



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS CON
POTENCIAL ANTIFÚNGICO Y FITOTÓXICO DE *LYSILOMA*
*ACAPULCENSE***

T E S I S

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

PRESENTA

YUNUETH KARINA MONSERRAT SANDOVAL ESPINOSA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente:	Dra. Perla Carolina Castañeda López
Vocal:	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
Secretario:	Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz
1er. Suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. Suplente:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar

Instituto de Química

Laboratorio 1-4. Productos Naturales

Facultad de Química. Ciudad universitaria

UNAM

Asesora del Tema: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Sustentante: Yunueth Karina Monserrat Sandoval Espinosa

Índice	Página
Lista de Figuras	vii
Lista de Cuadros	xi
Lista de Gráficas	xiii
Lista de abreviaturas	xv
I. Introducción	1
II. Antecedentes	4
1. Importancia de la actividad agrícola	4
1.1 Agricultura en México	4
2. Problemática en cultivos de importancia agrícola	6
2.1 Uso de pesticidas	8
3. Productos naturales como fuente de compuestos novedosos	9
4. Microorganismos endófitos	11
5. Hongos endófitos	12
6. Relación planta endófito	16
7. Metabolismo secundario de hongos endófitos	21
III. Hipótesis	34
IV. Objetivos	35
1. Objetivos generales	35
2. Objetivos particulares	35
V. Materiales y métodos	37

	Página
1. Sitio de colecta	37
2. Medios de cultivo empleados para el aislamiento, purificación y crecimiento óptimo de los hongos endófitos y fitopatógenos	37
3. Aislamiento y purificación de hongos endófitos y fitopatógenos de <i>Lysiloma acapulcense</i>	39
3.1 Hongos endófitos	39
3.2 Hongos fitopatógenos	39
3.3 Purificación de hongos endófitos y fitopatógenos	40
4. Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos aislados de la planta <i>L. acapulcense</i>	40
5. Bioensayos de antagonismo múltiple	41
6. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos endófitos	43
6.1 Cultivos en CPD	43
6.2 Cultivos en medio arroz	44
7. Obtención de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio	44
8. Determinación del potencial antifúngico	45
9. Determinación del potencial fitotóxico	46
VI. Resultados y discusión	48
1. Aislamiento y purificación de las cepas	49
2. Determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos puros	51

	Página
2.1 Hongos endófitos	51
2.2 Hongos fitopatógenos	59
3. Bioensayos de antagonismo múltiple	71
3.1 Antagonismo entre el endófito LAcE1 y los fitopatógenos aislados de la planta <i>L. acapulcense</i>	72
3.2 Antagonismo entre el endófito LAcE2 y los fitopatógenos aislados de la planta <i>L. acapulcense</i>	76
3.3 Antagonismo entre el endófito LAcE3 y los fitopatógenos de la planta <i>L. acapulcense</i>	79
3.4 Antagonismo entre el endófito LAcE4 y los 8 hongos fitopatógenos de la planta <i>L. acapulcense</i>	81
3.5 Antagonismo entre el endófito LAcE5 y los 8 hongos fitopatógenos de la planta <i>L. acapulcense</i>	84
3.6 Antagonismo entre el endófito LAcE6 y los 8 hongos fitopatógenos de la planta <i>L. acapulcense</i>	87
3.7 Antagonismo entre el endófito LAcE7 y los 8 hongos fitopatógenos de la planta <i>L. acapulcense</i>	90
4. Condiciones de cultivo en pequeña escala	93
4.1 Obtención de extractos orgánicos	94
5. Efecto antifúngico	98
5.1 Efecto antifúngico sobre microorganismos fitopatógenos de importancia agrícola	98

	Página
5.2 Efecto antifúngico sobre hongos fitopatógenos aislados de <i>L. acapulcense</i>	102
6. Efecto fitotóxico sobre semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Solanum lycopersicum</i>	105
6.1 Efecto sobre la germinación	105
6.2 Efecto sobre el crecimiento de la raíz	106
7. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos derivados del hongo LAcE5 utilizando CG-EM	110
VII. Conclusiones	114
VIII. Perspectivas	118
IX. Bibliografía	119

Lista de Figuras	Página
Figura 1. Filogenia de los eucariontes (Govers & Gijzen, 2006).	7
Figura 2. Hipótesis del antagonismo balanceado (Schulz & Boyle, 2005).	19
Figura 3. Bioensayo de antagonismo múltiple en caja Petri entre los hongos endófitos y fitopatógenos de <i>L. acapulcense</i> ; a y b representan los radios de crecimiento de cada microorganismo competidor. E: endófito, F: fitopatógeno.	43
Figura 4. Endófito LAcE1. A Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). B Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. C y D Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con azul de lactofenol.	52
Figura 5. Endófito LAcE2. A Crecimiento de 6 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). B Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. C y D Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con azul de lactofenol.	53
Figura 6. Endófito LAcE3. A Crecimiento de 25 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). B Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. C y D Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con azul de lactofenol y rojo congo, respectivamente.	54
Figura 7. Endófito LAcE4. A Crecimiento de 22 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). B Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. C y D Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con azul de lactofenol.	55
Figura 8. Endófito LAcE5. A Crecimiento de 10 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). B Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. C y D Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo.	56

- Figura 9.** Endófito LAcE6. **A** Crecimiento de 5 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con azul de lactofenol y rojo congo respectivamente. **58**
- Figura 10.** Endófito LAcE7. **A** Crecimiento de 7 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo respectivamente. **59**
- Figura 11.** Fitopatógeno LAcF2. **A** Crecimiento de 13 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente. **61**
- Figura 12.** Fitopatógeno LAcF3. **A** Crecimiento de 13 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo. **62**
- Figura 13.** Fitopatógeno LAcF4. **A** Crecimiento de 13 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo. **63**
- Figura 14.** Fitopatógeno LAcF5. **A** Crecimiento de 13 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo. **64**
- Figura 15.** Fitopatógeno LAcF6. **A** Crecimiento de 13 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo. **65**

	Página
Figura 16. Fitopatógeno LAcF7. A Crecimiento de 7 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). B Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. C y D Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo.	67
Figura 17. Fitopatógeno LAcF8. A Crecimiento de 7 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). B Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. C y D Observaciones microscópica en 40X, teñida con rojo congo y azul de lactofenol respectivamente.	68
Figura 18. Cambios morfológicos del endófito LAcE2 observados a lo largo de su crecimiento. Cultivos en medio PDA a los 2, 4 y 6 días de crecimiento.	69
Figura 19. Cambios morfológicos del endófito LAcF7 observados en diferentes días de crecimiento. Cultivos en medio PDA a los 2, 4, 5 y 7 días de crecimiento.	70
Figura 20. Orden en que se colocaron los hongos fitopatógenos competidores, en las cajas de Petri en los bioensayos de antagonismo múltiple. El endófito de prueba se inoculó en el centro (LAcE1-LAcE7).	72
Figura 21. Antagonismo del hongo endófito LAcE1 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de <i>L. acapulcense</i> , a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagónica.	74
Figura 22. Antagonismo del hongo endófito LAcE2 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de <i>L. acapulcense</i> , a los días 1, 3, 7 y 10 de interacción antagónica.	77
Figura 23. Antagonismo del hongo endófito LAcE3 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de <i>L. acapulcense</i> , a los días 1, 3, 5 y 20 de interacción antagónica.	80
Figura 24. Antagonismo del hongo endófito LAcE4 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de <i>L. acapulcense</i> , a los días 1, 3, 6 y 10 de interacción antagónica.	82

	Página
Figura 25. Antagonismo del hongo endófito LAcE5 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de <i>L. acapulcense</i> , a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagónica.	85
Figura 26. Antagonismo del hongo endófito LAcE6 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de <i>L. acapulcense</i> , a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagónica.	88
Figura 27. Antagonismo del hongo endófito LAcE7 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de <i>L. acapulcense</i> , a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagónica.	91
Figura 28. Cromatografía en capa fina comparativa de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, derivados de las distintas condiciones y medios de cultivo empleados para establecer las condiciones óptimas de cultivo del hongo endófito LAcE2. Sistema de elución: CH ₂ Cl ₂ -MeOH 98:2, revelador H ₂ SO ₄ al 10%.	97
Figura 29. Cromatografía de Gases del extracto del micelio del cultivo del hongo LAcE5.	113
Figura 30. Estructura y espectros de masas comparativos entre el Nonanal presente en el extracto del micelio de LAcE5 (A) y el registrado la biblioteca de espectros NIST (B).	113

Lista de Cuadros	Página
Cuadro 1. Clasificación de los hongos endófitos (Rodríguez <i>et al.</i> , 2009; Sánchez-Fernández <i>et al.</i> , 2013).	14
Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos	22
Cuadro 3. Composición de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento, purificación y crecimiento óptimo de los hongos endófitos y fitopatógenos.	38
Cuadro 4. Número total de aislamientos, aislamientos puros y morfotipos de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de <i>Lysiloma acapulcense</i> .	49
Cuadro 5. Claves asignadas a los hongos endófitos y fitopatógenos puros de <i>L. acapulcense</i> .	50
Cuadro 6. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de <i>L. acapulcense</i> en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE1. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.	75
Cuadro 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de <i>L. acapulcense</i> en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE2. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.	78
Cuadro 8. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento radial de los ocho fitopatógenos aislados de <i>L. acapulcense</i> en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE3. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.	81

Cuadro 9. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de <i>L. acapulcense</i> en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE4. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.	83
Cuadro 10. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de <i>L. acapulcense</i> en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE5. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.	86
Cuadro 11. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de <i>L. acapulcense</i> en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE6. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.	89
Cuadro 12. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de <i>L. acapulcense</i> en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE7. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.	92
Cuadro 13. Rendimientos de los cultivos en pequeña escala de los 7 hongos endófitos aislados de <i>L. acapulcense</i> en las distintas condiciones de cultivo.	96
Cuadro 14. Efecto antifúngico de 5 de los extractos orgánicos más activos, sobre el crecimiento radial de los 8 hongos fitopatógenos aislados de <i>L. acapulcense</i> .	104
Cuadro 15. Metabolitos secundarios identificados en el extracto del micelio del cultivo en CPD en condición estática del hongo LAcE5.	112

- Gráfica 1.** Efecto antifúngico de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1–LacE7, sobre el crecimiento del hongo *Alternaria alternata*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P<0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones. **99**
- Gráfica 2.** Efecto antifúngico de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1–LacE7, sobre el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P<0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones. **100**
- Gráfica 3.** Efecto antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1–LacE7, sobre el crecimiento del oomiceto *Phytophthora parasitica*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P<0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones. **101**
- Gráfica 4.** Efecto antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1–LacE7, sobre el crecimiento del oomiceto *Pythium aphanidermatum*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P<0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones. **102**
- Gráfica 5.** Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1–LacE7, sobre el crecimiento de la raíz de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P<0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones **107**

- Gráfica 6.** Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1–LacE7, sobre el crecimiento de la semilla de *Solanum lycopersicum*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones. **108**
- Gráfica 7.** Porcentajes de estimulación del crecimiento de la semilla de *Solanum lycopersicum* ocasionado por 4 extractos orgánicos derivados de hongos endófitos de *L. acapulcense*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones. **109**

Lista de abreviaturas

A	Agitación
<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>A. hypochondriacus</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
Ar	Arroz
CCF	Cromatografía en capa fina
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ OH	Metanol
cm ²	Centímetros cuadrados
CPD	Caldo-papa-dextrosa
°C	Grados Celcius
E	Estático
etc.	Etcétera
<i>F.oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
g	Gramos
h	Horas
L	Litros
<i>L. acapulcense</i>	<i>Lysiloma acapulcense</i>
Me	Medio
Mi	Micelio
MeOH	Metanol
mg	Miligramos

mL	Mililitros
PDA	Papa-dextrosa-agar
ppm	Partes por millón
<i>P. aphanidermatum</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>
<i>P. parasitica</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>
REBIOSH	Reserva de la Biósfera de la Sierra de Huautla
<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
vs	Contra

I. Introducción

La protección de cultivos debida a la presencia de plantas competidoras, insectos y enfermedades ocasionadas por microorganismos, ha sido un problema que se desarrolló desde inicios de la agricultura. La preocupación por el deterioro en las funciones de los sistemas agrícolas ha aumentado como resultado de la pérdida de la biodiversidad. Por otro lado, la intensificación de los sistemas de producción agrícola debido a la demanda a nivel mundial, ha resultado en un cambio dramático en el entorno donde se lleva a cabo esta actividad económica (Pachlatko, 1998; Bianchi *et al.*, 2006).

Las enfermedades de las plantas son una preocupación para el hombre debido a que perjudican los cultivos de importancia agrícola y forestal, provocando grandes pérdidas económicas, que propician el aumento en el precio de éstos productos. Además, millones de personas dependen de los productos vegetales, lo que puede marcar la diferencia entre una población normal y una población asociada al hambre. Al mismo tiempo, surge el uso intensivo de compuestos sintéticos, debido a que son capaces de reducir la aparición de estos patógenos, sin embargo, su uso indiscriminado ha provocado la aparición de severos daños ecológicos y la preocupación sobre el impacto potencial que los plaguicidas sintéticos tienen sobre la salud humana y el medio ambiente. Siendo evidente la necesidad de intensificar la búsqueda para reducir las pérdidas en la producción agrícola, sin consecuencias negativas para el medio ambiente y los seres humanos (Bianchi *et al.*, 2006; Agrios, 2010). Tal es el caso de los plaguicidas a base de productos naturales. Estos compuestos proviniendo de vías metabólicas secundarias y pueden ser más fácilmente biodegradados por los microorganismos del suelo y reintegrarse al medio ambiente, con menores índices de bioacumulación, sustituyendo así, a los compuestos de origen sintético (Dayan *et al.*, 2009). Los productos naturales presentan una gran diversidad química y estructural, además de un potencial biológico importante (Pachlatko, 1998; Bianchi *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que la diversidad microbiana ofrece una amplia variedad metabólica, ya que los microorganismos son capaces de desarrollarse en todos los nichos de la tierra, y al habitar en ambientes altamente competitivos han desarrollado mecanismos de defensa y de adaptación, conferidos en muchos casos a través de la producción de metabolitos secundarios. En especial, los microorganismos asociados a plantas son excelentes biosintetizadores de productos naturales, siendo fuente de metabolitos biológicamente activos (Ferreira-Koolen *et al.*, 2012; Kusari *et al.*, 2012). Los hongos endófitos son microorganismos que se encuentran prácticamente en los tejidos de todas las especies vegetales de la tierra, y poseen complejas enzimas que compiten y cooperan para biosintetizar moléculas estructuralmente diversas y complejas, y que a menudo son difíciles de sintetizar, las cuales pueden proporcionarle un efecto protector y de supervivencia a su hospedera (Strobel *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2010; Kusari *et al.*, 2012).

Debido a las diversas interacciones que el endófito mantiene con su hospedera y con otros competidores dentro de ésta, se induce la producción de metabolitos secundarios por parte del endófito, los cuales una vez aislados y caracterizados pueden tener un uso potencial en la medicina moderna, agricultura e industria. En particular, en el presente proyecto el principal interés está asociado con la inhibición del crecimiento de malezas y microorganismos patógenos en la agricultura (Strobel *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2012).

En este contexto, el presente trabajo tiene la finalidad de estudiar el potencial antagónico de hongos endófitos aislados de la planta *Lysiloma acapulcense* colectada en una zona de alta biodiversidad, la “Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla” (REBIOSH) y establecer la actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio. El proyecto comprende: 1) realizar el aislamiento y purificación de hongos endófitos y fitopatógenos a partir de hojas de *L. acapulcense*, 2) evaluar el antagonismo de hongos endófitos contra hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense*, 3) la obtención de los extractos orgánicos derivados de cultivos en pequeña escala de los hongos endófitos puros,

y 4) la evaluación del efecto de los extractos orgánicos sobre el crecimiento de microorganismos con importancia agrícola y fitopatógenos aislados de *L. acapulcense*, y sobre plantas prueba. Esto, con el objetivo de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones que se establecen entre las plantas hospederas y los hongos endófitos. Así, como al posible desarrollo de nuevos agentes antifúngicos y/o herbicidas de origen natural eficaces y menos tóxicos con el ambiente.

II. Antecedentes

1. Importancia de la actividad agrícola

La agricultura representa la mayor parte del uso de la superficie terrestre. En 1999 los pastos y los cultivos ocupaban el 37% de la superficie terrestre y se empleó más de dos tercios del consumo de agua humano en la agricultura (FAO, 2002). Es evidente que en muchos países su economía depende de los cultivos tradicionales de exportación, como son el plátano, azúcar, té, café, cacao, caucho natural, maíz, frijol, arroz, trigo, entre otros. Y al mismo tiempo varios de estos cultivos representan alimentos básicos para la población de origen (FAO, 2002).

En los últimos años, la tasa de crecimiento de la producción agrícola y los rendimientos de las cosechas han disminuido notablemente. Esto ha suscitado el temor de que el mundo no será capaz de producir alimentos suficientes para asegurar que las poblaciones futuras reciban una alimentación adecuada (FAO, 2002). Se estima que alrededor de 776 millones de personas en los países en desarrollo sufren de desnutrición, aproximadamente una de cada seis personas (FAO, 2002). Esto es un problema de gran interés a nivel mundial, ya que la desnutrición es la manifestación principal de la pobreza, y está directamente relacionada con la reducción de la capacidad de trabajo y resistencia a las enfermedades, afectando el desarrollo mental de los niños y los logros educativos de estos (FAO, 2002).

1.1 Agricultura en México

Desde tiempos remotos la agricultura ha sido una de las actividades principales en México, desarrollando una rica y compleja producción de varias especies importantes, desde los alimentos básicos como el maíz, trigo, frijol, amaranto y la calabaza, hasta los alimentos considerados no esenciales para el desarrollo de la población, como son: el cacao, la vainilla, diversas especies de chiles, numerosas frutas, hierbas aromáticas, tomate, aguacate, papaya, guayaba, tuna, nopal,

camote, chayote, cacahuete, zapote, jícama, tabaco, chicle, henequén y jojoba, entre muchos otros. Así, la difusión de estos productos ha enriquecido significativamente a la agricultura y la alimentación no solo de nuestro país, sino también de otras poblaciones del mundo (CONAGUA, 2009; FAO, 2009).

Actualmente, México cuenta con un territorio nacional de 198 millones de hectáreas, de las cuales cerca de 30 millones son tierras de cultivo y 115 millones de agostadero, además de 45.5 millones de hectáreas que cubren los bosques y selvas. La gran diversidad climática de México permite el desarrollo integral de diversos sistemas de producción (Lira-Saldívar, 2007 ;FAO, 2009).

La importancia de la actividad agrícola en nuestro país se ve reflejada en una gran variedad de aspectos, tanto económicos como sociales, algunos de ellos se nombran a continuación:

- Prácticamente toda la producción de alimentos se origina en este sector.
- Los productos agropecuarios son la base de un gran número de actividades comerciales e industriales.
- La agricultura es una actividad fundamental y predominante en el medio rural, en el cual habita 37% de la población nacional, sobre todo la población mas pobre, donde representa el 42% del ingreso familiar.
- El desarrollo rural también significa la incorporación de un importante potencial económico para el progreso de México incidiendo positivamente sobre este.

En las negociaciones comerciales internacionales, el sector agroalimentario es considerado como altamente sensible, subordinado a la multifuncionalidad de la agricultura, es decir, su importante incidencia en la alimentación, el empleo, la conservación de los recursos naturales, el medio ambiente incluyendo el ritmo del calentamiento global y el cambio climático, el ecoturismo, la preservación del paisaje rural y la conservación del patrimonio cultural (FAO, 2009).

La actividad agropecuaria arroja una gran cantidad de beneficios a México. Sin embargo, también forma parte de una problemática asociada a la producción agrícola y ganadera, la cual tiene un profundo efecto en el medio ambiente en general, ya que son la principal fuente de contaminación del agua por nitratos, fosfatos y pesticidas. También son la principal fuente antropogénica de gas metano y de óxido nitroso que promueven el efecto invernadero. Asimismo, contribuyen de forma masiva a otros tipos de contaminación del aire y del agua (FAO, 2002).

Por otra parte, existe una preocupación generalizada de que el mundo puede estar quedándose sin tierras agrícolas, esto asociado con el crecimiento indiscriminado de la población y la conversión de tierras agrícolas a usos urbanos, por la degradación de la tierra y por otros factores, se ve agravado notablemente (FAO, 2002). Aunado a esto, se suma la protección de las plantas de cultivo, las cuales son propensas a estar bajo la influencia de plantas competidoras, insectos y distintas enfermedades causadas por microorganismos. Como una forma de contrarrestar este tipo de problemas que ha ido arrastrando la humanidad desde que la agricultura se desarrolló, se ha implementado el uso de fertilizantes, abono y pesticidas con el fin de obtener mayor producción en los cultivos, y por consiguiente disminuir la falta de alimento para la población (Pachlatko, 1998; FAO, 2002; Lira-Saldívar, 2007).

2. Problemática en cultivos de importancia agrícola

Los daños provocados por las plagas, las malezas y las enfermedades ocasionadas por microorganismos han asolado a los cultivos desde el comienzo mismo de la agricultura. Para los agricultores combatir los daños ocasionados en los cultivos es una necesidad primordial, existe una alta diversidad de plantas, plagas y patógenos, capaces de dañar los cultivos de importancia económica, entre los que se encuentran las plantas arvenses (malezas), insectos, parásitos, virus, hongos y oomicetos. La dispersión de esporas o zoosporas de los hongos y oomicetos por factores ambientales provoca un aumento sustancial en la

incidencia de enfermedades en las plantas. Se ha demostrado que los oomicetos se encuentran entre los microorganismos más agresivos y devastadores de los cultivos, con más de 80 especies conocidas. Una de ellas, *Phytophthora infestans*, que destaca por su patogenicidad, es la causante de la quemadura o tizón tardío de la papa (FAO, 2001; Brown & Hovmøller, 2002; Strange & Scott, 2005; Govers & Gijzen, 2006; Tyler, 2007; Phillips *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2009).

Los oomicetos son microorganismos eucariontes, que inicialmente se clasificaron dentro del reino Fungi, ya que presentan un crecimiento filamentoso, producción de micelio y su reproducción es tanto sexual como asexual. Sin embargo, los oomicetos están genéticamente más emparentados con las algas café que con los hongos. Investigaciones reciente señalan que los oomicetos se clasifican dentro del reino Stramenopila, perteneciente al súper reino Cromalveolata, en el que están incluidas las diatomeas, las algas café y apicomplexa.

En la Figura 1 se muestra la clasificación de los oomicetos y hongos, en la que se aprecia la distancia filogenética que existe entre ambos organismos (Latijnhouwers, *et al.*, 2003; Govers & Gijzen, 2006; Phillips *et al.*, 2007; Beakes *et al.*, 2012).

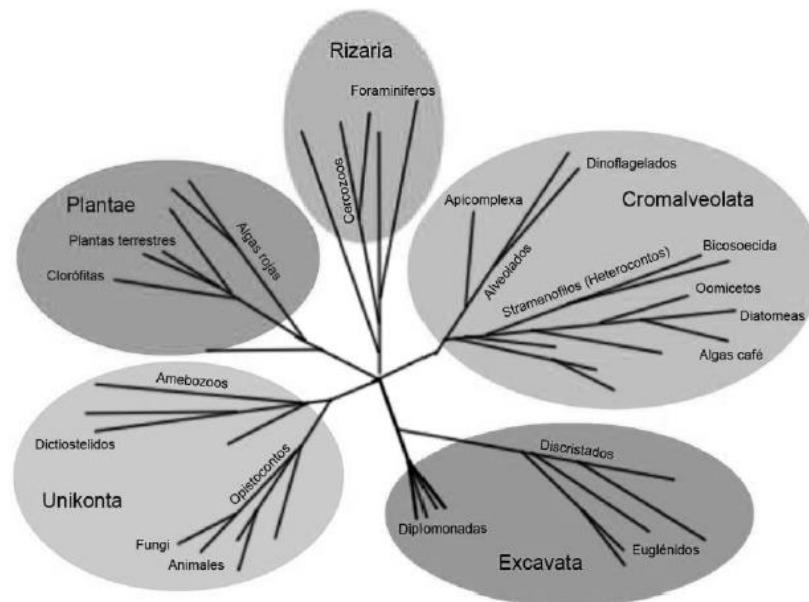


Figura 1. Filogenia de los eucariontes (Govers & Gijzen, 2006).

2.1 Uso de pesticidas

En los últimos años el uso de pesticidas sintéticos como principal medida de control, asociado a su uso intensivo e indiscriminado, ha provocado el desarrollo de resistencia de los microorganismos a los agroquímicos, lo que ha ocasionado un inevitable incremento en las concentraciones empleadas para su control, esto conlleva a una mayor contaminación ambiental y problemas de salud para los trabajadores del campo y los consumidores. La mayoría de los productos químicos empleados no son biodegradables y son responsables de la contaminación ambiental (Lira-Saldívar, 2007; Gond *et al.*, 2010).

El bromuro de metilo utilizado anteriormente para el control de microorganismos fitopatógenos, ejemplifica el impacto ecológico causado por los plaguicidas sintéticos al medio ambiente. Se utilizaban más de 80, 000 toneladas de éste compuesto al año, las cuales después de ser aplicadas al suelo, se evaporaban a la atmósfera, y llegaban hasta la estratósfera, contribuyendo a la desaparición progresiva de la capa de ozono sobre la Antártida. Causa por la cual en el año 2005 el uso del bromuro de metilo fue eliminado (Lira-Saldívar, 2007; Gond *et al.*, 2010).

