



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**BÚSQUEDA DE HONGOS ASOCIADOS A *Magnolia dealbata* Zucc. PRODUCTORES DE METABOLITOS  
CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**ALLAN ESPINOSA GÓMEZ**



México, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

Presidente	Profesor: <b>Abel Gutiérrez Ramos</b>
Vocal	Profesor: <b>José Alejandro Bonifaz Trujillo</b>
Secretario	Profesor: <b>Sergio Sánchez Esquivel</b>
1er Suplente	Profesor: <b>Misael González Ibarra</b>
2° Suplente	Profesor: <b>Beatriz Ruíz Villafán</b>

**Sitio donde se desarrolló el tema:** Laboratorio de Microbiología Industrial, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

---

**Dr. Sergio Sánchez Esquivel**

Asesor

---

**M. en B. Beatriz Ruiz Villafán**

Supervisor Técnico

---

**Allan Espinosa Gómez**

Sustentante

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios de México y por la grandiosa formación que me ha brindado, tanto personal como académicamente. En especial a la Facultad de Química, que tras años de enseñanzas ha forjado una educación que asegura mi desarrollo como profesional.

Asimismo, le agradezco al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, además de su tutoría en este proyecto, todas sus atenciones, así como su tiempo y la confianza depositada en mi persona; un ejemplo que acrecentó un gusto ya existente hacia la investigación.

A la M. en B. Beatriz Ruíz Villafán por la asesoría técnica recibida durante la realización de este trabajo, por los conocimientos y aportaciones tan acertivas, por su paciencia y el tiempo dedicado en cualquier asunto que se necesitara.

Al E. en B. Marco Antonio Ortiz Jiménez por su asesoría técnica y ayuda en la identificación de las cepas aquí empleadas, así como por el material de apoyo y su tiempo brindado.

A la M. en C. Silvia Margarita Guzmán Trampe por la colecta del material biológico empleado estableciendo así las bases de este trabajo, por sus aportaciones, tiempo y asistencia en los momentos que lo requerí.

A la QFB Teresa Andrade Rosas por la grandiosa ayuda y colaboración durante el desarrollo de este trabajo, por su paciencia, tiempo y dedicación para el mismo.

A la empresa ALTECSA S.A. de C.V. por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

A los profesores Abel Gutiérrez Ramos y José Alejandro Bonifaz por aceptar ser mis sinodales, por sus aportaciones relacionadas y no relacionadas con el presente trabajo, así como por el tiempo invertido en su revisión y evaluación.

## **Dedicatorias**

Esta tesis va dedicada a todas las personas que son parte esencial de mi vida; que a través de su apoyo hicieron posible el término de este proyecto, y que de una u otra forma están presentes en el camino que me encuentro recorriendo.

Para mi familia, donde cada quien a su manera me ha empujado siempre hacia adelante para alcanzar esta meta mucho antes vislumbrada. A mi madre, que ha fungido como pilar de un hogar, y me ha inculcado que lo que uno hace en vida resuena para toda la eternidad. A mi padre, que con paciencia y ejemplo me ha enseñado que el perseverar es una virtud que aún no se encuentra en desuso y que te abre cuantas puertas uno llegue a tocar. A mis hermanos, que igualmente con su ejemplo, me han exhortado a no estancarme y tener listo el pie para dar el siguiente paso. A Silvia, que ha sido como otra madre para mi y ha demostrado que en la vida se puede aprender demasiado, pero depende de que uno quiera. A Mike, que estando tras bambalinas la mayor parte del tiempo me ha otorgado su apoyo incondicional de incontables formas, lo cual ha facilitado mucho este recorrido. Pero sobretodo al cariño que nos une y que ha sido fuente de todas sus bondades para mi persona, gracias.

Esto va dedicado para ti Ale, que me has demostrado de que tan fuerte puede llegar a ser uno, que la batalla solo es perdida cuando no se pelea; que has convertido los momentos difíciles en momentos grandiosos y transformado las cosas sencillas en grandes alegrías. Gracias por todo mi vida, te amo con todo mi corazón y un poco más.  
**Un camino juntos... YRMU!!**

A esos amigos con los he vivido innumerables experiencias y que siguen a mi lado al pasar de los años, que hemos compartido grandes dificultades pero también cuantiosas alegrías; una vida marcada por momentos inolvidables: Amilcar, Chucho, Alegre, Octavio, Juan, Emmanuel, Pao, Lecu, he aquí una experiencia más.

Imposible olvidar a aquellos que dentro de la misma facultad también facilitaron el término de mi carrera, pero aún más importante, fueron amenizando maravillosamente mi estancia en la misma: **Nathalium**, Clark, Moni, Adri, Iván, Ángel, Mara, Anlly, Marco, Ara, Montse, Karen, Elvis, Cecy, Fonsy, Ale, Viri, Lalo y Carlos. Todo un gusto haberlos encontrado a lo largo de la carrera.

Por último pero para nada menos importantes, a mi familia los Sánchez, elemento vital de este logro. Por colaborar y ayudar en este proyecto de forma directa, por aportar ese toque especial en el trabajo diario, por las hartas sesiones de risoterapia, y poner el **mood** en todo momento. A Pirata (Silvia), Tere, Anita, Yolis, Bety, Dianita Rocha, Cecy, Dianita Lemus, Alba, Brenda, Mary Ann, Adán, Víctor, Cecilita, Brendita, Alex, Maus, y el Dr. Sergio. De todo corazón, gracias.

**“¿Son plantas o animales?”**

**“Señor, los Hongos son hongos...”**

**(Conocimiento purépecha. Mapes *et al.*, 1981)**

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	3
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	6
3.1. Asociaciones Endófito-Planta.....	6
3.2. El árbol <i>Magnolia dealbata</i> Zucc. ....	9
3.3. Los Hongos.....	12
3.4. Los hongos endófitos como fuente potencial de productos con actividad biológica y su importancia en la actualidad.....	14
3.5. La región 5.8S del DNAr como elemento para la identificación de hongos.....	17
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>6. MATERIALES</b> .....	20
6.1 Cepas y su conservación.....	20
<b>7. MÉTODOS</b> .....	22
7.1. Establecimiento de las condiciones óptimas para el crecimiento y la conservación de las cepas usadas.....	22
7.2. Aislamiento de los hongos endófitos.....	22
7.3 Fermentaciones.....	23
7.4 Preparación de las cepas microbianas sensibles.....	24
7.5 Determinación de la actividad antimicrobiana con pruebas de antibiosis por difusión.....	25
7.6 Caracterización de los hongos elegidos.....	26
7.6.1 Microcultivo.....	26
7.7 Cosecha y cuantificación de esporas.....	27
7.8 Cinética de crecimiento y producción de compuestos con actividad biológica por parte de la cepa 28B.....	31
7.9 Identificación de 28B, 37BR y 37C.....	32
7.10 Aislamiento del DNA genómico.....	33
7.11 Amplificación por PCR de la región del DNA ribosomal 5.8S...	34

<b>8.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
8.1	Aislamiento de los hongos	36
8.3	Pruebas de difusión en medio sólido	44
8.4	Búsqueda preliminar de actividad antimicrobiana	45
8.5	Recolección de esporas	51
8.6	Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa 28B	52
8.7	Micromorfología de 28B y 37C	59
8.8	Identificación de los hongos 28B, 37BR y 37C utilizando el gen del RNAr 5.8S	61
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>68</b>
<b>11.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>69</b>
	Anexo 1: Medios de cultivos y soluciones empleados	76
	Anexo 2: Técnicas Moleculares	82

## **1. RESUMEN**

Los microorganismos además de producir metabolitos primarios como el etanol, el ácido láctico y aminoácidos, son capaces también de generar metabolitos secundarios; los cuales constituyen aproximadamente la mitad de los productos farmacéuticos que se encuentran en el mercado hoy en día. Los microorganismos productores de antibióticos han sido aislados de diferentes fuentes naturales incluyendo la tierra, el agua (de río y de mar), el aire, las esponjas y las plantas. Por lo que respecta a las plantas, en la mayor parte de los casos se han estudiado únicamente los extractos de las mismas, sin tomar en cuenta a los microorganismos que presentan; por ello nos propusimos determinar la posible actividad antimicrobiana de algunos hongos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc., una planta importante en la medicina tradicional.

A partir de una serie de muestras de diferentes secciones del árbol *Magnolia dealbata* Zucc. se aislaron 45 hongos, de los cuales 11 generaron inhibición de bacterias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*). De los 11 hongos productores de actividad biológica, se seleccionaron 3 para su identificación, utilizando la región 5.8S del DNA ribosomal. Las secuencias obtenidas mostraron que 2 de las cepas eran *Penicillium chrysogenum*, mientras que la tercera se identificó como *Fusarium* sp. El estudio de los microorganismos endófitos de *Magnolia dealbata* Zucc. mostró la presencia de algunos hongos con capacidad antibiótica potencial, los cuales seguirán siendo caracterizados.

## **2. INTRODUCCIÓN**

Las relaciones simbióticas entre hongos y organismos fotosintéticos son antiguas y ubicuas, sin embargo, estas interacciones han sido catalogadas en menos del 5% de las 1.5 millones de especies de hongos que se estima que existen. Se ha encontrado que las plantas tropicales contienen una gran diversidad de microorganismos endófitos, muchos de ellos todavía sin clasificar y posiblemente pertenecientes a nuevos géneros y especies. Estos hongos endófitos están conformados por una gran variedad de micromicetos (hongos microscópicos) que colonizaron los tejidos de su planta hospedera sin causar síntomas aparentes de enfermedad, desarrollando una relación de antagonismo, comensalismo o mutualismo que está equilibrada por la virulencia del hongo y las defensas de ésta. De esta forma, los hongos endófitos encuentran un hábitat y alimento dentro de su hospedera y, a cambio algunos de ellos, gracias a los metabolitos secundarios que producen, suelen disminuir la probabilidad de que ésta se vea afectada por microorganismos patógenos competidores y factores ambientales adversos (Arnold *et al.*, 2003; Schulz y Boyle, 2005; Charepraset *et al.*, 2006; Gunatilaka, 2006).

Son estos metabolitos secundarios de gran interés potencial para la industria farmacéutica, ya que ante el problema actual de la resistencia a antibióticos comerciales por parte de microorganismos patógenos, y debido a la toxicidad presente en algunas de las nuevas moléculas, es necesario continuar buscando antimicrobianos efectivos y eficientes. Se estima que en el 2004, más del 70% de las bacterias patógenas aisladas, resultaron resistentes al menos a un antibiótico actual (Demain y Sánchez, 2009).

Cabe señalar que el problema de resistencia a los antibióticos no es exclusivo de México; sin embargo podemos afirmar con certeza que en nuestro país el abuso de antibióticos, el uso de fármacos de baja calidad; así como la automedicación, una práctica común todavía entre la población mexicana, ha contribuido en la elevación de los índices de resistencia (Amábile-Cuevas, 2010).

El reto que ha presentado dicha resistencia se ha enfrentado de 2 maneras: a través de la búsqueda de nuevos compuestos naturales, e investigando las propiedades antimicrobianas de derivados de antibióticos ya existentes (Wright, 2000).

De los 25 fármacos mejor vendidos en el año de 1997, 42% fueron productos naturales o sus derivados químicos, y de éstos, un 67% fueron antibióticos. De los 12,000 antibióticos conocidos en 1995, cerca del 22% los producían hongos filamentosos (A.L Demain y S. Sánchez, 2009; J.L. Adrio, A.L. Demain, 2003).

Conociendo el potencial con el que cuentan los microorganismos endófitos, en este proyecto nos enfocamos en la búsqueda de compuestos antibióticos que puedan ser producidos por los hongos asociados al árbol *Magnolia dealbata* Zucc, planta con propiedades medicinales.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Asociaciones Endófito-Planta**

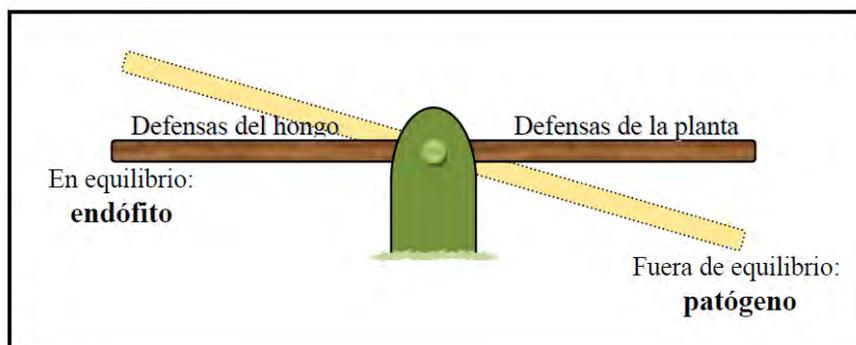
La palabra endófito significa literalmente “**en la planta**”, y es un término bastante amplio que incluye virtualmente cualquier organismo que resida dentro de la misma, además de que cualquier órgano de la planta u hospedero puede ser colonizado (Schulz y Boyle, 2005).

**A pesar de que el término “endófito” es empleado para todos los** microorganismos incluyendo bacterias, hongos, algas e insectos que habitan en las plantas sin causar síntomas de enfermedad visibles (sin importar la relación que los huéspedes guardan con ellas), los micólogos **han empezado a usar el término “endófito fúngico” para hongos que** colonizan plantas y que pasan la mayor parte de su ciclo vital dentro de su hospedero sin causar daño aparente en ningún momento en específico. Schulz y Boyle (2005) mencionan que no existen interacciones neutras entre endófitos y hospederos, sino que estas interacciones incluyen un balance de antagonismo, no relacionado con el órgano de la planta que es infectado. Siempre hay al menos un grado de virulencia por parte del hongo habilitando de esta manera la infección, mientras que las defensas de la planta hospedera limitan el desarrollo de los invasores fungales así como la enfermedad, como lo muestra de forma sencilla la figura 1 (Isaac, 1992).

Los hongos endófitos producen enzimas necesarias para penetrar y colonizar su hospedero, habitando los órganos superficiales de forma local e intercelular, mientras que en las raíces es extensiva, sistemática así como inter e intracelular. Crecen usando el fluido apoplástico (sustancia nutritiva que circula por los espacios intercelulares del tejido vegetal) como medio de crecimiento. Dicha asociación puede llegar a ser mutualista, por el contrario bajas concentraciones de compuestos de

defensa fenólicos pueden producir una infección patógena además de que algunos metabolitos pueden inhibir la fotosíntesis de la planta hospedera (Schulz *et al.*, 2002).

La interacción que entabla el hongo con la planta promueve una relación en la que se obtienen beneficios al menos para una parte (aunque para la otra pueda ser perjudicial); tal como la obtención de nutrientes a expensas del hospedero, o la mejora ecológica de la planta *per se*, o la posible acción mutualista que puede ejercer el huésped sobre la planta. Pero en su ahora hábitat interno, el hongo debe enfrentar condiciones agresivas porque la planta puede contener ya varios endófitos previamente instalados con los cuales el nuevo microorganismo debe competir (Faeth, 2002; Tan y Zou, 2001).



**Figura 1.** Relación entre el hongo endófito con su planta hospedera, balance de antagonismo.

Los hongos endófitos consisten en tres grupos ecológicos básicos: las micorrizas, los balansiaceos o *endófitos de los pastos*, y los no balansiaceos o *endófitos de plantas leñosas* (Schulz y Boyle, 2005).

Es posible aislar cientos de especies endofíticas a partir de una sola planta, de entre ellos al menos uno generalmente mostrará

especificidad por el hospedero. Los hongos endófitos, particularmente, exhiben gran especificidad a tejidos y órganos como resultado de su adaptación a las condiciones fisiológicas en plantas (Charepraset *et al.*, 2006).

Es generalmente aceptado que las plantas infectadas con endófitos son frecuentemente más sanas que aquéllas libres de endófitos, porque las primeras, suelen tener ventajas contra el estrés biótico y abiótico sobre sus contrapartes sin endófitos. Algunos endófitos incluso llegan a participar de forma directa o indirecta en la toma de nutrientes minerales para reducir o prevenir el estrés (Zhang *et al.*, 2006).

Aunque la creencia de que los hongos endófitos, especialmente los asexuales, pueden ser vistos como mutualistas con las plantas debido a la producción de micotoxinas que protegen a sus plantas hospederas de los herbívoros, se puede argumentar también que la gran mayoría de los endófitos raramente actúan como mutualistas defensivos. De hecho en estas simbiosis obligadas, los balansiaceos son frecuentemente neutrales o hasta patogénicos para sus hospederos, dependiendo del genotipo del endófito y su planta así como de las condiciones ambientales (Faeth, 2002; Faeth y Fagan, 2002).

