizar una colecta lo más amplia posible de los distintos órganos de las plantas durante diferentes etapas de su ciclo biológico; sin embargo, esto no constituyó el objetivo central del presente trabajo. Los aislamientos obtenidos e identificados fueron aquellos capaces de desarrollarse en un medio de cultivo general (PDA); su obtención contribuye al conocimiento de la diversidad de hongos microscópicos asociados con plantas de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo. Por otro lado, estos hongos pertenecen a géneros cosmopolitas, lo que coincide con lo mencionado por Samuels y Rossman (1992) quienes señalan que la mayoría de géneros de hongos conidiales de los ambientes tropicales son de distribución mundial.

Existen pocos estudios sobre los aislamientos asociados a las especies de plantas que se reportan en el presente trabajo; en estos estudios se mencionan principalmente hongos fitopatógenos. Por ejemplo, se han reportado especies de *Fusarium* en los géneros *Eugenia* (Mittal *et al*, 1999.) y *Piper* (Mustika, 1991; Raut, y Bhattacharya, 1999); también se han encontrado a *Pestalotia sapotae* (Sharma, *et al*, 1987) y *Fusarium solani* (Kore y Mashalkar, 1987) sobre plantas de la familia *Sapotaceae*.

En los géneros *Byrsonima*, *Jacquinia*, *Crescentia* y *Metopium browneii* no se habían reportado ninguno de los géneros de hongos aislados en el presente trabajo. Por otro lado, no existe información sobre la presencia de *Beltrania*, *Diplodina*, *Doratomyces*, *Nigrospora*, *Plhyctaena*, *Verticillium*, *Pestalotia* y *Fusarium* como hongos asociados a alguna de las especies de plantas que se colectaron, por lo que este estudio es el primero que se lleva a cabo sobre hongos asociados a la mayor parte de las especies de plantas colectadas en Quintana Roo.

Ciertos órganos y especies de las plantas colectadas, presentaron mayor diversidad de hongos que otras, por ejemplo, las ramas de *Jacquinia aurantiaca*,

de las cuales se aisló el mayor número de géneros de hongos (4 géneros diferentes y un aislamiento no determinado), mientras que otras especies de plantas presentaron un solo género de hongos en sus diversas estructuras, como las ramas y hojas de la especie de Sapotaceae, *Metopium brownei* y los frutos de *Jacquinia aurantiaca*.

De los 36 aislamientos identificados a nivel de género, *Pestalotia* resultó ser el más abundante con 22 aislamientos, los cuales se obtuvieron de todas las especies colectadas excepto de *Crescentia* sp. Después de *Pestalotia*, *Fusarium* fue el género más abundante con 7 aislamientos, obtenidos únicamente de *Jacquinia aurantiaca* y *Piper* sp. Dos aislamientos del género *Phlyctaena*, uno de *Diplodina* y uno de *Nigrospora* se aislaron de *Jacquinia aurantiaca*. Un aislamiento de *Doratomyces* se obtuvo de *Piper*, de *Crescentia* sp. se obtuvo un aislamiento de *Beltrania* y de *Eugenia* sp. uno de *Verticillium*.

El tipo de relación de estos hongos con las plantas colectadas no fue determinado, aunque durante el desarrollo del aislamiento se tomaron las medidas necesarias con el fin de obtener sólo aquellos hongos asociados a los tejidos vegetales y no los presentes en sus superficies de modo casual o como producto de la contaminación durante su traslado. No obstante, los hongos identificados en el presente trabajo, han sido frecuentemente reportados como fitopatógenos, aunque es importante tener en cuenta que este aspecto está asociado al hecho de que mucha de la investigación sobre hongos se enfoca en especial sobre los fitopatógenos, y por ello los trabajos publicados al respecto son mucho más numerosos que aquellos que se refieren a hongos endófitos. El interés en estos últimos, ha surgido recientemente. No obstante es importante considerar que el hecho de que exista una mayor cantidad de estudios sobre patógenos, no significa que los hongos se comporten únicamente como tales, hay que recordar que el comportamiento de los hongos ya sea como patógenos o como endófitos, depende de diversos factores como: la susceptibilidad de la planta asociada en sus diferentes estados de desarrollo, múltiples factores ambientales y la presencia del hongo en cuestión (Shulz. *et al*, 1999).

La temperatura ambiente que fue utilizada en los bioensayos de antagonismo ($\pm 23^{\circ}\text{C}$), pudiera haber sido más favorable para el crecimiento de algunos aislamientos, sin embargo no se observó que algunos aislamientos hayan crecido mejor que otros por este motivo, ya que a los 7 días de crecimiento todos los hongos se habían desarrollado adecuadamente, lo que permitió observar con claridad el comportamiento de los distintos aislamientos al interactuar entre sí.

En los bioensayos de antagonismo, se pudo apreciar que existen diferencias entre los géneros, en cuanto a sus formas de crecimiento y competencia frente a otros hongos. *Beltrania*, *Doratomyces* y *Verticillium* crecieron principalmente encima de los otros aislamientos; en cambio *Pestalotia*, creció mayoritariamente en contacto con ellos. En *Diplodina*, *Nigrospora* y *Phlyctaena* prevalece la formación de halos oscuros; y en *Fusarium* la formación de halos de inhibición; este género resultó el más agresivo al crecer con los demás, seguido por *Nigropora*. Cada género, e incluso cada aislamiento, posee mecanismos de competencia y formas de crecimiento distintas, dependiendo de las circunstancias en las que se encuentre.

Durante los bioensayos se pudo observar en el caso de *Doratomyces* (aislamiento que presentó el mayor porcentaje de crecimiento encimado), que no se comporta como micoparásito al competir con otros, en este caso al crecer encima de *Pestalotia* sp.. Se comprobó que su tasa de crecimiento no fue mayor a la de este último hongo (una característica del micoparasitismo). Las preparaciones microscópicas de los micelios de ambos hongos en las zonas encimadas, mostraron que no había un daño aparente en ninguno de los dos micelios, por lo que se considero que probablemente *Doratomyces* compite realizando una interferencia de tipo físico, o bien, aprovecha diferencialmente los nutrimentos sin establecer una competencia de exclusión frente a los otros aislamientos.

Un resultado interesante en los bioensayos de antagonismo, fue observar que ningún aislamiento de *Fusarium*, considerado en el presente estudio como el más agresivo de los géneros, inhibió el crecimiento de *Nigrospora*, el siguiente

más agresivo; los aislamientos 3, 5 y 6 de *Fusarium* (el 6 fue el más antagónico de todos) crecieron encima de *Nigrospora* y a pesar de ello, no lo inhibieron. Probablemente, esto pudiera ser un indicio de que *Nigrospora* tiene la capacidad de metabolizar o neutralizar las toxinas que *Fusarium* produce.