La preocupación del uso de los plaguicidas sintéticos debido a su impacto nocivo sobre el medio ambiente ha provocado que surjan nuevas regulaciones para su uso y registro. Tal es el caso de la Ley de Protección de la Calidad en los Estados Unidos (Food Quality Protection Act (FQPA) de 1996), la cual se encarga de la evaluación del potencial de nuevos pesticidas y su uso, así como de la revisión de los ya existentes, para hacer cumplir con los requisitos establecidos a cada uno de ellos. Estas nuevas regulaciones han reducido el número de pesticidas sintéticos disponibles en la agricultura (FQPA, 1996; Dayan, 2009).

Como consecuencia, en la actualidad es fundamental la búsqueda de nuevas estrategias que permitan la conservación y mejoramiento de los recursos naturales, tales como agua, suelo, aire, biodiversidad, etc., basadas en normas de producción inocuas desde el punto de vista social, ecológico y económico (Lira-

Saldívar, 2007). En las últimas décadas, surge el desarrollo de nuevos pesticidas teniendo como base fundamental el empleo de productos naturales, contrarrestando así, las pérdidas ocasionadas en los cultivos por plagas y patógenos, de una forma más noble con el medio ambiente y combatiendo además la resistencia que presentan los patógenos (Pachlatko, 1998; Lira-Saldívar, 2007; Dayan *et al.*, 2009; Duke *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010). Asimismo, las actividades agrícolas sustentables que utilizan técnicas y productos amigables con el ambiente, así como los alimentos orgánicos producidos sin agroquímicos resultan en productos sanos para el consumidor y con grandes beneficios al medio ambiente, antes, durante y después de su producción (Lira-Saldívar, 2007).

Debido a que los productos naturales son casi exclusivamente derivados de las vías asociadas con el metabolismo secundario, estos compuestos tienen una alta probabilidad de poseer algún tipo de actividad biológica contra otros organismos, a menudo a través de mecanismos novedosos de acción, lo que es particularmente importante, ya que las plagas continúan evolucionando hasta adquirir resistencia a los pesticidas disponibles actualmente, por lo que estos podrían resultar como una alternativa para la obtención de compuestos más eficaces y nobles con el ambiente (Pachlatko, 1998; Dayan *et al.*, 2009; Duke *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010).

3. Productos naturales como fuente de compuestos novedosos

La necesidad de nuevos y útiles compuestos para proporcionar ayuda en todos los aspectos de la condición humana es sumamente importante, debido a diversos problemas como son la resistencia a medicamentos por parte de bacterias, la aparición de virus potencialmente patógenos y la enorme incidencia de infecciones por hongos en la población humana, a esto se le suman las dificultades para la obtención de alimentos en algunas regiones del planeta, a causa de la degradación del medio ambiente, por pérdida de biodiversidad y deterioro de la tierra, por nombrar algunos. Por lo antes descrito es evidente la necesidad de la búsqueda de nuevos antibióticos, agentes terapéuticos y pesticidas altamente

eficaces, que posean baja toxicidad y a su vez que su impacto al medio ambiente sea menor (Pachlatko, 1998; Debbab, 2009; Duke *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010).

Como se mencionó previamente, en la actualidad la industria agroquímica ha incrementado marcadamente el interés por los compuestos de origen natural, debido a que muchos agentes agrícolas sintéticos han sido retirados del mercado por los problemas de seguridad y medio ambiente. A lo largo del tiempo la naturaleza ha evolucionado para producir una sorprendente diversidad de metabolitos secundarios, siendo estos compuestos menos agresivos con el medio ambiente y estructuralmente novedosos (Pachlatko, 1998; Strobel, 2004; Debbab *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010). Por esta razón las industrias de productos químicos comenzaron una búsqueda sin precedentes en la historia, en la que el principio básico era la comprensión de las complejas interacciones en la ecología de los organismos y utilizar este conocimiento con el fin de desarrollar productos seguros y ecológicamente racionales para el control de malezas, insectos y microorganismos patógenos de las plantas (Pachlatko, 1998; Strobel *et al.*, 2004; Ganesan, 2008).

Existe una gran diversidad de organismos productores de compuestos naturales, sin embargo, el interés actual por los microorganismos es evidente, lo que puede ser debido a que son cosmopolitas (ocupan todos los nichos vivientes y no vivientes de la Tierra), por lo que se les denomina cosmopolitas (Strobel *et al.*, 2004; Davidson, 1995; Gunatilaka, 2006). Se ha estimado que menos del 1% de las especies bacterianas y menos del 5% de las especies de hongos se conocen en la actualidad, lo que sugiere que existen millones de especies por descubrir (Patrick, 1997; Gunatilaka, 2006). Al mismo tiempo, el desarrollo de los microorganismos alterando sus parámetros de cultivo, da la posibilidad de obtener una variedad de metabolitos diferentes a partir de una sola cepa, mejor conocido como “one strain many compounds” (Gunatilaka, 2006; Kusari, 2012). Por esta razón los microorganismos surgen como una fuente potencial de metabolitos secundarios biológicamente activos, los cuales tienen aplicaciones como agroquímicos, antibióticos, inmunosupresores, antiparasitarios y agentes

anticancerígenos, entre otros (Strobel *et al.*, 2004; Debbab *et al.*, 2009; Li & Tao, 2009; Duke *et al.*, 2010). Aunque su impacto en el mercado de protección de cultivos es aun pequeño, su importancia radica en sus estructuras, ya que pueden utilizarse por sí mismos o bien ser la base para la síntesis de compuestos con actividad biológica útiles en la medicina y la agricultura (Pachlatko, 1998; Strobel *et al.*, 2004; Gunatilaka, 2006).

En la actualidad se sabe que los hongos y las bacterias están estrechamente vinculados con las plantas como microorganismos endófitos, formando asociaciones mutuamente beneficiosas, las cuales contribuyen con la protección de su hospedera y han sido relativamente poco estudiados (Faeth, 2002; Strobel *et al.*, 2004; Herre *et al.*, 2005; Gunatilaka, 2006; Rodriguez *et al.*, 2009).

4. Microorganismos endófitos

Aunque el término " endófito " fue utilizado mucho antes de 1866 por el científico alemán Heinrich Anton de Bary, quien advirtió la presencia de endófitos en plantas, fue hasta 1904, cuando Freeman describió la vida interna de hongos Clavicipitáceos en la semilla de la cizaña (*Lolium perenne*, *Lolium temulentum*) (Gond *et al.*, 2010).

Hoy en día se sabe que los microorganismos endófitos se encuentran en prácticamente todas las plantas en la tierra y que incluye bacterias, hongos, oomicetos, actinomicetos y algas, que pasan toda o un período de su ciclo de vida, en el interior del tejido sano de las plantas sin causar ningún síntoma de enfermedad. La población de endófitos presentes en una hospedera, varía de varios a unos pocos cientos de cepas. Debido a su naturaleza, los endófitos se pueden clasificar en tres grupos: (1) los agentes patógenos de otro hospedero que no sean patógenos en su relación endofítica, (2) los microorganismos no patógenos, y (3) patógenos que han fungido como inocuos pero aún son capaces de colonizar mediante métodos de selección o alteración genética (Tan & Zou, 2001; Gunatilaka, 2006; Gond *et al.*, 2010).

La estrecha interacción de los microorganismos con su hospedera conlleva a una variedad de relaciones que van desde la simbiosis hasta la patogenicidad. Con base en estas relaciones algunos endófitos pueden proporcionar protección a su planta hospedera y supervivencia, mediante la producción de una gran cantidad de metabolitos secundarios (Faeth, 2002; Strobel *et al.*, 2004; Schulz & Boyle, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009). Estos compuestos, una vez aislados y caracterizados, también pueden tener potencial para su uso en la medicina moderna, la agricultura y la industria (Strobel *et al.*, 2004; Li & Tao, 2009; Debbab *et al.*, 2009; Duke *et al.*, 2010; Gond *et al.*, 2010).

Entre todos los endófitos existentes, después de las bacterias, los hongos son dominantes en las plantas superiores, debido a la asociación que forma con su planta hospedera y los beneficios que conlleva. El interés en estos microorganismos ha aumentado debido a que son especies relativamente nuevas, es decir, recientemente estudiadas y productoras de moléculas biológicamente activas (Strobel *et al.*, 2004; Gunatilaka, 2006; Li & Tao, 2009; Debbab *et al.*, 2009; Duke *et al.*, 2010; Gond *et al.*, 2010).

5. Hongos endófitos

Los hongos endófitos son microorganismos ubicuos que viven inter o intracelularmente en los tejidos de las plantas durante al menos una parte de su vida sin causar síntomas aparentes de enfermedad. (Tan & Zou, 2001; Strobel *et al.*, 2004; Herre *et al.*, 2005; Arnold, 2007; Rosa *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009). Taxonómicamente, la mayoría de los hongos endófitos pertenecen al filum Ascomycota, mientras que algunas especies pertenecen a los filos Basidiomycota y Zygomycota (Herre *et al.*, 2005; Gunatilaka, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009).

Ningún estudio ha demostrado la existencia de una especie de planta sin endófitos (Huang *et al.*, 2001; Promputtha *et al.*, 2007). Si cada planta alberga en sus tejidos (hojas, pecíolos, cortezas, raíces y ramas) a uno o más hongos endófitos y existen cerca de 300 000 especies de plantas superiores, podemos deducir que hay un

largo camino por recorrer con respecto al estudio de los hongos endófitos y de su metabolismo secundario (Tan & Zou, 2001; Strobel *et al.*, 2004).

Los hongos endófitos foliares, a menudo benefician a sus hospederas a través de sus metabolitos secundarios mediante una variedad de efectos, como son el aumento en el crecimiento, la tolerancia a metales pesados, el aumento de la resistencia a la sequía y como defensa del ataque por herbívoros y patógenos. Los metabolitos secundarios involucrados en estos beneficios y que pueden modificar la vida de su hospedera incluyen entre otros a los alcaloides, terpenos y esteroides (Faeth, 2002; Herre *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009).

Dependiendo de su colonización en las diferentes plantas hospederas, los hongos endófitos se dividen en dos grupos básicos: generalistas (que se encuentran en gran abundancia entre las diferentes especies de plantas) y especialistas (que se encuentran en baja abundancia y en una planta huésped específica) (Rosa *et al.*, 2011). Además, dependiendo de la zona en la que se encuentre su hospedera los microorganismos endófitos pueden variar en cantidad; como ejemplo se espera que las plantas tropicales alberguen una población muy diversa de hongos endófitos, debido a que es una zona de alta biodiversidad (Rosa *et al.*, 2009).

Históricamente se ha realizado un intento por clasificar a los hongos endófitos, clasificándose como Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, la diferencia más sutil entre los dos grupos es que los endófitos Clavicipitáceos colonizan únicamente pastos, mientras que los no Clavicipitáceos tienen un rango mucho mayor de hospederos, colonizando las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (Arnold, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009). Por otra parte, tomando en cuenta su taxonomía, su evolución, las plantas hospederas y su papel ecológico, los endófitos se clasifican en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, de los cuales el grupo de los no Clavicipitáceos se divide en tres clases (Cuadro I) (Rodríguez *et al.*, 2009; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Clasificación de los hongos endófitos (Rodríguez *et al.*, 2009; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Criterio de Clasificación	Clavicipitáceo		No Clavicipitáceo	
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Rango de Huéspedes	Reducido	Amplio	Amplio	Amplio
Tejidos que colonizan	Tallos y rizoma	Tallos, raíz y rizoma	Tallos, hojas, corteza, flores y frutos	Raíz
Colonización <i>in planta</i>	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
Diversidad <i>in planta</i>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
Transmisión*	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Beneficios de conveniencia	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia a la sequía y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia al estrés biótico y abiótico y protegen contra los hongos patógenos por acción de los metabolitos secundarios	Inducen resistencia a las enfermedades, protección contra los herbívoros y modifican la sensibilidad al estrés abiótico mediante la producción de los metabolitos secundarios	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros

***Transmisión de hongos endófitos en las plantas: vertical, a través de las semillas, y horizontal, se adquieren del medio ambiente.**

Se ha demostrado que los hongos endófitos pueden influir en la protección de su hospedera, mediante tres mecanismos (Herre *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

- 1) Indirecto: incrementando las defensas químicas o fisiológicas intrínsecas al hospedero contra patógenos.
- 2) Directo: mediante defensas producidas directamente por los endófitos, por lo que son extrínsecos al huésped.
- 3) Ecológico: se lleva a cabo por ocupación del nicho ecológico, por hiperparasitismo y predación.

Un ejemplo de mecanismo indirecto de protección, se ve reflejado en los estudios realizados con una especie endófito de *Fusarium* denominada E5 aislada de *Euphorbia pekinensis*, en donde se ha demostrado que el elicitor puede inducir la producción de diterpenos y triterpenos en cultivos celulares en suspensión de *E. pekinensis*, además produce un efecto protector relacionado con enzimas peroxidasa, fenilalanina amonio liasa y catalasa (Gao *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011).

Por otra parte, un ejemplo de mecanismo directo es el ácido nonanóico un compuesto producido por *Trichoderma hartzium* un endófito de *Teobroma cacao*, que posee fuertes efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *Crinipellis perniciososa* y *Moniliophthora rorei* dos patógenos del cacao (Herre *et al.*, 2007).

Por último, especies de *Trichoderma* parasitan las hifas de patógenos como *Rhizoctonia solani* envolviéndolas, penetrándolas y liberando liasas para descomponer la pared celular del patógeno. Este proceso se conoce como hiperparasitismo. Por otro lado, en condiciones limitadas de nutrientes *Trichoderma* es capaz de producir y secretar una gran batería de enzimas que tienen como fin la descomposición de la pared celular del patógeno para su posterior asimilación, representando así la predación del patógeno por el endófito. A estas relaciones entre endófito y patógeno se le denomina mecanismo ecológico (Grosch *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010).

Los hongos endófitos constituyen un recurso de diversidad biológica y genética no descrita en su totalidad, y con aplicaciones biotecnológicas prácticas inmediatas. México cuenta con una alta diversidad de hongos microscópicos, de los cuales solamente 7, 000 han sido registrados, por lo que es considerado como uno de los lugares más biodiversos en el mundo. Es evidente que se sabe muy poco acerca de la ecología y biodiversidad de los hongos microscópicos en México, y en particular de los endófitos (Guzmán, 1998; González *et al.*, 2007). La cantidad total de especies de hongos endófitos está directamente relacionada con el número de hospederas que los puedan albergar (Strobel *et al.*, 2004; Schmit & Mueller, 2006).

6. Relación planta endófito

A nivel mundial existe una gran cantidad de especies vegetales (300 mil especies de plantas superiores). Por lo tanto, es necesario utilizar un criterio de selección apropiado que facilite y haga mas eficiente la difícil tarea de definir de que planta se podrían aislar hongos endófitos que pudieran producir metabolitos secundarios de interés. Los criterios de selección de plantas hospederas, consisten en coleccionar: (Strobel *et al.*, 2004; Arnold, 2007).

- 1) Plantas que crecen en áreas de alta biodiversidad. La presión evolutiva constante para sobrevivir en ecosistemas donde la competencia por nutrientes y espacio es muy grande, provoca una alta diversidad biológica que a la vez implica alta diversidad química. Las selvas tropicales son un ejemplo notable de este tipo de ambiente, la competencia es grande, los recursos son limitados, y la presión selectiva está en su apogeo. Esto incrementa la probabilidad de obtener hongos endófitos productores de nuevos compuestos (Strobel *et al.*, 2004).
- 2) Plantas que crecen en hábitats especiales. Estas especies tienen la posibilidad de desarrollar diferentes estrategias de supervivencia; un ejemplo de esto es la planta acuática *Rhyncholacis penicillata*, que vive en un ambiente acuático drástico, y de la cual se aisló una cepa de *Serratia*

marcenscens que produce oocidina A, un compuesto antioomiceto (Strobel *et al.*, 2004).

- 3) Plantas empleadas en la medicina tradicional. Como ejemplo importante se encuentra *Taxus brevifolia* de la cual se aisló por primera vez el Taxol, un compuesto ampliamente utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer. Posteriormente, este compuesto se obtuvo de *Taxomyces andreanae* un endófito de *T. brevifolia* (Tan & Zou, 2001; Strobel *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007; Kharwar *et al.*, 2011).
- 4) Plantas endémicas o con longevidad inusual (Strobel & Daisy, 2003; Strobel *et al.*, 2004). Por ejemplo, la planta *Gingko biloba* una especie de alta longevidad, se aisló el endófito *Xylaria* sp. que muestra una alta actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhae* y *Salmonella typhimurium* (Gond *et al.*, 2010).

Al colonizar los hongos endófitos a su planta hospedera, obtienen nutrición y protección por parte de la planta huésped, a cambio algunos de ellos, mediante la producción de ciertos metabolitos secundarios le confieren características defensivas, así como un mejor crecimiento (Tan & Zou, 2001; Rodríguez *et al.*, 2009).

Las hojas y raíces representan los nichos más dinámicos entre los endófitos y las plantas y con su entorno. Los hongos que habitan en estos tejidos biológicamente activos pueden compartir características que les permiten crecer y persistir en un medio cambiante. Cabe resaltar que los hongos que colonizan raíces se encuentran en un contexto fundamentalmente distinto al de los hongos en la filósfera, es decir, mientras que los hongos de la rizósfera se localizan en un ambiente que, en muchos casos contiene humedad, material orgánico y poca o ninguna luz; los endófitos foliares se mueven en gran parte de las corrientes de aire, deben crecer y penetrar el follaje, hacer frente a la desecación, radiación UV, el movimiento y la falta de una fuente de nutrientes (Arnold, 2007).

La simbiosis que establece el endófito y la planta hospedera puede ir desde los mutualistas y saprobios facultativos hasta los parásitos. Su colonización puede ser inter o intracelular, localizada o sistémica (Tan & Zou, 2001; Schulz & Boyle, 2005; Rodriguez *et al.*, 2009). Sin embargo, las interacciones dentro de los tejidos de la hospedera suelen ser muy sutiles, ya que las plantas normalmente no muestran ningún cambio observable en su tasa de crecimiento, no acumulan biomasa, tampoco modifican su raíz y no muestran características fácilmente cuantificables tras la colonización del endófito. No obstante, cuando las plantas son desafiadas por factores de estrés biótico o abiótico, la importancia de los endófitos se hace evidente (Arnold, 2007).

Para determinar la presencia de hongos endófitos en las plantas, se establecieron tres técnicas para su detección e identificación en los tejidos vegetales: (1) la observación histológica; (2) esterilización de la superficie del tejido del huésped y el aislamiento de los hongos emergentes en un medio de crecimiento apropiado, y (3) la detección de la química específica (por ejemplo, amplificación directa de ADN fúngico a partir de tejidos de plantas colonizadas). El primer método es el más adecuado para distinguir en qué medida un hongo coloniza realmente a su anfitrión. Durante el crecimiento de la hospedera, la diversidad y la densidad de la colonización microbiana aumenta, ya que la transmisión horizontal predomina, es decir, los endófitos se adquieren a través de otra planta hospedera por condiciones ambientales (Schulz & Boyle, 2005; Rodriguez *et al.*, 2009; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Se ha demostrado que algunos endófitos se adaptan y crecen solo en ciertos órganos de la planta, es decir, su nicho de crecimiento es específico (Schulz & Boyle, 2005).

La colonización y el crecimiento de los endófitos no solo dependen de la etapa de desarrollo de los simbioses, sino también de la virulencia del endófito, de la respuesta de defensa del huésped y de las condiciones ambientales. Al alterar estos factores se puede dar origen a la aparición de síntomas de enfermedad en la planta hospedera. Por lo tanto, el estadio del endófito no excluye la posibilidad de que un hongo puede llegar a ser patógeno cuando el anfitrión está estresado o

senescente (Rodríguez *et al.*, 2009). En una relación endofítica, la interacción finamente equilibrada entre el huésped y el hospedero dificulta la patogenicidad; el hongo endófito produce factores de virulencia y a su vez la planta huésped origina respuestas de defensa, provocando que ambas se encuentren en equilibrio y por lo tanto la enfermedad no se desarrolle. Este tipo de interacciones forman parte de la hipótesis del antagonismo balanceado, que en resumen describe la interacción entre la virulencia endofítica y los factores de respuesta de defensa de las plantas en la colonización asintomática y el efecto de los factores ambientales (Schulz, 2002; Schulz & Boyle, 2005; Kusari *et al.*, 2012) (Figura 2). Parece difícil comprender que en esta relación asintomática el endófito produce factores de virulencia, metabolitos secundarios fitotóxicos y exoenzimas, lo cual también determina su colonización en la hospedera al penetrar los tejidos y barreras de la planta, es decir, la síntesis de metabolitos secundarios por parte de los endófitos también es generada debido al efecto beneficioso de colonización y supervivencia que le proporcionan a sí mismo (Schulz & Boyle, 2005; Promputtha *et al.*, 2007).

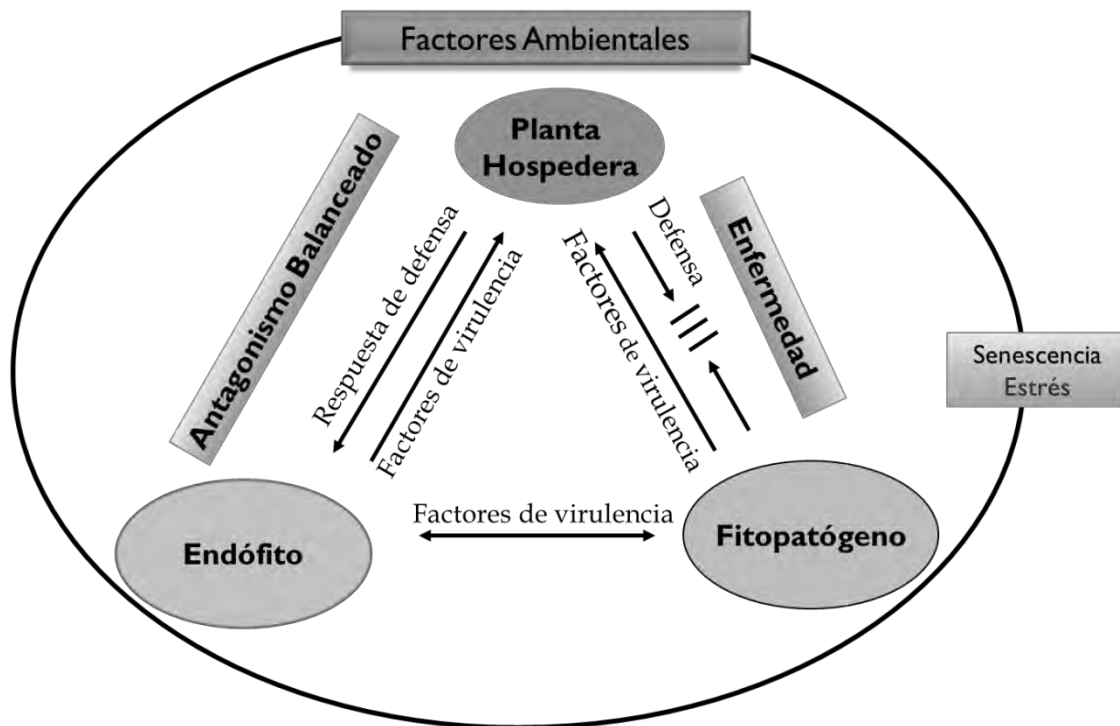


Figura 2. Hipótesis del antagonismo balanceado (Schulz & Boyle, 2005).

Es importante destacar que los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos podrían afectar a la comunidad ecológica en un nivel más amplio, como reguladores del crecimiento de plantas, antimicrobianos, antivirales e insecticidas, o incluso mediar la resistencia a algunos tipos de estrés abiótico. Esto implica que los endófitos pueden ser fuentes potenciales de nuevos productos naturales de interés agroquímico y/o farmacéutico, con un alto potencial en la industria (Tan & Zou, 2001; Strobel *et al.*, 2004; Debbab *et al.*, 2009; Li & Tao, 2009; Duke *et al.*, 2010; Gond *et al.*, 2010).

Además de mantener diversas interacciones con su hospedera, los hongos endófitos interactúan antagónicamente entre ellos dentro de la planta. Estas interacciones interespecíficas tienen como fin la competencia por los nutrientes y la obtención de más espacio o territorio. El éxito en la captación de recursos está determinada por varios factores, entre ellos una buena dispersión, la rápida germinación de las esporas, extensión del micelio y la capacidad para utilizar los compuestos orgánicos disponibles previamente sin colonizar (Boddy, 2000).