Dreyfuss y Chapela (1994) consideran que existen al menos 1.3 millones de hongos endófitos por ser descubiertos; y que solamente aquí en México, según cálculos, análisis poblacionales y extrapolaciones, se ha determinado que contamos con aproximadamente 200,000 hongos, de los cuales sólo el 3.5 % son conocidos. Sin embargo, hay que recordar que la gran destrucción forestal que ocurre al parejo de la pérdida de la diversidad en el país está afectando seriamente la biodiversidad total, principalmente en los trópicos, es por ello debemos valorar mejor los recursos con los que contamos, y más sabiendo el

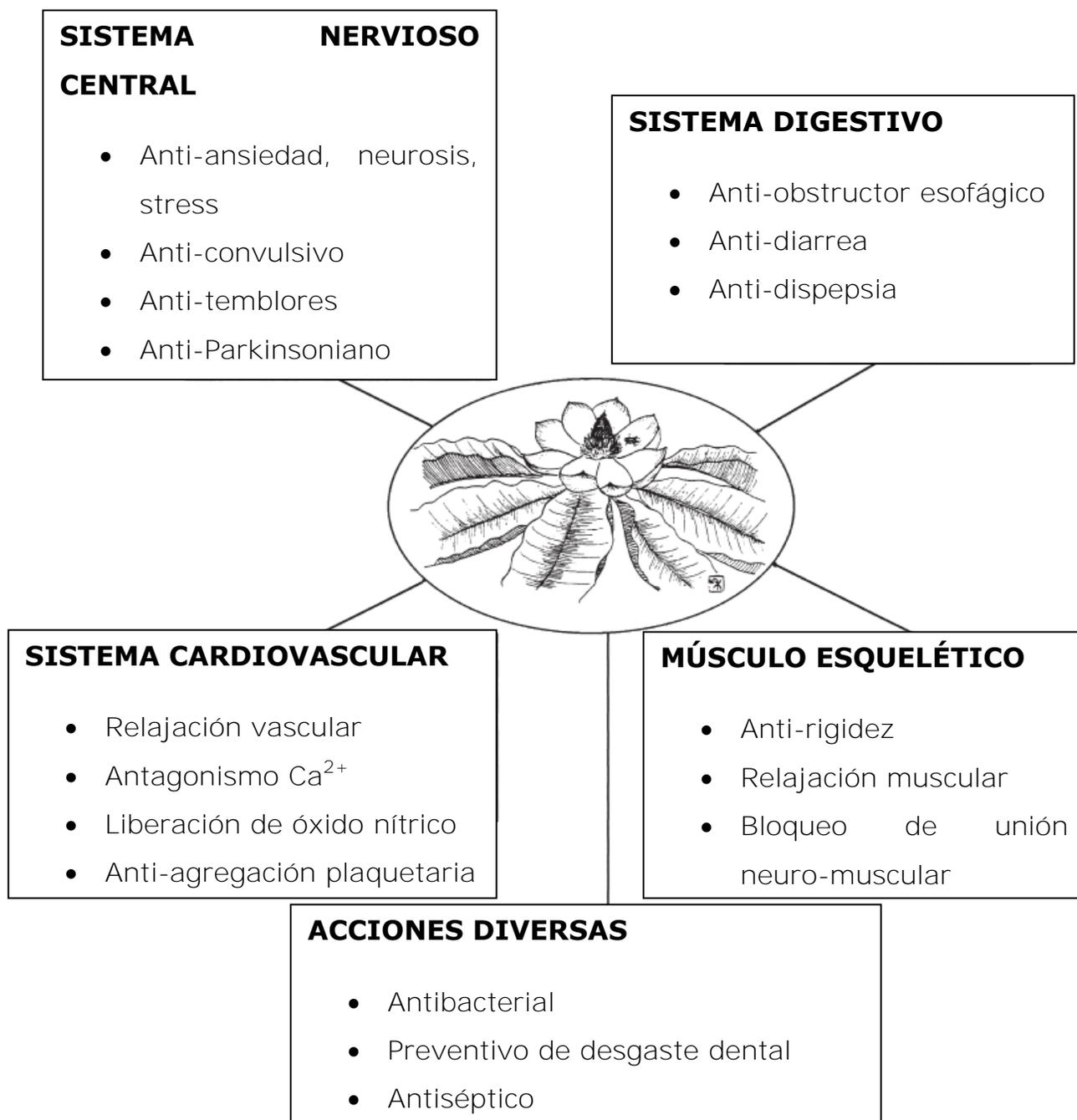
beneficio que representan para el género humano (Hawksworth, 2001; Guzmán, 1998).

### **3.2. El árbol *Magnolia dealbata* Zucc.**

El árbol con el que se trabajó y del cual se tomaron las muestras de tejido para la búsqueda de endófitos proviene de la familia Magnoliaceae, la cual es muy antigua, con fósiles remanentes que datan entre 36 y 58 millones de años; agrupa cerca de 220 especies de árboles caducifolios o perennes y arbustos nativos de Asia y América, poseen grandes y ostentosas flores que contienen tanto las partes femeninas como las masculinas. Esta familia fue nombrada así en honor a Pierre Magnol (1638-1715), profesor en Botánica y Medicina en Montpellier, Francia (Watanabe *et al.*, 2002)

Esta familia se encuentra ampliamente distribuida en climas tropicales o subtropicales. Aproximadamente el 80% de las especies se encuentran distribuidas al sureste de Asia, desde el Himalaya hasta Japón, y del Archipiélago Malayo hasta Nueva Guinea y Nueva Bretaña; mientras que en América reside el 20% restante, desde el templado sureste de Norte América a través de la América tropical a Brasil. Todas las especies de América pertenecen a 3 géneros: *Magnolia*, *Talauma* y *Liriodendrom*; en México tenemos 12 especies y 3 subespecies de *Magnolia* (Watanabe *et al.*, 2002; Sánchez-Velásquez y Pineda-López, 2010).

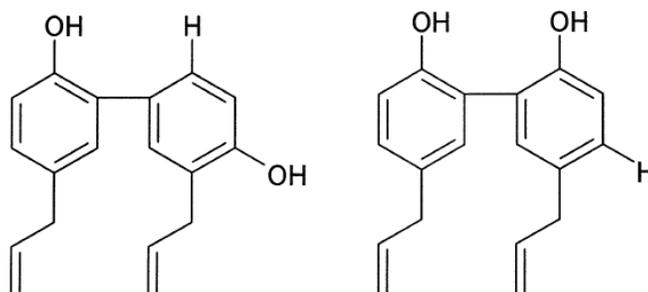
Entre las especies de *Magnolia*, *M. obovata* y *M. officinalis* han sido realmente importantes en la medicina herbal tradicional china y japonesa; su corteza se utiliza en casos de diarrea, flatulencia, amenorrea, pirosis y una variedad de dificultades gastrointestinales, aparte de otras, gracias a sus propiedades diversas (Figura 2) (Stuart, 1969).



**Figura 2.** Propiedades farmacológicas de la corteza de *Magnolia*.

Tomado de Watanabe *et al.*, 2002.

El género *Magnolia* es una fuente rica de compuestos con actividad biológica a los cuales se deben sus efectos farmacológicos. Éstos compuestos se agrupan en tres tipos: alcaloides, aceites esenciales y bifenoles. El honokiol y el magnolol (Figura 3) son los compuestos bifenólicos más comunes en *Magnolia*, éstos son isómeros posicionales los cuales exhiben actividad de relajación muscular, inhiben la movilización intracelular del calcio en plaquetas causada por el colágeno, así como su influjo en canales de calcio, tienen efectos antihemostáticos, antitrombóticos, ansiolíticos y actividad antibacterial. El honokiol induce la movilización de calcio y muestra actividad neurotrófica en neuronas corticales, además de un efecto antagónico en la calmodulina, el magnolol por su lado tiene efectos analgésicos y anti-inflamatorios (Sarker *et al.*, 2002; Kotani, 2005; Martínez *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Estructura del Honokiol y Magnolol.

El árbol de *Magnolia dealbata* fue descubierto en el siglo XVI por Francisco Hernández, y formalmente descrita por Zuccarini (1837). Luego de ello, no se supo nada de esta especie hasta 1948 y 1960, cuando Coneurse y Rzedowski colectaron especímenes (Gutiérrez y Vovides, 1997). Hernández también llegó a señalar el uso que los Aztecas tenían de este árbol, al cual llamaban Eloxochitl- del náhuatl- *Elotl* oreja y *Xochitl* flor (Gutiérrez, 1993; Pattison, 1985).

Debido al desconocimiento que por muchos años existió sobre la *Magnolia dealbata*, existen escasos trabajos de esta especie. Pese a ser nativa y endémica de México, no está tan ampliamente analizada como el resto de las especies del mismo género. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones muestran que las Magnolias conservan estructuras primitivas, por lo que representan un gran interés desde el punto de vista evolutivo, taxonómico y ecológico (Gutiérrez, 1993).

Esta especie está amenazada debido a la utilización de su madera para fabricación de utensilios, material de construcción y leña, así como por la colecta de su corteza y flores para su uso en medicina tradicional contra enfermedades del corazón, como ocurre en Veracruz y otros estados en los que crece. La verdadera amenaza por una severa cosecha de flores se debe a puros propósitos ornamentales, aunado a que la planta sufre de una pobre regeneración natural. Actualmente, la legislación mexicana la considera en peligro de extinción en la NOM-059-SEMARNAT-2001 (DOF, 2002) y se encuentra en el Red Data Book desde 1994, también está considerada en peligro por la International Union for Conservation of Nature. (Gutiérrez y Vovides, 1997; Velazco-Macías, 2008; Sánchez-Velásquez y Pineda-López, 2010).

### **3.3. Los Hongos**

Los hongos se definen como organismos eucariontes, heterótrofos, no fotosintéticos, macro o microscópicos, unicelulares como las levaduras, o pluricelulares, tales como los hongos filamentosos. Pueden tener un tipo de reproducción sexual (teleomórfica) por medio de esporas, o asexual (anamórfica) gracias a sus conidios. Presentan estructuras tubulares denominadas hifas, talo o filamentos, que son las unidades funcionales y somáticas de los mismos; al conjunto de hifas se le conoce como micelio.

Tienen una pared celular rígida conformada por quitina combinada con diversos polisacáridos (dextranas, mananas, xilanas y hemicelulosa) y pequeñas cantidades de lípidos, que pueden ser diferentes según los grupos taxonómicos. No obstante, en algunos grupos puede no estar presente la quitina y, en cambio, están presentes polisacáridos como celulosa (predominante en los *oomycetes*), **quitosana**,  $\beta$ -glucanas, mananas, glucógeno, galactanas y polímeros de galactosamina. Las membranas celulares de estos microorganismos cumplen con el modelo de bicapa lipídica, dentro de la que se encuentran incrustadas moléculas de ergosterol.

Viven como saprófitos (descomponiendo restos de plantas y animales), como parásitos obligados o biótrofos (sólo pueden vivir y reproducirse en el hospedero), parásitos facultativos o hemibiótrofos (viven del hospedero, y se reproducen dentro del mismo aunque éste ya no esté vivo) patógenos, o simbioses (viviendo en asociación con otros organismo beneficiándose mutuamente) (Sullia y Shantharm, 1998). Se alimentan por absorción de los nutrientes luego de que las enzimas llamadas exodespolimerasas, rompen carbohidratos y proteínas presentes en los diversos alimentos.

Son organismos cosmopolitas que han colonizado una gran variedad de nichos ecológicos: se les encuentra en zonas con climas ecuatoriales, tropicales, subtropicales, templados, semidesérticos, desérticos y aún en los fríos, desde el nivel del mar hasta altitudes superiores a los 4000 metros (Herrera y Ulloa, 1990). Son de formas muy variables y adaptaciones muy versátiles que les permiten enfrentarse a las condiciones cambiantes del medio en el que viven (Isaac, 1992).

Los hongos son excelentes fábricas de metabolitos primarios y secundarios relevantes, es por esta razón que se les ha puesto una atención especial en la actualidad. Se consideran organismos de gran importancia en el mundo, no sólo por su rol vital dentro de los ecosistemas, sino también por su influencia en las actividades humanas (Mueller y Schmit, 2007).

### **3.4. Los hongos endófitos como fuente potencial de productos con actividad biológica y su importancia en la actualidad**

A través de la historia, los mayores productores de metabolitos secundarios han sido los hongos y los actinomicetos. Se han descrito aproximadamente 8600 compuestos bioactivos de hongos, de los cuales 4900 son antibióticos y 3700 presentan otras actividades (Ganguli y Deshmukh, 2007). En particular, los metabolitos aislados de hongos endófitos poseen una gran diversidad química, incluyendo esteroides, xantonas, fenoles, isocumarinas, derivados del perileno, quinonas, furandionas, terpenoides, depsipéptidos y citocalacinas; además los hongos son usados en varios procesos de la industria tales como la producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos, alcoholes, pigmentos, lípidos y glicolípidos; son extremadamente importantes para nuestra salud así como nuestra nutrición, y tienen un tremendo impacto económico (Shulz y Boyle, 2005; Adrio y Demain, 2003).

Desde que la penicilina fue aislada de *Penicillium notatum*, se ha iniciado una tarea en el descubrimiento de productos nuevos a partir de metabolitos microbianos. Alrededor del 60% de los nuevos fármacos durante el período de 1981-2002, tales como anti-cancerígenos, anti-migraña y agentes anti-hipertensivos son productos naturales o basados en productos naturales (Zhang *et al.*, 2006).

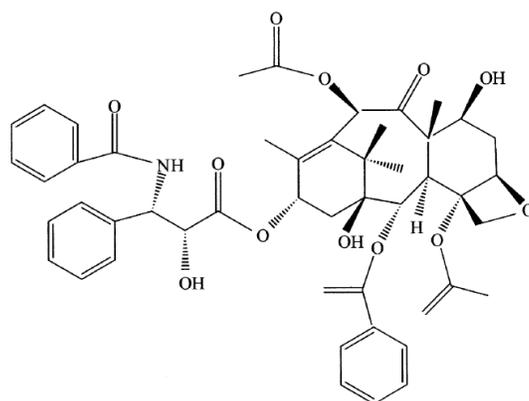
El mercado por áreas no farmacéuticas llegó a \$2 billones de dólares en el año 2000, en las que destacan: comida 45%, detergentes 34%, textiles 11%, pieles 3%, pulpa y papel 1.2% (Adrio y Demain, 2003). Por otra parte, considerando que 6 de 20 de los medicamentos más prescritos son de origen fúngico, y que aproximadamente sólo el 5% de los hongos han sido descritos, éstos representan un enorme potencial para la búsqueda de nuevos productos (Gloer, 1997; Hawksworth, 2001; Schulz *et al.*, 2002).

El estudio de los microorganismos endófitos ha recibido mucha atención debido a su indudable capacidad para generar productos naturales con potencial terapéutico (Kusari y Spiteller, 2011); esto se debe en parte a que durante su co-evolución junto con sus hospederas han llegado a adaptarse a sus micro ambientes por variación genética, y han desarrollado la habilidad bioquímica para producir compuestos similares o idénticos a aquéllos producidos por sus plantas hospederas como resultado de la recombinación génica al incluir el DNA de la planta dentro de su propio genoma (Photita *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo, no necesariamente dicha co-evolución conlleva a la producción del mismo compuesto (Kusari y Spiteller, 2011).

La búsqueda de nuevos productos para las industrias farmacéuticas y agroquímicas es un proceso constante que requiere optimización continua (Dreyfuss y Chapela, 1994). En este proceso es relevante considerar que: (1) los metabolitos secundarios que un hongo sintetiza corresponden con su nicho ecológico, y que (2) las interacciones metabólicas pueden mejorar la síntesis de dichos metabolitos secundarios (Schulz *et al.*, 2002). Estos compuestos de origen fúngico son ahora usados para varios fines, en su mayoría como antibióticos, aunque cabe recordar también que los inmunosupresores,

como la ciclosporina, revolucionaron la medicina facilitando los trasplantes de órganos.

Una molécula antitumoral resultado de un caso notable es el taxol (paclitaxel) (Figura 4), que fue primeramente aislado del árbol del tejo *Taxus brevifolia*, y luego se descubrió que también es producido por sus hongos endófitos *Taxomyces adreanae* y *Nodulosporium sylviforme*.



**Figura 4.** Fórmula química del Taxol o paclitaxel.

Actúa inhibiendo la división de células mamíferas cancerosas, promoviendo la polimerización de la tubulina e interfiriendo en la separación normal durante la división celular; también sirve como antifúngico por el mismo mecanismo, y es usado en contra de cáncer de mama y formas avanzadas del Sarcoma de Kaposi (Demain y Sánchez, 2009). El taxol fue el primer fármaco anticarcinogénico que llegó al billón de dólares por su consumo, y su producción microbiana eliminó la necesidad de aislarlo a partir de los árboles de lento crecimiento (Strobel, 2003).

Strobel *et al* (2004) proponen la siguiente estrategia de selección de hospederos:

- Plantas que habitan ambientes únicos, especialmente aquéllos con una biología inusual y que poseen estrategias de supervivencia novedosas.
- Plantas con historia etnobotánica (usada por indígenas).
- Plantas endémicas que suelen tener una longevidad inusual o que han ocupado ciertas masas de tierra desde la antigüedad.
- Plantas que crecen en áreas de gran biodiversidad, las cuales pueden alojar endófitos igualmente biodiversos.

Además de estas propuestas, con las cuales concuerdan Kusari y Spiteller (2011) agregan una más; aquellas plantas que además de endémicas pueden estar amenazadas, de las cuales es importante establecer las interacciones endófito-planta.

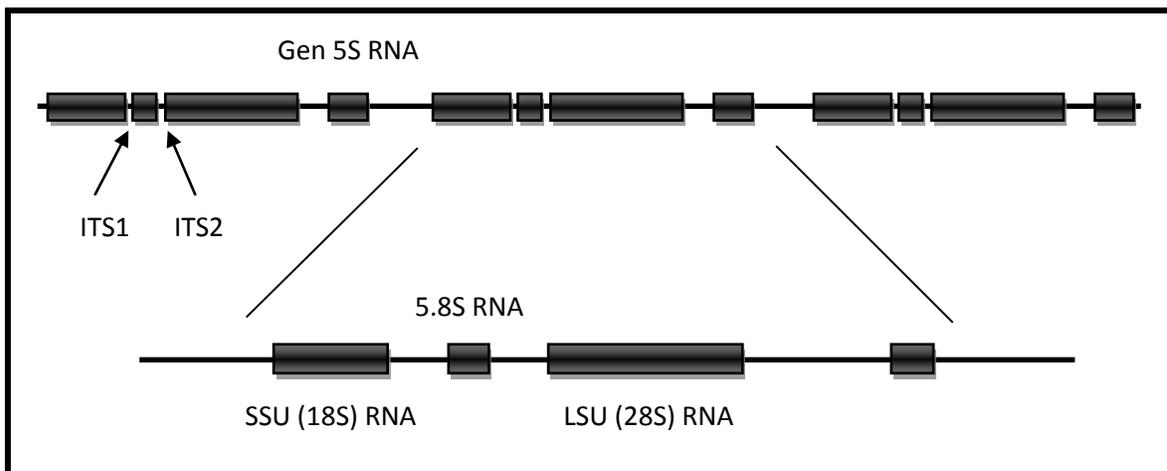
Uno de los principales problemas que enfrentan los endófitos es la rápida desaparición de los bosques tropicales, los cuales albergan el recurso más grande de obtención de microorganismos y sus productos. En el presente, se estima que solamente un 40-50% de los bosques que existían hace 1000-2000 años, permanecen en la actualidad. Así que, cuando desaparezca una especie de planta, así lo hará un complejo entero de endófitos asociados (Strobel, 2003).

### **3.5. La región 5.8S del DNAr como elemento para la identificación de hongos**

La identificación de los hongos puede considerarse "sencilla" debido a que poseen una morfología característica, sin embargo la identificación morfológica puede complementarse con un estudio de su DNA ribosomal (DNAr).

Los ribosomas de las células eucariontes contienen 2 especies de RNA de bajo peso molecular: la 5S y la 5.8S (160 pb), ambas especies son componentes estructurales de la subunidad 60S. (Rubin, 1972).