En los bioensayos de antagonismo también se pudo observar que los aislamientos de los siguientes géneros: 2 de *Phlyctaena*, 22 de *Pestalotia* y 7 de *Fusarium*, mostraron cierta tendencia a tener patrones de crecimiento semejantes; sin embargo, se pudieron apreciar diferencias entre ellos, lo que probablemente está influenciado tanto por las características biológicas de los hongos como por el tipo de relación que tienen con las plantas asociadas. Los hongos que viven en asociación con una planta, requieren establecer un equilibrio de defensa química con ella cuando son endófitos, o bien romper dicho equilibrio, venciendo las reacciones de defensa de las plantas, cuando son patógenos (Shulz. *et al*, 1999). Para lograrlo, los hongos necesitan un arsenal químico tal que les permita establecer este equilibrio químico con su hospedera, o bien superar las reacciones de defensa de la planta para poderla parasitar. El aislamiento de *Pestalotia* que presentó el porcentaje más alto de halos de inhibición (aislamiento No. 15), probablemente es un ejemplo de un hongo poseedor de un gran número de estas características. Este aislamiento fue obtenido de las hojas de *Metopium brownei*, una planta con defensas químicas muy agresivas, entre las cuales se han identificado urushioles y flavonoides con actividad fungitóxicas (Rivero-Cruz *et al*, 1997; Anaya *et al*, 1999). Para que un hongo se pueda establecer en una planta, requiere, además de otro tipo de defensas, los compuestos químicos que le permitan contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta. Es importante mencionar que los hongos asociados a las plantas, no son los únicos en presentar defensas de tipo químico, pues éstas se han observado en hongos que viven en otros ambientes como los coprófilos (Gloer, 1996; Gloer, 1997) ; en este caso, las defensas químicas que producen van dirigidas contra otros microorganismos competidores en este tipo de sustrato.

Los hongos seleccionados para buscar en ellos un potencial aleloquímico, se eligieron considerando su abundancia y la inhibición que produjeron sobre los otros aislamientos contiguos. *Fusarium* 6 se seleccionó justamente por ser el aislamiento que presentó el mayor porcentaje de halos de inhibición en sus formas de crecimiento (66 %) inhibiendo a muchos otros aislamientos, y además por que muy pocos hongos pudieron crecer encima de él (6 %). En el caso de *Pestalotia*, que fue el género más abundante con 22 aislamientos, se consideró importante seleccionar el más agresivo de éstos; de este modo, se seleccionó a *Pestalotia* 15, el cual mostró el mayor porcentaje de inhibición sobre otros aislamientos; de hecho, *Pestalotia* 15 presentó el mismo porcentaje de halos de inhibición y crecimiento con contacto (este último, considerado en el presente trabajo como crecimiento característico del género).

Para el cultivo de los dos hongos seleccionados, se eligió un medio de cultivo pobre en nutrimentos con el fin de que crecieran bajo condiciones de estrés, y de este modo, tratar de promover una respuesta similar a la mostrada por los hongos, al competir por diversos recursos en los bioensayos de antagonismo. Los extractos orgánicos, tanto del micelio como del medio de cultivo de ambos hongos, demostraron tener una importante actividad biológica, la cual, probablemente, está determinada por la presencia de moléculas biodinámicas.

Los extractos del medio de cultivo de *Pestalotiasp.* y *F. sporotrichioides*, fueron los tratamientos que presentaron mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento radial de los hongos de prueba (*Alternaria* sp. y *Curvularia* sp.). Estos resultados demuestran que el criterio utilizado para seleccionar los aislamientos con un posible potencial aleloquímico, fue el correcto. En los bioensayos de antagonismo, ambos hongos inhibieron frecuentemente a los aislamientos contiguos. Probablemente, las toxinas producidas tanto por *F. sporotrichioides* como por *Pestalotia* sp., se liberan al medio de cultivo, sea éste sólido o líquido, y de esta manera afectan el desarrollo de los otros hongos, lo que coincide con lo mencionado por Carroll (1988), al referir que los hongos

asociados con plantas, liberan dentro de los tejidos, tóxicas que previenen la colonización por otros microorganismos.

Curvularia sp. fue el hongo de prueba más inhibido (a los tres días de iniciado el bioensayo) por los extractos del medio de cultivo tanto de *F. sporotrichioides* como de *Pestalotia* sp. Esta inhibición disminuyó a los seis días, lo que pudo haberse motivado por la capacidad de *Curvularia* sp. de metabolizar los compuestos activos en los extractos. El mismo resultado se observó con *Alternaria* sp., cuyo crecimiento radial fue muy inhibido por el extracto del medio de cultivo de *F. sporotrichioides* a los tres días, disminuyendo este efecto a los seis días. Por el contrario, la inhibición del crecimiento radial de *Alternaria* sp. por efecto del extracto del medio de cultivo de *Pestalotia* sp., se mantuvo aproximadamente igual a los tres y seis días del experimento.

El efecto aleloquímico de los extractos orgánicos de *Pestalotia* sp. y *F. sporotrichioides*, fue mayor sobre las plantas de prueba que sobre los hongos de prueba. El extracto del micelio de *F. sporotrichioides* demostró ser más tóxico que el extracto del medio de cultivo de esta misma especie, pues inhibió el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli*, amaranto y jitomate, tratadas a 100 ppm (59 %, 72 % y 80.5 % de inhibición respectivamente); en cambio el extracto del medio de cultivo inhibió el crecimiento radicular un 24 % en *Echinochloa crusgalli*, 32 % en amaranto y 55 % en jitomate, a la misma concentración.

El extracto del medio de cultivo de *Pestalotia* sp., presentó el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular de jitomate y amaranto (67 % y 65 % respectivamente), y aunque el crecimiento radicular de amaranto también fue inhibido por el extracto del micelio, la inhibición fue dos veces menor que la presentada con el extracto del medio de cultivo (31 %).

En los bioensayos para probar el efecto letal de los extractos de los hongos sobre *Artemia salina*, la dosis letal media fue muy similar, solo que la actividad de *F. sporotrichioides* se presentó en el extracto del micelio (DL₅₀, 451 ppm), mientras que en *Pestalotia* sp. se presentó en el extracto del medio de cultivo (DL₅₀, 492 ppm).

Por lo anterior, podemos suponer que los compuestos activos de *Pestalotia* sp. bien se liberan al medio más fácilmente que los de *F. sporotrichioides* o presentan un espectro de acción más amplio, pues en todos los bioensayos, con semillas, hongos y artemias, el mayor efecto inhibitorio fue causado por el extracto del medio de cultivo de *Pestalotia*. En el caso de *F. sporotrichioides*, este hecho no se ve con la misma claridad, ya que se observó cierta selectividad en la actividad de sus extractos; el crecimiento radial de los hongos de prueba, fue inhibido por el extracto del medio de cultivo, mientras que el crecimiento radicular de las plantas de prueba y la sobrevivencia de las artemias, se afectaron más con el extracto del micelio.

Estos resultados en condiciones naturales podrían indicar que los hongos asociados al material vegetal, pueden liberar compuestos activos contra otro tipo de microorganismos que intenten colonizar a la planta; esta suposición está basada en el hecho de que los extractos del medio de cultivo de ambos hongos, presentan actividad contra los hongos de prueba. Sin embargo, *F. sporotrichioides* se muestra menos activo frente a las semillas y a *Artemia*, mientras que *Pestalotia* sp. afecta de manera similar, a los tres tipos de organismos de prueba. Es necesario realizar mayor investigación con ambos aislamientos de los hongos, para determinar si hay especificidad o no en liberar los compuestos activos dependiendo de la relación con distintos tipos de organismos.

Los estudios de especies antagonicas asociadas a plantas, proporcionan información útil, no sólo desde el punto de vista ecológico o de la biología de los organismos, sino también como un complemento valioso para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos con utilidad potencial, como agroquímicos o fármacos.

Aunque a la fecha, los hongos tropicales en particular, no han contribuido de una manera significativa al descubrimiento de nuevos compuestos útiles al hombre, lo que puede ser simplemente un reflejo del escaso número de estudios sobre hongos, y de los pocos emprendidos en estas zonas. Por esta razón, en la actualidad, tenemos que conformarnos con especular en buena medida, sobre el

potencial de los hongos tropicales como productores de nuevos metabolitos secundarios con una utilidad potencial (Wildman, 1997).