Las interacciones antagónicas pueden ser mediadas por dos mecanismos: (1) mecanismo químico o indirecto. En este caso los efectos antagónicos son a través de metabolitos secundarios solubles y/o productos de desecho o bien, mediante enzimas o compuestos volátiles, y (2) mecanismo físico o directo. Este mecanismo se da una vez que se establece el contacto y puede ser a nivel de hifas y/o micelios. Por un lado, las interacciones entre hifas, pueden ser por interferencias y/o parasitismo y por otra parte, las interacciones a nivel de micelio, se dan principalmente por formación de barreras y cordones miceliales (Boddy, 2000). Estos mecanismos se han evidenciado en cultivos *in vitro* donde los hongos antagonistas producen metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, además de evidenciar la clara interferencia en el crecimiento de sus competidores (Boddy, 2000; Grosch *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010; Varughese *et al.*, 2013). Es por esto, que el estudio químico y biológico de los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos seleccionados con base en las interacciones antagónicas observadas *in vitro*, podría conducir al descubrimiento de moléculas

biológicamente activas y estructuralmente novedosas (Boddy, 2000; Herre *et al.*, 2005; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

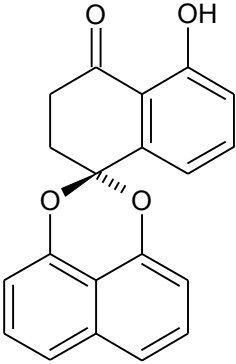
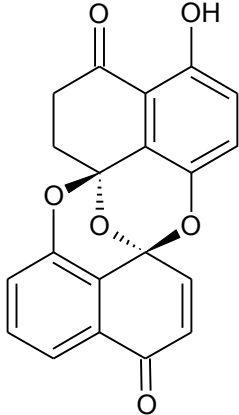
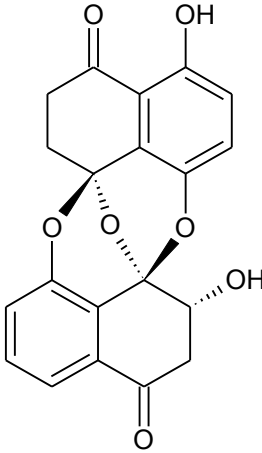
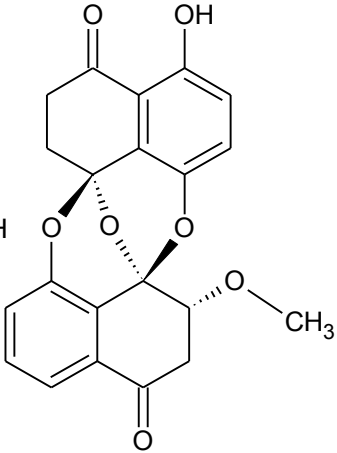
7. Metabolismo secundario de hongos endófitos

Existe una gran variedad de metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos, los cuales pertenecen a diversos grupos estructurales, incluyendo los esteroides, xantonas, fenoles, isocumarinas, derivados de perileno, quinonas, furandionas, alcaloides, terpenoides, depsipéptidos, y citocalasinas, entre otros (Tan & Zou, 2001; Schulz *et al.*, 2002; Schulz & Boyle, 2005; Yu *et al.*, 2010). Estos compuestos se sintetizan principalmente a través de la ruta del acetato mevalonato y de los policétidos (Schulz & Boyle, 2005; Gunatilaka, 2006).

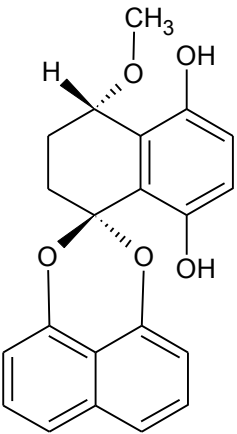
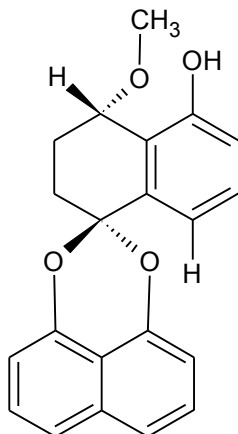
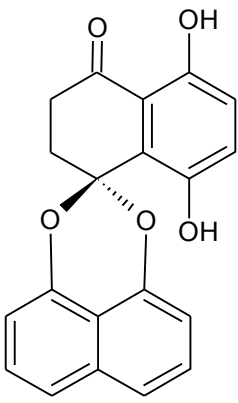
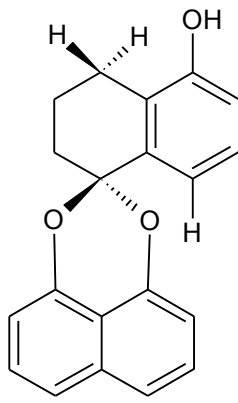
Las investigaciones llevadas a cabo por Tan y Zou (2001), Schulz y Boyle (2005) y Strobel (2004), entre otros grupos de investigación, han puesto en evidencia grandes cantidades de metabolitos secundarios asociados a hongos endófitos y su amplia actividad biológica, lo que proporciona una visión del potencial biológico que ofrece la investigación exhaustiva de los productos naturales obtenidos de hongos endófitos. Estos microorganismos resultan ser una fuente prometedora de compuestos con diversas actividades biológicas, y específicamente podrían tener un importante impacto en el desarrollo en moléculas de uso farmacéutico y agroquímico (Tan & Zou, 2001; Strobel *et al.*, 2004; Schulz & Boyle, 2005; Gunatilaka, 2006).

En el Cuadro 2 se describen ejemplos selectos de metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos, así como su actividad biológica.

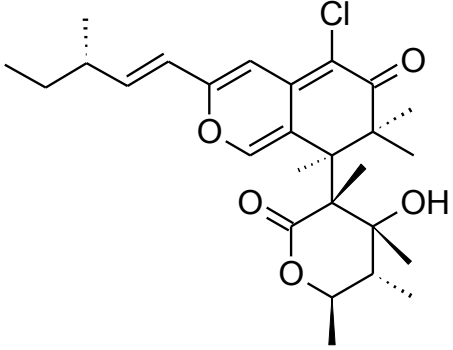
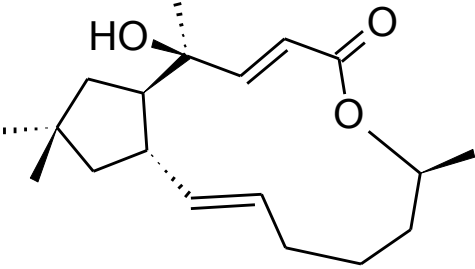
Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos.

Hongo Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Edenia gomezpompae</i> (Pleosporaceae)</p> <p>Endófito de</p> <p><i>Callicarpa acuminata</i> (Verbenaceae)</p> <p>(Macías-Rubalcava <i>et al.</i>, 2008; Macías-Rubalcava <i>et al.</i>, 2014)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Palmarumicina CP₂</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Preusomerina EG₁</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Preusomerina EG₂</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Preusomerina EG₃</p> </div> </div>	<p>Antifúngico</p> <p>vs</p> <p><i>Alternaria solani</i></p> <p><i>Phytophthora parasitica</i></p> <p><i>Phytophthora capsici</i></p> <p><i>Fusarium oxysporum</i></p> <p>Fitotóxica</p> <p>vs</p> <p><i>Amaranthus hypochondriacus</i></p> <p><i>Solanum lycopersicum</i></p> <p><i>Echinochloa crus-galli</i></p>

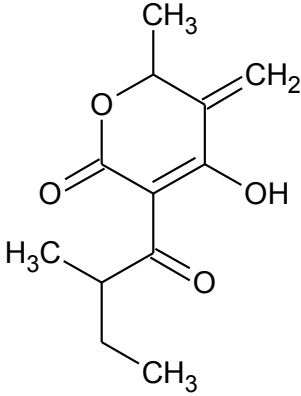
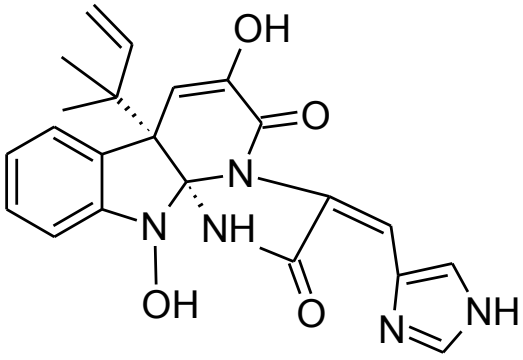
Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (Continuación).

Hongo Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Edenia gomezpompae</i> (Pleosporaceae)</p> <p>Endófito de <i>Callicarpa acuminata</i> (Verbenaceae) (Macías-Rubalcava <i>et al.</i>, 2014)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Palmarumicina EG₁</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Palmarumicina CP₁₉</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Palmarumicina CP₁₇</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Preusomerina EG₄</p> </div> </div>	<p>Fitotóxica vs <i>Amaranthus hypochondriacus</i></p> <p><i>Solanum lycopersicum</i></p> <p><i>Echinochloa crus-galli</i></p>

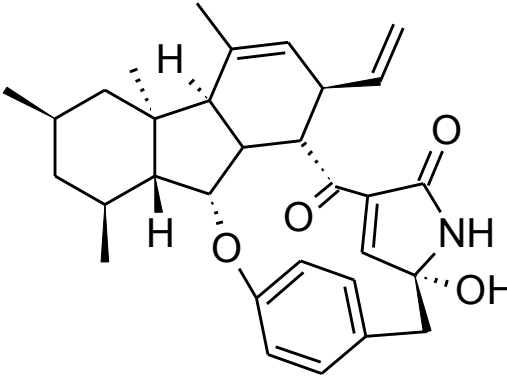
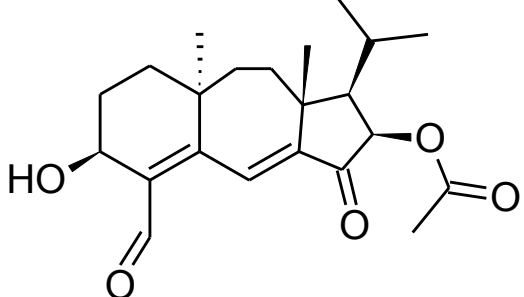
Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (Continuación).

Hongo Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae) Endófito de <i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae) (Qin <i>et al.</i>, 2009)</p>	 <p>Quetomugilina D</p>	<p>Antifúngico vs <i>Mucor miehei</i></p> <p>Tóxico vs <i>Artemina salina</i></p>
<p><i>Aspergillus clavatus</i> H-037 (Trichocomaceae) Endófito de <i>Taxus mairei</i> <i>Torreya grandis</i> (Taxaceae) (Zhu <i>et al.</i>, 2000)</p>	 <p>Brefeldina A</p>	<p>Antifúngico vs <i>Candida albicans</i></p> <p>Antiviral vs Sindbis</p> <p>Citotóxico vs Líneas celulares HCT 116</p>

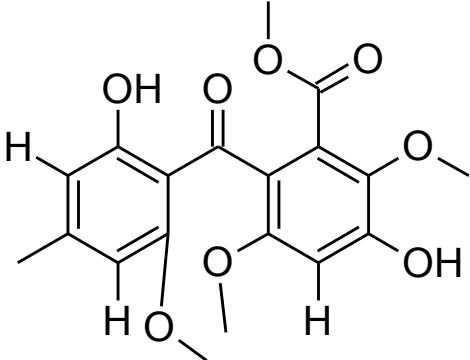
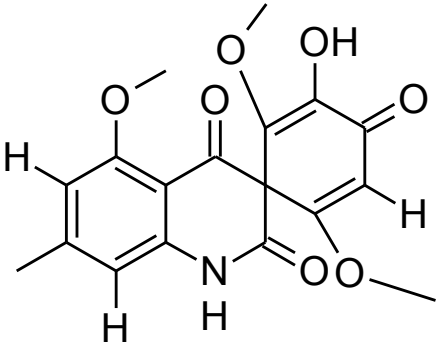
Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (Continuación).

Hongo Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Fusarium</i> sp. Endófito de <i>Selaginella pallescens</i> (Tan & Zou, 2001)</p>	 <p>Pentacétido CR377</p>	<p>Antifúngico vs <i>Candida albicans</i></p>
<p><i>Penicillium</i> sp. (Trichomaceae) Endófito de <i>Mauritia flexuosa</i> (Arecaceae) (Ferreira-Koolen <i>et al.</i>, 2012)</p>	 <p>Glandicolina B</p>	<p>Antibacteriano vs <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Escherichia coli</i></p>

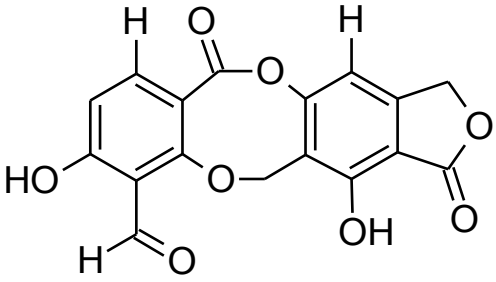
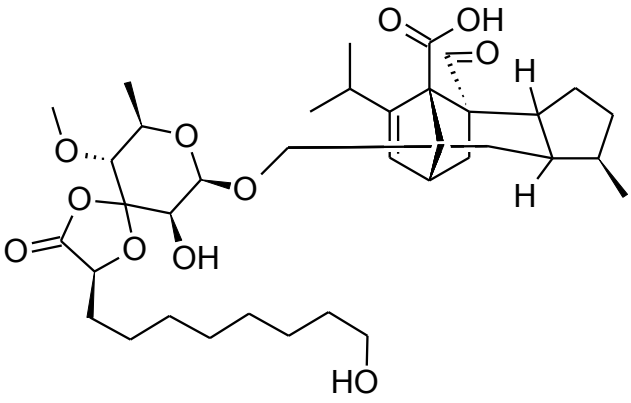
Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (Continuación).

Hongos Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Acremonium zeae</i> NRRL 13540 (Hypocreales mitosporico)</p> <p>Endófito de <i>Zea mays L.</i> (Poaceae)</p> <p>(Wicklow <i>et al.</i>, 2005)</p>	 <p>Pirrocidina A</p>	<p>Antifúngico vs <i>Fusarium verticillioides</i> <i>Aspergillus flavus</i></p> <p>Antibacteriano vs <i>Clavibacter michiganensis</i></p>
<p>Hongo CR115 no identificado</p> <p>Endófito de <i>Daphnopsis americana</i> (Thymelaeaceae)</p> <p>(Hughes & Trauner, 2003)</p>	 <p>Guanacastepeno A</p>	<p>Antibacteriano vs <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecium</i></p>

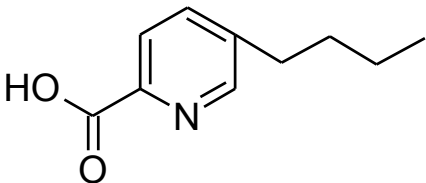
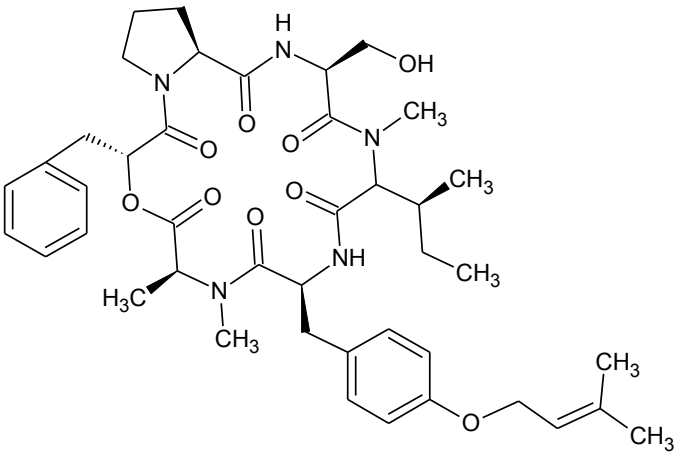
Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (Continuación).

Hongos Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura Química	Actividad biológica
<p><i>Aspergillus fumigatus</i></p> <p>Endófito de</p> <p><i>Cynodon dactylon.</i> (<i>Poaceae</i>)</p> <p>(Liu <i>et al.</i>, 2004)</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Asperfumina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Asperfumoide</p> </div>	<p>Antifúngico</p> <p>vs</p> <p><i>Candida albicans</i></p>

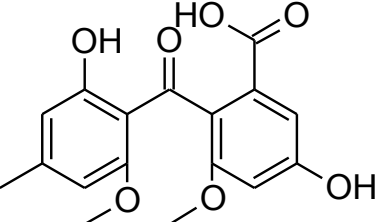
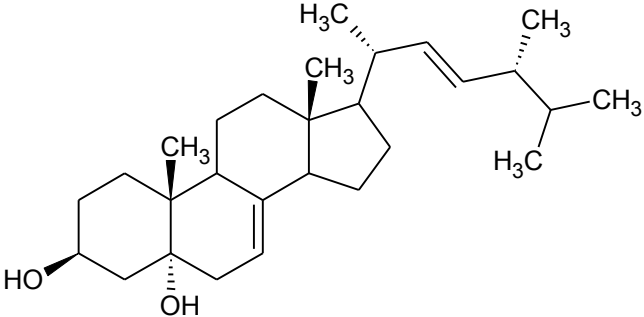
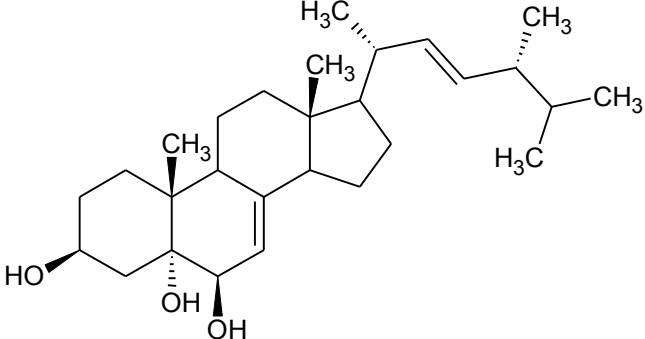
Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (Continuación).

Hongos Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Cordyceps Dipterigen</i> F0307</p> <p>Endófito de <i>Desmotetes incomparabilis</i></p> <p>(Varughese <i>et al.</i>, 2013)</p>	 <p style="text-align: center;">Cordicepsidona A</p>	<p>Antifúngico vs <i>Gibeberella fujikuroi</i> <i>Pythium ultimum</i></p>
<p><i>Morinia pestalozzioides</i></p> <p>Endófito de <i>Santolina rosmarinifolia</i> (Asteraceae)</p> <p><i>Thymus mastichina</i> (Lamiaceae)</p> <p>(Basilio <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p style="text-align: center;">Moriniafungina</p>	<p>Antifúngico vs <i>Criptococcus neoformans</i> <i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. lusitaniae</i></p>

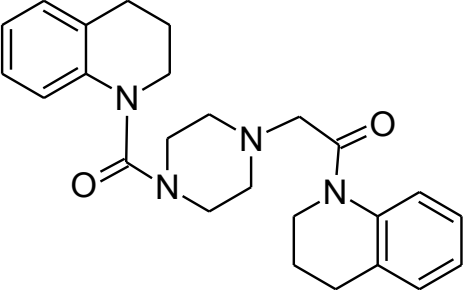
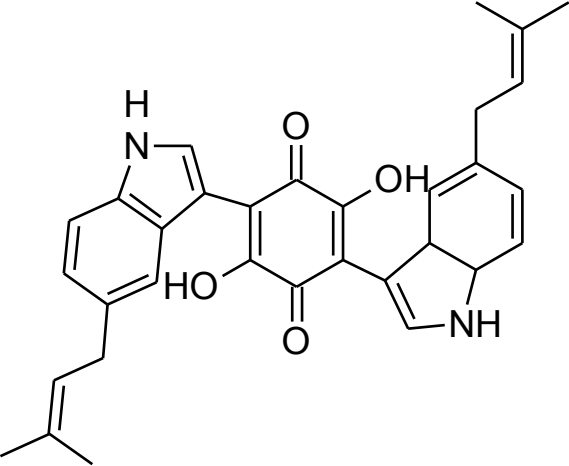
Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (Continuación).

Hongos Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Fusarium verticillioides</i></p> <p>Endófito de</p> <p><i>Zea mays</i></p> <p>(Bacon <i>et al.</i>, 2004; Son <i>et al.</i>, 2008)</p>	 <p>Ácido fusárico</p>	<p>Antibiótico</p> <p>vs</p> <p><i>Bacillus mojavensis</i></p> <p>Antioomiceto</p> <p>vs</p> <p><i>Phytophthora infestans</i></p>
<p><i>Pullularia</i> sp.</p> <p>BCC 8613 (Dothioraceae)</p> <p>Endófito de</p> <p><i>Calophyllum</i> sp. (Calophyllaceae)</p> <p>(Isaka <i>et al.</i>, 2007)</p>	 <p>Pulularina A</p>	<p>Antiplasmódico</p> <p>vs</p> <p><i>Plasmodium falciparum</i> K1</p> <p>Antiviral</p> <p>vs</p> <p>Herpes simple (HSV-1)</p>

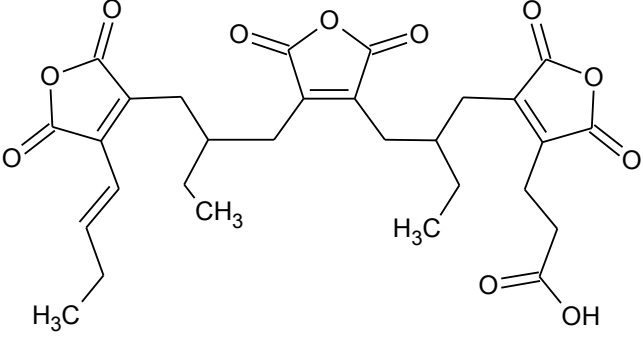
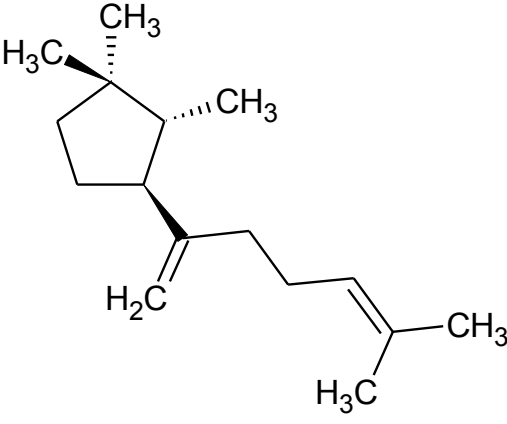
Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (Continuación).

Hongos Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Rhizoctonia</i> sp.Cy064 (Hymemomycetes mitosporico)</p> <p>Endófito de <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p> <p>(Ma <i>et al.</i>, 2004)</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Ácido rizocetónico</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Ergosterol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>3β, 5α, 6β-trihidroxiergosta-7.22-dieno</p> </div>	<p>Antibiótico</p> <p>vs</p> <p><i>Helicobacter pylori</i></p>

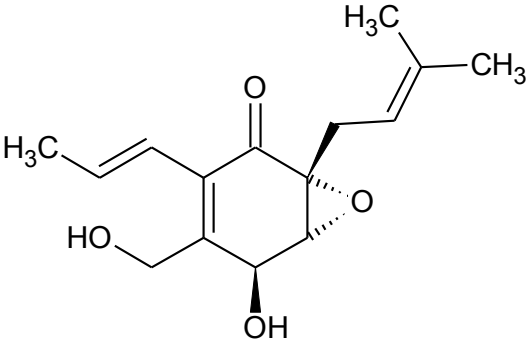
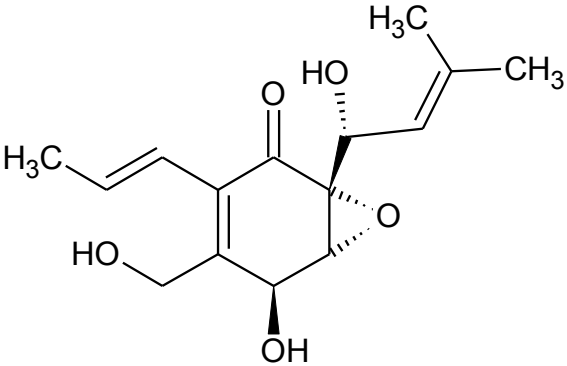
Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (Continuación).

Hongos Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Aspergillus niger</i> IFB E003 (Trichocomaceae)</p> <p>Endófito de <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p> <p>(Shen <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p style="text-align: center;">Aspernigerina</p>	<p>Citotóxico vs</p> <p>En líneas celulares de los carcinomas nasofaríngeo epidermoide, cervical Hela y colorectal SW1116</p>
<p><i>Chaetomium</i> sp. (Chaetomiaceae)</p> <p>Endófito de <i>Salvia officinalis</i> (Lamiaceae)</p> <p>(Debbab <i>et al.</i>, 2009)</p>	 <p style="text-align: center;">Cocliodinol</p>	<p>Citotóxico vs</p> <p>Contra líneas celulares de linfoma murino t L5178Y</p>

Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (Continuación).

Hongos Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Dwayaangam colodena</i> (Orbiliaceae)</p> <p>Endófito de <i>Picea rubens</i> (Pinaceae)</p> <p>(Sumarah <i>et al.</i>, 2010)</p>	 <p style="text-align: center;">Cordianhídrido B</p>	<p>Insecticida vs Lepidóptero <i>Choristoneura fumiferana</i></p>
<p><i>Epichloe festucae.</i> (Clavicipitaceae)</p> <p>Endófito de Varias especies de pastos (Poaceae)</p> <p>(Bultman & Leuchtmann, 2008)</p>	 <p style="text-align: center;">Chokol K</p> <p style="text-align: center;">Esqueleto reportado solo en endófitos</p>	<p>Atractor de insectos</p> <p>Mosca <i>Botanophyla</i> para la propagación de esporas</p>

Cuadro 2. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos. (Continuación).