La unidad transcripcional está compuesta por unidades repetidas en tándem codificantes: 18S (SSU), 5.8S y 28S (LSU), y no codificantes (ITS1 y ITS2) que se encuentran entre dichas secuencias y espaciadores intergénicos (IGS) (Figura 5) (Ferrer *et al.*, 2001; Chandra Nayaka, 2011).



**Figura 5.** Región 5.8S junto con los ITS1 e ITS2, delimitado por 18S (SSU) y 28S (LSU).

Las secuencias del DNAr de la sub-unidad pequeña evolucionan relativamente lento y es útil para relacionar organismos distantes, mientras que los genes del RNAr mitocondrial cambian un poco más rápido y pueden ser de ayuda para llegar a establecer orden o familia. Por último, las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS) y las unidades repetidas de los espaciadores intergénicos (IGS) del RNAr evolucionan aún más rápido, variando entre las especies o géneros (White *et al.*, 1990).

#### **4. HIPÓTESIS**

La historia etnobotánica así como el hábitat del árbol *Magnolia dealbata* Zucc., apoyan la existencia de hongos endófitos con capacidad antimicrobiana.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de actividad antimicrobiana en hongos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc.

##### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Encontrar medios adecuados para el primo aislamiento, desarrollo y producción de antimicrobianos de los hongos aislados.
- Seleccionar hongos que inhiban el crecimiento de otros microorganismos.
- Identificación de algunas cepas fungales inhibidoras del crecimiento microbiano.

## 6. **MATERIALES**

### 6.1 **Cepas y su conservación**

Los hongos utilizados en este estudio fueron aislados de muestras de tejido vegetal tomadas por la M. en C. Silvia Margarita Guzmán Trampe, a partir de dos árboles de *Magnolia dealbata* Zucc. (Figura 6). Los árboles se encuentran localizados en las coordenadas



19° 21'05.9'' N y 97° 03'30.8''W ubicados entre las localidades de Ixhuacán de los Reyes y Coatepec, en el estado de Veracruz, Méx. a una altura aproximada de 1591 msnm (bosques de niebla). Las cepas una vez aisladas fueron conservadas a 4°C en medio sólido en cajas Petri y en tubo inclinado, y las esporas en SSI.

**Figura 6.** Fotografía de uno de los individuos del árbol *Magnolia dealbata* Zucc. utilizados en este estudio.

Las 4 cepas sensibles utilizadas en las pruebas de antibiosis abarcan un amplio espectro, como son la cepa Gram negativa *Escherichia coli*; las Gram positivas *Bacillus subtilis* ATCC 6633 además de *Micrococcus luteus*, y por último la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Las 4 cepas microbianas se sembraron cada 2 meses en NA (Nutrient Agar Difco) y posteriormente se guardaron en glicerol, como se dicta a continuación:

1. Preparar 50 mL del medio óptimo de crecimiento para cada microorganismo (YPD para *S. cerevisiae* y *B. subtilis*, LB para *E. coli*, y NB para *M. luteus*), e incubarlo durante 12-18 horas con agitación (180 rpm), a su temperatura respectiva.
2. Centrifugar a 8000 rpm con una temperatura de 4°C en una J2-MC Centrifuge (Beckman) con tubos de 50 mL, y decantar.
3. Resuspender en 5 mL de glicerol al 10%.
4. Hacer alícuotas de 500 µL en tubos de 1.5 mL (Eppendorf).
5. Congelar a -20°C en un refrigerador Cool-Lab Freezer.

Los medios probados en las fermentaciones fueron: Czapek Dox el cual es un medio químicamente definido para el cultivo de hongos capaces de utilizar al nitrato como única fuente de nitrógeno, el agar-Extracto de malta que es un medio rico, muy usado para el aislamiento de hongos saprófitos, el medio Lactosa-Extracto de Levadura que es un medio mínimo, y el Sabouraud que también es un medio rico al que se le variaron las fuentes de carbono y sus concentraciones (Apéndice 1).

## **7. MÉTODOS**

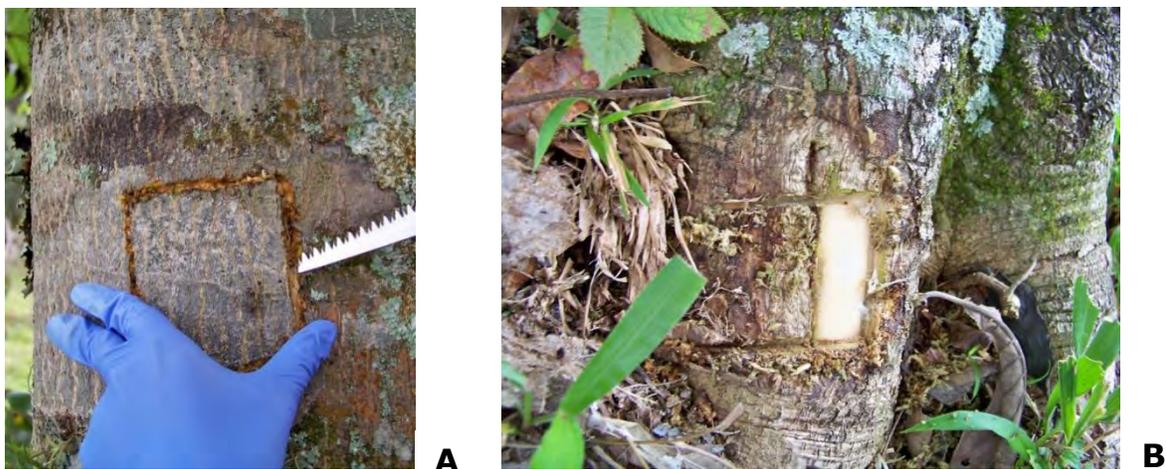
En el presente trabajo se hizo la búsqueda de cepas fúngicas que inhibieran el crecimiento de otros microorganismos; para ello se buscaron medios idóneos para que los hongos crecieran rápidamente, se realizaron fermentaciones y pruebas de antibiosis por difusión, así como la identificación de las cepas más relevantes.

### **7.1. Establecimiento de las condiciones óptimas para el crecimiento y la conservación de las cepas usadas**

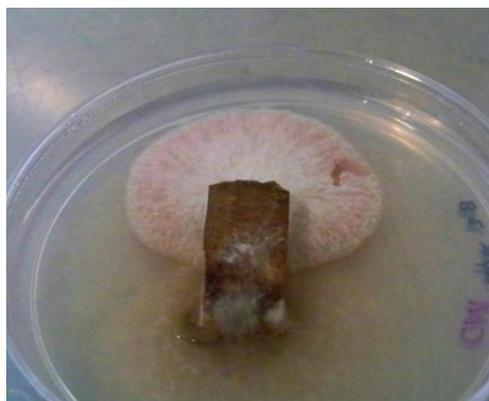
Con el fin de encontrar el medio más adecuado para la producción de compuestos con actividad biológica en fermentación sumergida, se probaron varios medios con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Así mismo, después de elegir el medio con mejor producción, se variaron las concentraciones de carbono. Para lo anterior, se inocularon matraces Erlenmeyer de 150-mL con 30 mL del medio a probar, más 10 perlas de vidrio para romper el micelio. Los matraces inoculados se incubaron a 29°C, 180 rpm durante 12 días, tomando muestras de 1 mL de cada matraz cada 3 días para probar su capacidad antibiótica.

### **7.2. Aislamiento de los hongos endófitos**

Las muestras tomadas de los árboles de *Magnolia dealbata* Zucc fueron fragmentos de corteza sanitizada (lavado con agua destilada y después con EtOH al 70%) o sin sanitizar, raíz, hojas, ramas y agua de los lavados de las mismas (Figura 7). Estas muestras sirvieron de inóculo para cajas con medio sólido Czapek adicionado con cloranfenicol (25 µg/mL), para el aislamiento selectivo de los hongos (Figura 8).



**Figura 7.** Fotografías de **A.** Corte de la corteza. **B.** Corte del floema del árbol *Magnolia dealbata* Zucc.



**Figura 8.** Fotografía de un ejemplo de cómo fueron colocadas las muestras de tejido vegetal sobre Medio Czapek con cloranfenicol.

### **7.3 Fermentaciones**

Cada serie de fermentaciones constó de 8-10 hongos. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de bafle alto de 250-mL con 50 mL de medio SD (Sabouraud Dextrose) con 0.5% de glucosa, pH de  $5.6 \pm 0.2$ . Estos matraces fueron inoculados con  $1 \times 10^8$  esporas/mL para posteriormente

ser incubados a 29°C y 180 rpm durante 13 días. Se tomaron muestras en esterilidad de 1 mL por duplicado en los días 3, 6, 9 y 13. Las muestras fueron centrifugadas a 13 000 rpm durante 10 minutos en un centrífuga para microtubos Centrifuge 5415 D (Eppendorf). Una vez centrifugadas las muestras se colocó el sobrenadante en otro tubo de 1.5 mL. Los sobrenadantes obtenidos fueron filtrados en membrana de 0.22 µM con un diámetro de 2.5 cm (Millipore). Posteriormente, un mililitro de cada uno de los filtrados fueron concentrados 10 veces en un SpeedVac Concentrator Savant ISS110 (Thermo Scientific). Los concentrados fueron almacenados a 20°C bajo cero, en un congelador Cool-Lab Freezer para ser usadas cuando se requiriera.

#### **7.4 Preparación de las cepas microbianas sensibles**

Antes de realizar las antibiosis fue necesario activar las cepas microbianas con las que se evaluaría la actividad inhibitoria producida por los hongos.

Dos días antes de la prueba de antibiosis por difusión, se realizaron pre-inóculos en matraces de 150-mL con 30 mL de medio NB (Nutrient Broth Difco) inoculándolos con una asada del microorganismo sensible crecido previamente en caja Petri. Los matraces fueron incubados durante 12-18 horas a 180 rpm a 37°C para las bacterias (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*) y a 29°C la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Se inocularon otros matraces de 150 mL con 30 mL de medio NB con 30 µL de los pre-inóculos, y se incubaron de 12-18 horas a 180 rpm a sus temperaturas respectivas. Estos segundos matraces contienen las cepas microbianas que serán utilizadas para las pruebas de antibiosis.

## 7.5 Determinación de la actividad antimicrobiana con pruebas de antibiosis por difusión

Las antibiosis se realizaron con las muestras obtenidas del punto 7.3. Para la determinación de actividad antimicrobiana se siguió el procedimiento que a continuación se describe:

1. Se prepararon tubos con 30 mL de medio NA para cada caja de antibiosis, los cuales fueron inoculados con 0.1% de la cepa microbiana a probar.
2. Se homogeneizaron agitando suavemente y se vaciaron en cajas Petri estériles.
3. Las muestras de las fermentaciones preparadas en el punto 7.3.1 se descongelaron para tomar de cada uno 25  $\mu\text{L}$  y colocarlos en sensidiscos de 6 mm.
4. Una vez que se han dejado absorber, se tomaron con pinzas esterilizadas y se colocaron cuidadosamente sobre el agar de las cajas previamente inoculadas con las cepas microbianas. Se hizo prueba de cada muestra de fermentación con cada una de las cepas sensibles (Figura 9).



**Figura 9.** Diagrama de la prueba de antibiosis. **A.** Caja Petri con sensidiscos saturados con muestras a probar. **B.** Halos de inhibición presentes contra la cepa sensible alrededor de los sensidiscos.

5. Una vez colocados los sensidiscos, se incubaron las cajas durante 12-18 horas a 37°C (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*) y a 29°C (*Saccharomyces cerevisiae*).
6. Pasado el tiempo de incubación, se verificaron las cajas para medir, en su caso los halos de inhibición y calcular sus dimensiones, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Diámetro total del halo (mm)} - 6 \text{ mm (sensidisco)}}{2} = \text{Radio del halo generado}$$

## **7.6 Caracterización de los hongos elegidos**

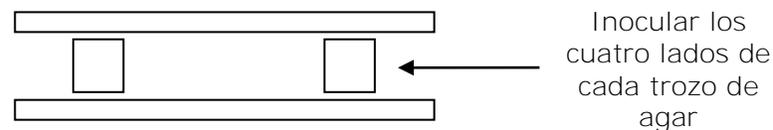
Con el fin de identificar a los hongos de trabajo se realizaron análisis de la morfología así como de crecimiento de los mismos.

### **7.6.1 Microcultivo**

Para analizar la micromorfología (el micelio y la estructura) de los 3 hongos seleccionados se realizaron microcultivos, como se indica a continuación:

1. Se cortaron cuadritos de medio SDA más 1% de glucosa, con unas dimensiones de aproximadamente 2 x 2 cm.
2. Se esterilizaron 2 portaobjetos y un triángulo de vidrio dentro de una caja Petri.
3. En esterilidad se colocaron 2 cuadros de SDA al 1% en los extremos de uno de los portaobjetos y se inocularon por contacto con uno de los hongos en las cuatro orillas de cada pedazo (Figura 10).

4. El otro portaobjeto se colocó encima, y el cultivo se dejó sobre el triángulo dentro de la caja.
5. La base interna de la caja fue tapizada con algodón y se humedeció con agua estéril, teniendo cuidado que el nivel del agua no tocara los portaobjetos, creando así una cámara húmeda para facilitar el crecimiento del hongo.
6. Se cubrió la caja con aluminio y se dejó incubar de 3 a 7 días a una temperatura de 29°C.
7. Pasado el tiempo de crecimiento, se desprendieron los cuadritos de agar con el hongo crecido, se colocó una gota de azul de algodón y se observó en el microscopio óptico.



**Figura 10.** Diagrama de la preparación de un microcultivo. La flecha señala la posición de los cuadritos de agar entre los portaobjetos dentro de la caja Petri.

## 7.7 Cosecha y cuantificación de esporas

Los conidios (esporas asexuales) son estructuras que el hongo utiliza para su reproducción, y como tal, son clave para su preservación; es por eso que para conservar al hongo es vital conservar sus esporas viables. Para lograr lo anterior se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se hicieron fermentaciones en un matraz Erlenmeyer de 250-mL con 50 mL de medio SD (0.5%) de cada hongo. Se inoculó el matraz con una asada del hongo crecido en caja Petri o con 500  $\mu$ L

de un cultivo anterior y se incubó a 29°C a 180 rpm durante 3 días.

2. Se tomó 1 mL de los cultivos anteriores y se inocularon de 3 a 5 matraces Erlenmeyer de 500-mL con 100 mL de PDA (Potato Dextrose Agar Bioxon) recién esterilizado.
3. Los matraces con el medio y el inóculo se homogeneizaron e incubaron posteriormente a 29°C de 7 a 10 días.
4. Una vez pasado el tiempo de incubación, se agregaron aproximadamente 20 mL de Tween 20 al 0.1% para recolectar las esporas. El contenido se agitó vigorosamente y se vaciaron en un tubo de 50 mL (Falcon). Esto se repitió una vez más para tener un mejor rendimiento en la cosecha (Figura 11).
5. Los volúmenes colectados fueron filtrados en trampas para esporas, con el fin de remover restos de micelio y pedazos de agar.
6. Para aumentar el rendimiento de conidios durante la filtración, se añadió más Tween 20 (0.1%) sobre las trampas.
7. Todos los filtrados obtenidos se recuperaron en un solo tubo de 50-mL y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos, después se decantó el sobrenadante.
8. El botón con conidios se resuspendió en suficiente SSI estéril (el volumen depende de la cantidad de conidios colectadas), evitando que la SSI forme conglomeraciones o que los conidios se adhieran al tubo.
9. Una vez obtenida la solución, se prepararon alícuotas de 1 mL en tubos de 1.5-mL y se almacenaron en refrigeración a 4°C (Thermo Scientific).

A partir de estas alícuotas se realizaron los experimentos posteriores de cinéticas de crecimiento, micro morfología u obtención de más esporas. Así mismo, se hizo un conteo de conidios viables.



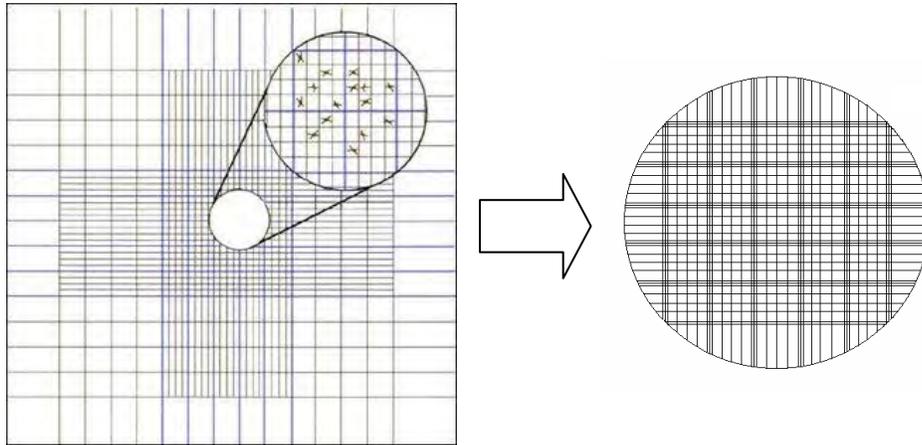
**Figura 11.** Recolección de esporas. Adición del Tween 20 (0.1%) al medio, en esterilidad.

Para el conteo fue necesario preparar diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) de 1 mL en SSI adicionado con Tween 20 al 0.1%. El conteo se realizó utilizando una cámara de Neubauer.

Para cuantificar se tomaron 10  $\mu$ L de cada dilución y se procedió a contar de acuerdo con la siguiente metodología:

1. Se colocaron los 10  $\mu$ L dentro de la cámara de Neubauer y se le cubrió con el cubreobjetos. Se puso cuidadosamente la cámara sobre la platina del microscopio óptico de campo claro PrimoStar (Weiss), se observó con el objetivo de 10x (Figura 12).
2. Debido al tamaño pequeño de los conidios, se contaron todas aquéllas dentro del cuadrante central. Se pueden contar todos los cuadros contenidos en dicho cuadrante siguiendo un orden específico evitando contar algún recuadro más de una vez, o se

pueden contar solamente 5 cuadros (los 4 de los extremos y el central). Este conteo se realizó con el objetivo de 40x.



**Figura 12.** Diagrama de la cámara de Neubauer. Ilustración en objetivo de 10x con el cuadrante central aumentado a 40x donde se realizó la cuenta.