Muchos organismos en el planeta están todavía por descubrirse, al igual que los compuestos activos que producen, especialmente si nos referimos a los microorganismos. De esta manera, el estudio de las diversas relaciones entre plantas y microorganismos, así como de los metabolitos que intervienen como mediadores en ellas, puede contribuir al hallazgo de nuevas relaciones bióticas, al enriquecimiento del conocimiento de la biodiversidad y al descubrimiento del valor agregado de los recursos bióticos, el cual ayudará a aportar más y mejores argumentos en favor de su conservación. El presente trabajo es una contribución importante en este sentido.

6. Bibliografía

- Agrios, G.N. 1997. Plant pathology. Academic Press. San Diego.
- Anaya, A.L.; B.E. Hernández-Bautista; A. Torres-Barragán, J; León-Cantero y M. Jiménez-Estrada. 1996. Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell (Asteraceae), Matarique o Maturin. *J. Chem Ecol.* 22(3): 393-403.
- Anaya, A.L.; R. Mata; F. Rivero-Cruz; B.E. Hernández-Bautista; D. Chávez-Velasco y A. Gómez-Pompa. 1999. Allelochemical potential of *Melopium brownii* (Jacq.) Urban (Anacardiaceae). *J. Chem Ecol.* 25 (1): 141-156.
- Anderson, J.E.; C.M. Goetz y J.L. McLaughlin. 1991. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem. Studies* 2: 107-111.
- Barnett, H.L. y B.B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfecti fungi. Burgess Publishing Co. Estados Unidos.
- Bennett, J.W. 1983. Differentiation and secondary metabolism in mycelial fungi. Pp 1-32. En Bennett J.W. y A. Ciegler, editores. Secondary metabolism and differentiation in fungi. Marcel. Dekker, Inc. Nueva York.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureaux. Reino Unido.
- Boussienguet, J. 1991. Problems of assessment of biodiversity. Pp. 31-35. En Hawksworth, D.L., editor. The Biodiversity of Microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture. CAB international. Reino Unido.
- Burgess, L.W.; C.M. Liddell y B.A. Summerell. 1988. Laboratory manual for *Fusarium* research. University of Sydney: Sydney.
- Campbell, D.G. y H.D. Hammond. 1989. Floristic inventory of Tropical countries. The New York Botanical Garden: Nueva York.
- Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology.* 69 (1): 2-9.
- Chefras, J. 1991. Disappearing Mushrooms: Another Mass Extinction?. *Science.* 254:1458.

- Colwell, R.R., R.A Clayton, B.A. Ortiz-Conde, D. Jacobs y E. Russek-Cohen. 1995. The microbial species concept and biodiversity. Pp. 3-15. En Allsopp, D., R.R Colwell y D.L. Hawksworth, editors. *Microbial diversity and ecosystem function*. CAB International. Reino Unido.
- Cooke, R. Y J. Whipps. 1993. *Ecophysiology of Fungi*. Blackwell Scientific Publications. Gran Bretaña.
- Deacon, J.W. 1997. *Modern mycology*. Blackwell Science. Gran Bretaña.
- Frank. 1998. Special metabolites in relation to conditions of growth. Pp 321-287. En Frisvad, J.; P. Bridge y D. Arora, editores. *Chemical fungal taxonomy*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
- Fox, F.M. 1993. Tropical fungi: their commercial importance. Pp 253-263. En Issac S.; J.C. Frankland; R. Watling y A. J. S. Walley, editores. *Aspects of Tropical Mycology*. Cambridge Univ. Press. Cambridge, Reino Unido.
- Guzmán, G. 1994. Análisis cualitativo y cuantitativo sobre la diversidad de los hongos en México. En Halffter, G., editor. *La diversidad biológica de Iberoamérica*. Instituto de Ecología, Xalapa. México.
- Guzmán G. 1995. La diversidad de hongos en México. *Ciencias*. 39:52-56.
- Gerlach, W. y H. Nirenberg. 1982. The genus *Fusarium*: a pictorial atlas. *Mitt. Biol. Bund. Land-Forst*. 209.
- Gloer, J. B. 1995. The chemistry of fungal antagonism and defense. *Can. J. Bot.* 73 (Suppl. 1): S1265-S1274.
- Gloer, J. B. 1996. New antifungal and antiinsectan natural products from fungi: an ecology-based approach. *Rev. Latinoamer. Quim.* 24 (3-4): 191-208.
- Gloer, J.B. 1997. Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. Pp. 249-268. En Wicklow D. y B. Sönderström, editores. *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*. Springer-Verlang. Alemania.
- Gómez-Pompa A. 1998. La vegetación en la zona Maya. Pp. 39-51, En P. Schmidt, M de la Garza, y E. Nalda, editores. *Los Mayas*. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes/Instituto Nacional de Antropología e Historia, México.
- Hallmann, J. y R.A. Sikora. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 102: 155-162.

- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity; magnitude, significance and conservation. *Mycol. Res.* 95 (6): 641-655.
- Hawksworth, D.L.; D.W Minter; G. Kinsey. y P.F. Cannon. 1996. Inventoryng a tropical fungal biota: intensive and extensie approaches. En Janardanan, K. K., C. Rajendran, K. Natacajan, y D. L. Hawksworth, editores. *Tropical Mycology*. Oxford & IBH publishing. Nueva Delhi.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1990. El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. UNAM y Fondo de la cultura económica. México.
- Hyde, K. Y. D. Hawksworth, 1997. Measuring and monitoring the biodiversity of microfungi. Pp 11-28. En Hyde, K., editor. *Biodiversity of tropical microfungi*. Hong Kong University Press. Hong Kong.
- Killham, K. 1994. *Soil Ecology*. Cambridge University. Cambridge, Reino Unido.
- Keddy P. 1989. *Competition*. Chapman and Hall. Nueva York.
- Kore,S.S. y S. I. Mashalkar. 1987. Dry rot disease of sapota caused by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities*. 12 (3): 279-282.
- Margulis, L. y D. Sagan. 1995. *What is life?*. Simon and Shuster. Nueva York.
- May, R. M. 1991. A fondness for fungi. *Nature*. 352: 475-476.
- Mittal R.K.; H.J. Hansen; K. Thomsen. 1999. Seed mycoflora of *Eugenia dysenterica* and its effect on germination and storability. Pp 87-95. En Marzalina M.; K.C. Khoo; N. Jayanthi; F.Y Tsan y B. Krishnapillay, editores. IUFRO Seed Symposium 1998 "Recalcitrant seeds": Proceedings of the- Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, 12-15-October 1998. Malasia.
- Moore-Landecker, E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. Prentice Hall. Estados Unidos.
- Morrone, J.J. 2001. Sistemática, biogeografía, evolución: los patrones de la biodiversidad en tiempo-espacio. UNAM, Facultad de Ciencias. México.
- Mustika, I. 1991. Effects of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani* on black pepper (*Piper nigrum* L.). *Industrial Crops Research Journal*. 4 (2): 7-13.
- Neville J. y J. Webster. 1995. *Fungal ecology*. Chapman & Hall. Gran Bretaña.
- Noh M.J., J.G. Yang, K.S. Kim, Y.M. Yoon, K.A. Kang, H.Y. Han, S.B. Shim y H.J. Park. 1999. Isolation of novel microorganism, *Pestalotia heterocomis*, producing paclitaxel. *Biotechnology and Bioengineering*. 64 (5): 620-623.