Hongos Endófito /planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Pestalotiopsis jesteri</i> (Amphisphaeriaceae)</p> <p>Endófito de <i>Fragariae bodenii</i> (Gentianaceae)</p> <p>(Li & Strobel, 2001)</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Jesterona</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Hidroxi-jesterona</p> </div>	<p>Antioomiceto vs <i>Pythium ultimum</i></p> <p><i>Aphanomyces</i> sp.</p> <p><i>Phytophthora citrophthora</i></p> <p><i>Phytophthora cinnamomi</i></p>

III. Hipótesis

Se ha demostrado que los hongos endófitos producen una gran variedad de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas, como agentes antifúngicos, bactericidas, nematocidas y fitotóxicos, entre otras; en consecuencia, algunos de ellos pueden contribuir de manera importante a los mecanismos de protección de sus hospederas. Por esta razón, aislar hongos endófitos de *L. acapulcense* colectada en una zona de alta biodiversidad, podría resultar en una fuente novedosa de origen natural para la obtención de compuestos que posean actividad antifúngica y/o fitotóxica.

IV. Objetivos

1. Objetivos generales

Aislar y purificar hongos endófitos y fitopatógenos de hojas de *Lysiloma acapulcense*, colectadas en la 'Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla', estableciendo sus características macro y microscópicas, así como evidenciar el potencial antagónico de los hongos endófitos, mediante bioensayos de antagonismo múltiple entre endófitos y fitopatógenos.

Establecer el potencial biológico de los extractos orgánicos obtenidos a partir del medio de cultivo y micelio, sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba, con el fin de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones que se establecen entre las plantas hospederas y los hongos endófitos. Asimismo, contribuir al posible desarrollo de nuevos agentes antifúngicos o herbicidas de origen natural que sean eficaces y más nobles con el ambiente.

2. Objetivos particulares

- Aislar hongos endófitos y fitopatógenos, de hojas sanas y con síntomas de enfermedad respectivamente, de *L. acapulcense*.
- Realizar las resiembras necesarias en cajas de Petri con agar-papa-dextrosa (PDA), hasta obtener aislamientos puros de hongos endófitos y fitopatógenos, tomando como criterio de pureza sus características macroscópicas en el anverso y reverso de sus micelios.
- Identificar a nivel de género a los hongos endófitos y fitopatógenos en estudio, mediante el análisis detallado de sus características macro y microscópicas, empleando técnicas de microcultivo.

- Establecer el potencial antagónico de los hongos endófitos mediante la realización de bioensayos de antagonismo múltiple, utilizando como competidores a los hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense*.
- Determinar las condiciones óptimas de crecimiento para cada hongo endófito puro, realizando cultivos en pequeña escala, empleando medio caldo-papa-dextrosa en condiciones de incubación estáticas y de agitación, y medio de arroz incubado en condiciones estáticas.
- Obtener los extractos orgánicos del medio de cultivo y de micelio, por medio de particiones sucesivas del medio de cultivo y mediante maceración exhaustiva del micelio, empleando diclorometano y acetato de etilo, en ambos casos respectivamente.
- Realizar un análisis cromatográfico en capa fina de los extractos orgánicos obtenidos del medio de cultivo y micelio y establecer su similitud.
- Evaluar cuantitativamente el potencial antifúngico de los extractos orgánicos sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos de importancia en la agricultura: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica* y *Pythium aphanidermatum*, y sobre los hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense*, empleando el método de dilución en agar.
- Establecer cuantitativamente el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*.
- Realizar la identificación preliminar de los componentes presentes en al menos uno de los extractos más activos utilizando la técnica de Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM.)

V. Materiales y métodos

1. Sitio de colecta

El material vegetal objeto de estudio se colectó utilizando un criterio ecológico en una zona de alta diversidad biológica, la 'Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH)' ubicada en el municipio de Quilamula, estado de Morelos, México. Esta reserva es un territorio ubicado en la Cuenca del río Balsas, rico en recursos hidrológicos y con una importante cubierta forestal; y Abarca los estados de Morelos, Puebla y Guerrero. Está compuesta de selva baja caducifolia, bosque de encino y selva baja subcaducifolia (Fernández-Saldaña *et al.*, 2007). Cuenta con 59,030 hectáreas y representa uno de los remanentes más importantes de selva baja subcaducifolia, caracterizada por contener árboles que no sobrepasan los 12 m de altura, sus temperaturas anuales varían entre 20 y 29°C, tiene un rango altitudinal que va de los 700 a los 2,200 metros sobre el nivel del mar (msnm) (SEMARNAT, 2005).

Para el aislamiento de los hongos endófitos, se colectaron hojas sanas del árbol *Lysiloma acapulcense* (sin signos de enfermedad, ni heridas causadas por herbívoros) y de manera adicional, se colectaron hojas con signos de enfermedad (sin ataques por herbívoros), para el aislamiento de los hongos fitopatógenos.

2. Medios de cultivo empleados para el aislamiento, purificación y crecimiento óptimo de los hongos endófitos y fitopatógenos

En el Cuadro 3 se resume la composición de los medios de cultivo empleados para el aislamiento, purificación y caracterización a nivel macro y microscópico de los diferentes hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *L. acapulcense*. Así, como los utilizados para establecer las condiciones óptimas de crecimiento de cada uno de los hongos endófitos puros.

Cuadro 3. Composición de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento, purificación y crecimiento óptimo de los hongos endófitos y fitopatógenos.

Medio de cultivo*	Composición
Papa-dextrosa-agar (PDA)	200 g de papas, 20 g de dextrosa, 15 g de agar en 1000 mL de agua destilada. Hervir durante 20 minutos la papa fresca previamente pelada y cortada en cubos. Posteriormente, filtrar a través de gasa la infusión de papa y agregar la dextrosa y el agar. Por último, añadir agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL (Ulloa & Hanlin, 1978; Leslie & Summerell, 2006; Armendáriz-Guillén, 2013).
Caldo papa-dextrosa (CPD)	200 g de papas, 20 g de dextrosa en 1000 mL agua destilada. Hervir durante 20 minutos la papa fresca previamente pelada y cortada en cubos. Posteriormente, filtrar a través de gasa la infusión de papa y agregar la dextrosa y el agar. Por último, añadir agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL (Armendáriz-Guillén, 2013).
Medio arroz (MA)	200 g arroz y 200 mL de agua destilada. Hidratar el arroz durante una hora en 200 mL de agua destilada, filtrarlo a través de gasa y posteriormente, agregar 200 mL de agua destilada (Aly <i>et al.</i> , 2008; Armendáriz-Guillén, 2013).

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

3. Aislamiento y purificación de hongos endófitos y fitopatógenos de *Lysiloma acapulcense*

3.1 Hongos endófitos

Para el aislamiento de los hongos endófitos se utilizaron seis hojas sanas de *L. acapulcense*. El material vegetal se lavó con agua purificada y después con agua destilada estéril. Posteriormente, se esterilizó superficialmente empleando la siguiente secuencia de soluciones: etanol al 75%, agua destilada estéril, NaClO al 3.4%, agua destilada estéril, etanol al 75% y agua destilada estéril, cada una de ellas por 1 min (González *et al.*, 2007, 2009).

Las hojas esterilizadas se secaron con papel absorbente estéril y con ayuda de un bisturí esterilizado a la flama se obtuvieron pequeños segmentos de 2 x 2 mm de la parte central de las hojas sin tomar nervaduras. Al azar se seleccionarán 4 segmentos por hoja y se colocaron en cajas de Petri con papa-dextrosa-agar (PDA) + Cloranfenicol (500 mg/L) y otros 4 segmentos en medio agar-agua destilada al 2% (AA) + Cloranfenicol (500 mg/L). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente con ciclos de luz fluorescente-oscuridad (12:12 h) y se revisaron periódicamente durante seis semanas. Cada colonia distinta que emergió a partir de cada segmento de hoja se transfirió a cajas de Petri con medio PDA con el fin de obtener colonias puras.

3.2 Hongos fitopatógenos

El aislamiento de los microorganismos fitopatógenos se llevó a cabo utilizando las hojas de *L. acapulcense* que mostraron signos de enfermedad es decir, manchas o zonas dañadas. Las hojas seleccionadas se lavaron con agua corriente y después con agua destilada estéril. Enseguida, se esterilizaron superficialmente con NaClO al 2% durante 2 min. Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril y se colocaron en cámaras húmedas. Las cajas de Petri se incubaron a temperatura ambiente con fotoperíodos de luz-oscuridad de 12:12 h. Las colonias

que emergieron de las partes dañadas se transfirieron a cajas Petri con PDA + cloranfenicol 500 mg/L.

3.3 Purificación de hongos endófitos y fitopatógenos

Las colonias de hongos endófitos y fitopatógenos que emergieron de los segmentos de hoja o de las hojas con lesiones, respectivamente, una vez transferidos a cajas Petri con PDA, se purificaron haciendo las resiembras necesarias hasta obtener cultivos puros. En algunos casos fue necesaria la adición de los antibióticos cloranfenicol, nitrofurantoína o ampicilina a una concentración de 1 g/L, para eliminar la presencia de bacterias endófitas. Los diferentes hongos aislados, se resembraron hasta observar que las características de crecimiento fueran homogéneas. La pureza de los microorganismos se estableció mediante un análisis detallado de sus características macro y microscópicas.

4. Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos aislados de la planta *L. acapulcense*

Las características macroscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos se establecieron utilizando cultivos en medio PDA incubados con ciclos de luz fluorescente-obscuridad 12:12 h. Las observaciones se realizaron periódicamente con ayuda de un microscopio estereoscópico, hasta su crecimiento al límite en las cajas de Petri, el cual difiere según su tasa de crecimiento.

Cada uno de los microorganismos se analizó por cuadruplicado, registrando las características del micelio aéreo: tipo de crecimiento, textura, consistencia, superficie y color del micelio en el anverso (parte superior del micelio) y reverso (parte inferior del micelio). También se registró la producción de exudado, así como la difusión de pigmentos coloridos en el medio de cultivo (posibles metabolitos secundarios) (Leslie & Summerell, 2006; Sánchez-Fernández, 2010; Armendáriz-Guillén, 2013). Al mismo tiempo, se determinó el área de crecimiento

(cm²), midiendo diariamente su crecimiento radial o irregular, hasta llegar a los límites de las cajas de Petri, utilizando un escáner HP Laser Jet M1005 MFP. Con esta información se obtuvieron las tasas de crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógenos, graficando el crecimiento de los hongos en cm² vs días de crecimiento. Por último, se obtuvieron fotografías de los hongos endófitos y fitopatógenos a diferentes tiempos de crecimiento.

La caracterización microscópica de los microorganismos, se realizó analizando detalladamente preparaciones frescas de los micelios, obtenidas por medio de la técnica de microcultivo. Para lo cual, se cortaron cuadros de PDA de 1 cm² y con un grosor aproximado de 5 mm. Posteriormente, el cuadro de PDA se inoculó por picadura en los cuatro lados con ayuda de un asa estéril y se colocó entre dos portaobjetos estériles que se ubicaron en una caja Petri que contiene un triángulo de vidrio, el cual sostiene los portaobjetos. Las cajas de Petri se incubaron por una semana a temperatura ambiente con fotoperíodo de luz fluorescente-obscuridad de 12:12 h. Al término del período de incubación se separaron los dos cubreobjetos y se desechó el agar. A continuación, se realizó una tinción en fresco del micelio adherido en cada uno de los portaobjetos, empleando una gota de colorante azul de lactofenol y rojo congo. Las preparaciones se observaron a 10x y 40x en un microscopio óptico marca Motic (modelo BA410). Las características microscópicas registradas para cada hongo en estudio incluyen: el tipo de micelio (septado o cenocítico), la presencia de esporas y/o estructuras de reproducción (esporangióforos, conidióforos, basidióforos, ascas) (Sánchez-Fernández, 2010; Armendáriz-Guillén, 2013). Finalmente, se obtuvieron diversas fotografías de las estructuras observadas, empleando una cámara digital, Moticam 2000 de 2.0 (Digital microscopy).

5. Bioensayos de antagonismo múltiple

Los bioensayos de antagonismo múltiple se realizaron utilizando a los hongos endófitos puros de *L. acapulcense*, y los hongos fitopatógenos de la misma hospedera.

Los microorganismos se inocularon de acuerdo a sus tasas de crecimiento, empleando cajas Petri de vidrio estériles, de 15 cm diámetro que contenían 50 mL de PDA. Cada microorganismo de prueba se sembró utilizando inóculos de 5 mm de diámetro, de los micelios de los hongos previamente incubados en PDA por aproximadamente 10 días.

Los inóculos se colocaron equidistantes distribuyéndolos en forma de reloj como se muestra en la Figura 3. Las cajas Petri se incubaron a temperatura ambiente con fotoperíodo de luz fluorescente-obscuridad 12:12 h. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Todo el procedimiento experimental se efectuó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar vertical.

Los resultados de crecimiento e interacción macroscópica entre los microorganismos, se registraron e interpretaron a partir de las primeras interacciones micelio-micelio del hongo endófito con algún o algunos de los fitopatógenos competidores, o bien al observar a distancia la disminución del crecimiento del micelio de alguno de los fitopatógenos, estableciéndose como día uno de observación, y en general se concluyó al día 10 de interacción antagónica. Tomándose fotografías a lo largo de todo el bioensayo para evidenciar el antagonismo.

Los resultados de crecimiento se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento de los diferentes competidores, comparando el crecimiento de los microorganismos con respecto a los controles de crecimiento de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\left| \frac{a-b}{b} \times 100 \right| = c$$

Donde a y b son los radios de los hongos fitopatógenos.

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis t-Student pareada de dos colas ($\alpha=0.05$) utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.01 (Zar, 2010).

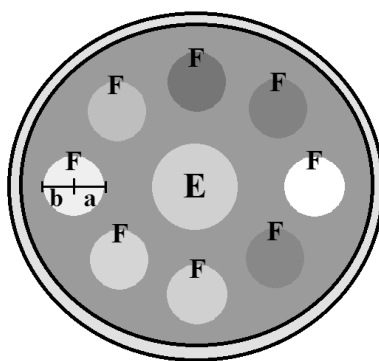


Figura 3. Bioensayo de antagonismo múltiple en caja Petri entre los hongos endófitos y fitopatógenos de *L. acapulcense*; a y b representan los radios de crecimiento de cada microorganismo competidor. E: endófito, F: fitopatógeno.

6. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos endófitos

Las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos endófitos se establecieron realizando cultivos en pequeña escala, utilizando dos medios de cultivo: caldo papa-dextrosa (CPD), incubando los microorganismos en condiciones estáticas y de agitación, y en medio arroz con incubación en condiciones estáticas. En ambos casos los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente con fotoperíodos de 12:12 h luz fluorescente-obscuridad. En el Cuadro 3 se resume la composición y modo de preparación de los medios de cultivo empleados.

6.1 Cultivos en CPD

Para realizar los cultivos en medio CPD en condiciones de agitación se emplearon matraces Erlenmeyer de 2000 mL conteniendo 1200 mL de medio de cultivo. Los matraces se incubaron por un período de 15 días, empleando un agitador orbital (Orbit Environ-Shaker, Lab Line modelo 3527). Para obtener los cultivos en condiciones estáticas se utilizaron matraces Fernbach de 2800 mL con 1200 mL de medio de cultivo, incubándolos por un período de 30 días. En ambos casos, el inóculo consistió en cinco cortes del micelio del hongo, realizados con un sacabocados estéril de 10 mm de diámetro, sobre el micelio de un cultivo del

microorganismo en medio sólido, previamente incubado por un período de 8 días en PDA (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008, 2010; Sánchez-Fernández, 2010; Armendáriz-Guillén, 2013).

6.2 Cultivos en medio arroz

El medio arroz fue utilizado como medio de cultivo para obtener mejores rendimientos comparados con el CPD. Los cultivos se realizaron en matraces Fernbach de 2800 mL conteniendo 200 g arroz y 200 mL de agua destilada. Los matraces se incubaron en condiciones estáticas durante 30 días a temperatura ambiente con fotoperíodos 12:12 h luz fluorescente-obscuridad (Aly *et al.*, 2008; Armendáriz-Guillén, 2013). El inóculo utilizado se obtuvo utilizando la misma técnica indicada en el inciso anterior.

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

Una vez transcurrido el período de incubación se realizaron preparaciones del medio de cultivo y micelio por medio de una tinción de Gram (Forbes, 2009), esto con el fin de verificar la pureza de los cultivos. Posteriormente, para los cultivos en CPD se separó el medio de cultivo del micelio, mediante una filtración utilizando gasa. El micelio húmedo obtenido se sometió a un proceso de maceración con CH_2Cl_2 (500 mL x 3). Inmediatamente después y con el mismo procedimiento se realizaron extracciones con AcOEt (500 mL x 3). Los extractos del medio de cultivo se obtuvieron realizando particiones sucesivas empleando también CH_2Cl_2 y AcOEt como disolventes de extracción. La fase orgánica resultante se filtró y secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío con un rotaevaporador (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; Macías-Rubalcava *et al.*, 2014).

Los extractos orgánicos de los cultivos en medio arroz se maceraron exhaustivamente utilizando CH_2Cl_2 y AcOEt como disolventes de extracción, siguiendo la misma técnica descrita para los extractos orgánicos derivados del micelio de los cultivos en CPD.

Cada uno de los extractos obtenidos a partir del micelio y del medio de cultivo generado de los distintos cultivos se analizó por cromatografía en capa fina, para determinar su similitud cromatográfica y se determinó su rendimiento.

8. Determinación del potencial antifúngico

La determinación cuantitativa de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de los hongos endófitos de *L. acapulcense*, se realizó mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en la agricultura, dos hongos: *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* (Eumycota), y dos oomicetos *Phytophthora parasitica* y *Pythium aphanidermatum* (Oomycota) y entre 8 microorganismos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense* (LAcF1-LAcF8). Las cepas de los microorganismos fitopatógenos de importancia en la agricultura fueron donadas por la Dra. Olga Gómez y la M. en C. Bertha Tlapal Bolaños, del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar la muestra se pesaron 20 mg de cada extracto y se disolvieron en 0.1-0.3 mL de metanol, posteriormente, se adicionaron 40 mL de agua destilada estéril y 40 mL de PDA (2%), para obtener una concentración final de 250 ppm. En cada caja Petri se colocaron 5 mL de la disolución y se dejaron solidificar (~40 °C). En seguida, se colocó en el centro de cada caja un inóculo de 0.5 cm de diámetro del microorganismo de prueba. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las cajas se incubaron de 3 a 4 días, dependiendo del microorganismo de prueba, a 28 °C con fotoperíodos luz fluorescente-oscuridad 12:12 h. Como controles negativos se utilizaron PDA (1%) y PDA (1%)/metanol (0.1-0.3 mL) y como controles positivos se utilizaron el fungicida comercial Prozicar® 50 P.H (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato) a una concentración de 250 ppm, para hongos verdaderos y el Ridomil Gold 4E® (Metalaxil-m) para oomicetos a la misma concentración (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008, 2010).

Al final del bioensayo se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro de los micelios de cada repetición y de cada especie de hongo de prueba. Los promedios se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ($\alpha=0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HDS (utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.01) (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008, 2014; Sánchez-Fernández, 2010; Zar, 2010; Armendáriz-Guillén, 2013).

9. Determinación del potencial fitotóxico

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos se llevó a cabo mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y la longitud de la raíz de dos plantas de prueba; *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) [amaranto] y *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) [jitomate], utilizando el método en caja Petri (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010, 2014; Sánchez-Fernández, 2010; Armendáriz-Guillén, 2013). Las semillas de *A. hypochondriacus* se compraron en el mercado de Tulyehualco México, D.F. y las de *S. lycopersicum* se adquirieron en “Semillas Berentsen”, Celaya, Guanajuato, México.

Estas especies son plantas de prueba ampliamente utilizadas para establecer de manera preliminar el efecto fitotóxico de extractos orgánicos, fracciones y compuestos puros, son especies que presentan alta viabilidad y rápida germinación (Macías-Rubalcava *et al.*, 2014).

Los bioensayos de fitotoxicidad se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar las muestras se pesaron 4 mg de extracto orgánico y se disolvieron en 0.1-0.3 mL de metanol. Posteriormente, se agregaron 20 mL de agua destilada y 20 mL de agar al 2%, para obtener una concentración final de 100 ppm.

A continuación, 5 mL de las diluciones se vertieron en las cajas Petri y se dejaron solidificar por completo (~ 40 °C). En seguida, se colocaron 10 semillas por caja, de cada una de las especies de prueba.

Las cajas Petri se incubaron en la oscuridad a 27 °C y la actividad fitotóxica se registró contando el número de semillas germinadas y midiendo la longitud de las radículas después de 24 h para el caso de *A. hypochondriacus* y 72 h para *S. lycopersicum*. Paralelamente, se evaluaron los controles negativos y positivos. Como control negativo se usó agar-agua al 1% y agar-agua 1%/metanol (0.1-0.3 mL) y como control positivo se utilizó el herbicida comercial RIVAL® (Glifosato: sal monoamónica de N-(fosfometil) glicina) a 100 y 300 ppm. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado bajo un diseño completamente al azar. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010, 2014; Sánchez-Fernández, 2010; Zar, 2010; Armendáriz-Guillén, 2013).

VI. Resultados y discusión

La presente investigación se desarrolló con el propósito de establecer el potencial antagónico de hongos endófitos aislados de *Lysiloma acapulcese* (Fabaceae), la cual fue colectada en una zona de alta biodiversidad. Así como, establecer la actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y micelio. Con lo cual se pretende contribuir al conocimiento de las diferentes relaciones entre las plantas hospederas y hongos endófitos, y a su vez evidenciar la importancia de los metabolitos secundarios biosintetizados por estos últimos.

Los resultados obtenidos se dividen en siete partes:

La primera comprende el aislamiento y purificación de los hongos endófitos y fitopatógenos de *L. acapulcese*. La segunda abarca la determinación de las características macro y microscópicas de los hongos aislados. La tercera se enfoca en los estudios de antagonismo directo entre los hongos aislados de *L. acapulcese*. La cuarta sección describe la obtención de cultivos en pequeña escala de los hongos endófitos puros, empleando condiciones de incubación estáticas y de agitación, y como medios de crecimiento caldo-papa-dextrosa y arroz; así como la obtención de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio. La quinta, se refiere a la evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en la agricultura y de hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcese*. La sexta etapa incluye la evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos obtenidos, sobre la geminación y el crecimiento de la raíz en dos semillas de prueba. Finalmente, la última parte consiste en la determinación del perfil cromatográfico por CG-MS de los extractos derivados del hongo más activo.

1. Aislamiento y purificación de las cepas

El presente proyecto se inició con la colecta de las hojas del árbol *L. acapulcense* en la “Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla” (REBIOSH), en el estado de Morelos. La vegetación de esta zona es de selva baja caducifolia y cuenta con un total de 130 familias, 469 géneros y 967 especies de plantas vasculares (Fernández-Saldaña *et al.*, 2007). El criterio de selección además de plantas que crecen en áreas de gran diversidad biológica (Guiraldo-Abreu & Cuellar, 2008), también incluye aquellas que no presentarán ningún daño por patógenos o herbívoros, para el caso de los endófitos, es decir se colectaron bajo un criterio ecológico, y en el caso de los hongos fitopatógenos se tomaron en cuenta aquellas hojas que presentaran síntomas de enfermedad, exceptuando las que tuvieran daños por algún tipo de herbívoro. Cabe destacar que para *L. acapulcense* no hay reportes en la literatura acerca del aislamiento o identificación de sus hongos endófitos por lo que representa una fuente novedosa para la obtención de compuestos fitotóxicos y antifúngicos.

A partir de los hongos emergentes de las hojas de *L. acapulcense* en cajas Petri con PDA, se realizaron los aislamientos, tanto de las hojas sanas como de las que mostraban síntomas de enfermedad, y se realizaron las resiembras necesarias hasta obtener aislamientos puros, lográndose obtener 7 hongos endófitos y 8 fitopatógenos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número total de aislamientos, aislamientos puros y morfotipos de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *Lysiloma acapulcense*.

Hongos	Número de aislamientos totales	Número de aislamientos puros	Número de morfotipos
Endófitos	789	7	7
Fitopatógenos	134	8	8

A cada una de los hongos se les asignó una clave durante su aislamiento y purificación, y fueron designadas de la siguiente manera: las primeras tres letras corresponde a las iniciales de la planta hospedera, los caracteres siguientes consisten en las resiembras necesarias para obtener el aislamiento puro. Finalmente, para facilitar su manejo se cambiaron las claves, conservando las primeras tres letras seguidas de E en el caso de los endófitos, y F en el caso de los fitopatógenos y un número consecutivo.

En el Cuadro 5 se muestran las claves originales y las asignadas para el fácil manejo de cada una de los aislamientos puros.

Cuadro 5. Claves asignadas a los hongos endófitos y fitopatógenos puros de *L. acapulcense*.

Clave del hongo endófito durante el proceso de aislamiento y purificación	Clave asignada	Clave del hongo fitopatógeno durante el proceso de aislamiento y purificación	Clave asignada
LAc4i1CePnOrAlgOr	LAcE1	LAcKACGOrC	LAcF1
LAc1a1ICCCAcOrOrOrOrOr	LAcE2	LAcA1aCOr	LAcF2
LAc2g1Or	LAcE3	LAcA2BC	LAcF3
LAc1dIIA	LAcE4	LAcA2CC4e1	LAcF4
LAc2g2IIB1	LAcE5	LAcA3ACOrOr	LAcF5
LAc6b2CyO	LAcE6	LAcC3OrOrOr	LAcF6
LAc6g1Or	LAcE7	LAcLPNA5e1BCNAA	LAcF7
		LAcLPNBIOrOr4e1A	LAcF8

2. Determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos puros

Las características macroscópicas de los hongos puros se determinaron mediante la observación detallada con un microscopio estereoscópico de los cultivos en PDA, estableciéndose: color, textura, consistencia de la superficie y tipo de crecimiento del micelio, presencia de pigmentos y de exudado. Por otra parte, se estableció la tasa de crecimiento para cada aislamiento puro mediante la construcción de las curvas de crecimiento, graficando el área en cm^2 vs tiempo en días, donde la pendiente indica la tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$).