3. El conteo se realizó por duplicado para luego hacer un promedio del conteo de conidios.
4. El cálculo de los conidios se hizo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\# \text{ esporas} / \text{mL} = \# \text{ esporas contadas} * 25 * \frac{1}{\text{dil}} * 10^4$$

Donde: **25** es el número total de cuadros dentro del cuadrante central, **10<sup>4</sup>** es un factor de corrección que corresponde al volumen ocupado en la cámara llevando el resultado a 1 mL de muestra

Esta cantidad de esporas calculada fue la concentración final del *stock* de glicerol, y siempre que se realizaron cinéticas de crecimiento se utilizaron a una concentración para el pre-inóculo de  $1 \times 10^8$  esporas.

### **7.8 Cinética de crecimiento y producción de compuestos con actividad biológica por parte de la cepa 28B**

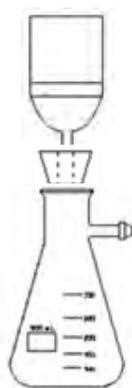
Como parte esencial dentro del estudio fisiológico se realizaron cinéticas de crecimiento de tres cepas de hongos para determinar la biomasa y pH durante su crecimiento, y así complementar su caracterización.

El procedimiento con el cual se realizó la cinética del hongo 28B fue el siguiente:

1. Se realizó un pre-inóculo en un matraz Erlenmeyer de bafle alto de 250-mL con 50 mL de medio SD (0.5%) que fue incubado a 29° y 180 rpm durante 3 días.
2. Pasado el tiempo de incubación se tomó 1 mL del pre-inóculo y se adicionó en matraces Erlenmeyer de bafle alto de 500-mL con 100 mL de medio SD al 0.5% por duplicado o triplicado.
3. Los matraces recién inoculados fueron incubados a 29°C con agitación de 180 rpm durante 7 días, y se tomaron alícuotas de 4 mL cada 24 horas.
4. El pH fue monitoreado diariamente con un Microprocessor pH Meter (HANNA Instruments).
5. La muestra tomada fue centrifugada a 13000 rpm durante 10 minutos colocando el sobrenadante en otro tubo de 1.5-mL.
6. El crecimiento fue seguido por medición de peso seco. Para ello, se pusieron a peso constante papeles filtro Whatman 1 en una mufla a 70°C.

7. Una vez que se tuvieron a peso constante, se filtraron las muestras sobre ellos utilizando un equipo Millipore y se volvieron a poner a peso constante. Una vez pesados, se determinó la biomasa por diferencia de peso. (Figura 13).

Para las pruebas de antibiosis se siguió el procedimiento señalado en el punto 7.2.1.



**Figura 13.** Sistema de filtración Millipore.

## **7.9 Identificación de 28B, 37BR y 37C**

Con el fin de saber que hongos estamos trabajando y si estamos obteniendo algún compuesto conocido es necesario identificar a los hongos seleccionados, para esto contamos con ciertas herramientas bioinformáticas que nos permiten, con cierto grado de confianza, determinar el género y en general la especie del hongo en cuestión; para ello, es necesario secuenciar la región 5.8S DNA ribosomal el cual nos facilita su reconocimiento, por lo que se debe primero obtener éste para las pruebas de biología molecular.

## 7.10 Aislamiento del DNA genómico

El aislamiento del DNA genómico del hongo es vital para todas las metodologías de biología molecular posteriores, así que se debe obtener en condiciones óptimas. Lo anterior se logra con extracciones con fenol-cloroformo y alcohol isoamílico a partir de micelio obtenido en su etapa de crecimiento exponencial, y tratado con el buffer TE, lisando así al microorganismo y permitiendo la rápida obtención del DNA, como se menciona en el anexo 2.

La obtención del material genético como tal es un paso de gran importancia, pero aún no se encuentra apto para ser usado por lo que debe ser también purificado, es decir libre de proteínas y de RNA (Anexo 2).

Una vez tratado, es necesario verificar que se haya obtenido DNA genómico puro y sin degradar, para ello se realizaron geles de agarosa al 0.8% (Anexo 2). En caso de que el DNA obtenido no esté degradado y ya se encuentre puro se puede proceder para usarlo en las pruebas de PCR.

Una vez aislado, purificado y analizado por gel de agarosa 0.8%, se determinó la concentración del DNA por espectrofotometría a 260 nm en un BioPhotometer plus (Eppendorf).

Dicha concentración se calcula con la siguiente ecuación:

$$[DNA] = Abs_{260} * \epsilon * \frac{1}{dil} = \mu g/mL$$

Donde:  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar (50  $\mu g/mL$ ).

## 7.11 Amplificación por PCR de la región del DNA ribosomal 5.8S

Para realizar la identificación de los hongos, se amplificó la región 5.8S DNAr y los espaciadores transcritos internos por PCR con un kit (BioTecMol) junto con *primers* universales para eucariontes: ITS1-F Fwd e ITS4-A Rev (Invitrogen):

ITS1-F: CTTGGTCATTTAAGAGGAAGTAA

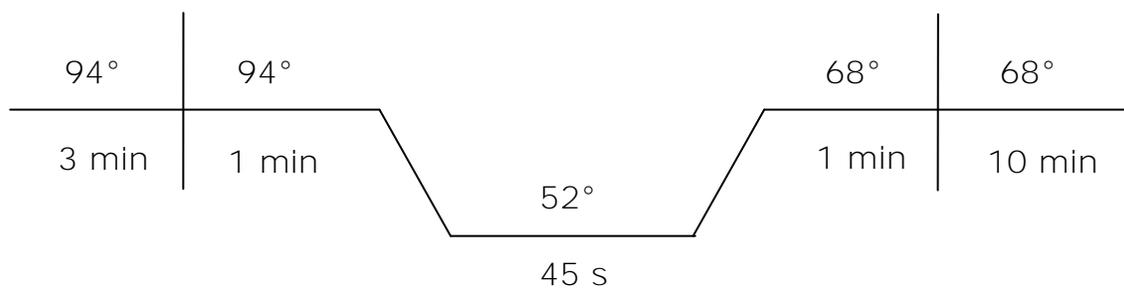
ITS4A: CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG

Para esta reacción se utilizó la siguiente mezcla de reacción, en el orden y con las cantidades usadas (Tabla 1):

Reactivo	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )		
	28B	37BR	37C
H <sub>2</sub> O	30	31	30.5
Buffer 10x	5	5	5
MgCl <sub>2</sub> [1.5 mM]	2.5	2.5	2.5
dNTPs [1.25 mM]	8	8	8
Primer Fwd [20pM]	1	1	1
Primer Rev [20pM]	1	1	1
DNA genómico [150 ng/ $\mu\text{L}$ ]	2	1*	1.4**
Amplificasa	0.5	0.5	0.5

**Tabla 1.** Reactivos usados para realizar el PCR. Las cepas amplificadas son los 3 hongos elegidos por su actividad antimicrobiana (28B, 37BR y 37C). \*Proviene de una dilución 1:2. \*\*Proviene de una dilución 1:5.

La reacción de PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos bajo las siguientes condiciones:



Para corroborar el producto de PCR esperado (600-800 pb) se corrió un gel de agarosa de los amplicones obtenidos.

Posteriormente, se escaló la PCR en mayor cantidad bajo las mismas condiciones, y los amplicones obtenidos fueron purificados de gel con el kit de extracción QIAEX II (catálogo No. 20051).

## **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **8.1 Aislamiento de los hongos**

Se sabe que plantas perennes que crecen en climas tropicales y/o subtropicales son hospederas de una gran variedad de endófitos, en comparación con aquéllas que crecen en áreas secas o frías (Strobel, 2003).

Por lo que en un inicio se partió de una colección de muestras de tejido de los árboles de *Magnolia dealbata* Zucc, de donde se obtuvo un total de 107 microorganismos: 52 hongos filamentosos, y 55 bacterias. Una parte de los organismos bacterianos resultantes, se encuentran dentro de la familia de *Pseudomonas*, de las cuales, 8 han presentado actividad antimicrobiana, y de éstas, 4 también poseen actividad citotóxica. Estos microorganismos se encuentran en estudio por la M. en C. Silvia Margarita Guzmán Trampe.

Además, también se han identificado a *Serratia marcescens* (efecto bactericida, actividad proteolítica, lítica, de DNasa, bacteriocinas y surfactante), y a *Bacillus weihenstephanensis* (Manterola, 2011).

Así que en este trabajo nos enfocamos en busca de hongos con actividad biológica de relevancia a partir de las cepas fúngicas encontradas (Tabla 2). El primer aislamiento se realizó en medio Czapek sólido más cloranfenicol y posteriormente todas se crecieron en SDA (1%), por picadura en el agar al centro de la caja Petri. Sin embargo, aunque se aislaron estas cepas, no fue aparente su capacidad antibiótica, por ello se decidió buscar los medios de cultivo que permitieran observar su producción de antimicrobianos. Para esta fase de búsqueda se utilizaron solamente 4 hongos: 35Cna, 35Cne, 43B y 39A.

<b>Origen</b>	<b>Caja</b>	<b>Número</b>	<b>Observaciones de morfología</b>
Fruto A.1	17	A-B	Crecimiento radial, micelio vegetativo negro punteado, micelio aéreo pardo, blanco en la orilla.
		Ac	Crecimiento radial, micelio vegetativo negro punteado, micelio aéreo pardo, blanco en la orilla, parece ser el mismo hongo que el anterior.
Corteza externa A.1	18	A1	Crecimiento radial, micelio vegetativo beige micelio aéreo café relativamente más oscuro con bordes irregulares.
		A2	Crecimiento radial e irregular, micelio vegetativo café oscuro, micelio aéreo café aún más pálido.
		A3	Crecimiento radial e invasivo, micelio vegetativo color crema y micelio aéreo blanco.
Hoja A.1	20	A	Crecimiento radial, limitado e irregular, micelio vegetativo color naranja ladrillo y micelio aéreo verde bandera.
Raíz s/s A.1	28	B	Crecimiento radial, regular y limitado, micelio vegetativo blanco y micelio aéreo con tonalidades de beige a verde a blanco de forma concéntrica y con gotas de exudado amarillo sobre la superficie.
Agua corteza A.1	31	A	Crecimiento irregular y limitado, tiene micelio vegetativo blanquecino, y micelio

			aéreo blanco levantado.
		A (b.a)	Crecimiento radial, limitado y regular, con micelio vegetativo blanco anillado, y micelio aéreo café amarillento con una cubierta blanquecina.
		A (c.a)	Crecimiento irregular y limitado, micelio vegetativo blanco y aéreo rosado crateriforme que rompe el agar.
Corteza externa. s/s A.1	33	E	Crecimiento radial invasivo, micelio aéreo color verde.
Hoja A.2	34	A	Crecimiento radial, micelio vegetativo blanco con centro naranja, micelio aéreo blanco.
		B	Crecimiento radial invasivo, micelio aéreo verde oscuro
Rama s/s. A.2	35	A	Crecimiento radial invasivo, blanco, algodonoso
		Av	Crecimiento irregular, limitado con micelio vegetativo blanco que produce un pigmento amarillo al medio, micelio aéreo con tonalidad entre café claro y verde.
		C	Crecimiento radial e ilimitado, micelio vegetativo blanquecino con punteado negro y orillas blancas, micelio aéreo blanco y ligero punteado.
		Cna	Crecimiento radial ilimitado, micelio

Agua raíz A.2			vegetativo naranja que libera su pigmento anaranjado al medio y micelio aéreo blanco.
		Cne	Crecimiento radial ilimitado, micelio aéreo y vegetativo de color blanco
		Negra 1	Crecimiento irregular y limitado, micelio vegetativo blanco y rugoso que rompe el agar, micelio aéreo blanco rugoso.
		E	Crecimiento radial e ilimitado, micelio vegetativo negro, y el aéreo va de negro a blanco en las orillas.
		E negra	Crecimiento radial e ilimitado, micelio vegetativo negro, y el aéreo va de negro a blanco en las orillas, parece ser el mismo hongo.
	36	A	Crecimiento limitado e irregular, con micelio vegetativo blanco que produce un ligero pigmento negro al medio, con micelio aéreo café blanquecino crateriforme.
		B	Crecimiento irregular y limitado, micelio vegetativo blanco y aéreo blanco que rompe el agar.
		D	Crecimiento radial ilimitado, colonia de bordes regulares, de color beige, parece bacteria o levadura.
		E	Crecimiento radial, limitado con micelio vegetativo color arena y rugoso, y micelio aéreo blanco a tonos amarillos en la orilla

Agua corteza A.1			con producción de gotas.
		F	Crecimiento radial, limitado con micelio vegetativo rugoso color durazno, y micelio aéreo blanco, rugoso y poco abundante.
	37	A	Crecimiento radial, limitado y regular con micelio vegetativo que produce un pigmento rojizo a todo el medio, y micelio aéreo café con orillas más claras.
		B	Crecimiento radial, limitado y regular, micelio vegetativo blanco, micelio aéreo blanco algodonoso.
		Bl	Crecimiento radial, limitado y regular con micelio vegetativo que produce un pigmento rojizo a todo el medio, y micelio aéreo café con orillas más claras.
		BR	Crecimiento radial, regular y limitado, micelio vegetativo amarillo que produce un pigmento amarillo tenue al medio, micelio aéreo con tonalidades amarillas, rosas y cafés de forma anillada, y con gotas de exudado amarillo sobre la superficie.
		BN	Crecimiento radial, regular y limitado, micelio vegetativo amarillo que produce un pigmento amarillo al medio, micelio aéreo blanco amarillento.
		Bnegra2	Crecimiento radial, regular y limitado, con micelio vegetativo blanco que libera un

			pigmento amarillo, y su micelio aéreo verde obscuro que se torna negro y orillas blancas
		C	Crecimiento radial limitado y regular, de micelio vegetativo blanco que produce un pigmento rojizo al medio, y micelio aéreo blanco algodonoso, ralo y limoso en el centro.
		C	Crecimiento radial limitado y regular, de micelio vegetativo blanco, micelio aéreo blanco seco.
		N	Crecimiento radial limitado, colonia plana, de color blanco y duro al tacto, semejante a bacteria o levadura.
		Negra 1	Crecimiento irregular, limitado con micelio vegetativo que produce un pigmento amarillo tenue y micelio aéreo de color amarillo-verde-blanco en anillos.
Corteza A. 1	38	A blanco	Crecimiento radial, regular, limitado, con micelio vegetativo rugoso rojizo que libera un pigmento café al medio, y micelio aéreo rosado.
		A café	Crecimiento radial, regular y limitado, con micelio vegetativo durazno y rugoso, micelio aéreo crateriforme con tonalidades verdes a blanco.
Tronco delgado A. 1	39	A*	Crecimiento radial limitado y regular, con micelio vegetativo negro y su micelio aéreo también negro y elevado.

		A negra	Crecimiento radial, regular y limitado, micelio vegetativo blanco que libera un pigmento amarillo al medio, y con micelio aéreo verde oscuro que se torna negro con orillas blancas.
		A rosa	Crecimiento radial, regular y limitado, micelio vegetativo blanco que libera un pigmento amarillo al medio, y con micelio aéreo verde oscuro que se torna negro con orillas blancas, parece ser el mismo hongo.
		Ar	Crecimiento radial, regular y limitado, micelio vegetativo negro que libera un pigmento al medio de color café tenue y micelio aéreo seco, con punteado negro.
		B BI	Crecimiento radial, irregular ilimitado, su micelio vegetativo es rojizo opaco, blanco en la orillas y libera un pigmento naranja al medio, y micelio aéreo blanco con café.
Rama A.2	42	A	Crecimiento radial, ilimitado y regular, micelio vegetativo blanquecino con puntos negros, y su micelio aéreo gris con orillas blancas.
		B	Crecimiento radial, ilimitado y regular, micelio vegetativo blanquecino con puntos negros, y su micelio aéreo gris con orillas blancas, parece ser el mismo hongo.
Agua	43	A	Hongo blanco, crecimiento abundante,

corteza A. 2		B Crecimiento radial, limitado y regular, con micelio vegetativo blanco y micelio aéreo verde con orillas blancas.
--------------	--	---

**Tabla 2.** Hongos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. Morfología macroscópica.

La optimización de las condiciones de crecimiento de los endófitos, es un reto de prueba y error, como lo aclaran Zhang *et al.* (2006), y así fue en un inicio, ya que se buscó un medio adecuado donde crecieran rápidamente los hongos, y que adicionalmente permitiera observar actividad antimicrobiana. El medio que cumplió con estos criterios fue el Sabouraud Dextrosa (0.5%), porque favoreció el crecimiento del hongo en pocos días, y le permitió la entrada a la fase de producción o idiofase al poco tiempo de iniciada la fermentación. Esto debido a la escasez del alimento preferencial, lo que conlleva a la producción de compuestos de interés; aunque la glucosa es una excelente fuente de carbono para el crecimiento, frecuentemente interfiere con la formación de metabolitos secundarios (Adrio y Demain, 2003).

Una vez que se determinó el medio ideal para la búsqueda de la actividad antimicrobiana, se dividió el *stock* de las cajas Petri en 5 series para poder evaluar los microorganismos contenidos en las mismas. De las cajas almacenadas, se obtuvieron a veces más de un hongo de una sola caja, ya que la macro-morfología era diferente, así como el color o la superficie.

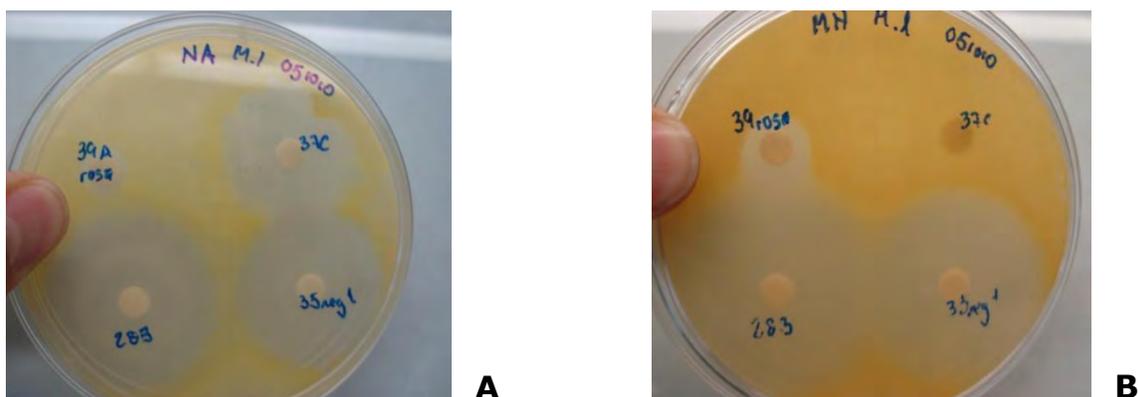
La nomenclatura de los hongos a evaluar radica en el número de caja al ser aislado y la letra siguiente corresponde a una secuencia dentro de una caja con más de un microorganismo. En aquellos casos en

los que la caja contaba con más de un hongo, se le colocó otra letra referente a su color u otra característica para diferenciarlo.