- Ostenfeld, T. 1998. Volatiles in fungal taxonomy. Pp 263-287. En Frisvad, J.; P. Bridge y D. Arora, editores. Chemical fungal taxonomy. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
- Raut, S.K y S.S Bhattacharya. 1999. Pest and diseases of betelvine (Piper betle) and their natural enemies in India. *Experimental and Applied Acarology*. 23 (4): 319-325.
- Rivero-Cruz, J.F.; D. Chávez; B. Hernández-Bautista; A.L. Anaya y R. Mata. 1997. Separation and characterization of *Metopium brownei* urushiol components. *Phytochemistry* 45(5): 1003-1008.
- Rodrigues, K. y O. Petrini. 1997. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. Pp 57-69. En Hyde, K., editor. Biodiversity of tropical microfungi. Hong Kong University Press. Hong Kong.
- Rossmann, A.Y. 1994. Strategy for an all-taxa inventory for fungal biodiversity. *Bull. Bot. Inst. Acad. Sinica*. 14: 169-194.
- Rossmann, A.Y. 1997. Biodiversity of tropical microfungi. Pp 1-10. En Hyde, K., editor. Biodiversity of tropical microfungi. Hong Kong University Press. Hong Kong.
- Samuels, G.J. y A.Y. Rossmann. 1992. Microfungi in diverse tropical habitats. En Abstracts of the British Mycological Society Tropical Mycology Symposium. University of Liverpool, 6-9 Abril 1992.
- Sharma, B.M.; S.C. Kaushal y S.K. Sugha. 1987. Growth requirements of *P. sapota* isolated from leaves of *A. sapota* (Manilkara zapota) are tabulated. *Research Bulletin of the Panjab University Science*. 38 (1-2): 55-58.
- Shivas, R.G. y J.L. Alcorn. 1996. A checklist of plant pathogenic microfungi in the rainforest of the wet tropics of northern Queensland. *Aust. Plant Pathol.* 25 (3): 158-173.
- Shivas, R.G. y K. Hyde. 1997. Biodiversity of plant pathogenic fungi in the tropics. Pp 47-56. En Hyde, K., editor. Biodiversity of tropical microfungi. Hong Kong University Press. Hong Kong.
- Shulz, B.; A. Römmert; U. Dammann; H. Aust y D. Strack. 1999. *Mycological Research* 103 (10): 1275-1283.
- Tilman, D. 1982. Resource competition and community structure. Princeton University Press. Princeton.
- Turner, W.B. 1971. Fungal metabolites. Academic Press. Londres.

- Turner, W.B. y D.C. Aldridge. 1983. *Fungal Metabolites*. Vol. 2. Academic Press. Nueva York.
- Whittaker, R. H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*. 163: 150-160.
- Wicklow, D.T. 1981. Biogeography and conidial fungi. Pp. 417-447 En Cole, G.T. y B. Kendrick, editores. *Biology of conidial fungi*, Volume 1. Academic press. Nueva York.
- Widden, P. 1997. Competition and the fungal community. Pp. 135-147. En Wicklow D. y B. Sönderström, editores. *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*. Springer-Verlag. Alemania..
- Wildman, H.G. 1995. Influence of habitat on the physiological and metabolic diversity of fungi. *Can. J. Bot.* 73 (Suppl. 1) : S907-S916
- Wildman, H.G. 1997. Potential of tropical microfungi within the pharmaceutical industry. Pp. 29-46. En Hyde, K., editor. *Biodiversity of tropical microfungi*. Hong Kong University Press. Hong Kong.
- Wilson, E. 1992. *The diversity of life*. The Belknap Press of Harvard University Press. USA.
- Zak, J.C. 1993. The enigma of desert ecosystems: the importance of interactions among the soil biota to fungal biodiversity. Pp. 59-71. En Isaac S.; J.C. Frankland; R. Watling y A.J.S. Walley, editores. *Aspects of Tropical Mycology*. Cambridge Univ. Press. Cambridge, Reino Unido.

- Turner, W.B. y D.C. Aldridge. 1983. *Fungal Metabolites*. Vol. 2. Academic Press. Nueva York.
- Whittaker, R. H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*. 163: 150-160.
- Wicklow, D.T. 1981. Biogeography and conidial fungi. Pp. 417-447. En Cole, G.T. y B. Kendrick, editores. *Biology of conidial fungi*, Volume 1. Academic press. Nueva York.
- Widden, P. 1997. Competition and the fungal community. Pp. 135-147. En Wicklow D. y B. Sönderström, editores. *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*. Springer-Verlag. Alemania..
- Wildman, H.G. 1995. Influence of habitat on the physiological and metabolic diversity of fungi. *Can. J. Bot.* 73 (Suppl. 1) : S907-S916
- Wildman, H.G. 1997. Potential of tropical microfungi within the pharmaceutical industry. Pp. 29-46. En Hyde, K., editor. *Biodiversity of tropical microfungi*. Hong Kong University Press. Hong Kong.
- Wilson, E. 1992. *The diversity of life*. The Belknap Press of Harvard University Press. USA.
- Zak, J.C. 1993. The enigma of desert ecosystems: the importance of interactions among the soil biota to fungal biodiversity. Pp. 59-71. En Isaac S.; J.C. Frankland; R. Watling y A.J.S. Walley, editores. *Aspects of Tropical Mycology*. Cambridge Univ. Press. Cambridge, Reino Unido.

Anexo 1

MEDIOS DE CULTIVO.

- Papa-dextrosa-agar (PDA)

200 g de papa

20 g dextrosa

15 g agar

en 1 L de agua destilada

- Papa-sucrosa-agar (PSA)

500 ml de extracto de papa

20 g de sucrosa

20 g de agar

en 500 ml de agua destilada

- Syntetischer Nährstoffärmer agar (SNA)

1g de KH_2PO_4

1 g de KNO_3

0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0.5 g de KCl

0.2 g de glucosa

0.2 g de sacarosa

20 g de agar

en 1 L de agua destilada

- Medio de peptona-agar con neomicina y cloranfenicol (NCPA)

15 g de peptona

1 g de KH_2PO_4

0.5 g. de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.2 g de cloranfenicol

20 g de agar

en 1 L de agua destilada

- Dicloran-cloranfenicol-peptona-agar (DCPA)

15 g de peptona

1 g de KH_2PO_4

0.5 g. de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.2 g de Dicloran

20 g de agar

en 1 L de agua destilada).

- Czapek-Dox

30 g de sacarosa

3 g de NaNO_3

1 g de K_2HPO_4

0.5 g de MgSO_4

0.5 g de KCl

0.01 g de FeSO_4

en 1 L de agua destilada

Anexo 2

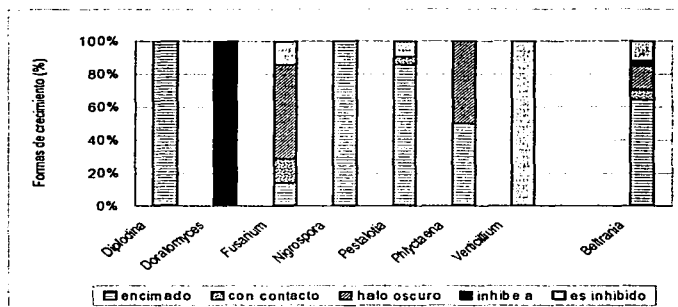


Figura 21. Porcentaje de crecimiento del aislamiento del género *Beltrania* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