Las características microscópicas se establecieron mediante la observación de los micelios en preparaciones en fresco, teñidas con rojo congo y azul de lactofenol en un microscopio óptico de luz, registrándose el tipo de micelio (septado o cenocítico), estructuras reproductivas (esporangióforos, conidióforos, basidióforos, ascas) y/o esporas observadas.

A continuación se describen las características macro y microscópicas más importantes, para cada uno de los hongos puros. Asimismo, se muestran las tasas de crecimiento, las cuales se clasificaron arbitrariamente en 5 categorías como: crecimiento muy lento ($< 3.0 \text{ cm}^2/\text{día}$), lento ($3.0-4.9 \text{ cm}^2/\text{día}$), medio ($5.0-9.9 \text{ cm}^2/\text{día}$), rápido ($10.0-12.9 \text{ cm}^2/\text{día}$) y muy rápido ($> 13.0 \text{ cm}^2/\text{día}$).

2.1 Hongos endófitos

LAcE1

En la Figura 4A se muestra un cultivo de 15 días en PDA del endófito LAcE1. Se observa la formación de micelio aéreo aterciopelado y de consistencia blanda, inicialmente es color crema. En el anverso se presenta la misma coloración. Su crecimiento es irregular mostrando un micelio escaso en algunos puntos y más abundante en otros.

La Figura 4B muestra la curva de crecimiento del endófito, con una tasa de crecimiento de 2.6 cm²/día, clasificándolo como un hongo de crecimiento muy lento.

En las Figuras 4C y D se observan las estructuras del endófito LAcE1 en preparaciones en fresco teñidas con azul de lactofenol y observadas a 40X. Se aprecian hifas septadas, así como el nacimiento de nuevas hifas y una gran cantidad de cadenas de conidios ovoides. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.

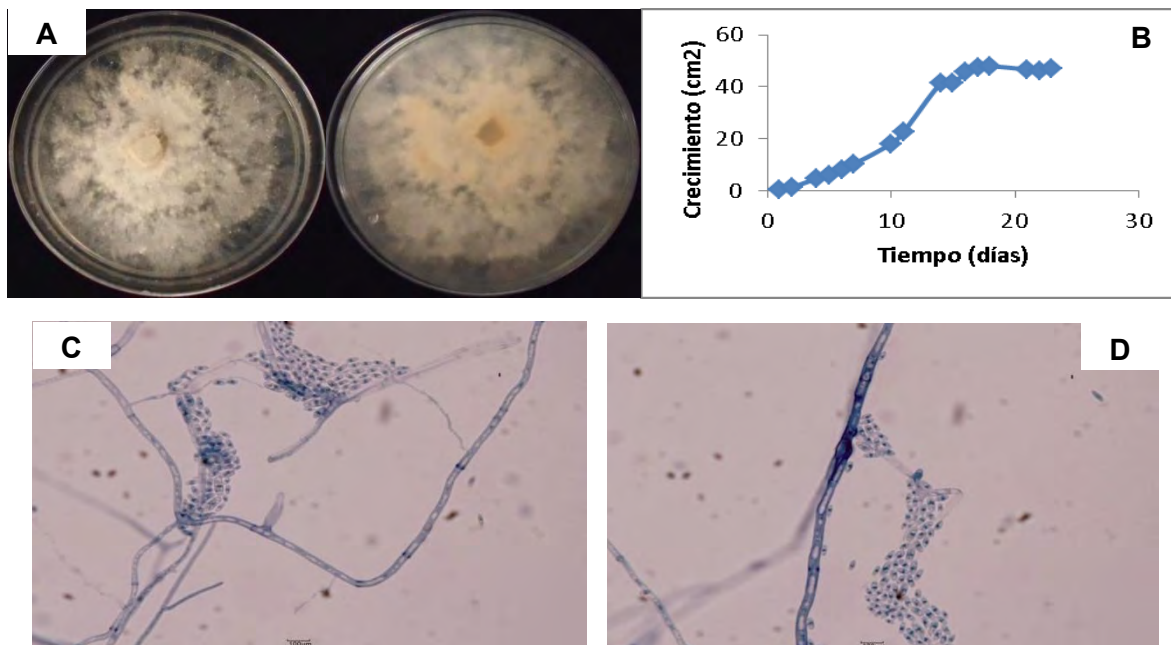


Figura 4. Endófito LAcE1. **A** Crecimiento de 15 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con azul de lactofenol.

LAcE2

En la Figura 5A se muestra un cultivo de 6 días en PDA del endófito LAcE2. Se observa la formación de micelio aéreo velloso y de consistencia blanda, al centro se observa con micelio escaso, inicialmente blanco y con el tiempo se comienza a pigmentar en ciertos puntos hasta llegar a ser verde-café. En el anverso en las primeras etapas de crecimiento se presenta una coloración blanco-beige y con el

paso del tiempo su pigmentación en algunos puntos se torna negra. Su crecimiento es radial.

La Figura 5B muestra la curva de crecimiento del endófito, con una tasa de crecimiento de 13.0 cm²/día. Lo cual lo ubica como un hongo de crecimiento muy rápido.

Las Figuras 5C y D muestran las estructuras del endófito LAcE2 en preparaciones en fresco teñidas con azul de lactofenol observada a 40X. Se aprecian dos tipos de hifas, unas hialinas delgadas que salen de otras más gruesas y además comienzan a verse más oscuras (dematiáceas). Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.

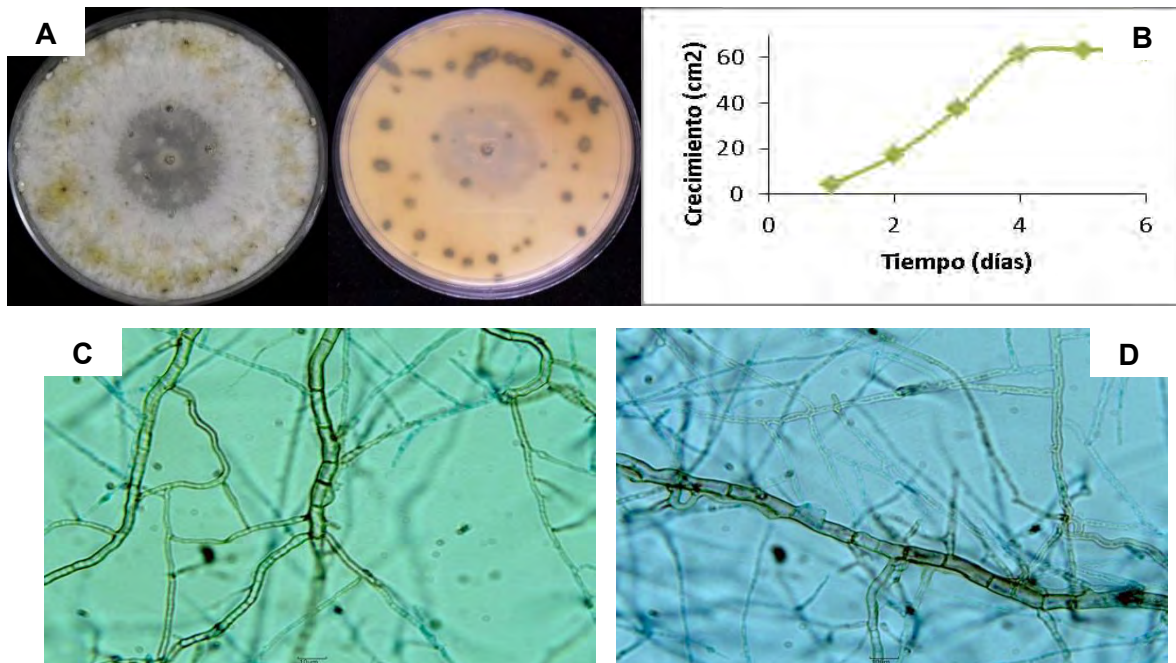


Figura 5. Endófito LAcE2. **A** Crecimiento de 6 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con azul de lactofenol.

LAcE3

En la Figura 6A se muestra un cultivo de 25 días en PDA del endófito LAcE3. Se observa la formación de micelio aéreo aterciopelado- polvoso y de consistencia

blanda, es color blanco y esporula en gran medida. En el anverso se presenta de color crema y con el medio con cuarteaduras. Su crecimiento es radial.

La Figura 6B muestra la curva de crecimiento del endófito, con una tasa de crecimiento de 2.3 cm²/día. Lo cual lo clasifica como un hongo de crecimiento muy lento.

Las Figuras 6C y D presentan las estructuras del endófito LAcE3 en preparaciones en fresco teñidas con azul de lactofenol y rojo congo, respectivamente, observadas a 40X. Se aprecian hifas, fiálides y cadenas de conidios en forma de vainas delgadas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.

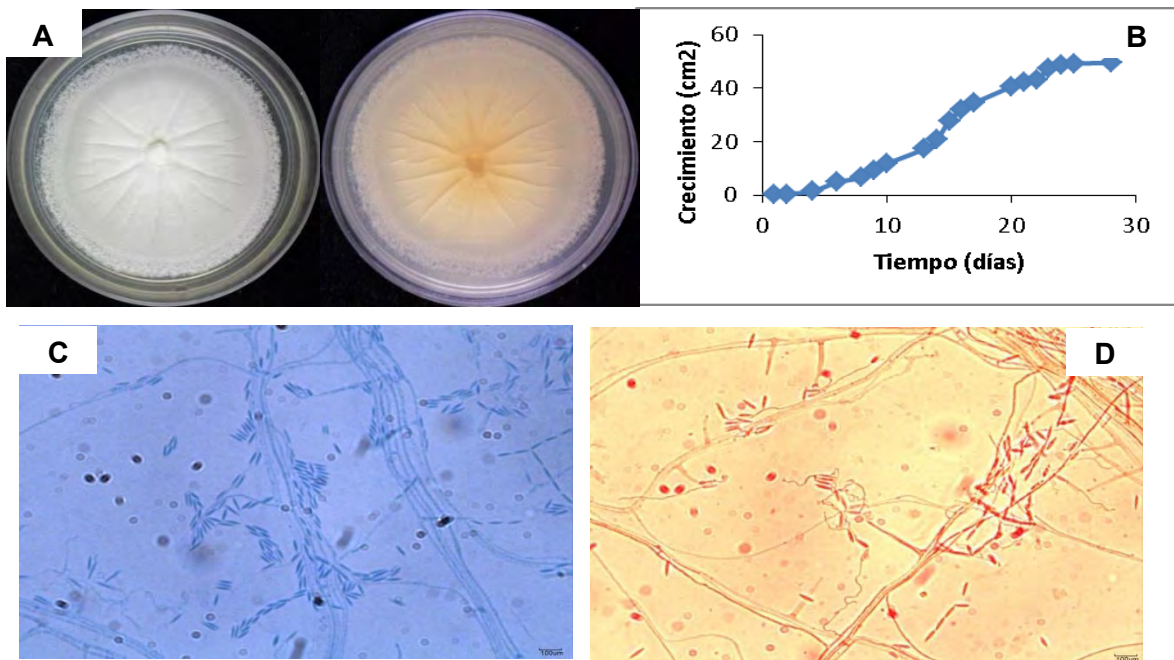


Figura 6. Endófito LAcE3. **A** Crecimiento de 25 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con azul de lactofenol y rojo congo, respectivamente.

LAcE4

En la Figura 7A se muestra un cultivo de 22 días en PDA del endófito LAcE4. Se observa la formación de micelio aéreo aterciopelado-lanoso y de consistencia blanda, color blanco y esporula en gran medida. En el anverso el micelio se presenta de color crema. Su crecimiento es radial.

La Figura 7B muestra la curva de crecimiento del endófito, con una tasa de crecimiento de $2.1 \text{ cm}^2/\text{día}$. Lo cual lo ubica como un hongo de crecimiento muy lento.

Las Figuras 7C y D presentan las estructuras del endófito LAcE4 en preparaciones en fresco teñidas con azul de lactofenol, observadas a 40X. Se aprecian hifas muy delgadas, cadenas de conidios en forma de vainas alargadas y delgadas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.

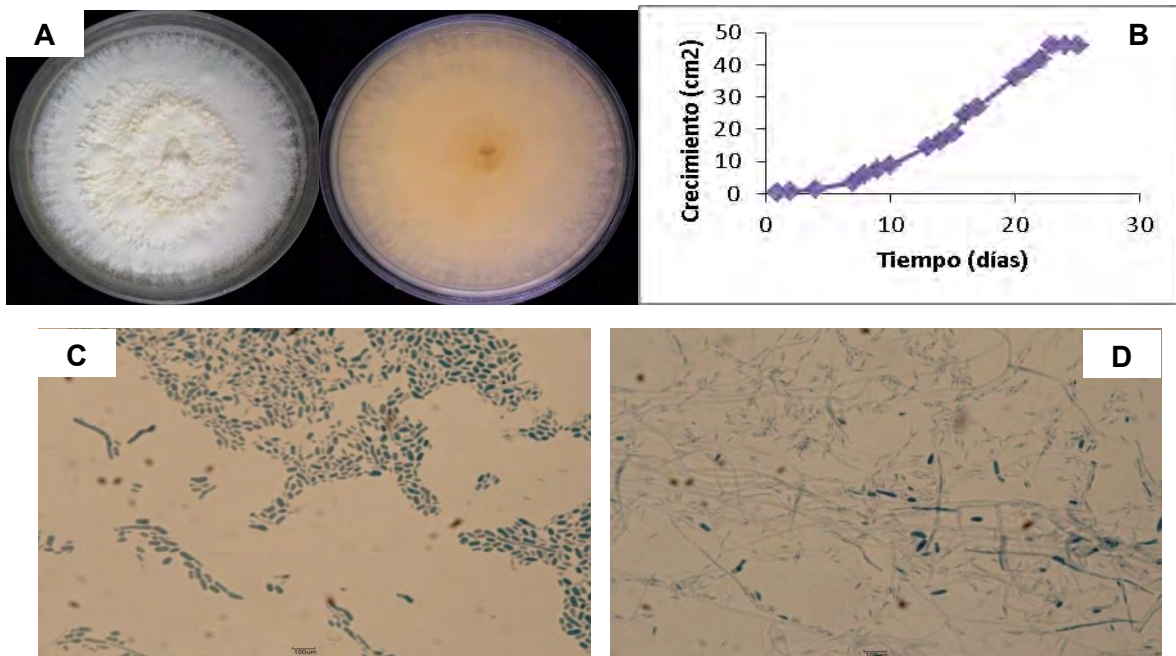


Figura 7. Endófito LAcE4. **A** Crecimiento de 22 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con azul de lactofenol.

LAcE5

En la Figura 8A se muestra un cultivo de 10 días en PDA del endófito LAcE5. Se observa la formación de micelio aéreo algodonoso, blanco y de consistencia blanda, también un micelio inmerso de color salmón y consistencia cremosa. En el anverso el micelio se presenta color salmón. Su crecimiento es radial-estrellado.

La Figura 8B muestra la curva de crecimiento del endófito, con una tasa de crecimiento de $8.0 \text{ cm}^2/\text{día}$, clasificándolo como un hongo de crecimiento medio.

Las Figuras 8C y D presentan las estructuras del endófito LAcE5 en preparaciones en fresco teñidas con rojo congo y observadas a 40X. Se aprecian hifas hialinas, delgadas y septadas, con algunos organelos, además de crecimiento de hifas en varios segmentos y conidios aislados. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.

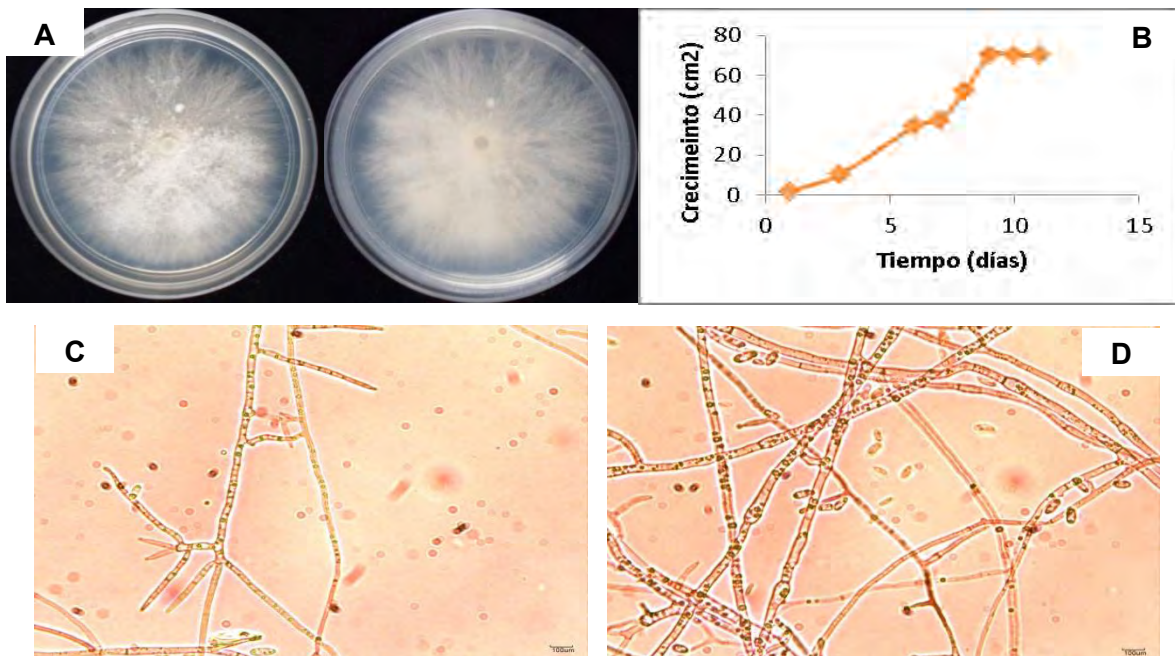


Figura 8. Endófito LAcE5. **A** Crecimiento de 10 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo.

Cabe mencionar que de manera paralela se llevó a cabo la descripción taxonómica de los hongos en el laboratorio de Macromicetos y Levaduras por la Dra. Patricia E. Lappe Oliveras del Instituto de Biología, UNAM, en el caso particular de éste endófito se permitió determinar que pertenece al género *Fusarium* especie *oxysporum* variedad *redolens*. Actualmente, se está confirmando esta taxonomía mediante estudios de biología molecular.

LAcE6

En la Figura 9A se muestra un cultivo de 5 días en PDA del endófito LAcE6. Se observa la formación de micelio aéreo veloso, color blanco y de consistencia blanda, el centro tiene micelio escaso, y con el tiempo se pigmenta a verde-café. El anverso es blanco y con el tiempo se torna verde. Su crecimiento es radial.

La Figura 9B muestra la curva de crecimiento del endófito, con una tasa de crecimiento de 16.4 cm²/día. Lo cual lo ubica como un hongo de crecimiento muy rápido.

Las Figuras 9C y D presentan las estructuras del endófito LAcE6 en preparaciones en fresco teñidas con azul de lactofenol y rojo congo respectivamente, observada a 40X. Se aprecian dos tipos de hifas, unas hialinas y delgadas que salen de otras más pigmentadas, gruesas y septadas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se lograron observar estructuras de reproducción.

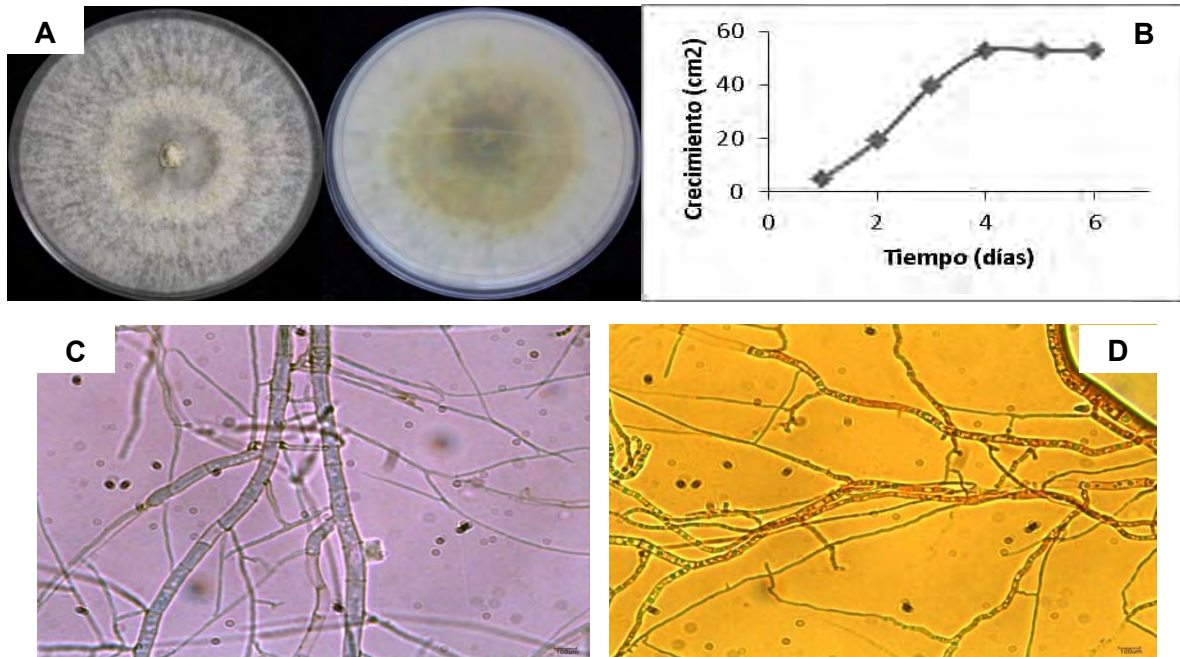


Figura 9. Endófito LAcE6. **A** Crecimiento de 5 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con azul de lactofenol y rojo congo respectivamente.

LAcE7

En la Figura 10**A** se muestra un cultivo de 7 días en PDA del endófito LAcE7. Se observa la formación de micelio aéreo vellosillo-algodonoso y de consistencia blanda, al centro el crecimiento es escaso seguido de un halo de hifas más abundante, inicialmente es color blanco y con el tiempo se comienza a pigmentar en ciertos puntos a verde. El envés es blanco con puntos escasos verdes. Su crecimiento es radial.

La Figura 10**B** muestra la curva de crecimiento del endófito, con una tasa de crecimiento de 11.9 cm²/día. Lo cual lo clasifica como un hongo de crecimiento rápido.

Las Figuras 10**C** y **D** presentan las estructuras del endófito LAcE7 en preparaciones en fresco teñidas con rojo congo, observadas a 40X. Se aprecian hifas hialinas septadas que van de delgadas a gruesas y se logran observar

algunos organelos. Bajo estas condiciones de cultivo, no se pudieron observar estructuras de reproducción.

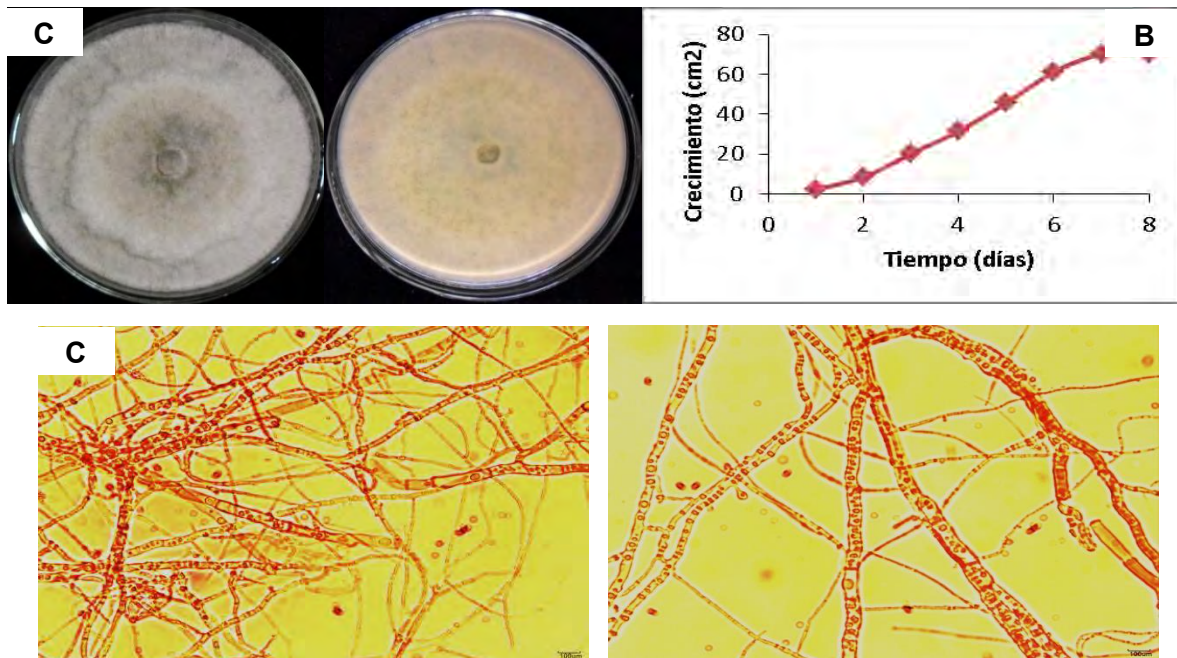


Figura 10. Endófito LAcE7. **A** Crecimiento de 7 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo respectivamente.