Las cepas de hongos 31A, 33B y 39BN no pudieron ser re-aisladas de las cajas originales en ningún medio probado, y por ello tampoco se les pudo hacer la prueba de antibiosis. Así mismo, las cepas 33E, 37N 35A, 43A, 34A, 34B, y 36D no crecieron en las fermentaciones preliminares por lo que tampoco se les determinó su posible capacidad antibiótica.

### 8.3 Pruebas de difusión en medio sólido

Antes de comenzar las antibiosis, se realizó una prueba para determinar el medio en el que se realizarían las pruebas de difusión para éstas, ya que se sugiere que se utilice el medio Mueller Hinton Agar (MHA) para este experimento (Matthew *et al.*, 2009).



**Figura 14.** Pruebas de difusión contra *Micrococcus luteus* con los extractos de los hongos 39A rosa, 37C, 28B y 35 negra1. **A.** en Agar Nutritivo. **B.** en Mueller Hinton Agar. Extractos de células crecidas en medio líquido Sabouraud Dextrosa (0.5 %).

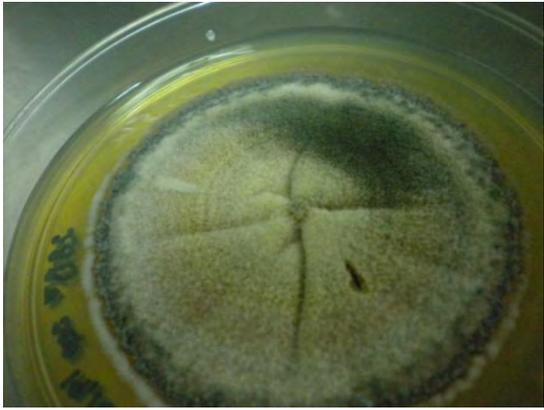
En este caso se analizaron los medios NA y MHA, donde finalmente el medio NA mostró mejor visibilidad de los halos y crecimiento de las cepas sensibles, por lo que se le estableció como medio ideal para las pruebas de antibiosis (Figura 14).

#### **8.4 Búsqueda preliminar de actividad antimicrobiana**

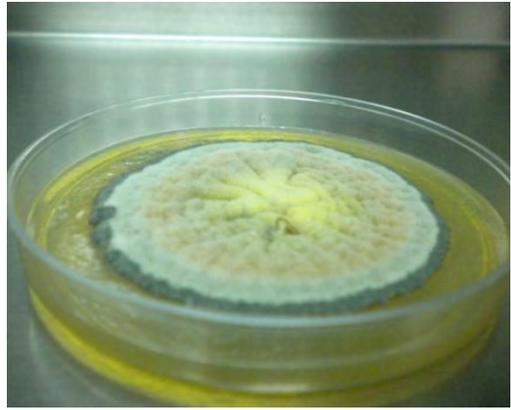
Para la determinación de la actividad antimicrobiana se utilizaron cepas Gram-positivas como *Micrococcus luteus*, y *Bacillus subtilis*, además de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*, en el caso de eucariontes, solamente se probó a *Saccharomyces cerevisiae*. Para inocular las cajas con las cepas sensibles, primero se probaron diversas técnicas, ya que se quería determinar la actividad antimicrobiana de la manera más rápida posible; se probó por estría, por plaqueado con varilla de vidrio, plaqueado con perlas de vidrio y con la cepa embebida en el medio de cultivo, siendo ésta última el método de elección por ser el más homogéneo y con menor manipulación en su preparación.

De los hongos aislados, al menos 11 resultaron con actividad antibiótica, como se muestra en la Tabla 3 y Figura 15.

Debido a que 28B y 37BR mostraron un espectro de inhibición más amplio que las demás cepas, fueron elegidas para su identificación. La cepa 37C también fue seleccionada para su identificación debido a que presentó una mayor actividad bacteriostática.



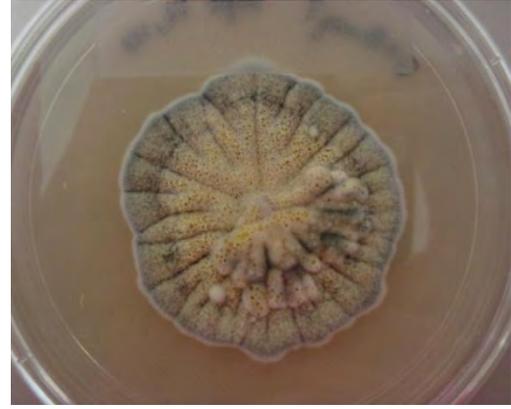
**A**



**B**



**C**



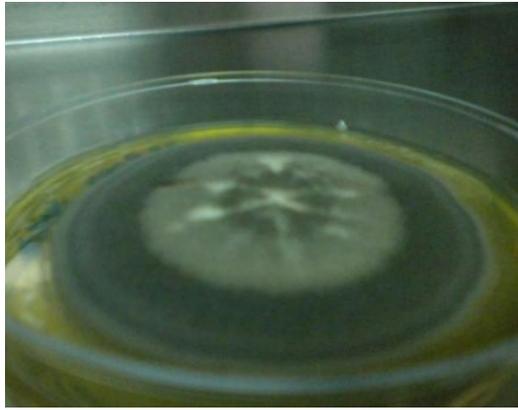
**D**



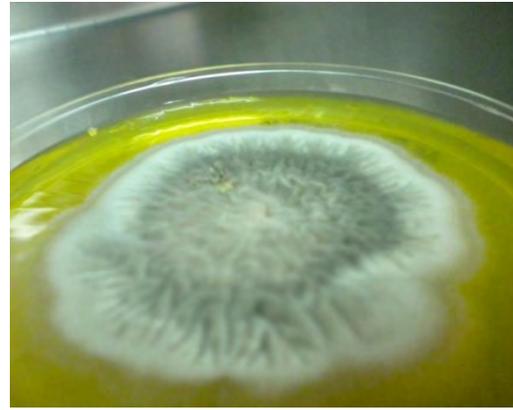
**E**



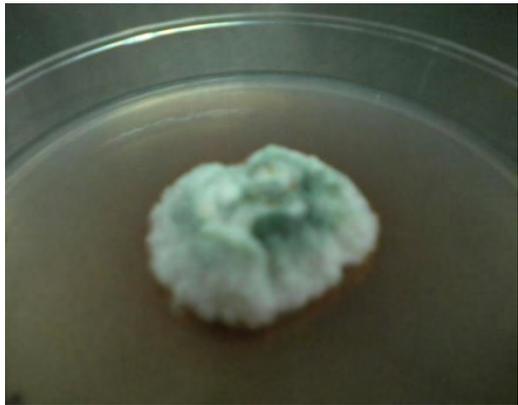
**F**



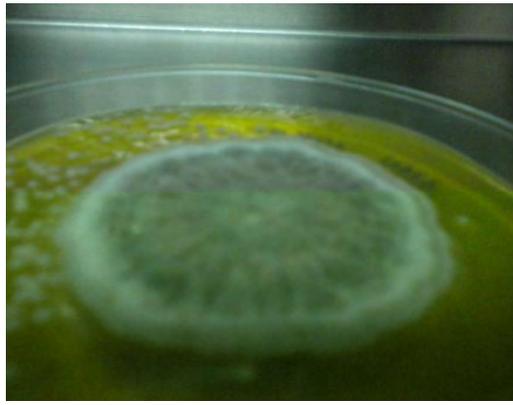
**G**



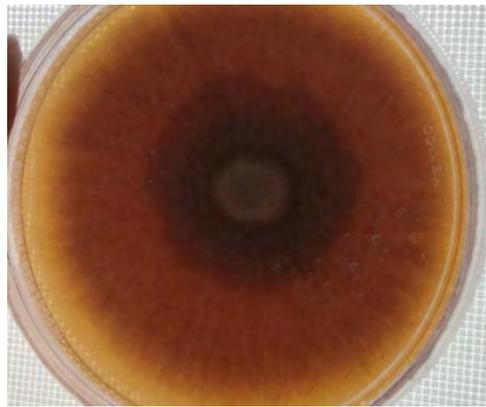
**H**



**I**



**J**



**K**

**Figura 15.** Fotografías de los 11 hongos que presentaron actividad antimicrobiana. **A.** Cepa 28B. **B.** 37BR. **C.** Cepa 43B. **D.** Cepa 37B negra2. **E.** Cepa 31A (b.a). **F.** Cepa 35 Negra1. **G.** Cepa 39A rosa. **H.** Cepa 35Av. **I.** Cepa 31A (c.a). **J.** Cepa 37BN. **K.** Cepa 37C. Cepas crecidas en medio Sabouraud Dextrosa Agar (2%).

Origen	Caja	Número
Raíz s/s A.1	28	B
Agua corteza A.1	31	A (b.a)
		A (c.a)
Rama s/s. A.2	35	Av
		Negra 1
Agua corteza A.1	37	BR
		BN
		B negra2
		C
Tronco delgado A.1	39	Arosa
Agua corteza A.2	43	B

**Tabla 3.** Las 11 cepas de hongos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. que mostraron actividad antimicrobiana contra las cepas Gram-positivas (*Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*).

Todos estos hongos inhibieron el crecimiento de las bacterias Gram-positivas (*Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* ATCC 6633), sobresaliendo los hongos 28B y 37BR que mostraron un efecto fungistático en contra de *Saccharomyces cerevisiae* y bacteriostático contra *Escherichia coli*. Sin embargo, después de varias resiembras de los hongos, esta última actividad ya no fue tan visible (Figura 16).

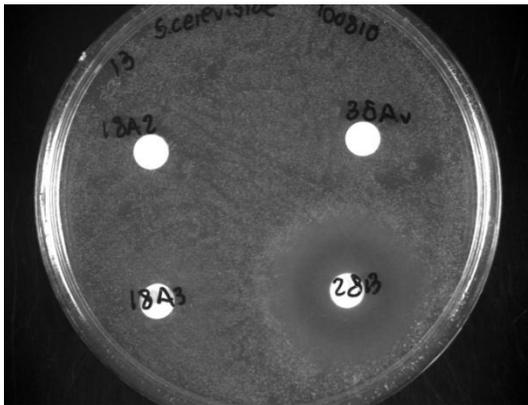
Las cepas 39A rosa y 39A negra presentaron el mismo patrón de antibiosis, misma morfología (macroscópica y microscópica) por lo que se determinó eran el mismo hongo.



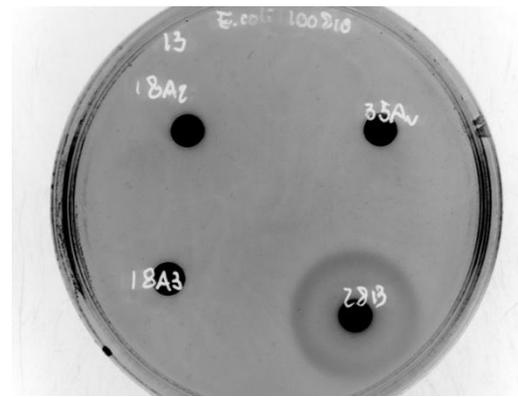
**A**



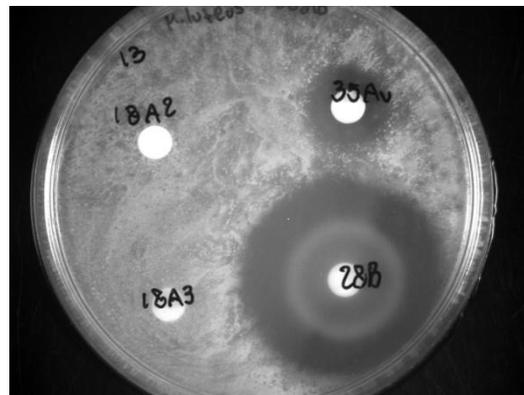
**B**



**C**



**D**

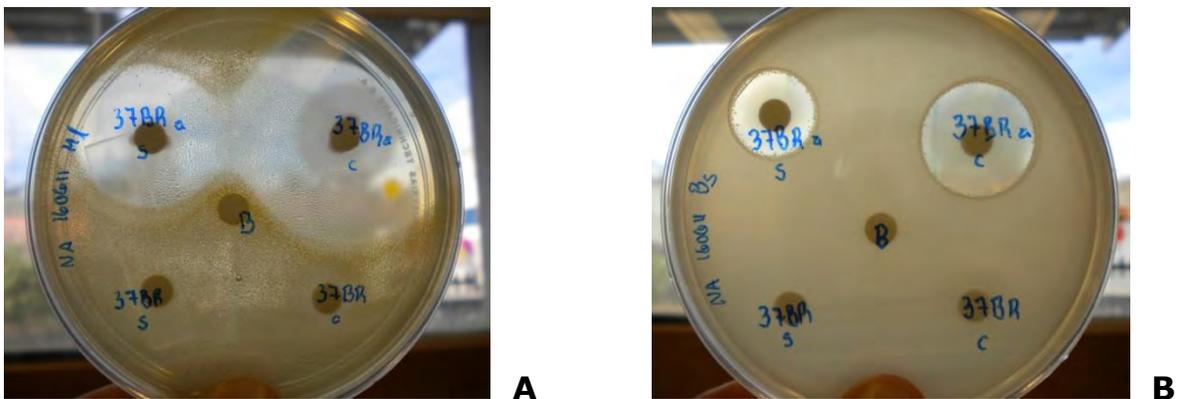


**E**

**Figura 16.** Pruebas de antibiosis donde se encontró actividad inhibitoria de los hongos 37BR, 37BN, 28B y 35Av contra las cepas sensibles. **A.** Inhibición de *Micrococcus luteus* con sobrenadantes de los días 4, 7 y 12 de la fermentación de 37BR **B.** Inhibición de *Micrococcus luteus* con sobrenadantes de los días 4, 7 y 12 de la fermentación de 37BN. **C.**

Inhibición de *Saccharomyces cerevisiae* con sobrenadante del día 13 de la fermentación de 28B. **D.** Inhibición de *Escherichia coli* con sobrenadante del día 13 de la fermentación de 28B. **E.** Inhibición de *Micrococcus luteus* con sobrenadante del día 13 de la fermentación de 28B y 35Av. Los hongos fueron crecidos en medio líquido Sabouraud Dextrosa (0.5 %).

Por otra parte, se comprobó que las cepas de hongos que habían presentado actividad inhibitoria, la perdían después de varias resiembras (Figura 17), Esto puede ser debido a que el microorganismo ya no se encuentra en estrés por las resiembras en medios ricos. Tan y Zou (2001) consideran en parte que la pérdida de actividad pueda deberse a que ahora el hongo no se encuentra amenazado por ningún motivo, no hay necesidad de competir contra algún otro microorganismo como sería si todavía se encontrara en su planta hospedera.

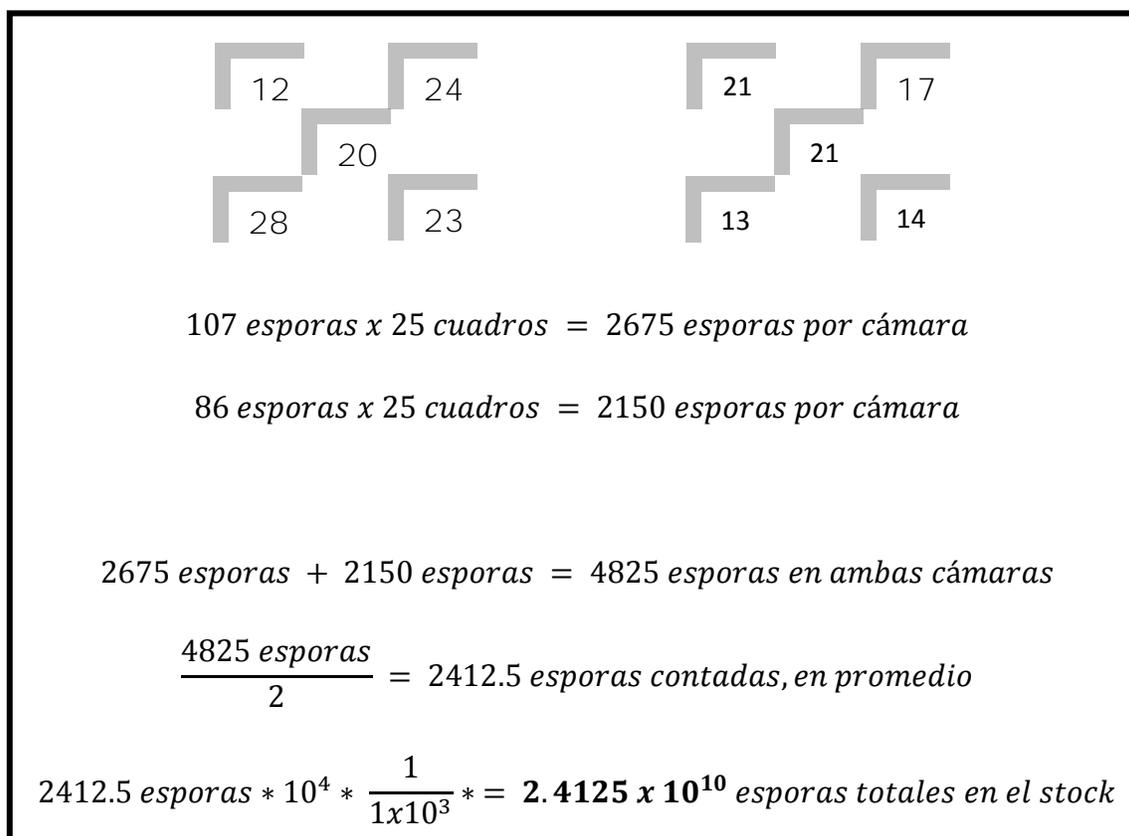


**Figura 17.** Antibiosis. Pruebas con el hongo 37BR mostrando su actividad (arriba) y sin actividad (abajo), **A.** a partir de una muestra concentrada y **B.** sin concentrar. Muestras obtenidas de células crecidas en medio líquido Sabouraud Dextrosa (0.5).