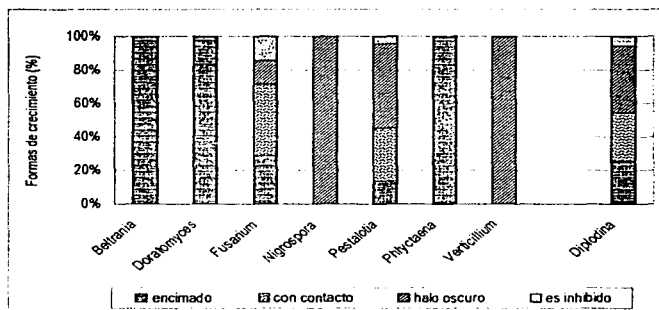


Figura 22. Porcentaje de crecimiento del aislamiento del género *Diplodina* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

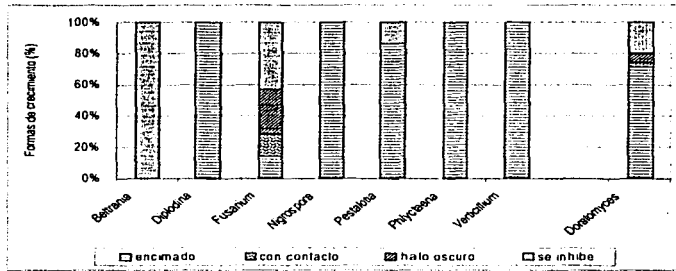


Figura 23. Porcentaje de antagonismo del aislamiento del género *Doratomyces* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

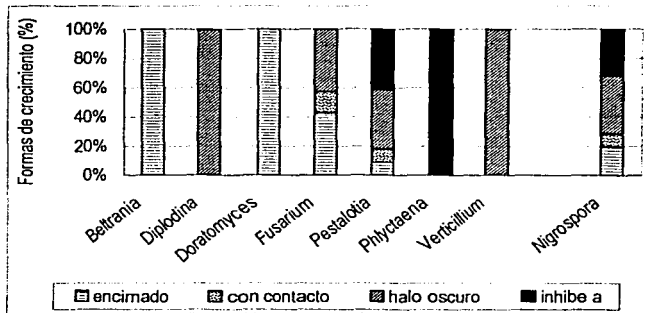


Figura 24. Porcentaje de antagonismo del aislamiento del género *Nigrospora* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

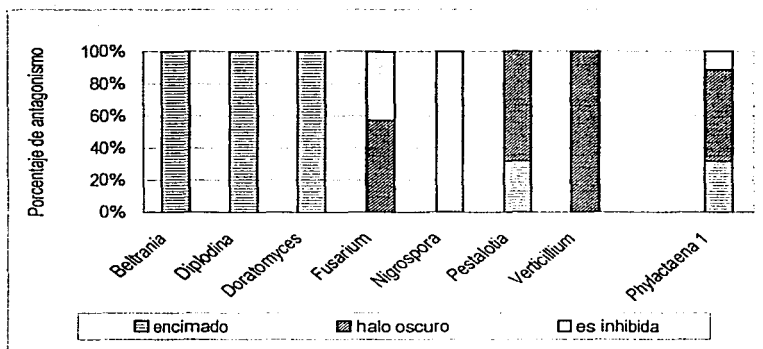


Figura 25. Porcentaje de formas de crecimiento del aislamiento No. 1 de *Phylyctaena* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

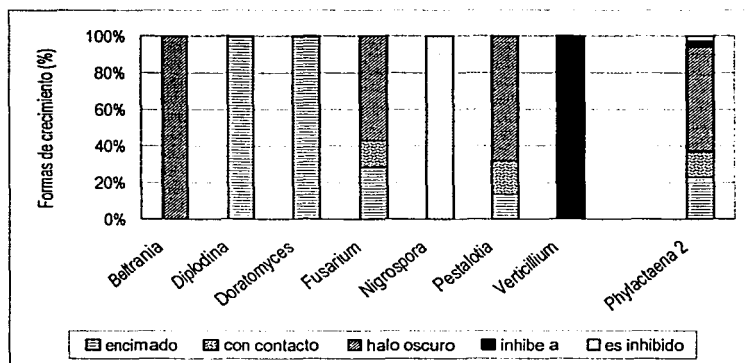


Figura 26. Porcentaje de Formas de crecimiento del aislamiento No. 2 de *Phylyctaena* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él

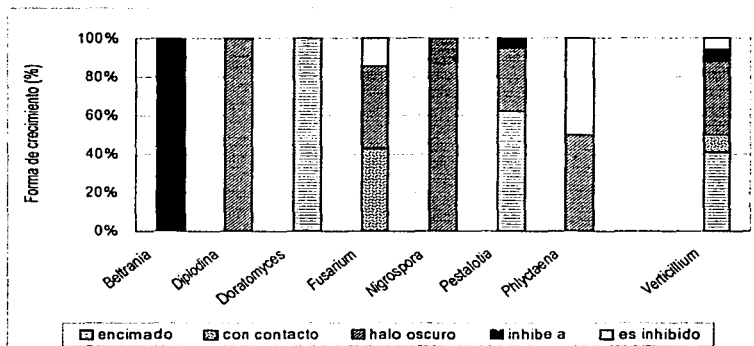


Figura 27. Porcentaje de antagonismo del aislamiento del género *Verticillium* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

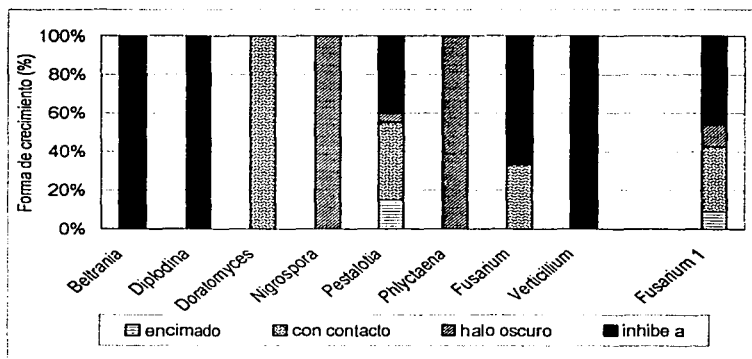


Figura 28. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 1 de *Fusarium* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

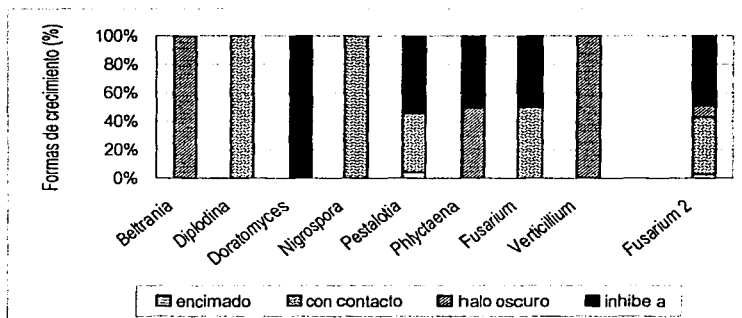


Figura 29. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 2 de *Fusarium* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

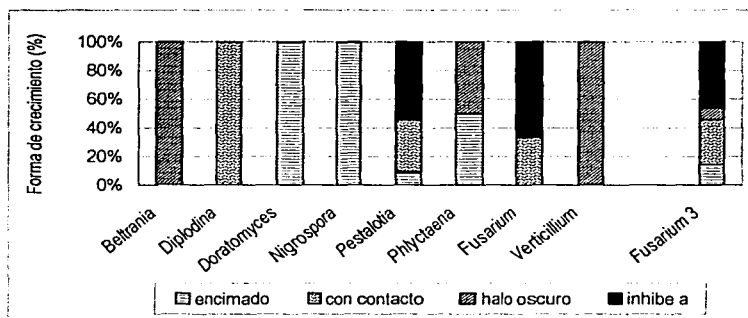


Figura 30. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 3 de *Fusarium* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