2.2 Hongos fitopatógenos

LAcF1

En la Figura 11A se muestra un cultivo de 13 días en PDA del fitopatógeno LAcF1. Se observa la formación de micelio aéreo algodonoso, color lila y de consistencia blanda. El envés se observa rojo-morado. Su crecimiento es radial.

La Figura 11B muestra la curva de crecimiento del fitopatógeno, con una tasa de crecimiento de 6.4 cm²/día. Lo cual lo cataloga como un hongo de crecimiento medio.

Las Figuras 11C y D presentan las estructuras del endófito LAcF1 en preparaciones en fresco teñidas con rojo congo observadas a 40X. Se aprecian

hifas hialinas septadas, crecimientos de hifas en varias partes, además se observan fiálides y algunas conidiosporas aisladas.

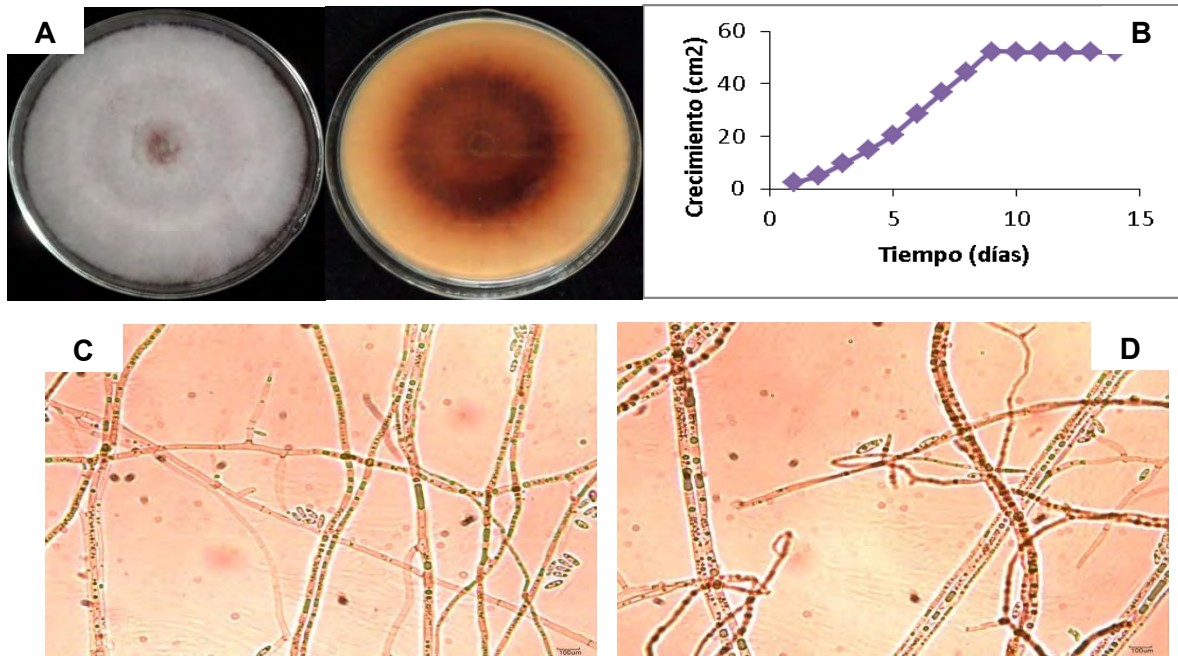


Figura 10. Fitopatógeno LAcF1. **A** Crecimiento de 13 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C y D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo.

Con base en el análisis conjunto de las características macro y microscópicas observadas, en particular la coloración, la textura y consistencia de su micelio aéreo y la formación de un pigmento rojizo que se difunde en el medio, aunado a las fiálides y los conidios dispersos en forma ovoide observados a 40X, se estableció una aproximación al género del endófito LAcF1, que corresponde a *Fusarium* sp.

LAcF2

En la Figura 11A se muestra un cultivo de 13 días en PDA del fitopatógeno LAcF2. Se observa la formación de micelio aéreo de consistencia blanda, el color del centro es ligeramente naranja y de textura flocosa, el borde es blanco y veloso, se distinguen ligeros anillos desde el centro a la orilla. El envés es ligeramente

naranja y se aprecian tenues anillos desde el centro hasta la orilla. Su crecimiento es radial.

La Figura 11B muestra la curva de crecimiento del fitopatógeno, con una tasa de crecimiento de $5.1 \text{ cm}^2/\text{día}$. Lo cual lo ubica como un hongo de crecimiento medio.

Las Figuras 11C y D presentan las estructuras del fitopatógeno LAcF2 en preparaciones en fresco teñidas con rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente, observadas a 40X. Se aprecian fiálides rodeadas por cúmulos de conidios cilíndricos y algunas hifas hialinas y septadas, además conidiosporas aisladas.

El tipo de conidios y principalmente su agrupación en forma de cabezas similares a las del género *Penicillium*, lo que permite determinar que el hongo LAcF2 podría tratarse de una especie perteneciente al género *Gliocardium* sp. ya que en este caso los conidios se encuentran más compactos y dentro de gotas mucilaginosas, característico de este género (Barnett & Hunter, 2006).

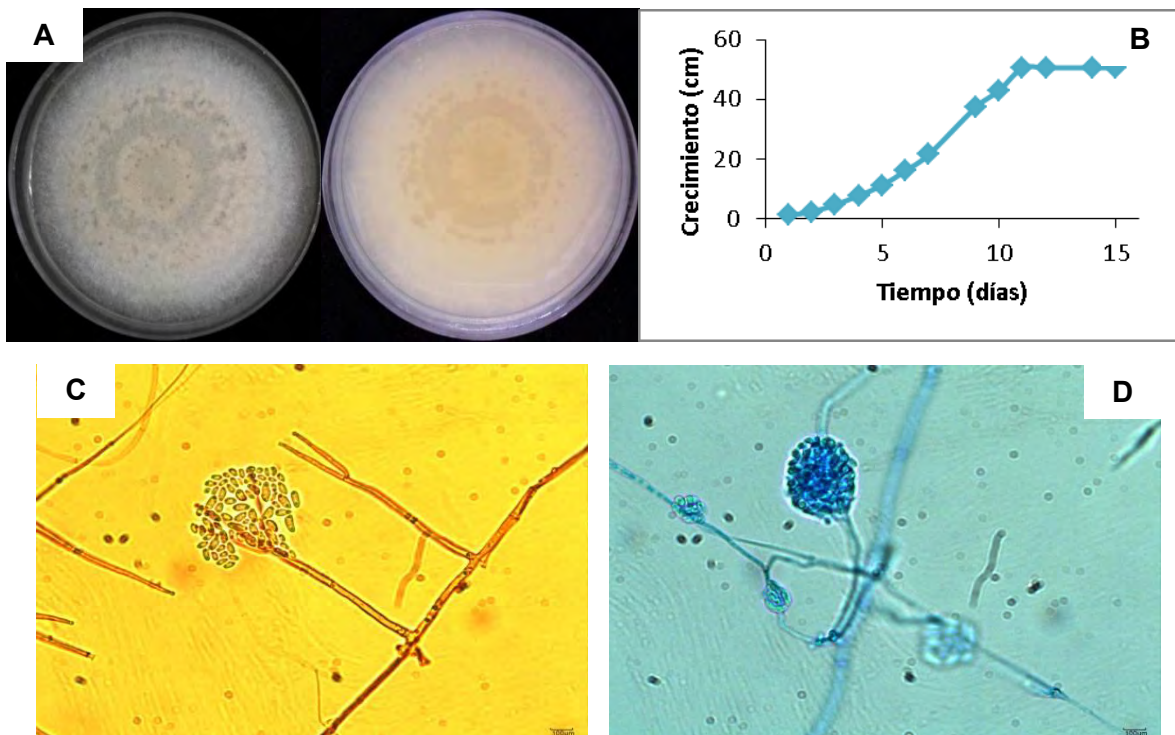


Figura 11. Fitopatógeno LAcF2. **A** Crecimiento de 13 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente.

LAcF3

En la Figura 12A se muestra un cultivo de 13 días en PDA del fitopatógeno LAcF3. Se observa la formación de micelio aéreo aterciopelado de color ligeramente naranja y de consistencia blanda, se aprecian anillos en el borde. El envés es naranja tenue, con la formación de anillos en la orilla. Su crecimiento es radial.

La Figura 12B muestra la curva de crecimiento del fitopatógeno, con una tasa de crecimiento de $4.3 \text{ cm}^2/\text{día}$. Lo cual lo cataloga como un hongo de crecimiento lento.

En las Figuras 12C y D se presentan las estructuras del fitopatógeno LAcF3 en preparaciones en fresco teñidas con rojo congo observadas a 40X. Se aprecian hifas hialinas y septadas, en ambas preparaciones se distingue una fiálide que está rodeada por conidios, además se observan algunas conidiosporas aisladas.

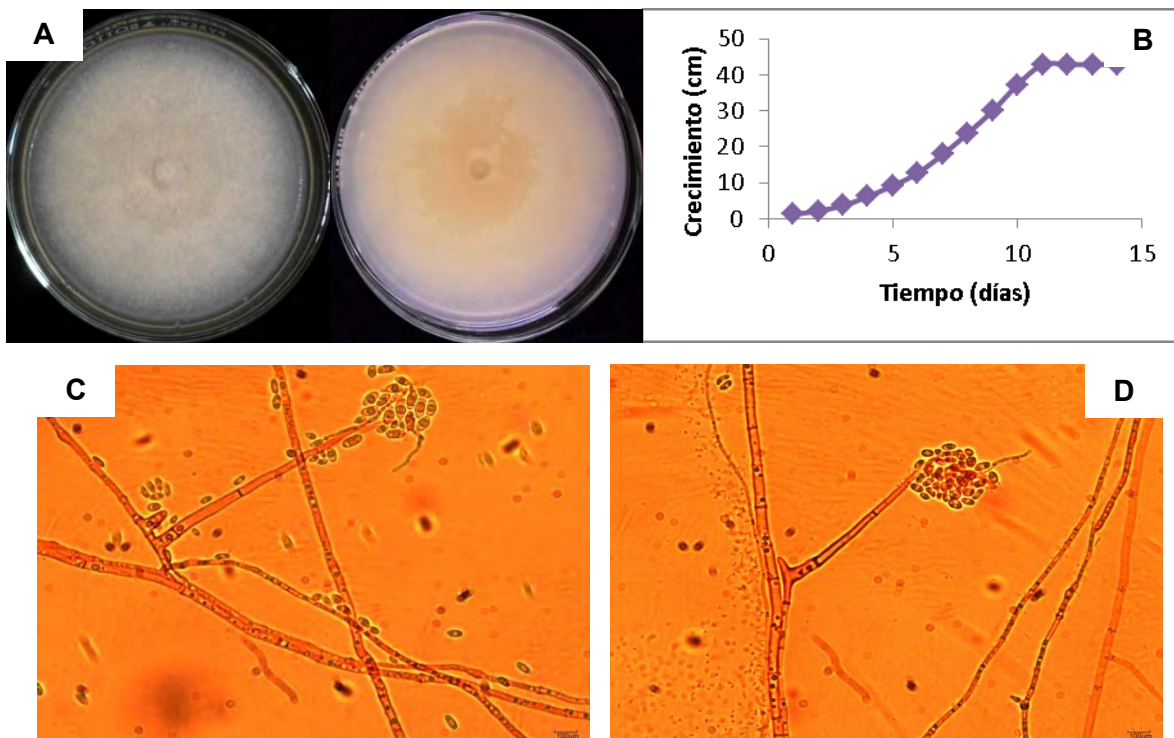


Figura 12. Fitopatógeno LAcF3. **A** Crecimiento de 13 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo.

La forma de agrupación de los conidios en cabezas mucosas cubriendo la fiálide, además de las características macroscópicas observadas muestra que el hongo LAcF3 podría pertenecer al género *Acremonium sp* (Adelaide, 2014).

LAcF4

En la Figura 13A se muestra un cultivo de 13 días en PDA del fitopatógeno LAcF4. Se observa la formación de micelio aéreo algodonoso-vellososo color crema y de consistencia blanda. El envés es de color crema y su crecimiento es radial.

La Figura 13B muestra la curva de crecimiento del fitopatógeno, con una tasa de crecimiento de $4.8 \text{ cm}^2/\text{día}$, clasificándolo como un hongo de crecimiento lento.

Las Figuras 13 C y D presentan las estructuras del fitopatógeno LAcF4 en preparaciones en fresco teñidas con rojo congo observadas a 40X. Se aprecian hifas hialinas septadas y se distinguen algunos crecimientos de hifas sobre las ya existentes, además se observan fiálides y algunas conidiosporas aisladas.

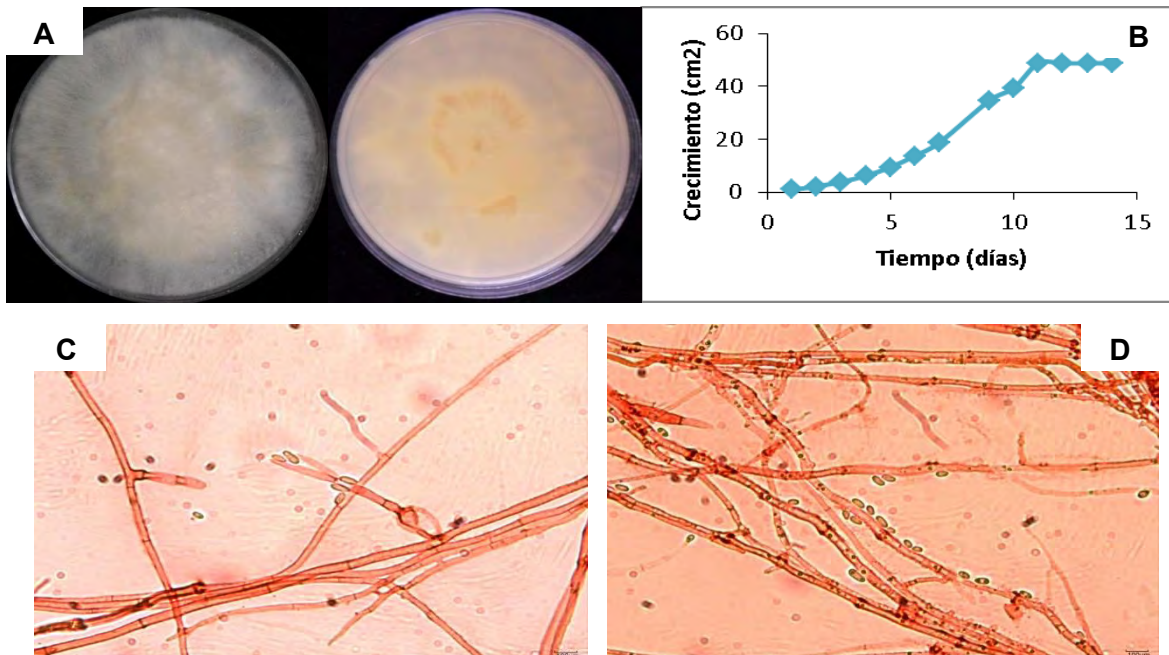


Figura 13. Fitopatógeno LAcF4. **A** Crecimiento de 13 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo.

LAcF5

En la Figura 14A se muestra un cultivo de 13 días en PDA del fitopatógeno LAcF5. Se observa la formación de micelio aéreo lanoso color crema y de consistencia blanda. El envés es color naranja tenue. Y con crecimiento radial.

La Figura 14 B muestra la curva de crecimiento del fitopatógeno, con una tasa de crecimiento de $5.6 \text{ cm}^2/\text{día}$, clasificándolo como un hongo de crecimiento medio.

En las Figuras 14C y D se muestran las estructuras del fitopatógeno LAcF5 en preparaciones en fresco teñidas con rojo congo observadas a 40X. Se aprecian hifas hialinas y septadas, en algunos casos se observan organelos dentro de las hifas, además se distinguen fiálides bifurcadas, rodeadas por conidios, también se observan algunas conidiosporas aisladas.

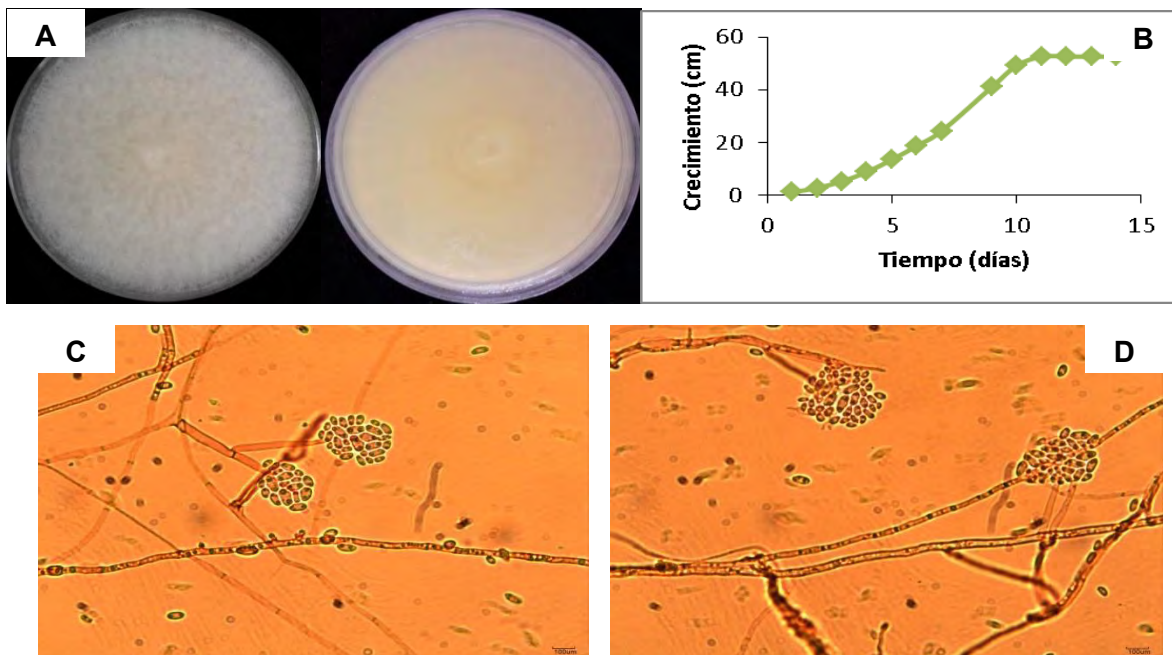


Figura 14. Fitopatógeno LAcF5. **A** Crecimiento de 13 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo.

De nueva cuenta, la forma de agrupación de los conidios en cabezas mucosas cubriendo las fiálides, aunado a las características macroscópicas observadas,

permiten establecer que el hongo LacF5 posiblemente pertenece al género *Acremonium* sp. (Adelaide, 2014).

LAcF6

En la Figura 15A se muestra un cultivo de 13 días en PDA del fitopatógeno LAcF6. Se observa la formación de micelio aéreo lanoso color crema y de consistencia blanda. El envés es naranja tenue. Y su crecimiento es radial.

La Figura 15B muestra la curva de crecimiento del fitopatógeno, con una tasa de crecimiento de $4.5 \text{ cm}^2/\text{día}$. Lo cual lo clasifica como un hongo de crecimiento lento.

Las Figuras 15C y D presentan las estructuras del fitopatógeno LAcF6 en preparaciones en fresco teñidas con rojo congo observada a 40X. Se aprecian hifas hialinas y septadas, además de fiálides bifurcadas rodeadas por conidios, se observan algunas conidiosporas aisladas.

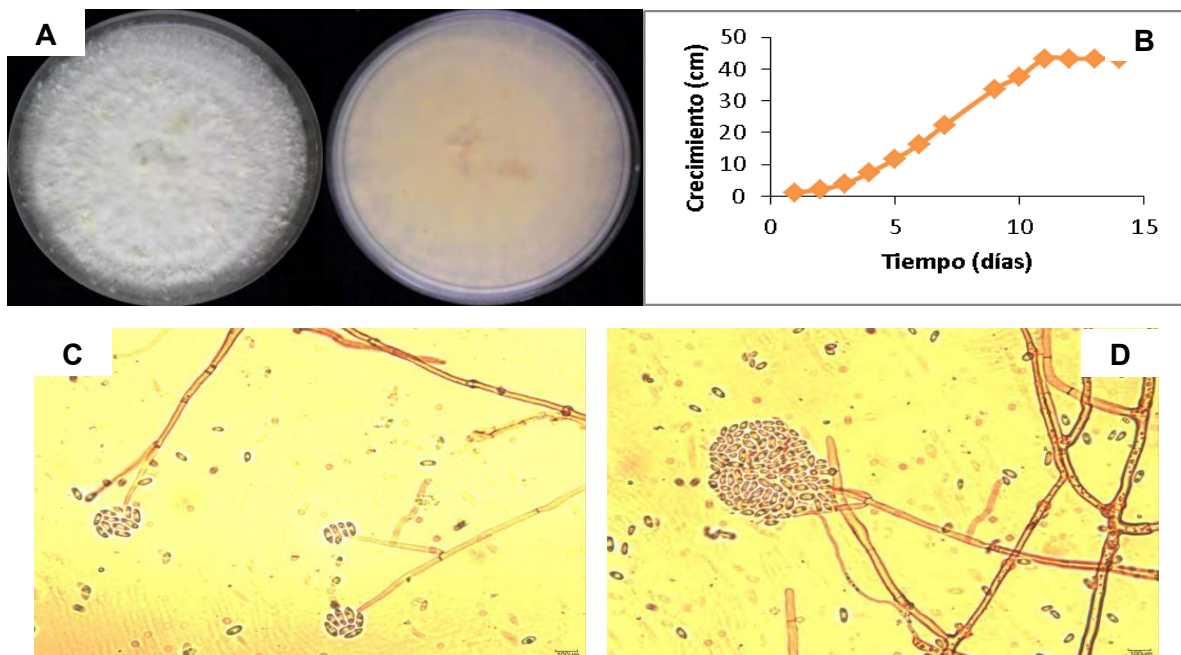


Figura 15. Fitopatógeno LAcF6. **A** Crecimiento de 13 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo.

La forma de agrupación de los conidios en cabezas mucosas cubriendo las fiálides, además de las características macroscópicas observadas muestran que el hongo LacF6 también podría pertenecer al género *Acremonium* sp. (Adelaide, 2014).

LAcF7

En la Figura 16A se muestra un cultivo de 7 días en PDA del fitopatógeno LAcF7. Se observa la formación de micelio aéreo plumoso, negro y verde tenue, de consistencia blanda y exudado negro. El envés también es negro. Y su crecimiento es radial.

La Figura 16B muestra la curva de crecimiento del endófito, con una tasa de crecimiento de 11.0 cm²/día. Lo cual lo cataloga como un hongo de crecimiento rápido.

Las Figuras 16C y D presentan las estructuras del fitopatógeno LAcF7 en preparaciones en fresco teñidas con rojo congo observadas a 40X. Se aprecian hifas septadas y conidios fusiformes de 6 septos; 4 demateáceos y el basal y terminal hialinos. Bajo estas condiciones de cultivo, no se lograron observar estructuras de reproducción.

El tipo y características de sus conidios y las características macroscópicas de su micelio, son muy similares a las del género *Pestalotia*, lo que indica que el hongo fitopatógeno LAcF7 es una especie relacionada con éste género (Lezcano *et al.*, 2009).

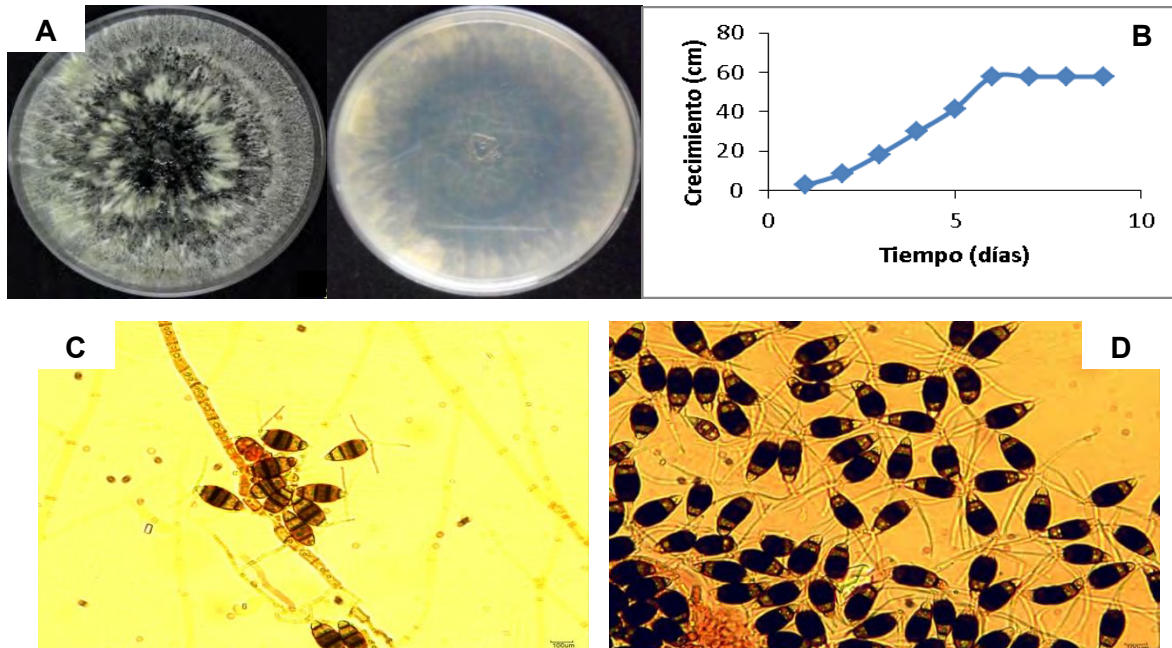


Figura 16. Fitopatógono LAcF7. **A** Crecimiento de 7 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópicas en 40X, teñidas con rojo congo.