## 8.5 Recolección de esporas

Se recolectaron las esporas de los 11 hongos que mostraron alguna actividad antimicrobiana, pero sólo se cuantificaron los conidios de 28B, con el cual se realizaron cinéticas de crecimiento. Las esporas fueron cosechadas de medio Papa Dextrosa Agar (PDA).

Para su almacenamiento a 4°C se mantuvieron en SSI, pero para su conteo, se les adicionaba Tween 20 para disgregarla.



**Figura 18.** Ejemplo de cálculo del número de esporas del *stock* de la cepa 28B.

Al contar, utilizamos el criterio de solamente tomar en cuenta las esporas que se encontraran dentro del cuadrante y en las orillas izquierdas y superiores del mismo (Figura 18).

Este volumen fue utilizado en todas las cinéticas de crecimiento. Las esporas fueron conservadas en SSI a 4°C, aunque también podrían haberse mantenido en glicerol. Sin embargo, en los experimentos iniciales con los primeros 4 hongos probados se demostró que al ser conservados en glicerol tardaban más en reactivarse.

Una vez estimado el número de esporas contenidas en el *stock*, se realizó el cálculo para determinar el volumen de inóculo como se muestra a continuación:

$$\frac{\frac{1 \times 10^8 \text{ esporas}}{\text{mL}} * 1 \text{ mL}}{2.4125 \times 10^{10} \text{ esporas}} = 4.1450772 \times 10^{-3} \text{ mL} = 4.1 \mu\text{L}$$

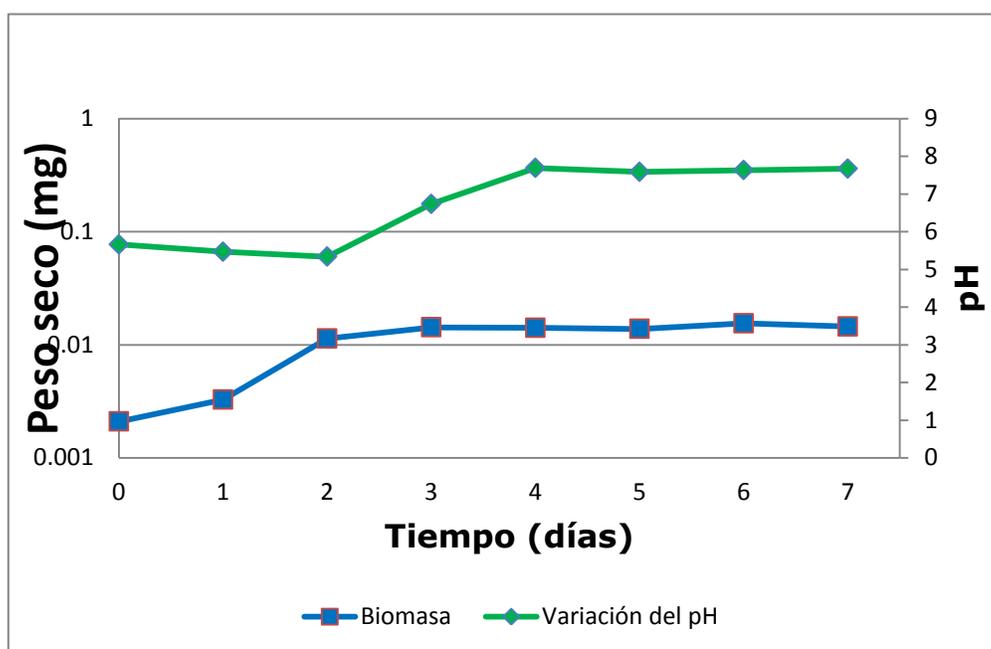
## **8.6 Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa 28B**

En las cinéticas realizadas se midió crecimiento, pH y producción de antibiótico.

Las fermentaciones deben realizarse usando condiciones controladas (Kusari y Spiteller, 2011), por ello se usaron 4  $\mu\text{L}$  del *stock* de conidios del hongo 28B para las cinéticas realizadas, ya sea por duplicado o triplicado, y se mantuvieron las condiciones de agitación, temperatura, así como inóculo siempre constantes.

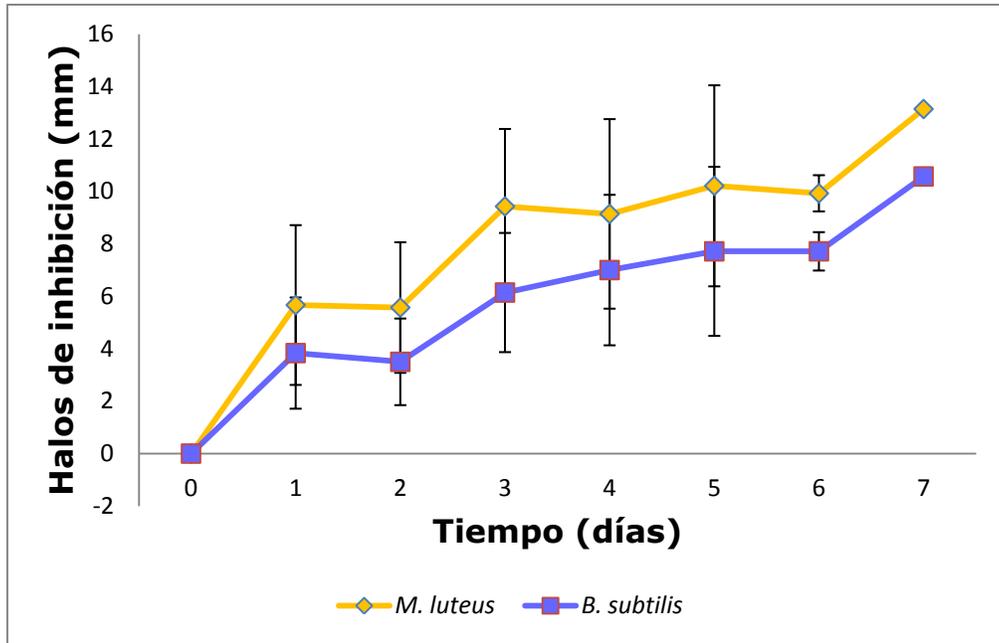
Debido a que en una fermentación anterior se determinó que a partir del séptimo día el hongo entraba en fase de muerte, se acortó la duración de la toma de muestra.

En la curva de pH se observa una ligera acidificación de medio hasta los 2 días, lo que puede deberse a que al inicio el hongo consume la glucosa del medio produciendo ácidos orgánicos; después de este tiempo, se incrementa el pH hasta alcanzar un valor de 7.5 al último día de la fermentación, ya que tras utilizar la glucosa, el hongo empieza a utilizar a la peptona, alcalinizando el medio. (Figura 19).

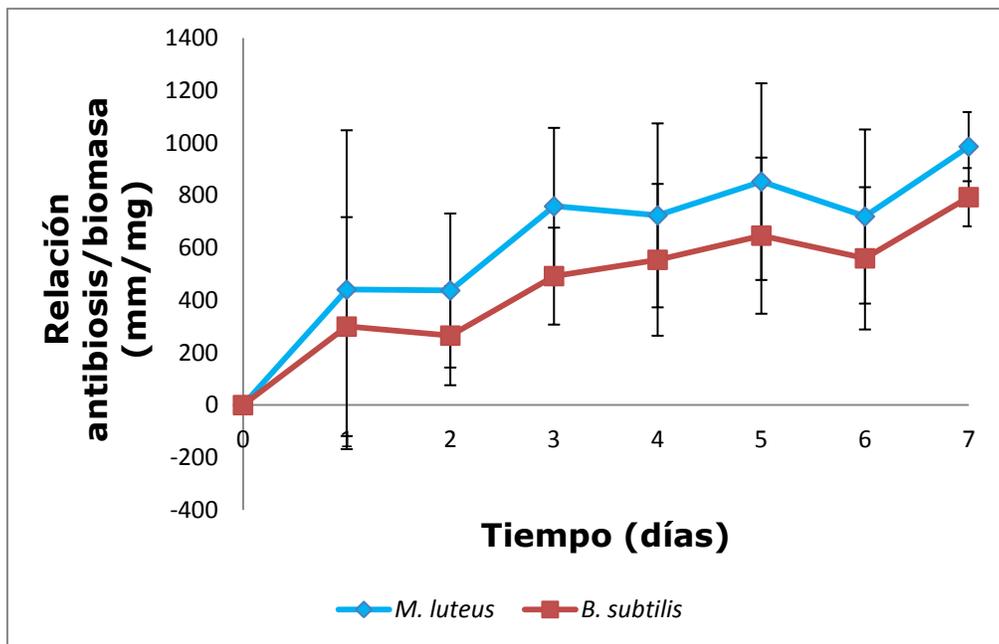


**Figura 19.** Cinética de pH y crecimiento del hongo 28B. El hongo se cultivó en medio Sabouraud dextrosa (0.5%), a 29°C, 180 rpm. La biomasa se determinó por peso seco.

El crecimiento del hongo alcanza la fase estacionaria al segundo día, lo que probablemente se relaciona con la utilización de la glucosa presente (Figura 19).



**Figura 20.** Actividad del hongo 28B contra las cepas sensibles Gram-positivas (*Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*).



**Figura 21.** Producción de metabolitos con actividad antimicrobiana contra las cepas sensibles Gram-positivas.

La producción de los metabolitos con actividad antimicrobiana es mínima en los dos primeros días, pero se incrementa notablemente después de la fase estacionaria de crecimiento (Figura 20). Es de hacer notar, que dichos compuestos no se degradan durante el experimento, que son extracelulares y estables a los niveles de pH alcanzados (Figura 21).

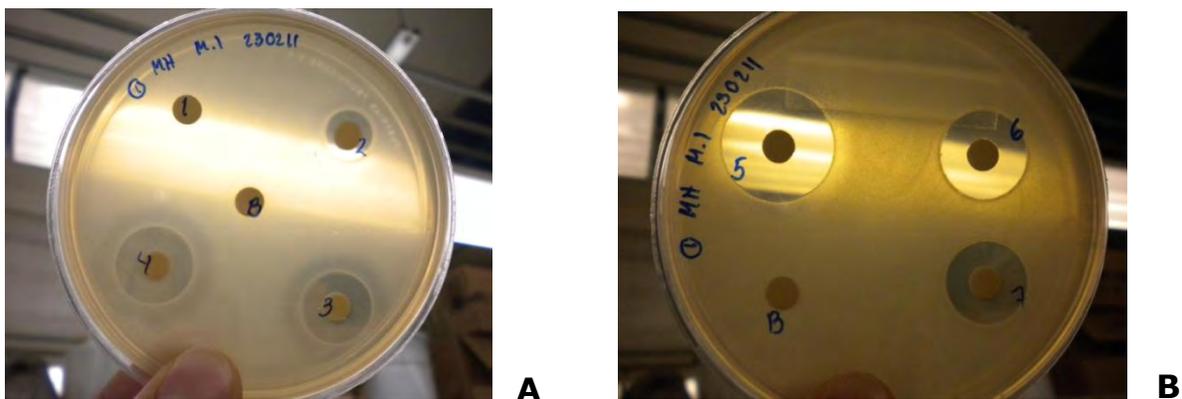
La producción de los metabolitos con actividad antimicrobiana es mínima en los dos primeros días, pero se incrementa notablemente después de la fase estacionaria de crecimiento (Figura 20). Es de hacer notar, que dichos compuestos no se degradan durante el experimento, que son extracelulares y estables a los niveles de pH alcanzados (Figura 21).

En las fermentaciones realizadas se obtenía un sobrenadante amarillo (Figura 22), pero cuando éste, aún concentrado era incoloro resultaba en un halo de inhibición de menor tamaño contra los Gram +, y era nulo contra las otras dos cepas sensibles.



**Figura 22.** Fotografía de una fermentación de 28B en matraz Erlenmeyer de 500-mL baffle alto con medio Sabouraud dextrosa al 0.5%, en el que se obtiene un sobrenadante amarillo.

Fue apreciable también que la bacteria de prueba *Micrococcus luteus* es más susceptible a los compuestos producidos, ya que se generan halos bactericidas de mayor tamaño (Figuras 23 y 24).



**Figura 23.** Antibiosis de los extractos diarios de 28B provenientes de la cinética por triplicado contra *Micrococcus luteus* con **A.** Días 1, 2, 3, 4 de la serie 1. **B.** Día 7 de las tres series. Extractos obtenidos en medio líquido Sabouraud dextrosa (0.5 %).



**Figura 24.** Antibiosis contra *Bacillus subtilis* con los extractos de 28B provenientes de los días 5, 6 y 7 de la cinética. Células crecidas en medio líquido Sabouraud dextrosa (0.5 %).

Luego de concentrar la muestra, en las cajas de antibiosis se observa un halo alrededor del sensidisco muy opaco, que se opalece aún más después de refrigerar, pareciera ser un precipitado de sales y/o compuestos contenidos en la alícuota que difunden muy poco en el agar.

Se realizó un Análisis de Varianza a los datos de las antibiosis para verificar si existía alguna diferencia significativa entre éstas; ya que si existiera tal diferencia, nuestros cálculos sobrepasarían la F establecida y nuestro trabajo experimental no sería fiable, lo que nos sugeriría que las condiciones, la manipulación o el experimento en sí no fuera adecuado por la falta de resultados consistentes.

Se trabajaron los datos bajo un valor crítico de 2.32, obtenido de una tabla estadística de distribución Fisher con 6 grados de libertad y 42 de error, con un grado de confianza de 95%, es decir, una alfa de 0.05.

Ho: las medias de las pruebas son iguales

H1: algunas medias son diferentes

Los datos que a continuación se presentan son los mm generados en los halos de inhibición durante las pruebas de antibiosis contra las cepas Gram-positivas, con éstos datos se calculó la ANOVA correspondiente para cada cepa bacteriana (Tablas 4 y 5).

Donde:

N: # de tratamientos totales

FV: fuente de variación

SS: suma de cuadrados

GL: grados de libertad

CM: cuadrado medio

Fc: Fisher calculado

<b>N</b>	49					
<b>Repeticiones</b>	7					
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
0	0	0	0	5.5	5.5	6
2.5	5	2.5	5	6	11.5	6.5
7	8	7	8	12.5	11	12.5
11.5	11	11.5	11	5	9	5
13	13	13	13	5.5	8.5	5.5
13	13	13	13	6	6	5.5
13	12.5	13	12.5	13.5	14.5	13

<b>FV</b>	<b>SS</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>
<b>Tratamiento</b>	17.19387755	6	2.865646259	0.139072301
<b>Error</b>	865.4285714	42	20.60544218	Se acepta Ho
<b>Total</b>	882.622449	48		

**Tabla 4.** ANOVA de los datos de antibiosis contra *Micrococcus luteus*.

<b>N</b>	49					
<b>Repeticiones</b>	7					
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
0	0	0	0	4	4	3.5
2	2	2	2	4.5	7.5	4.5
4.5	5.5	4.5	5.5	7.5	6.5	9
8.5	9	8.5	9	3.5	5.5	5
10	10	10	10	4	5	5
10.5	10	10.5	10	4	3.5	5.5
10.5	10	10.5	10	11	12	10

<b>FV</b>	<b>SS</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>
<b>Tratamiento</b>	7.48979592	6	1.24829932	0.09145278
<b>Error</b>	573.285714	42	13.6496599	Se acepta Ho
<b>Total</b>	580.77551	48		

**Tabla 5.** ANOVA de los datos de antibiosis contra *Bacillus subtilis*.

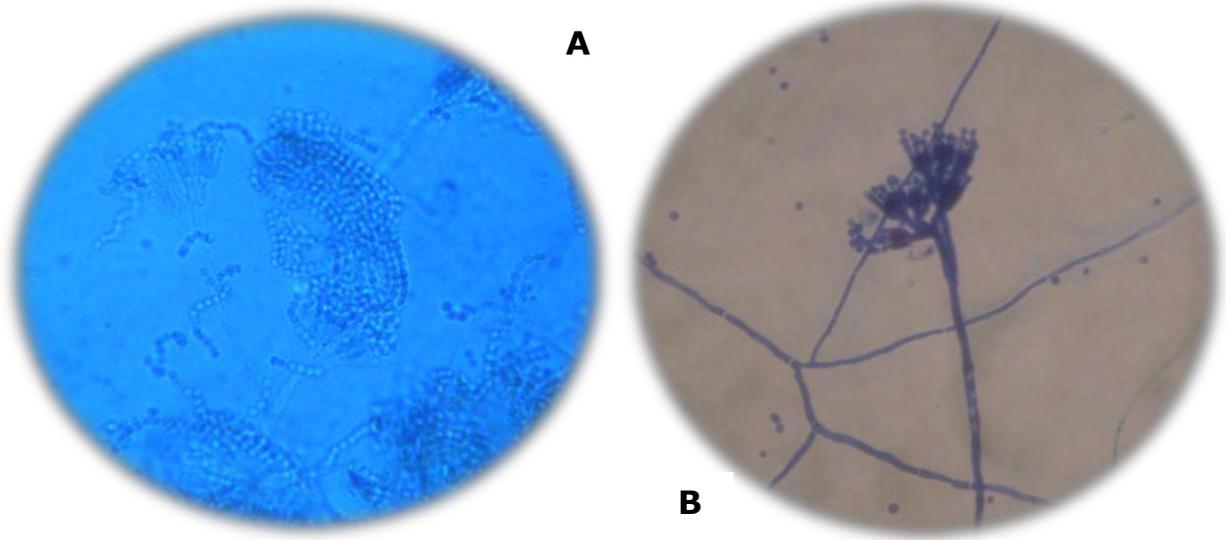
En ambos casos, las hipótesis nulas son aceptadas, lo que nos dice que no hay ninguna diferencia significativa en las diferentes pruebas de antibiosis realizadas durante las diferentes cinéticas de 28B.

Es decir, que los resultados de estas pruebas son confiables y reproducibles, siempre y cuando se mantengan las mismas condiciones y procedimientos.