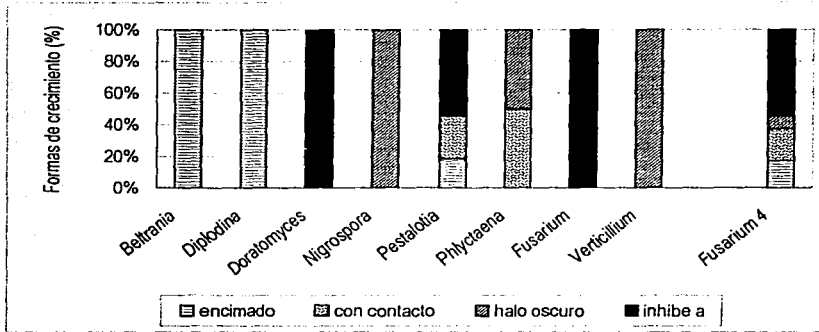


Figura 31. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 4 de *Fusarium* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él

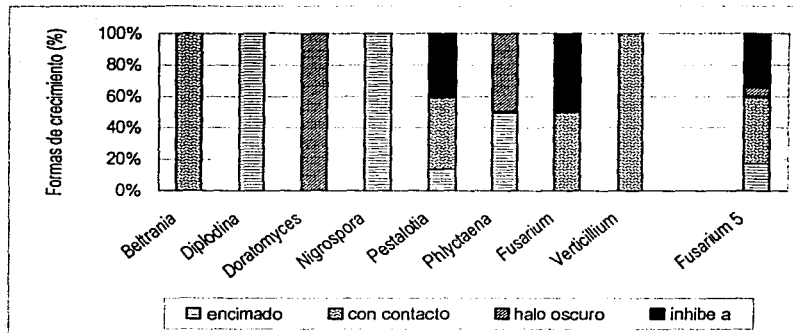


Figura 32. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 5 de *Fusarium* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él

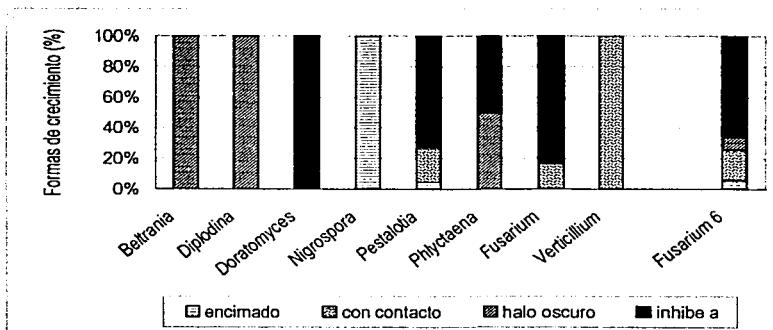


Figura 33. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 6 de *Fusarium* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

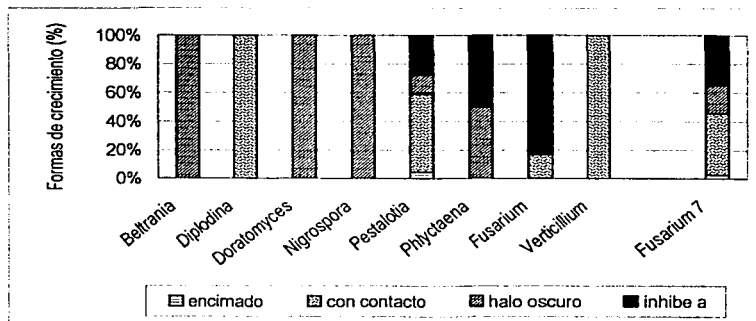


Figura 34. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 7 de *Fusarium* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

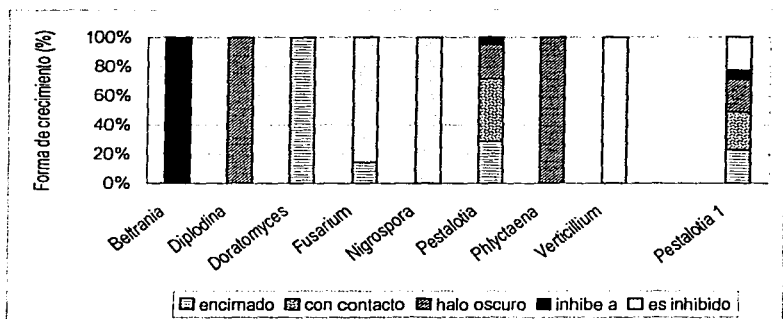


Figura 35. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 1 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

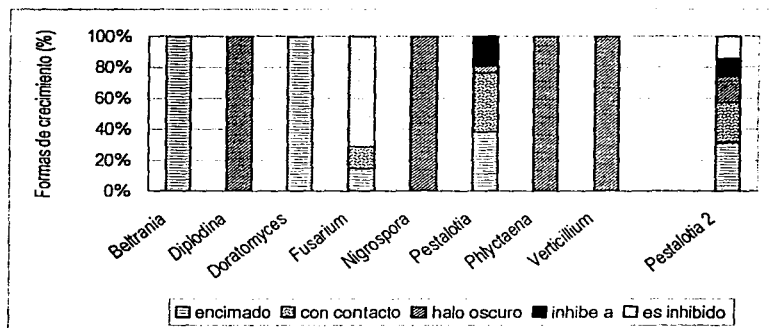


Figura 36. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 2 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

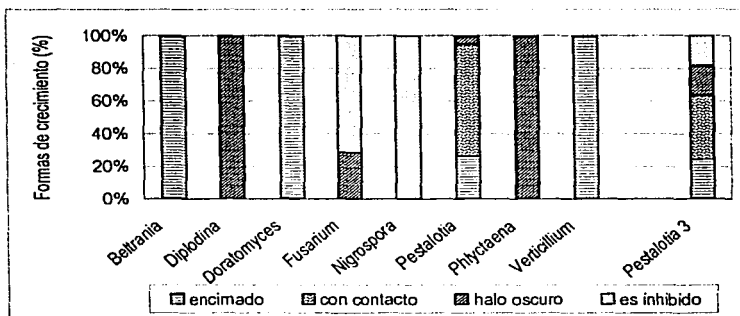


Figura 37. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 3 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

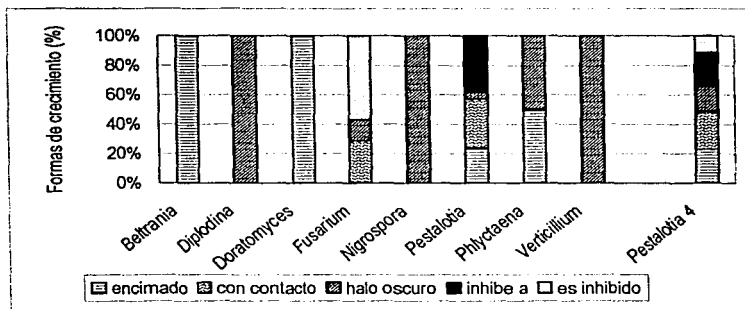


Figura 38. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 4 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