LAcF8

En la Figura 17**A** se muestra un cultivo de 7 días en PDA del fitopatógono LAcF8. Se observa la formación de micelio aéreo aterciopelado, color blanco y de consistencia blanda. El envés es color blanco. Y su crecimiento es radial.

La Figura 17**B** muestra la curva de crecimiento del fitopatógono, con una tasa de crecimiento de 8.6 cm²/día. Lo cual lo cataloga como un hongo de crecimiento medio.

Las Figuras 17**C** y **D** presentan las estructuras del fitopatógono LAcF8 en preparaciones en fresco teñidas con rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente, observadas a 40X. Se aprecian hifas hialinas septadas, e hifas delgadas saliendo de gruesas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se lograron observar estructuras de reproducción.

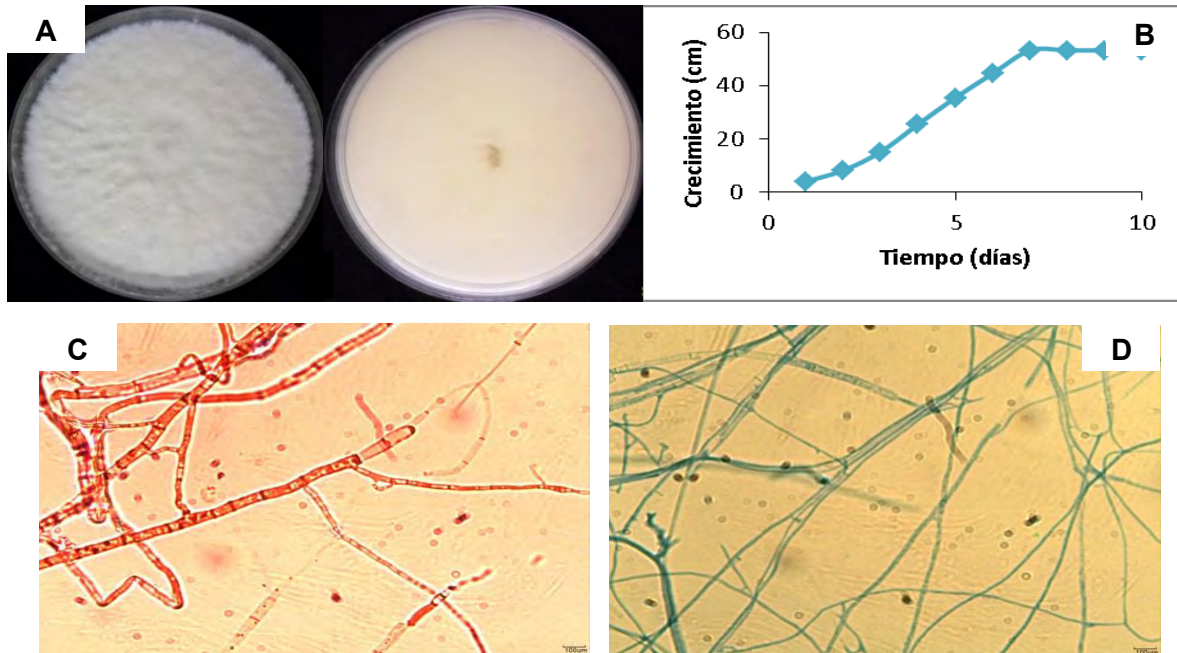


Figura 17. Fitopatógeno LAcF8. **A** Crecimiento de 7 días en medio PDA anverso (izq.) reverso (der.). **B** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **C** y **D** Observaciones microscópica en 40X, teñida con rojo congo y azul de lactofenol respectivamente.

La determinación de la tasa de crecimiento de cada uno de los microorganismos en estudio, permitió determinar paralelamente las características macroscópicas de cada aislamiento puro, observándose que en algunos casos la morfología de las colonias cambia con respecto a la edad de los cultivos. Así, por ejemplo, en la Figura 18 es posible observar que en un inicio el micelio del hongo endófito LAcE2, es blanco y apariencia vellosa, y después de 2 días de crecimiento, el centro presenta micelio escaso, y el anverso es completamente blanco. Al término de su fase de crecimiento a los 6 días, comienza a presentar pigmentación en el micelio color verde y cúmulos de hifas que se pigmentan a negro. En el anverso también se observan los cúmulos de hifas con pigmentación negra y en el medio cultivo se observa la difusión de un pigmento café claro.

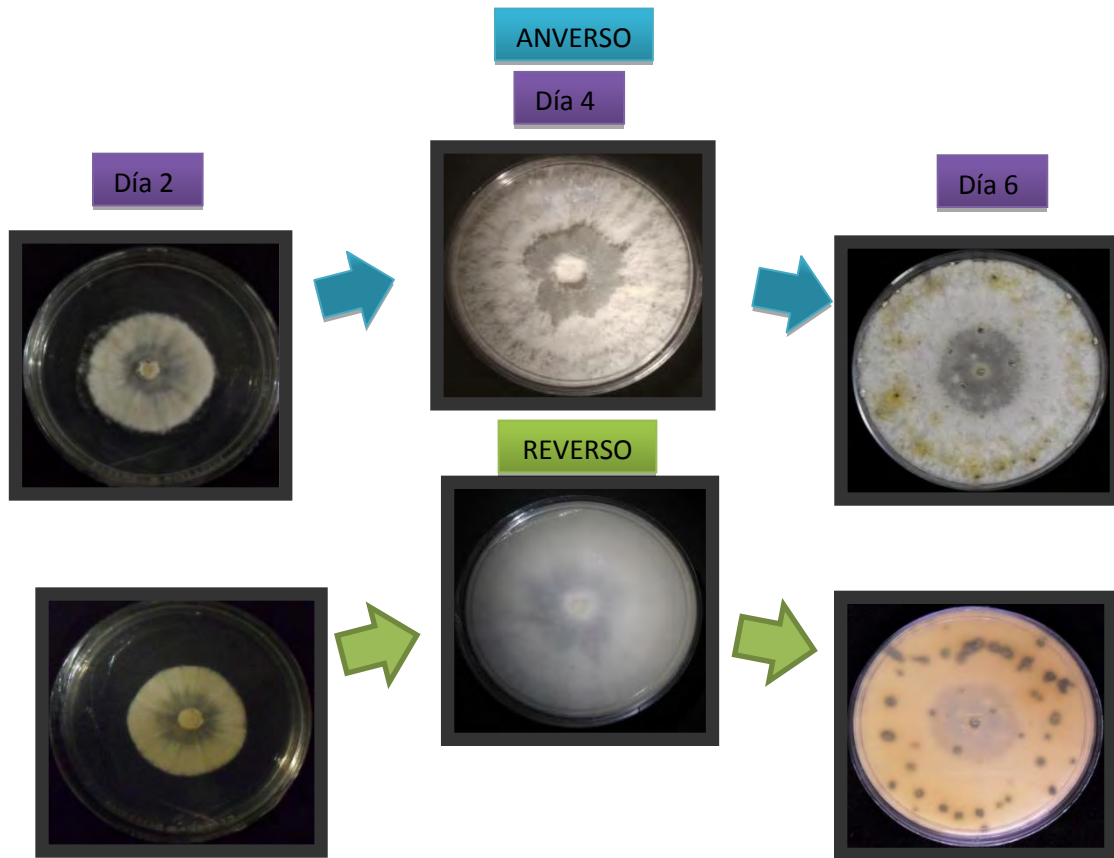


Figura 18. Cambios morfológicos del endófito LAcE2 observados a lo largo de su crecimiento. Cultivos en medio PDA a los 2, 4 y 6 días de crecimiento.

Por otra parte, en la Figura 19 se observa claramente como el micelio del hongo fitopatológico LAcF7, inicialmente es blanco y de textura vellosa. Posteriormente, entre el día 4 y 5 de crecimiento, el centro se torna negro, y en el envés de su micelio se observan ligeros anillos negros. Finalmente, al día 7 de crecimiento la mayoría de las hifas de su micelio son negras y la textura de su micelio se vuelve plumosa observable en el anverso y en el reverso se distingue un pigmento negro.

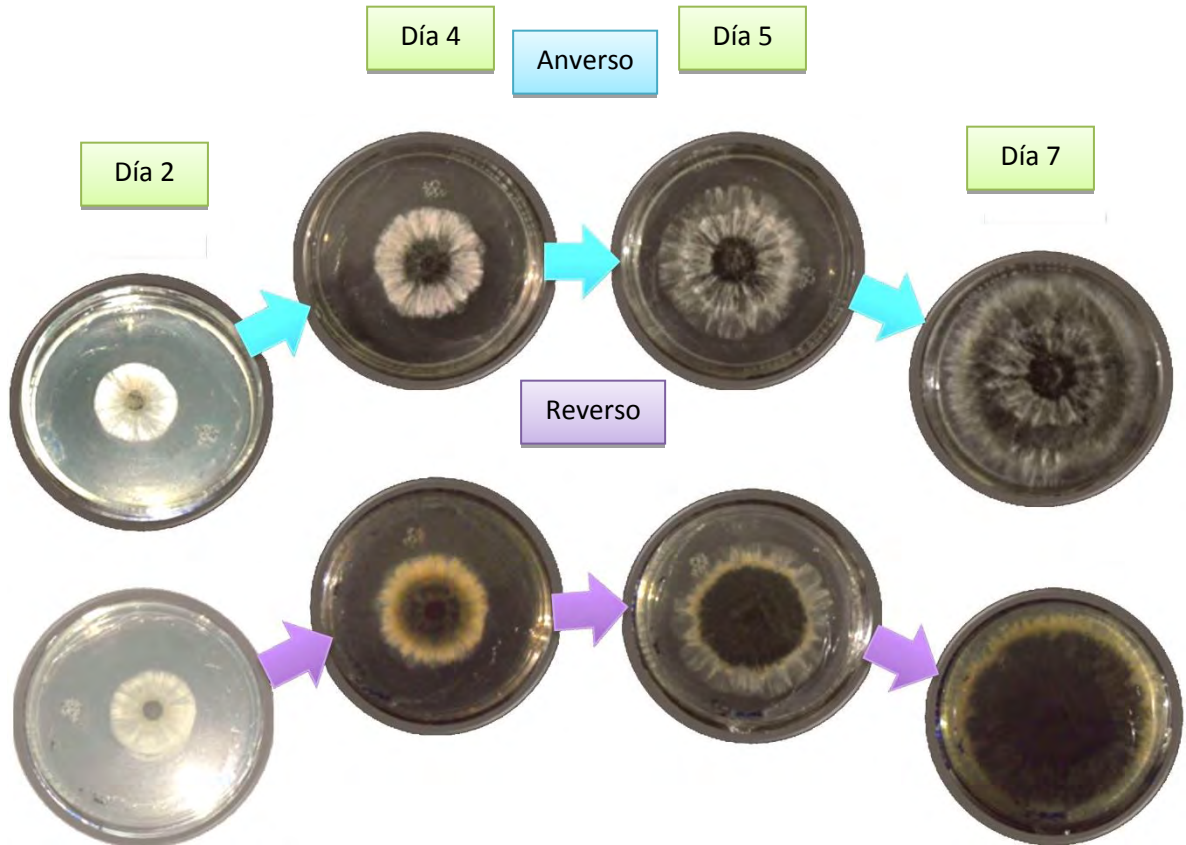


Figura 19. Cambios morfológicos del endófito LAcF7 observados en diferentes días de crecimiento. Cultivos en medio PDA a los 2, 4, 5 y 7 días de crecimiento.

Las consideraciones generales sobre la identificación de los hongos filamentosos incluyen principalmente su tasa de crecimiento, las características morfológicas de las colonias y las características microscópicas de su micelio, siendo estas últimas uno de los datos más concluyentes para su identificación (Forbes, 2009). En general, el análisis conjunto de las características macro y microscópicas de los hongos aislados de *L. acapulcense* permitió llegar al establecimiento preliminar del género y en el caso particular del endófito LacE5 establecer su identidad taxonómica (*Fusarium oxysporum* variedad *redolens*). Sin embargo, es necesario realizar estudios moleculares para poder asignar el género y la especie de manera inequívoca. Además, el estudio de las características microscópicas de los hongos en estudio, permitió distinguir entre hongos con características macroscópicas

similares, y con esto establecer el número de morfotipos aislados de *L. acapulcense*.

Por último, se pudo apreciar el crecimiento típico de hongos filamentosos en medio sólido, el cual es constante y uniforme para los microorganismos de crecimiento indefinido. La tasa de crecimiento de los hongos puede variar cuando los factores ambientales no son adecuados, sin embargo en el presente trabajo se establecieron condiciones óptimas de crecimiento para cada uno de los hongos en estudio, en consecuencia, las curvas de crecimiento obtenidas siguen un comportamiento casi ideal. En las gráficas mostradas no se observa la fase lag o de latencia debido a que los inóculos se tomaron de cultivos en condiciones óptimas de crecimiento, por lo tanto, el hongo no tuvo que adaptarse al nuevo medio de cultivo, observándose por consiguiente, como primera fase la logarítmica o exponencial, seguida de la fase estacionaria que indica que la tasa de crecimiento es igual a la tasa de muerte y que se llega al equilibrio celular, siendo esta fase la más importante si se desean obtener metabolitos secundarios, ya que es la etapa de producción de estos (French & Hebert, 1980; Hernandez *et al.*, 2003).

3. Bioensayos de antagonismo múltiple

El potencial antagónico de los hongos endófitos se estableció con base en las tasas de crecimiento de los hongos puros, mediante un bioensayo de antagonismo múltiple contra los 8 microorganismos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense*.

En las Figuras 21 a 27 se muestran los antagonismos múltiples entre los hongos endófitos LAcE1-LAcE7 y los fitopatógenos LAcF1-LAcF7 de *L. acapulcense*. Para el registro del potencial antagónico se tomaron en cuenta como las primeras interacciones antagónicas, el contacto micelio-micelio del hongo endófito con algún o algunos de los fitopatógenos competidores y/o cuando se mostrara una disminución a distancia del crecimiento del micelio de alguno de los fitopatógenos, dicha observación corresponde al día 1 de interacción. Con excepción del endófito

LAcE2 que es un microorganismo de crecimiento muy rápido y de LAcE3 que es un hongo de crecimiento muy lento, en todos los casos se muestran las imágenes correspondientes a los antagonismos observados en los 1, 3, 5 y 10 de interacción antagonica. Estos tiempos de interacción fueron elegidos debido a que los micelios en las zonas de interacción, muestran cambios morfológicos evidentes. En todas las imágenes se observa la parte anverso (izq.) y reverso (der.) de los micelios, ordenando los microorganismos fitopatógenos como se muestra en la Figura 20.

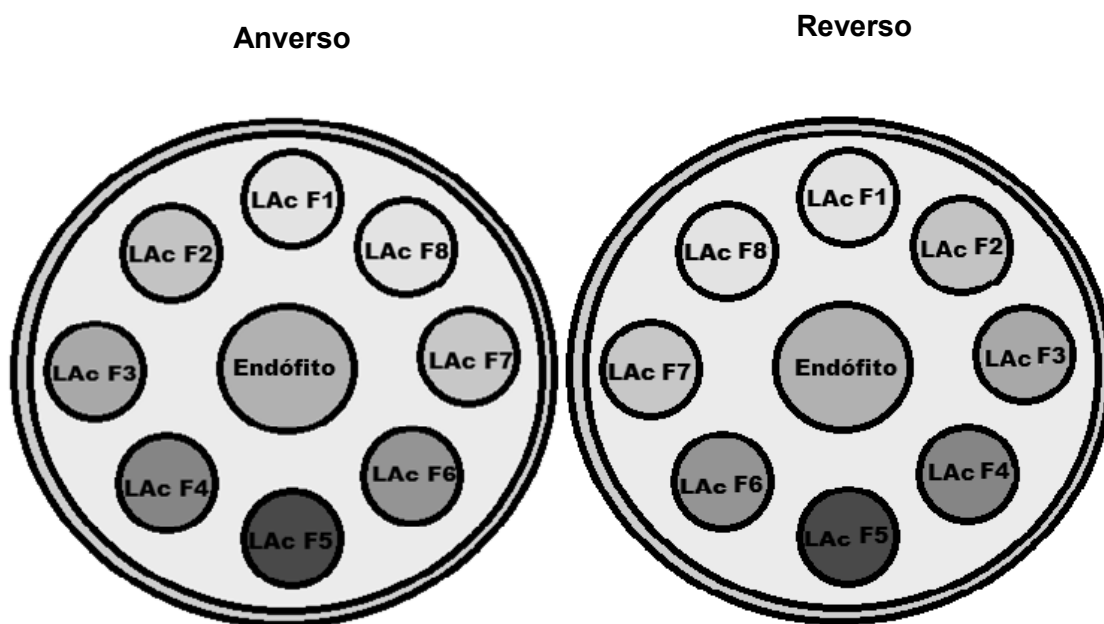


Figura 20. Orden en que se colocaron los hongos fitopatógenos competidores, en las cajas de Petri en los bioensayos de antagonismo múltiple. El endófito de prueba se inoculó en el centro (LAcE1-LAcE7).

3.1 Antagonismo entre el endófito LAcE1 y los fitopatógenos aislados de la planta *L. acapulcense*

En la Figura 21, se presenta el antagonismo entre el endófito LAcE1 y los 8 hongos fitopatógenos de *L. acapulcense* a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción,

observándose que, en general, los hongos fitopatógenos disminuyen su crecimiento, o que el crecimiento de las hifas es escaso al hacer contacto con el endófito de prueba.

Desde los primeros días de interacción antagónica se aprecia que el crecimiento de los fitopatógenos LAcF3-LAcF7 es inhibido por la presencia del endófito LAcE1. Los microorganismos crecen sin entrelazar las hifas de sus micelios. Este tipo de interacción puede estar mediada por compuestos que se difunden en el medio de cultivo o bien por compuestos volátiles, que sirven como mecanismo de defensa de algunos hongos (Boddy, 2000; González *et al.*, 2009; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Por otra parte, los fitopatógenos LAcF1, LAcF2 y LAcF8, crecen hasta que sus micelios hacen contacto con el endófito LAcE1, sin embargo, a pesar de entrelazar las hifas de sus micelios y de formar barreras miceliales, como en el caso de LAcF1, el crecimiento de 4 de los fitopatógenos es inhibido en más del 50% a partir del día 3 de interacción.

Al día 10 de interacción, todos los microorganismos alcanzaron su máximo crecimiento en las cajas de Petri, en esta etapa se observa que el endófito LAcE1 a pesar de no continuar su crecimiento por la presencia de los fitopatógenos competidores, ninguno de ellos logró crecer sobre el endófito, poniendo de manifiesto que este hongo cuenta con mecanismos de defensa físicos y químicos que lo hacen un fuerte competidor *in vitro* y probablemente *in vivo* (Gao *et al.*, 2010).

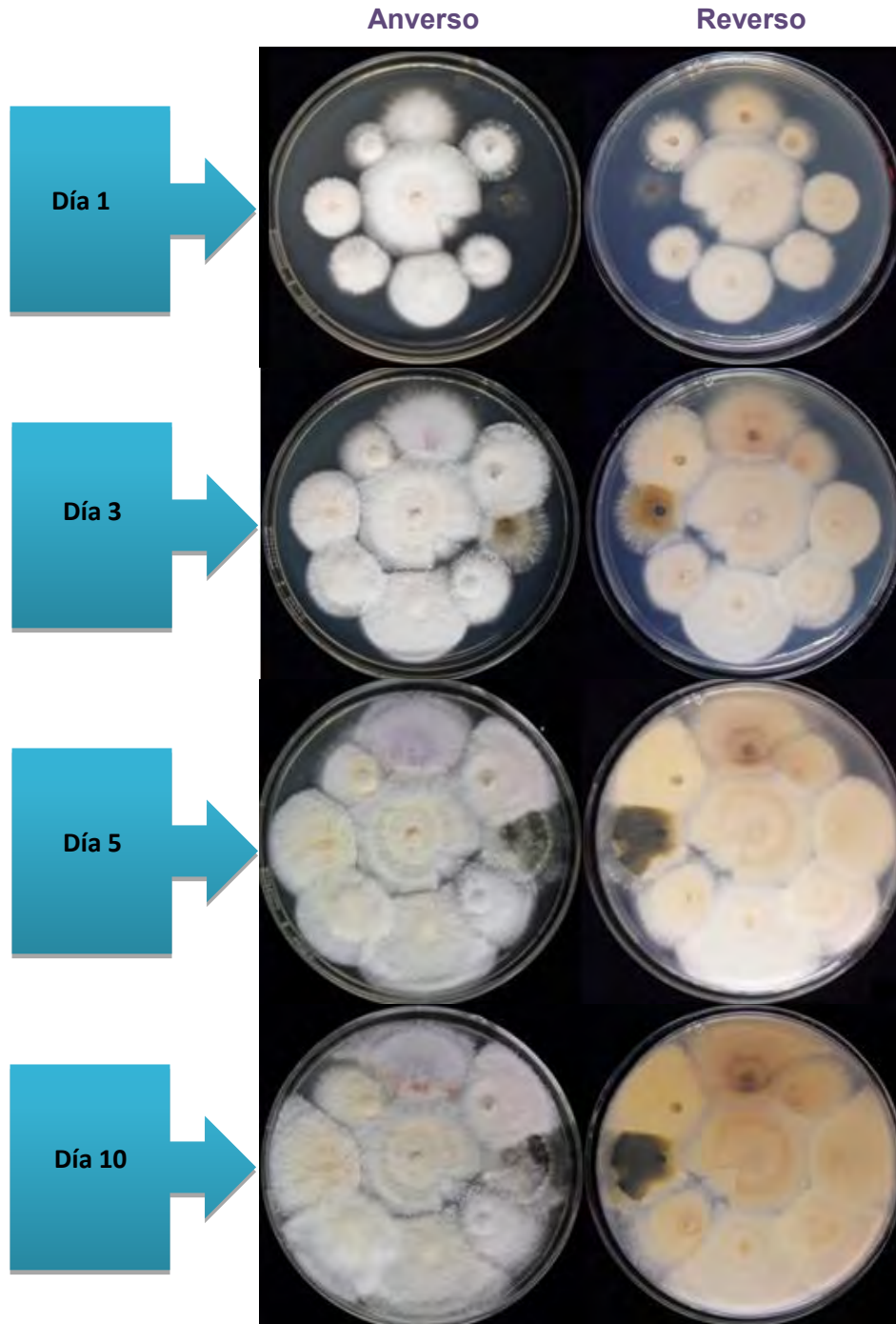


Figura 21. Antagonismo del hongo endófito LAcE1 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de *L. acapulcense*, a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagonica.

En el Cuadro 6 se presentan los porcentajes de inhibición a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagonica, y que corresponden a las imágenes mostradas en la Figura 21. En general, a partir del día 5 los fitopatógenos son inhibidos en más del 50%, y la inhibición es progresiva y significativa a lo largo de todo el bioensayo. Los valores obtenidos permiten confirmar que el endófito LAcE1 presenta un fuerte potencial antagonico frente a sus competidores fitopatógenos. Es posible que el endófito LAcE1 forme parte de los mecanismos de defensas de su hospedera (Gao *et al.*, 2010; Strobel *et al.*, 2004).

Cuadro 6. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense* en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE1. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.

Hongos fitopatógenos	día 1	día 3	día 5	día 10
	% Inhibición			
LAcF1	38.1*	50.9*	62.3*	58.3*
LAcF2	29.2*	65.8*	70.4*	72.6*
LAcF3	10.7	18.7	54.4*	53.6*
LAcF4	17.9*	43.9*	60.3*	65.0*
LAcF5	27.5*	45.3*	50.8*	53.3*
LAcF6	16.7*	30.9*	48.2*	42.2*
LAcF7	16.0*	55.3*	67.2*	74.1*
LAcF8	21.9*	53.7*	54.4*	57.1*

3.2 Antagonismo entre el endófito LAcE2 y los fitopatógenos aislados de la planta *L. acapulcense*

En la Figura 22, se presenta el antagonismo entre el endófito LAcE2 y los 8 hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense* a los días 1, 3, 7 y 10 de interacción. En general, al día uno de interacción se observa que algunos hongos fitopatógenos tienen contacto con las hifas del endófito LAcE2. En el día 3 de interacción LAcE2 creció entre los fitopatógenos y sobre el micelio del fitopatógeno LAcF7. Al mismo tiempo, el micelio del endófito comienza a cambiar de blanco a gris-verde y la abundancia de las hifas de los fitopatógenos se ve disminuida por el contacto hifa-hifa con el endófito LAcE2.