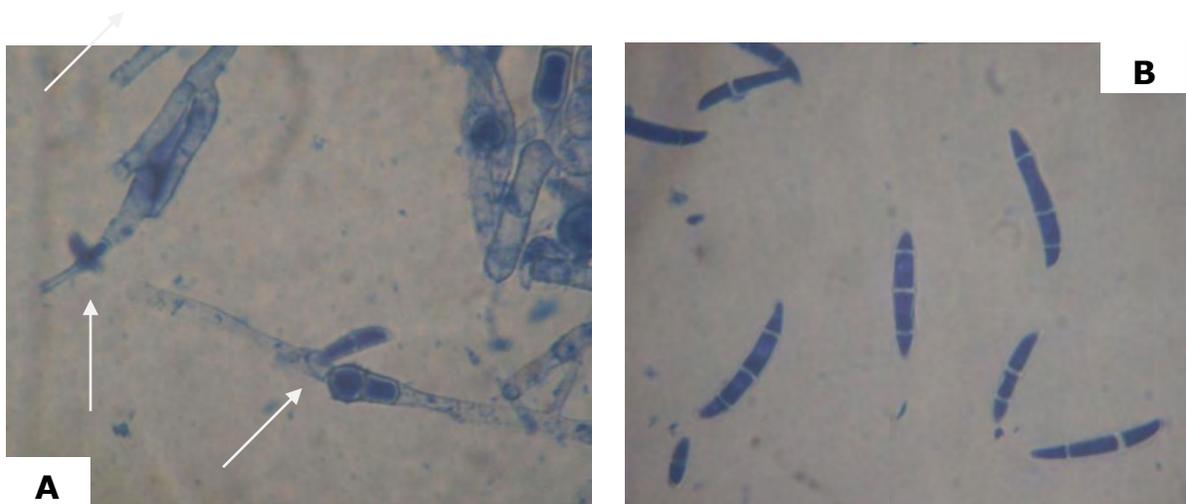
## **8.7 Micromorfología de 28B y 37C**

Aparte de las anotaciones morfológicas previas en SDA al 1%, también se revisó cómo eran las estructuras microscópicas de los hongos elegidos por medio del microcultivo: 28B (Figura 25) y 37C (Figura 26).

Para el caso de la cepa 28B se pudieron observar blastoconidios a lo largo del campo de visión, ya sea como parte de las estructuras fúngicas o dispersas, es muy distinguible el conidióforo con forma de fiálide, estructura típica del género *Penicillium*, con forma de "manita"; tiene un micelio macrosifonado, septado y hialino soportando las fiálides; lo cual concuerda con cualquier análisis morfológico de la especie que especifica al *P. chrysogenum* como un hongo filamentoso con conidióforos tabicados con metúlas finales y conidios elipsoidales verde-azules en el extremo de las fiálides (Webster, 1986; Carrillo, 2003).



**Figura 25.** Hongo 28B con tinción azul de algodón. **A.** En objetivo de 40x. **B.** En objetivo de 100x.



**Figura 26.** Hongo 37C observado en objetivo de 100x con tinción azul de algodón. **A.** Macroconidio junto a lo que parece ser una clamidoconidio. **B.** Macroconidios.

En la observación al microscopio de 37C se vieron macroconidios ligeramente curvas con 3 a 5 septos, pero gracias al microcultivo se pudieron apreciar las estructuras con mayor claridad, es decir, un

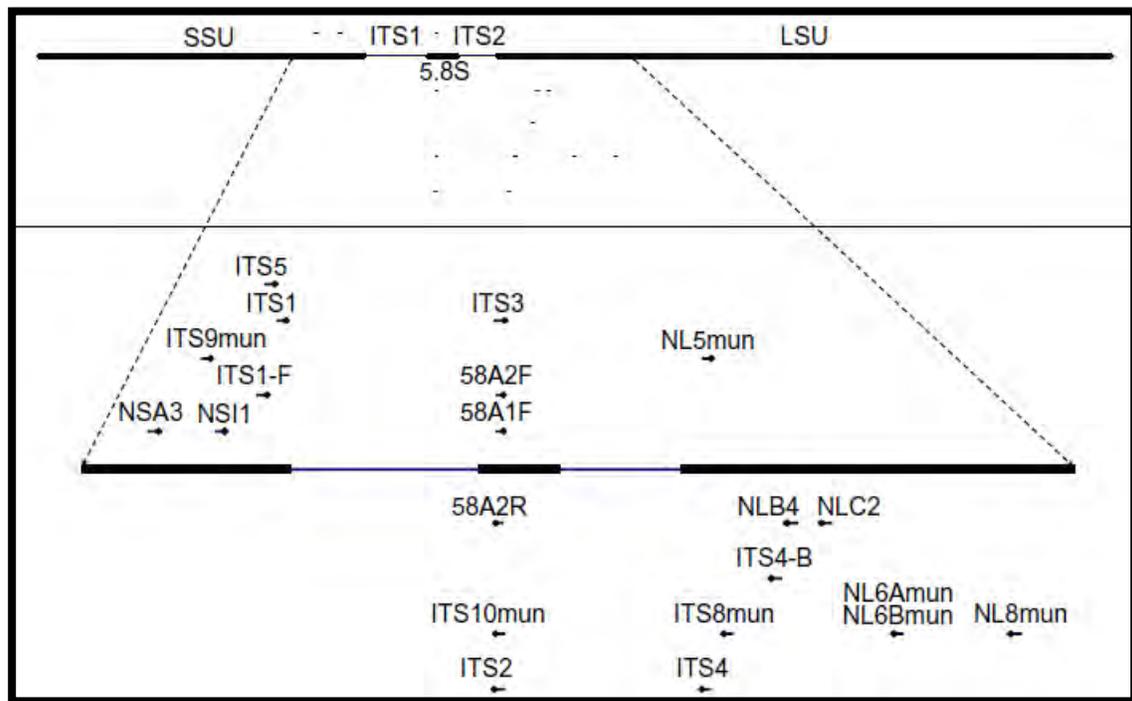
micelio hialino, macrosifonado y septado; lo que nos sugiere una similitud con la familia de *Fusarium*, la cual tiene macroconidios curvos e igualmente hialinos, pluriseptados con célula apical más o menos puntiaguda, y que también genera microconidios. Algunas especies producen clamidoconidios terminales, laterales o intercalares (Booth, 1971, Carrilo, 2003)

### **8.8 Identificación de los hongos 28B, 37BR y 37C utilizando el gen del RNAr 5.8S**

Como parte de la identificación de un hongo endófito, se complementa el estudio morfológico con la comparación de secuencias de DNAr 18S, 5.8S, o de los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) en las bases de datos en red como el NCBI y algunas otras más (Zhang *et al.*, 2006).

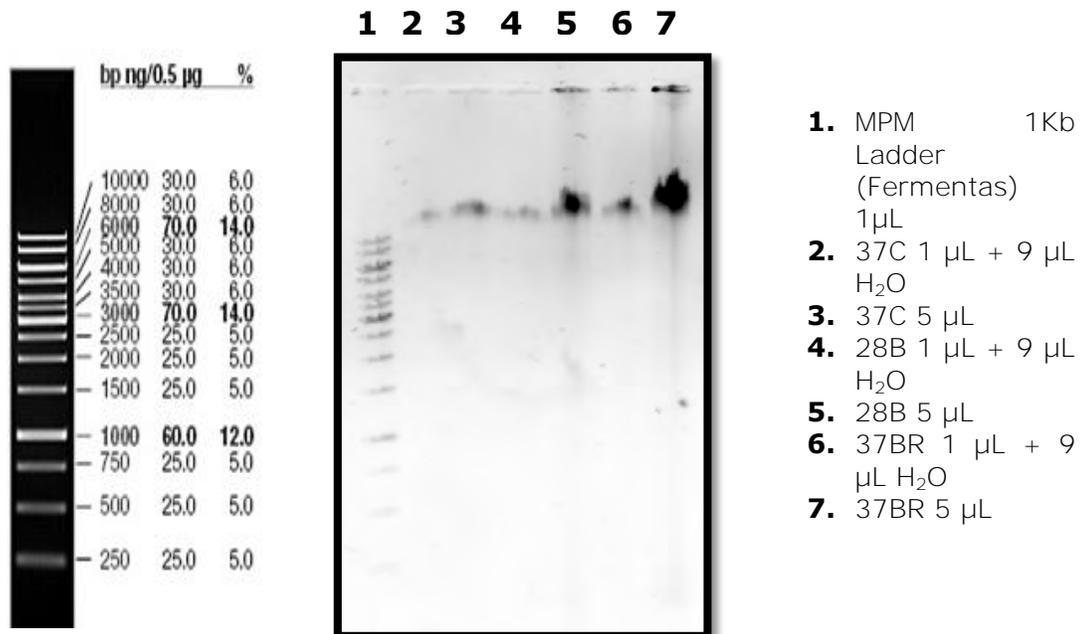
Los ITS son secuencias altamente variables de gran importancia en la identificación de especies fúngicas por análisis de PCR, (Martin y Rygiewicz, 2005). Es de ésta forma que se planteó la identificación de los hongos 28B, 37BR y 37C, para lo cual fue necesario aislar su DNA genómico (Figura 27). Luego de ser purificados se verificó si este DNA no se encontraba degradado por medio de geles de agarosa y usando de revelador al bromuro de etidio.

La naturaleza multicopia del DNAr hace que los ITS sean fáciles de amplificar a partir de muestras de DNA pequeñas, diluidas o degradadas (Larena *et al.*, 1999; Gardes y Bruns, 1993). Se utilizaron los *primers* ITS1F e ITS4A (Figura 28) porque amplifican las secuencias ITS1 e ITS2 colindantes de la secuencia codificante 5.8S y se sitúan entre la SSU y la LSU del operon ribosomal (Martin y Rygiewicz, 2005).

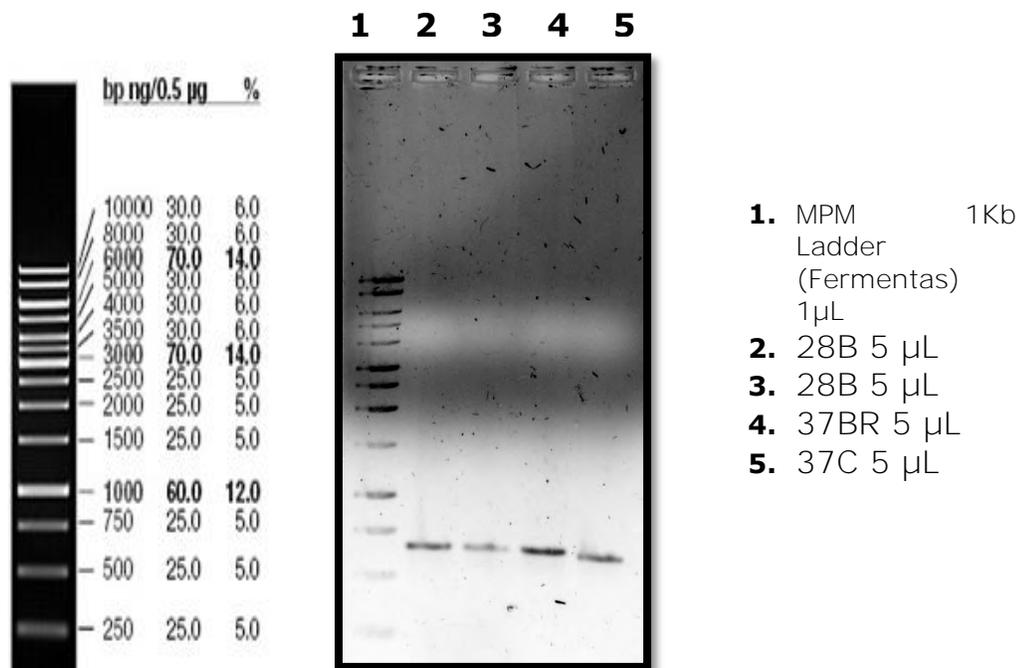


**Figura 28.** Diagrama de la localización de los *primers* en el clúster ribosomal consistente de DNAr: SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU (Martin y Rygielwicz, 2005).

El DNA genómico entero se puede apreciar porque no muestra signos de degradación en la parte inferior de su banda de corrimiento. Cuando el DNA obtenido se encuentra en condiciones óptimas puede ser utilizado para su amplificación por PCR (Figura 27). Los ITS en particular son un buen objetivo para un análisis filogenético en los hongos; como sabemos se ubican entre las áreas altamente conservadas de 18S, 5.8S y 28S, y ya que toda la región usualmente mide de 600-800 pb se esperaba ver bandas cercanas a esa región en el gel.



**Figura 27.** Gel de agarosa (0.8%) con DNA genómico de los hongos seleccionados.



**Figura 29.** Gel de agarosa (0.8%) con los productos de PCR de los hongos seleccionados.

Tras una PCR exitosa, y haber conseguido unos productos con el tamaño esperado éstos se purificaron y cuantificaron (Figura 29).

Luego de ser extraídos y cuantificados, los productos de PCR se enviaron a secuenciar a la compañía Laragen. Fueron éstas secuencias las que se introdujeron en el programa BLAST (Basic Local Alignment Tool), donde finalmente se confirmó que los hongos 37BR y 28B son el mismo hongo, *Penicillium chrysogenum*, mientras que el 37C resultó ser un *Fusarium* sp. (Tabla 6).

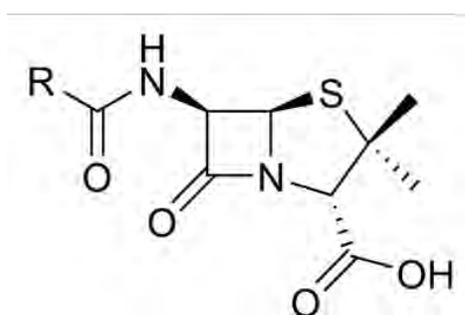
Hongo	Query Length	Description	Max Score	Query coverage	E value	Max ident
<b>28B</b>	431	<i>Penicillium chrysogenum</i>	767	100%	0.0	99%
<b>37C</b>	598	<i>Fusarium</i> sp.	1034	99%	0.0	98%
<b>37BR</b>	441	<i>Penicillium chrysogenum</i>	792	100%	0.0	99%

**Tabla 6.** Resultados de la comparación de secuencias de las muestras 28B, 37C y 37BR utilizando el programa BLAST.

Ambos organismos han sido ampliamente estudiados, en especial *Penicillium chrysogenum* respecto a la producción de la penicilina (Figura 30), compuesto antibiótico que actúa contra las bacterias Gram-positivas al interferir en la síntesis de la pared bacteriana inhibiendo la transpeptidasa, lo cual previene el entrecruzamiento o polimerización de

cadena de peptidoglicano, finalizando en paredes débiles y mal formadas, que, junto con la presión osmótica promueve la lisis, y por lo tanto la muerte de la célula bacteriana (Brock, 2009).

Además de la penicilina, en el género *Penicillium* se han encontrado diversos metabolitos secundarios, entre ellos el ácido ciclopiazónico, ácido secalónico D, ácido penicílico, clicloclorotina, citroviridina, citrinina, griseofulvina, ocratoxina A, patulina, penitrem A (Pitt y Hocking, 1997), rubratoxina B, chrisogina y roquefortina C, por mencionar algunos.



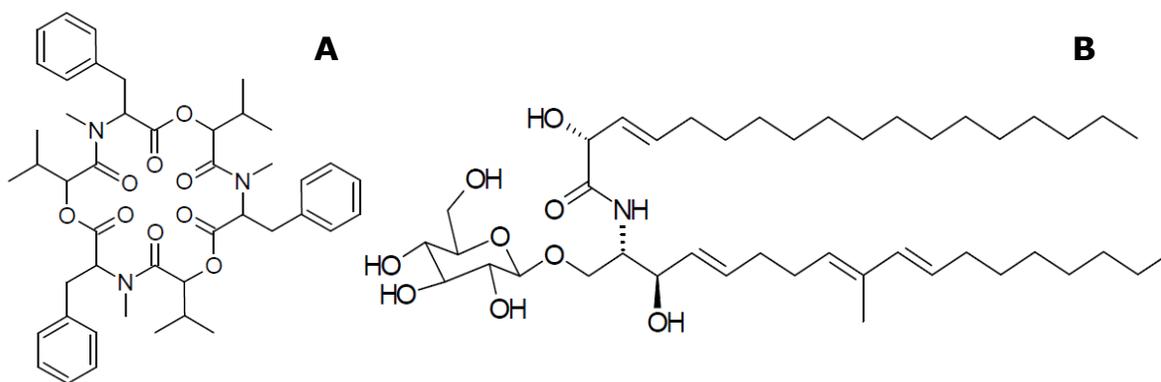
**Figura 30.** Estructura química de la penicilina. Compuesto  $\beta$ -lactámico producido por *Penicillium chrysogenum*

Por otra parte, el género *Fusarium* contiene especies consideradas fitopatógenas que causan daños de billones de dólares debido a la pérdida de cultivos, además de que producen metabolitos secundarios tóxicos y carcinogénicos que pueden ser razón de infecciones oportunistas, especialmente en humanos inmunocomprometidos (Leslie y Summerell, 2006).

Aún cuando se podría trabajar con el *Fusarium* sp. obtenido en el presente proyecto, la producción de los compuestos de efectos nocivos o de riesgo (hiperestrogénicos, cardiotóxicos o carcinogénicos) limitan

dicha posibilidad. Tal es el caso de los tricotecenos (toxina T-2 y HT-2, Desoxinivalenol tipo B) que poseen una termoestabilidad notable, ya que luego de 30 minutos a 150°C se degrada solamente un 10% de la toxina T-2 (hemorrágico) (Carrillo, 2003).

Entre los metabolitos mencionados destacan las micotoxinas, pero también se conoce que producen compuestos de beneficio humano; tales como la beauvericina que funciona como insecticida y tiene una actividad antibacteriana relevante (Figura 31.A) (Carrillo, 2003), el cerebrósido y la fusarusida que también actúan contra algunas bacterias e inhiben la xantina oxidasa (Figura 31.B) (Shu, 2004), o el subglutinol que es un inmunosupresor, el pentacétido CR377 que inhibe a *Candida albicans* (Tan y Zou, 2001), el ácido fusárico que igual tiene actividad antibacteriana con cierta toxicidad en mamíferos (Bacon y Yates, 2006), y la vincristina que es un anticancerígeno (Gunatilaka, 2006), por mencionar algunos.



**Figura 31.** Estructuras químicas de los compuestos producidos por el género *Fusarium*. **A.** Beauvericina. **B.** Fusarusida.

Podemos asegurar que los hongos endófitos son una buena fuente de metabolitos secundarios, y su búsqueda no es una simple caminata azarosa a través de un bosque cualquiera como dirían Schulz *et al.*, (2002).