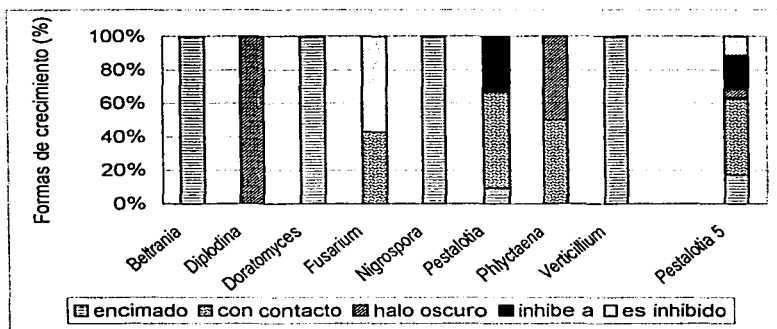


Figura 39. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 5 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

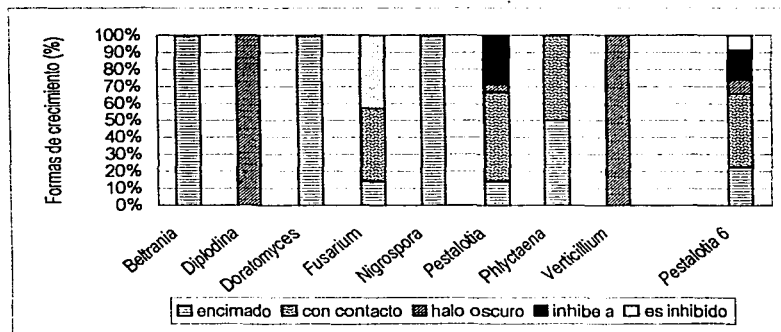


Figura 40. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 6 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

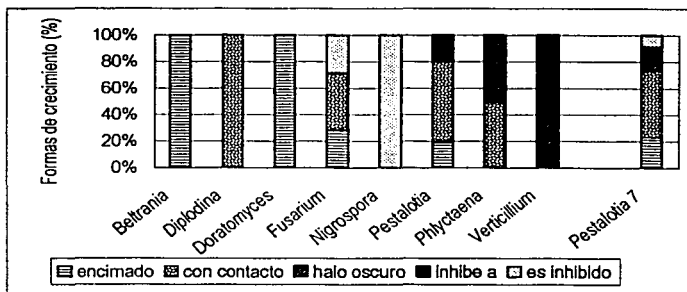


Figura 41. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 7 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

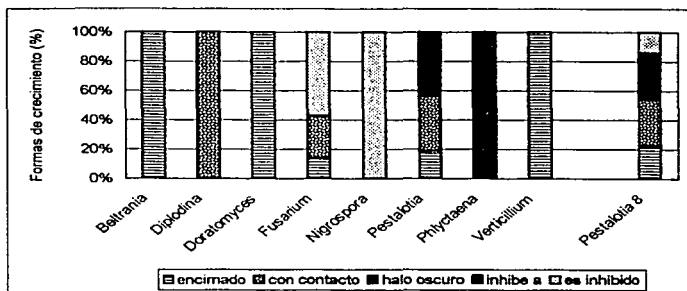


Figura 42. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 8 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él

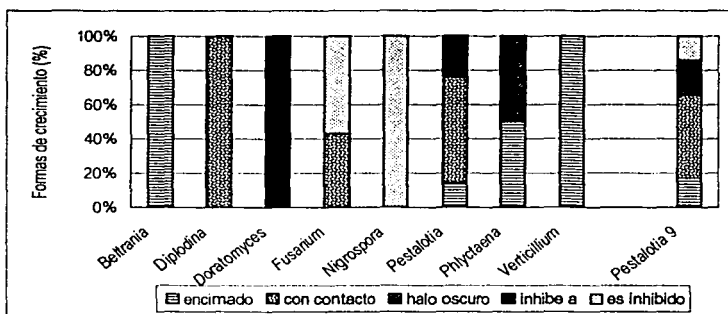


Figura 43. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 9 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

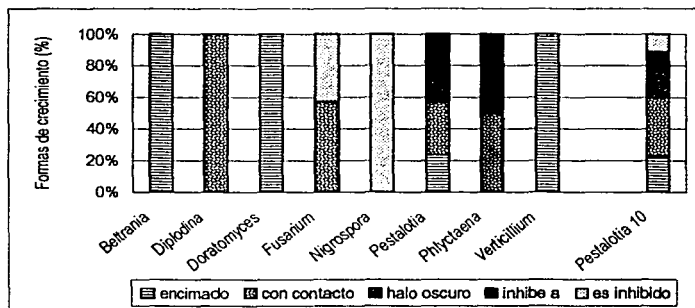


Figura 44. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 10 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

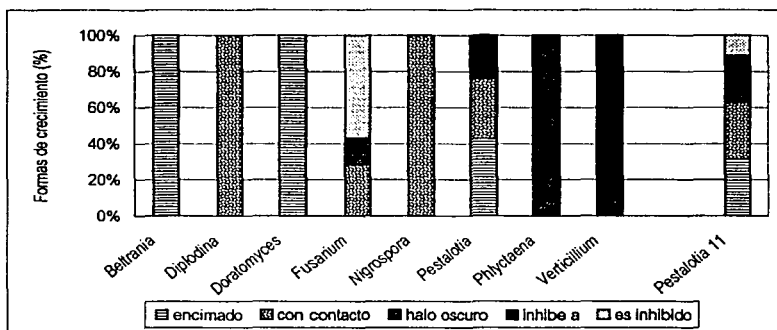


Figura 45. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 11 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

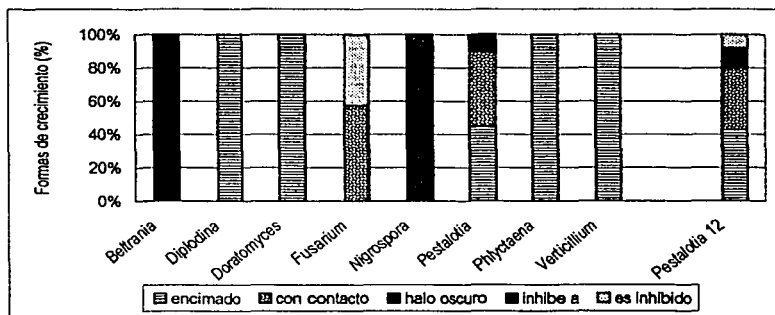


Figura 46. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 12 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

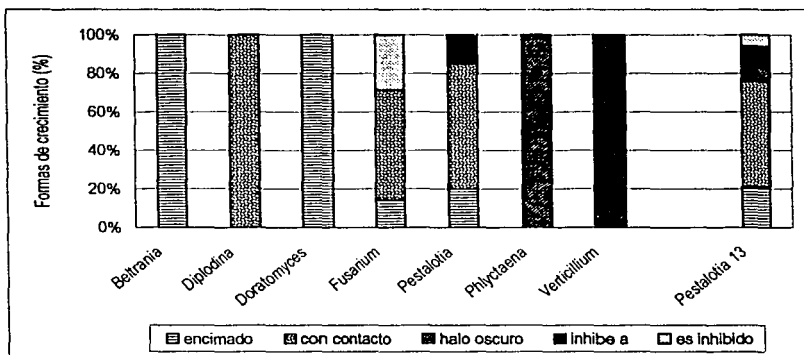


Figura 47. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 13 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

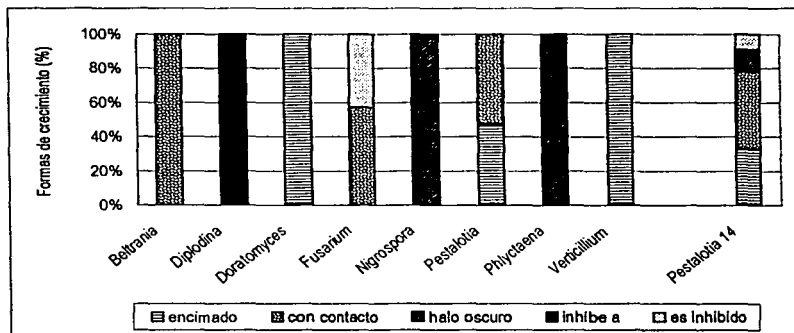


Figura 48. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 14 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

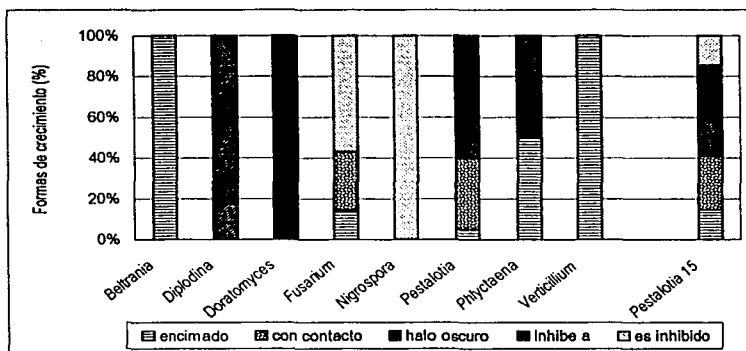


Figura 49. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 15 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

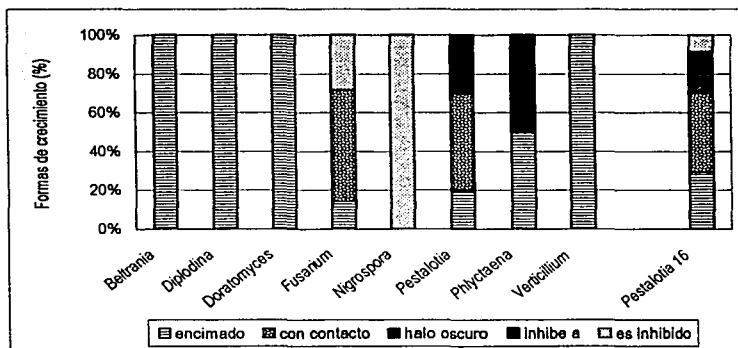


Figura 50. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 16 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

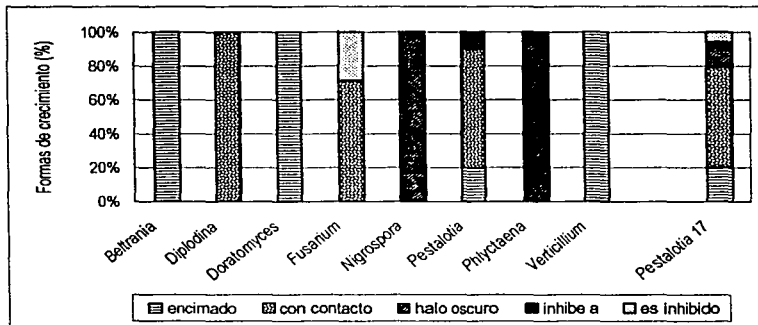


Figura 51. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 17 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

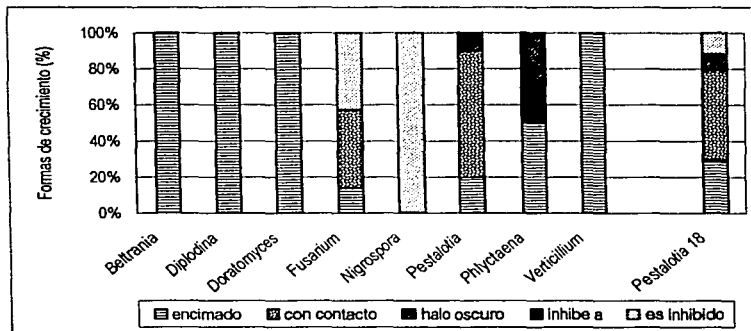


Figura 52. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 18 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

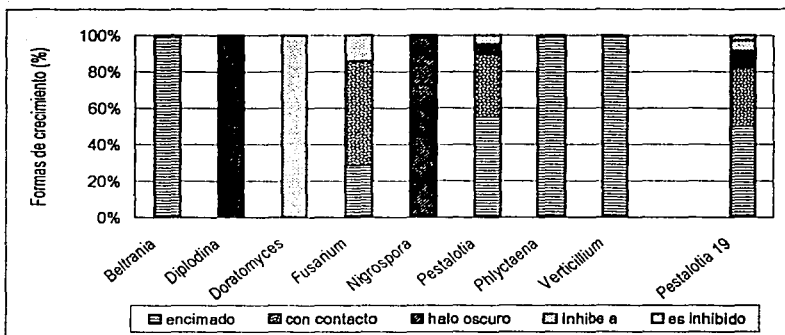


Figura 53. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 19 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

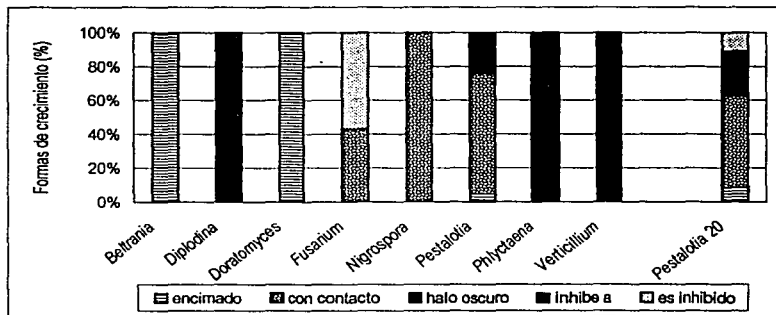


Figura 54. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 20 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

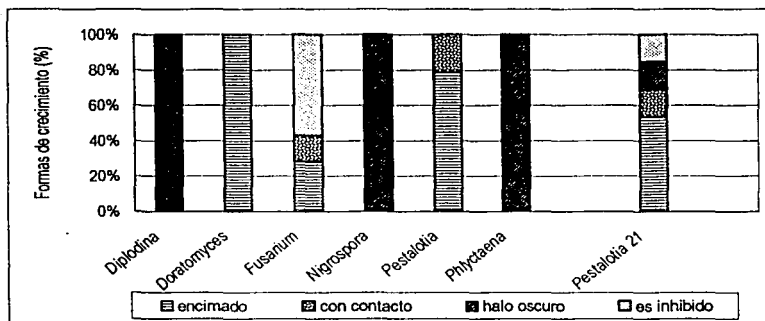


Figura 55. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 21 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.

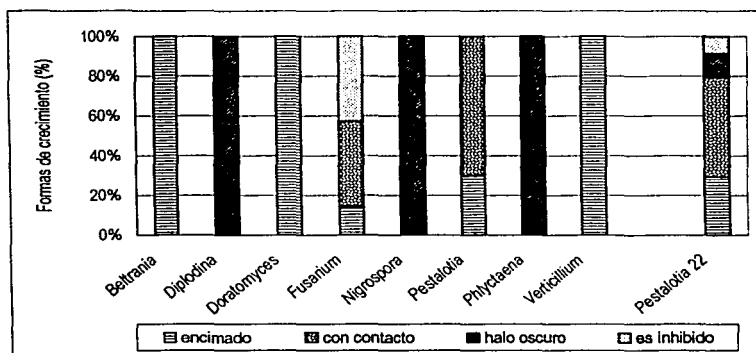


Figura 56. Porcentaje de antagonismo del aislamiento 22 de *Pestalotia* y su comportamiento con los otros géneros al crecer contiguos a él.