Aunque hay grandes problemas que aminoran el acervo endofítico existente, también hay soluciones; por lo que estoy de acuerdo con Strobel (2003), el cual propone que los países necesitan establecer bases de información acerca de su biodiversidad al mismo tiempo que se hacen colecciones de microorganismos que habiten en estas áreas.

## **9. CONCLUSIONES**

Sí se encontró actividad antibiótica por parte de algunos hongos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. Inicialmente se aislaron 45 hongos filamentosos, de los cuales 11 presentaron dicha actividad antimicrobiana al menos contra Gram-positivos, y al final se eligieron para su identificación solamente 3: las cepas 28B, 37BR y 37C, por su actividad inhibitoria.

Se determinó por amplificación de la región 5.8S y BLAST que 28B y 37BR son el mismo hongo: *Penicillium chrysogenum.*, y además se identificó al hongo 37C como *Fusarium* sp.

## **10. PERSPECTIVAS**

- La identificación de los hongos restantes que presentaron actividad antimicrobiana por amplificación de la región 5.8S del DNA ribosomal.
- Optimización del medio de cultivo realizando un diseño experimental.
- Realizar una comparación de la acción antitumoral de los compuestos producidos por *Magnolia dealbata* Zucc. (magnolol y honokiol) con los extractos de los hongos probados.
- Separar y purificar los compuestos causantes de los efectos antibióticos y antitumorales.
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios previamente separados.

## **11. REFERENCIAS**

- 1) **Adrio, L. J. y Demain, L. A.** 2003. Fungal biotechnology. *Int Microbiol.* 6: 191-199.
- 2) **Amábile-Cuevas, C. F.** 2010. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries.* 4(3): 126-131.
- 3) **Arnold, A. E.; Mejía, L. C.; Kylo, D.; Rojas, E. I.; Maynard Z.; Robbins N. y Herre E. A.** 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS.* 100 (26) 15649-15654.
- 4) **Ávalos-García, M.** 2010. Caracterización polifásica de una cepa de *Streptomyces* aislada de una región del Valle de México (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
- 5) **Baco, C. W. y Yates, I. E.** 2006. Endophytic Root Colonization by *Fusarium* Species: Histology, Plant Interactions, and Toxicity. En *Soil Biology. Microbial Roots Endophytes.* B. Shulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Volume 9. Cap 8. 133-147 pp.
- 6) **Booth C. 1971.** The Genus *Fusarium*. CMI. Kew, Surrey. pp. 19-31.
- 7) **Carrillo, L. 2003.** Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Capítulo 5-6. Universidad Nacional de Salta.
- 8) **Cicuzza, D., Newton, A. and Oldfield, S.** 2007. The Red List of Magnoliaceae. Project Report. Cambridge, England: Botanic Gardens Conservation International (BGCI) and Fauna & Flora International (FFI).
- 9) **Chandra Nayaka, S. y Wulff, E. G.** 2011. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 90:1625-1639.

- 10) **Charepraset, S.; Piapukiew, J.; Thienhirum, S.; Whalley, A. J. S. y Sihanonth P.** 2006. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samaca saman* Merr. World J Microbiol Biotechnol. 22: 481-486.
- 11) **Demain, A. y Sánchez, S.** 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J Antibiot. 62: 5-16.
- 12) **Dreyfuss M. M. y Chapela I. H.** 1994. Potential of fungi in the discovery of novel, low molecular weight pharmaceuticals. In: Gullo V (ed.). The discovery of natural products with therapeutic potential. Butterworth Heinemann, London, pp: 49-80.
- 13) **Faeth, S. H.** 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualist? Oikos 98: 25-36.
- 14) **Faeth, S. H.; Fagan, W. F.** 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualist? Integ. and Comp. 42: 360-368.
- 15) **Ferrer, C.; Colom, F.; Frases, S.; Mulet, E.; Abad, J. L. y Alió, J. L.** 2001. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. J Clin Microbiol. Vol. 39, No. 8. 2873-2879.
- 16) **Ganguli, B. N.; Deshmukh, S. K.** 2007. Fungi. Multifaceted Microbes. Anamaya Publishers. New Deli.
- 17) **Gloer, J. B.** (1997) Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. In *The Mycota*. Vol. IV. *Environmental and Microbial Relationships* (D. T. Wicklow & B. E. Soderstrom, eds). Springer-Verlag, New York. pp: 249-268.
- 18) **Gardes, M. y Bruns, D.** 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol. 2, 113-118.

- 19) **Gunatilaka, L. A.** 2006. Natural Products from Plant-Associated Microorganism: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J. Nat. Prod.* 69, 509-526.
- 20) **Gutiérrez, L. y Vovides, A. P.** 1997. An *in situ* study of *Magnolia dealbata* Zucc. In Veracruz State: an endangered endemic tree of Mexico. *Biodivers Conserv.* 6, 89-97.
- 21) **Gutiérrez, L.** 1993. Estudio biológico de una especie forestal endémica (*Magnolia dealbata* Zucc.). (Tesis de Maestría) Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., México.
- 22) **Guzmán G.** 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodivers Conserv.* 7, 369-384.
- 23) **Hawksworth, D. L.** 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105 (12):1422-1432.
- 24) **Herrera, T. y Ulloa, M.** 1990. El Reino de los hongos. México: UNAM & Fondo de Cultura Económica.
- 25) **Isaac, S.** 1992. Fungal-plant interactions. Chapman & hall. Reino Unido.
- 26) **Kotani A., Kojima, S.; Hakamata, H.; Jin, D. y Kusu, F.** 2005. Determination of Honokiol and Magnolol by Micro HPLC with Electrochemical Detection and Its Application to the Distribution Analysis in Branches and Leaves of *Magnolia obovata*. *Chem. Pharm. Bull.* 53 (3) 319-322.
- 27) **Kusari, S. y Spiteller, M.** 2011. Are we ready for industrial productions of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Nat. Prod. Rep.* 28, 1203-1207.
- 28) **Larena, I.; Salazar, O.; González, V.; Julián, M.C. y Rubio, V.** 1999. Design of a primer for ribosomal DNA internal

transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. J Biotechnol. Volume 75, Issues 2-3, 187-194.

29) **Leslie, John F.; Summerell, Brett A.** 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. USA.

30) **Madigan, Michael T.; Matinko, John M.; Dunlap, Paul V.; Clark, David P.** 2009. Brock Biology of Microorganisms. 12<sup>th</sup> ed. Pearson Benjamin Cummings. USA.

31) **Manterola Morales A. M.** 2011. Aislamiento e identificación de una cepa bacteriana asociada a *Magnolia dealbata* Zucc. por su capacidad para producir un antibacteriano (Tesis de Licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

32) **Mapes, C.; Guzmán, G. y Caballero, J.** (1981) Etnomicología Purépecha. El conocimiento y uso de los hongos en la Cuenca de Pátzcuaro, Michoacán. México City: Dirección Culturas Populares.

33) **Martin, K. J. y Rygiewicz, P. T.** 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiology. 5:28.

34) **Martínez A.L.; Domínguez, F.; Orozco, S.; Chávez, M.; Salgado, H.; González, M. y González-Trujano, M.E.** 2006. Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the *Magnolia dealbata* Zucc. Leaves in mice. J Ethnopharmacol. 106, 250-255.

35) **Wikler, Matthew A.; Cockerill, Franklin R.; Bush, Karen; Dudley, Michael N.; Eliopoulos, George M.; Hardy, Dwight J.; Hecht, David W.; Ferraro, Mary Jane.; Swenson, Jana M.; Hindler, Janet F.; Patel, Jean B.; Powell, Mair; Turnidge, John D.; Weinstein, Melvin P. y Zimmer, Barbara L.** 2009. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved

Standards- Tenth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. Vol. 29 No. 1. USA.

36) **Meléndez González, C.** 2009. Potencial aleloquímico del endófito *Edenia gomezpompae* sobre diferentes comunidades de hongos endófitos de plantas tropicales. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.

37) **Mueller, G. M. y Schmit, J. P.** 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodivers Conserv.* 16: 1-5.

38) **Muriá González, M. J.** 2007. Búsqueda de actividad antifúngica y fitotóxica en algunos hongos endófitos aislados de hojas de árboles de la selva mediana subperenifolia de Quintana Roo. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.

39) **Patisson, G.** 1985. *Magnolia dealbata*. *Magnolia J. Magnolia Society* 22: 17-18.

40) **Pitt, J.I. y Hocking, A.D.** 1997. *Fungi and Food Spoilage*. 2º ed. Blackie Academic & Professional, London.

41) **Photita, W.; Lumyong, S.; Lumyong, P. y Hyde K. D.** 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycol. Res.* (12): 1508-1513.

42) **Sánchez Fernández, R.E.** 2010. Potencial alelopático de extractos del micelio y medio de cultivo de un hongo endófito aislado de *Lochocarpus castilloi* (Fabaceae). (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.

43) **Sánchez-Velásquez, L.R. y Pineda-López, M. del R.** 2010. Comparative demographic analysis in contrasting environments of *Magnolia dealbata*: an endangered species from Mexico. *Popul. Ecol.* 52: 203-310.

- 44) **Sarker, S. D.; Latif, Z.; Stewart, M. y Nahar, L.** 2002. *Magnolia*. Chapter 3 Phytochemistry of the Genus *Magnolia*. Taylor & Francis. Editado por Satyajit D. Sarker y Yuji Maruyama.
- 45) **Schulz, B. y Boyle C.** 2005. The endophytic continuum. Mycol. Res. 109 (6) 661-686.
- 46) **Schulz, B.; Boyle C.; Draeger, S.; Römmert, A. y Krohn, K.** 2002. Endophytic fungi : a source of novel biologically active secondary metabolites. Mycol. Res. 106 (9) 996-1004.
- 47) **Shu, R. G.; Wang, F. W.; Yang, Y. M.; Liu, Y. X y Tan, R. X.** 2004. Antibacterial and Xanthine Oxidase Inhibitory Cerebrosides from *Fusarium* sp. IFB-121, an Endophytic Fungus in *Quercus variabilis*. Lipids. Vol. 39. No. 7.
- 48) **Strobel, G. A.** 2003. Endophytes as source of bioactive products. Microb Infect. 5, 535-544.
- 49) **Strobel, G. A.; Daisy, B.; Castillo, U. y Harper, J.** 2004. Natural Products from Endophytic Microorganisms. J. Nat. Prod. 67, 257-268.
- 50) **Stuart, G. A. 1969.** Chinese Materia Medica, 2<sup>nd</sup> edition, pp. 254-256. Taipei: Ku T'ing Book House.
- 51) **Sullia, S.B. y Shantharms.** 1998. General Microbiology. Science Publishers inc. E.U.
- 52) **Tan, R. X. y Zou, W. X.** 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. Nat. Prod. Rep 18: 448-459.
- 53) **Velazco-Macías, C. G.; Forughbakhch-Pournavab, R.; Alanís-Flores, G. J. y Alvarado-Vázquez, M. A.** 2008. *Magnolia dealbata* en Nuevo León, México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 79: 459-463.

- 54) **Watanabe, K.; Ikegami, F. y Horie, S.** 2002. *Magnolia*. Chapter 1 Introduction. The Genus *Magnolia*. Taylor & Francis. Editado por Satyajit D. Sarker y Yuji Maruyama.
- 55) **Webster J.** 1986. Introduction to Fungi. 2° ed. Cambridge University Press.
- 56) **White, T. J.; Bruns, T. y Taylor, J.** 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. Inc. 315-322.
- 57) **Wright, G. D.** 2000. Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. Chem Biol. 7: R127-R132.
- 58) **Zhang, W. H., Song, Y. C. y Tan, R. X.** 2006. Biology and chemistry of endophytes. Nat. Prod. Rep. 23, 753-771.

## **APÉNDICE**

### **Anexo 1: Medios de cultivos y soluciones empleados**

Todas las cantidades aquí anotadas son llevadas a 1 Litro con agua destilada.

#### **Agar Czapek Dox + Cloranfenicol**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Sacarosa	30.0 g
MgSO <sub>4</sub>	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO <sub>4</sub>	0.01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
NaNO <sub>3</sub>	3.0 g
Cloranfenicol	25 µg/mL
Agar	15.0 g

Se esteriliza en autoclave. El cloranfenicol se agrega al final cuando el medio esté casi a temperatura ambiente. pH final =  $7.3 \pm 0.2$

### **YPD modificado (Yeast Extract, Peptone, Dextrose)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Extracto de levadura	10.0 g
Peptona	20.0 g
Glucosa	10.0 g
Agar	15.0 g

Se esteriliza en autoclave.

### **SDA al 2% (Sabouraud Dextrose Agar)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Digerido de tejido animal	5.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g

Se esteriliza en autoclave. pH final =  $5.6 \pm 0.2$

### **SDA al 1% (Sabouraud Dextrose Agar)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Digerido de tejido animal	5.0 g
Dextrosa	10.0 g
Agar	15.0 g

Se esteriliza en autoclave. pH final =  $5.6 \pm 0.2$

### **SDA al 0.5% (Sabouraud Dextrose Agar)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Digerido de tejido animal	5.0 g
Dextrosa	5.0 g
Agar	15.0 g

Se esteriliza en autoclave. pH final =  $5.6 \pm 0.2$

### **SMA al 1% (Sabouraud Maltose Agar)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Digerido de tejido animal	5.0 g
Maltosa	10.0 g
Agar	15.0 g

Se esteriliza en autoclave. pH final =  $5.6 \pm 0.2$

### **Agar Extracto de Malta (modificado)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Extracto de Malta	25.0 g
Agar	15.0 g

Se esteriliza en autoclave.

### **Agar Nutritivo**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Extracto de res	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	15.0 g

Se esteriliza en autoclave. pH final =  $6.8 \pm 0.2$

### **LELA (Lactosa-Extracto de Levadura)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Lactosa	1.0 g
Extracto de Levadura	0.5 g
Agar	20.0 g

Se esteriliza en autoclave.

### **PDA (Potato Dextrose Agar)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Infusión de papa (sólidos)	4.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g

Se esteriliza en autoclave. pH final =  $5.6 \pm 0.2$

### **MHA (Mueller Hinton Agar)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Extracto de res	2.0 g
Digerido ácido de Caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	17.0 g

Se esteriliza en autoclave. pH final =  $5.6 \pm 0.2$

### **Buffer TE**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	4%
Sacarosa	25%

Se esteriliza en autoclave. Llevar los componentes del buffer, menos la sacarosa a un pH = 8, antes de mezclarlos

Todos los medios aquí descritos fueron usados también en forma de caldo, con la excepción del PDA y el MHA.

## **Anexo 2: Técnicas Moleculares**

### ***Extracción del DNA genómico***

1. Hacer fermentaciones en un matraz Erlenmeyer de 250-mL con 50 mL de medio SD (0.5%) con los hongos 28B, 37BR y 37C. Inocular el matraz de la fermentación con una asada del hongo crecido en caja Petri o 500  $\mu$ L de un cultivo anterior, incubarlo a 29°C ,180 rpm, durante 3-5 días.
2. En un sistema al vacío (Millipore) con filtros Whatman 1 estériles, filtrar la mitad del volumen de un matraz con el hongo ya crecido sin dejar secar, agregando 2 volúmenes de agua destilada estéril. Repetir con la otra mitad del volumen contenido en el matraz.
3. Dejar secar y añadir un volumen de acetona al buchner; luego de que esté seco apagar el vacío y retirar el filtro con pinzas. Pesarlos y guardarlos en una caja Petri a -20°C. A estos filtrados secos se les conoce como polvos de acetona.
4. Triturar 100 mg de polvos de acetona en un mortero estéril con ayuda de un poco de hielo seco hasta que quede un polvo fino. Dejar sublimar el hielo seco.
5. Mezclar el triturado con buffer TE en una relación de 20 mL por cada gramo de polvo de acetona, y seguir moliendo hasta obtener una solución homogénea.
6. Pasar la solución a un tubo de centrifuga y realizar 2 extracciones con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1). La mezcla se centrifuga 15 minutos a 12 000 rpm en una centrifuga Beckman a 4°C para cada extracción y se recupera la fase acuosa evitando tomar la interfase.
7. Para precipitar el DNA, agregar 1/100 de volumen de NaCl 1N y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
8. Almacenar a -20°C.

Este material puede mantenerse durante varias semanas.

### ***Purificación del DNA genómico***

1. Centrifugar la muestra con el DNA obtenido del hongo a 12 000 rpm por 15 minutos a 4°C.
2. Decantar el etanol absoluto y lavar con 5 mL de etanol al 70%.
3. Centrifugar nuevamente a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C.
4. Decantar el etanol y quitar el excedente con pipeta.
5. Dejar secar el botón a temperatura ambiente.
6. Resuspender el botón en buffer TE ( $\pm$  5 mL).
7. Adicionar RNAsa [50  $\mu$ L/mL] final (SIGMA). Incubar a 37°C por 30 minutos.
8. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, alicuotar en tubos de 1.5 mL con 500  $\mu$ L.
9. Extraer con 500  $\mu$ L de fenol-clorofomo-isoamílico.
10. Recuperar la fase acuosa y precipitar el ADN con 2.5 volúmenes de etanol absoluto (20 minutos a -20°C) o con un volumen de isopropanol (a temperatura ambiente).
11. Repetir del paso 1 al 4.
12. Disolver el botón en agua destilada estéril si se va a utilizar para PCR o en buffer TE para conservar.

### ***Preparación de geles de electroforesis de agarosa al 0.8 %***

Pesar 0.32 g de agarosa (Vivantis) y disolver en 40 mL de buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x.

1. Calentar 1 minuto para solubilizar la agarosa y dejar enfriar unos momentos a temperatura ambiente.
2. Vaciar en el molde para el gel previamente nivelado.
3. Con cuidado añadir 1  $\mu$ L de bromuro de etidio [20 mg/mL], homogeneizando con la punta de la pipeta el gel aún líquido.

4. Colocar un peine con pozos evitando que se formen burbujas y dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. Luego que haya solidificado el gel, introducirlo en la cámara de electroforesis y cubrirlo por completo con buffer TAE 1x.
6. Sobre papel parafilm preparar las muestras a correr con el buffer de carga diluido 1:3 (Fermentas). Mezclar 1  $\mu\text{L}$  de muestra o marcador de peso molecular (1 kb Ladder, Fermentas) con 1  $\mu\text{L}$  de buffer de carga homogeneizando con la pipeta.