Por otro lado, se observa que al día 7, con excepción de la interacción con los fitopatógenos LAcF1, LAcF2 y LAcF8, el endófito de prueba no detuvo su crecimiento aún en presencia de sus competidores, de manera que, LAcE2, logró crecer entre los fitopatógenos por toda la caja Petri. Además, su micelio aéreo continuó pigmentándose a café-verdoso y a café-negro observado en el reverso de las cajas de Petri. En la zona de contacto de las hifas de los fitopatógenos LAcF2-F6 y el endófito LAcE2, se observa la producción de un pigmento amarillo-café.

A pesar de que los fitopatógenos LAcF1, LAcF2 y LAcF8 desde el día 3 mostraron una fuerte competencia con el endófito inhibiendo su crecimiento, estos también fueron inhibidos significativamente, en más del 40% por el endófito LAcE2. Finalmente, al día 10 de interacción se inhibió significativamente el crecimiento de los hongos fitopatógenos, formando al contacto con ellos una barrera miceliar en la zona de interacción, pigmentada en amarillo. El cambio en la coloración del micelio del hongo LAcE2 de blanco a negro, puede ser el resultado de la activación de un mecanismo de defensa contra sus competidores, los cuales no lograron crecer sobre él ni inhibir su crecimiento.

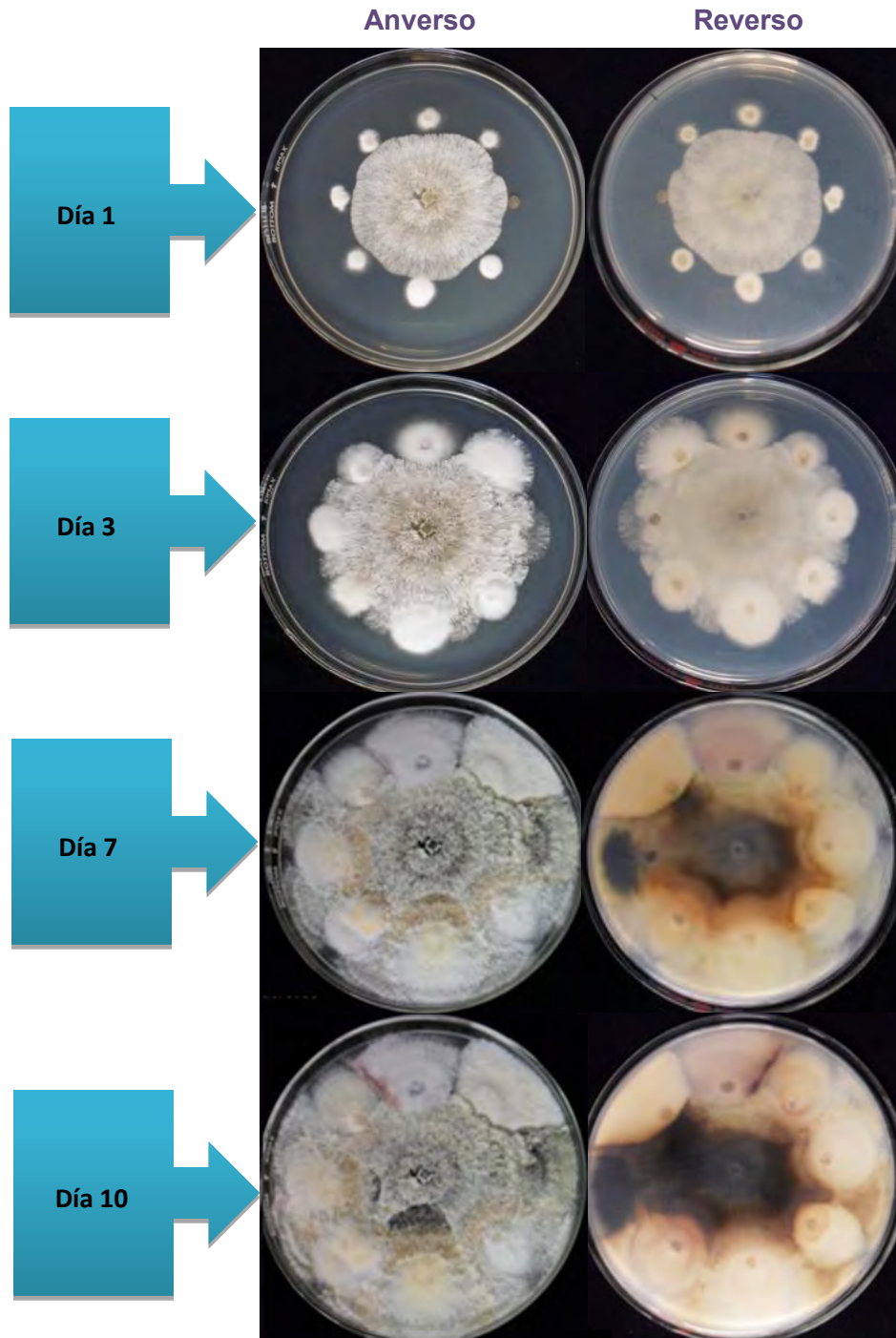


Figura 22. Antagonismo del hongo endófito LAcE2 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de *L. acapulcense*, a los días 1, 3, 7 y 10 de interacción antagonista.

En el Cuadro 7 se presentan los porcentajes de inhibición de los fitopatógenos competidores a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagonica con el endófito LAcE2 y que corresponden a las imágenes mostradas en la Figura 22. En general, a partir del día 3 los porcentajes de inhibición de 4 de los fitopatógenos son significativos y superiores al 50%. El fitopatógeno LAcF7 es inhibido en un 100% a partir del día 3 de interacción.

En todos los casos el efecto inhibitorio se mantiene a lo largo del bioensayo y es progresivo con el paso del tiempo. El endófito LacE2 muestra un fuerte potencial antagonico lo cual podría deberse a que es un hongo de crecimiento muy rápido, además de formar barreras miceliales (mecanismos de defensa físicos) entorno a sus competidores y de producir pigmentos en la zona de interacción (mecanismos de defensa químicos). Su tasa de crecimiento podría proporcionarle una ventaja contra sus competidores.

Cuadro 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense* en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE2. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.

Hongos fitopatógenos	día 1	día 3	día 7	día 10
	% Inhibición			
LAcF1	15.8*	43.3*	70.5*	71.4*
LAcF2	14.3	53.9*	75.5*	71.2*
LAcF3	33.3*	52.2*	63.3*	66.1*
LAcF4	8.3	30.8*	58.7*	66.7*
LAcF5	33.3*	28.1*	50.0*	53.3*
LAcF6	18.7*	22.7*	47.1*	59.0*
LAcF7	27.3	100.0*	100.0*	100.0*
LAcF8	7.1	68.4*	79.3*	79.3*

3.3 Antagonismo entre el endófito LAcE3 y los fitopatógenos de la planta *L. acapulcense*

En la Figura 23, se ilustra el antagonismo entre el endófito LAcE3 y los 8 hongos fitopatógenos de *L. acapulcense*. En general, se observa que los fitopatógenos crecen hasta hacer contacto las hifas de sus micelios con las del endófito LAcE3. En el día uno de interacción algunos hongos, como LAcF2, LAcF4 y LAcF7, comienzan a ser inhibidos por la presencia del endófito. Por otra parte, los fitopatógenos LAcF1 y LAcF5 comienzan a crecer sobre el micelio del endófito de prueba. A los días 3 y 5 los hongos LAcF1 y LAcF5 continúan creciendo sobre el endófito LAcE3 y los fitopatógenos LAcF4 y LAcF6 comienzan a crecer encima del micelio del hongo endófito manteniéndose así, a lo largo de todo el bioensayo.

El hongo endófito LAcE3 no presenta un potencial antagónico importante ya que fue inhibido por 2 de sus 8 competidores. Sin embargo, los fitopatógenos LAcF2, LAcF7 y LAcF8 fueron inhibidos significativamente en más del 50% por el hongo endófito LAcE3 al día 20 (Cuadro 8).

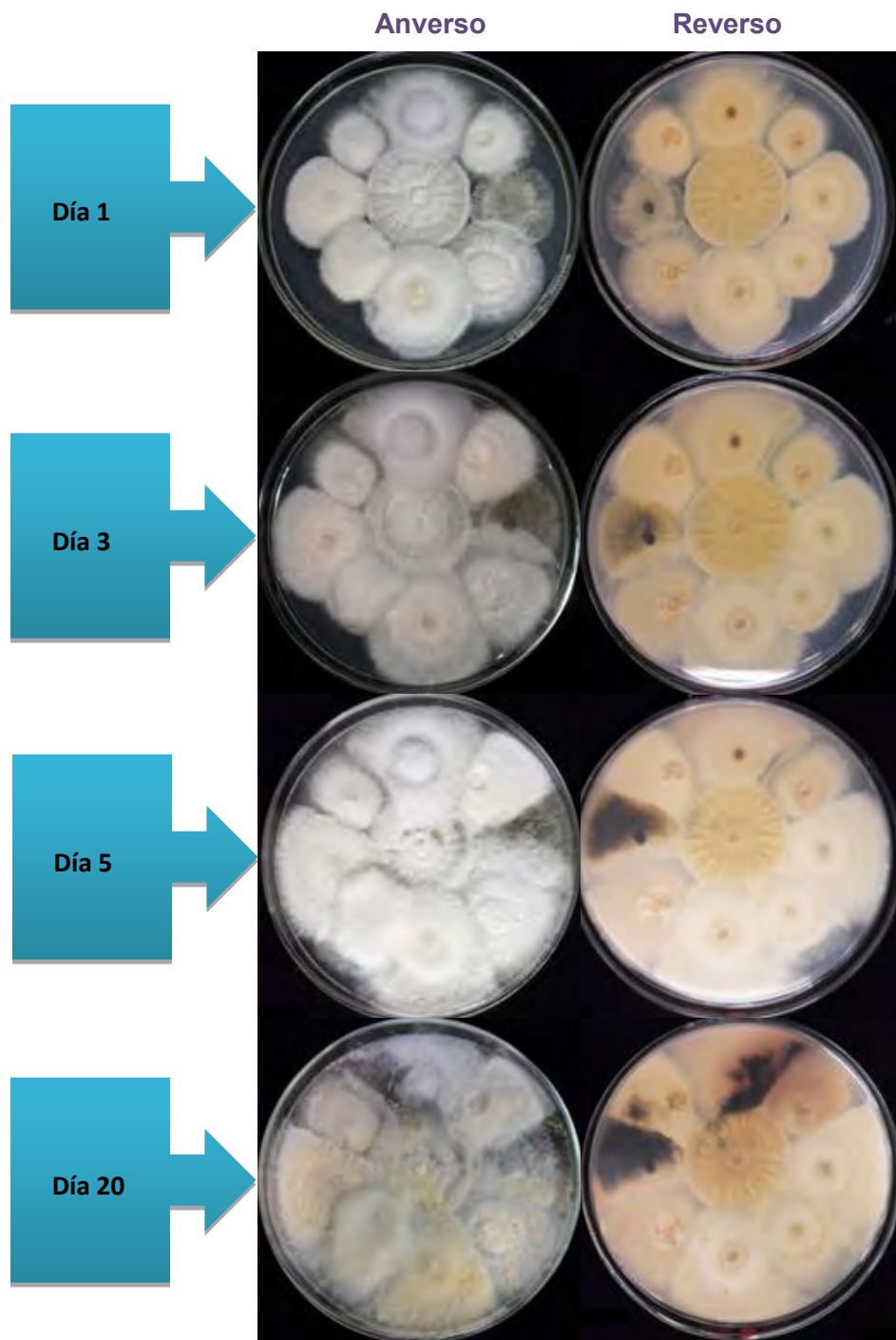


Figura 23. Antagonismo del hongo endófito LAcE3 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de *L. acapulcense*, a los días 1, 3, 5 y 20 de interacción antagonística.

Cuadro 8. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento radial de los ocho fitopatógenos aislados de *L. acapulcense* en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE3. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.

Hongos fitopatógenos	día 1	día 3	día 5	día 20
	% Inhibición			
LAcF1	29.8*	43.9*	40.3*	43.1*
LAcF2	26.5*	35.6*	48.1*	50.0*
LAcF3	7.4	22.7*	32.7*	42.6*
LAcF4	15.1*	20.0	18.2	34.5*
LAcF5	17.9	35.7*	40.0*	35.6*
LAcF6	16.2	26.5*	30.8*	25.0*
LAcF7	75.0*	69.4*	70.9*	71.7*
LAcF8	38.7	46.9*	52.6*	55.0*

3.4 Antagonismo entre el endófito LAcE4 y los 8 hongos fitopatógenos de la planta *L. acapulcense*

En la Figura 24, se presenta el antagonismo entre el endófito LAcE4 y los 8 hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense*. A partir del día uno y hasta el final del bioensayo antagónico, se observó una inhibición a distancia y una disminución en la densidad de las hifas de los micelios de los fitopatógenos competidores.

En las etapas finales del bioensayo los hongos fitopatógenos LAcF3, LAcF4 y LAcF5 crecieron hasta hacer contacto con el micelio del endófito de prueba, sin embargo, su crecimiento fue inhibido por LAcE4 (Cuadro 9).

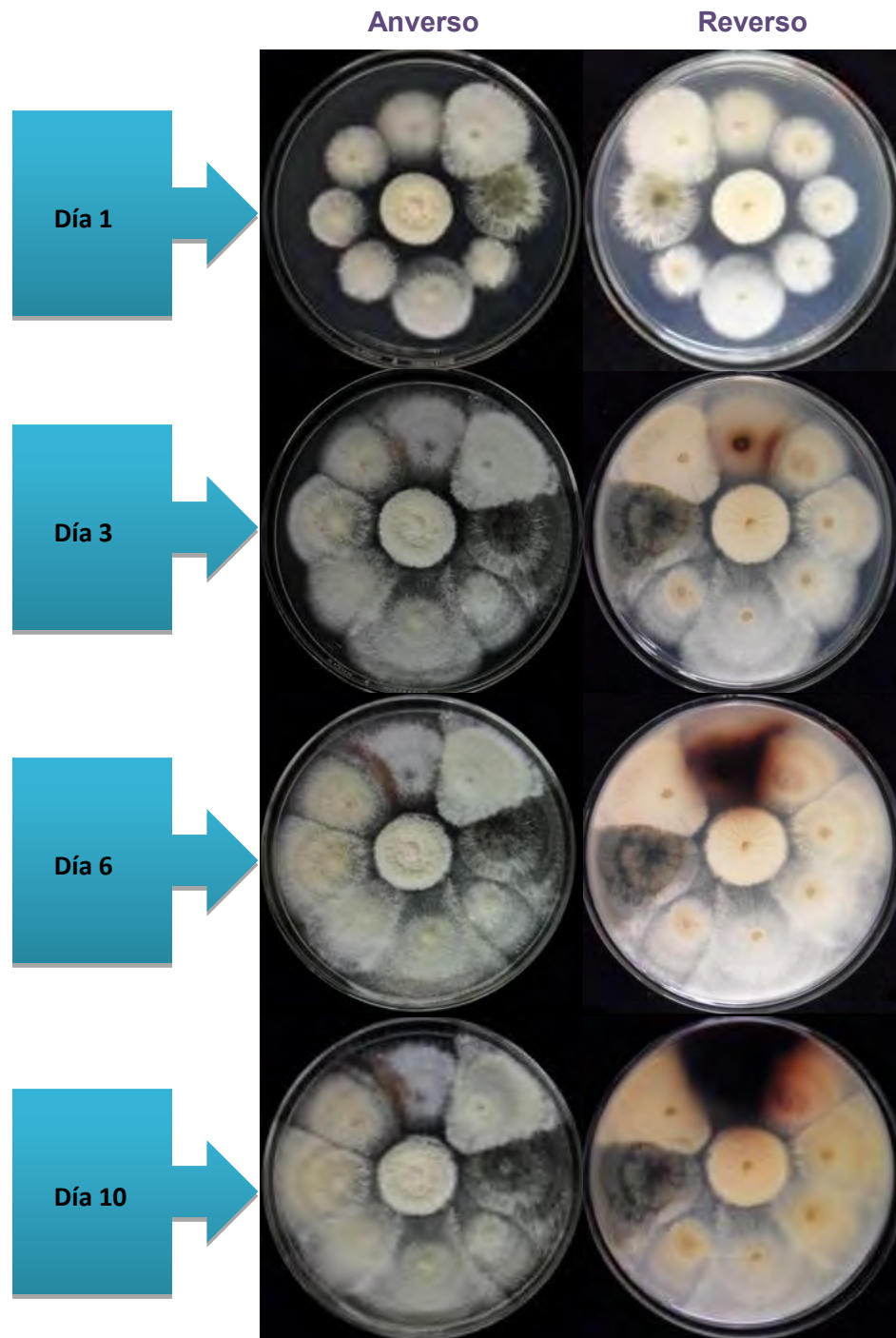


Figura 24. Antagonismo del hongo endófito LAcE4 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de *L. acapulcense*, a los días 1, 3, 6 y 10 de interacción antagonista.

El endófito LAcE4 es un hongo con alto potencial antagónico ya que inhibe el crecimiento de todos sus competidores, además de modificar las características macroscópicas de sus micelios. Es posible que este efecto se deba a la presencia de compuestos volátiles. Se sabe que muchos hongos producen compuestos volátiles con actividad antifúngica como por ejemplo, los sintetizados por los géneros *Muscodor ssp.*, *Nodulisporium ssp.*, entre otros (González-Lamothe *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010).

Cuadro 9. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense* en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE4. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.

Hongos fitopatógenos	día 1	día 3	día 6	día 10
	% Inhibición			
LAcF1	13.9	31.5*	35.4*	37.8*
LAcF2	4.1	19.4*	38.3*	41.0*
LAcF3	11.1*	1.4	35.2*	39.6*
LAcF4	-10.2	16.9	30.7*	34.4*
LAcF5	13.3	21.2*	23.5*	27.6*
LAcF6	-11.1	4.8	39.1*	43.2*
LAcF7	24.0*	35.9*	40.9*	44.0*
LAcF8	27.7*	27.6*	33.3*	29.5*

3.5 Antagonismo entre el endófito LAcE5 y los 8 hongos fitopatógenos de la planta *L. acapulcense*

En la Figura 25, se presenta el antagonismo entre el endófito LAcE5 y los 8 hongos fitopatógenos de *L. acapulcense*, observándose al día uno de interacción antagonista una disminución del crecimiento de las hifas de los hongos LAcF6, LAcF7 y LAcF8. Al día 3 de interacción, el crecimiento de los competidores es limitado por la presencia del endófito de prueba. Además, LAcE5 comienza a formar micelio aéreo más abundante blanco. Al día 5, se observa la formación de barreras miceliales color café, en la zona de interacción con los fitopatógenos LAcF3, LAcF4 y LAcF5, visibles en el anverso y reverso de las cajas de Petri. Al mismo tiempo, el hongo LAc F6 comienza a crecer sobre el endófito LAcE5.

Por último, al día 10 de interacción, los hongos LAcF2, LAcF3, LAcF5 y LAcF6 comienzan a crecer sobre el endófito de prueba, no obstante, el hongo LAcE5 produce un pigmento rojizo que se difunde en el medio de cultivo. Los fitopatógenos LAcF1, LAcF4, LAcF7 y LAcF8 continúan siendo inhibidos significativamente por la presencia de LAcE5.

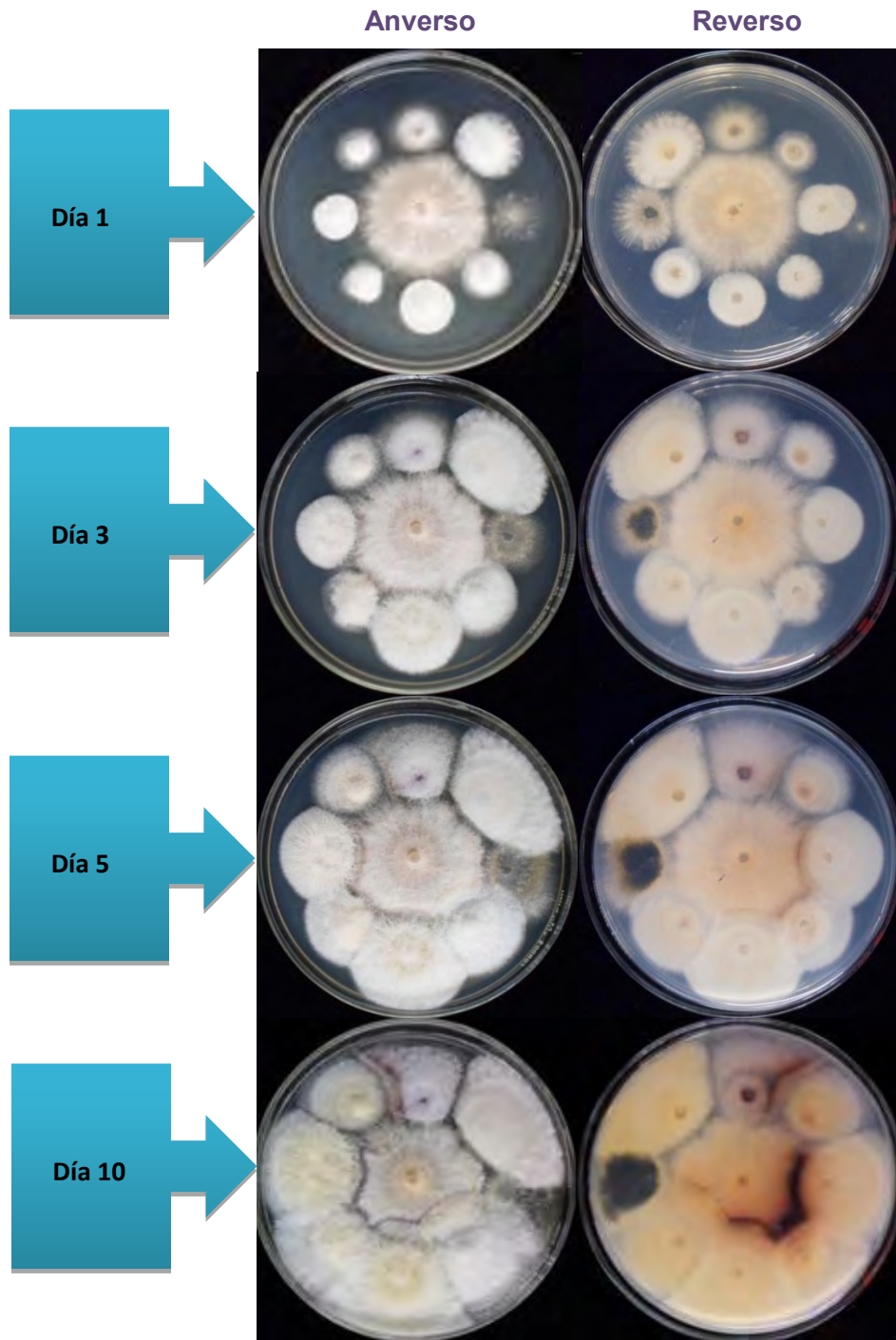


Figura 25. Antagonismo del hongo endófito LAcE5 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de *L. acapulcense*, a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagonística.

En el Cuadro 10 se presentan los porcentajes de inhibición de los fitopatógenos competidores a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagonica con el endófito LAcE5 y que corresponden a las imágenes presentadas de la Figura 25. Los porcentajes de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos LAcF1, LAcF4, LAcF7 y LAcF8, aumentan significativamente con respecto al tiempo de interacción. Por el contrario, los porcentajes de inhibición de LAcF2, LAc F3, LAcF5 y LAcF6 aumentan significativamente hasta el día 5 de interacción, observándose que al día 10 ya no son inhibidos por la presencia del endófito LAcE5. Cabe resaltar que el endófito LAcE5 modificó sus características macroscópicas al producir mayor crecimiento de su micelio aéreo y difundir un pigmento rojo en el medio de cultivo, esto posiblemente como medida de defensa hacia sus antagonistas (Boddy, 2000; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Cuadro 10. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense* en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE5. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.

Hongos fitopatógenos	día 1	día 3	día 5	día 10
% Inhibición				
LAcF1	25.0*	55.6*	64.8*	71.4*
LAcF2	3.4	34.0*	35.7*	-8.3*
LAcF3	3.0	34.0*	40.8*	26.6*
LAcF4	6.9	28.6*	52.4*	54.4*
LAcF5	11.8	27.6*	33.7*	-14.3*
LAcF6	17.1	12.0	32.9*	-6.4
LAcF7	42.0*	54.1*	66.7*	75.9*
LAcF8	31.2	60.0*	67.0*	69.0*

3.6 Antagonismo entre el endófito LAcE6 y los 8 hongos fitopatógenos de la planta *L. acapulcense*

En la Figura 26, se ilustra el antagonismo entre el endófito LAcE6 y los 8 hongos fitopatógenos de *L. acapulcense*. Al día uno de interacción se observa que el endófito de prueba comienza a inhibir el crecimiento de LAcF1, LAcF3 y LAcF8. Al día 3 de interacción los hongos fitopatógenos de LAcF2 a LAcF5 crecen sin entremezclar las hifas de sus micelios con el endófito LAcE6. Sin embargo, se observa claramente la inhibición de crecimiento por la presencia de LAcE6, deteniéndose completamente en la zona de interacción antagónica.

Por último, a los 5 y 10 días de interacción antagónica, los competidores continúan siendo inhibidos significativamente por el endófito de prueba. Además, el endófito LAcE6 comienza a crecer sobre el micelio de LAcF1 y LAcF7. Por su parte, el fitopatógeno LAcF1 produce un pigmento rojizo, observable en el reverso de las cajas Petri.

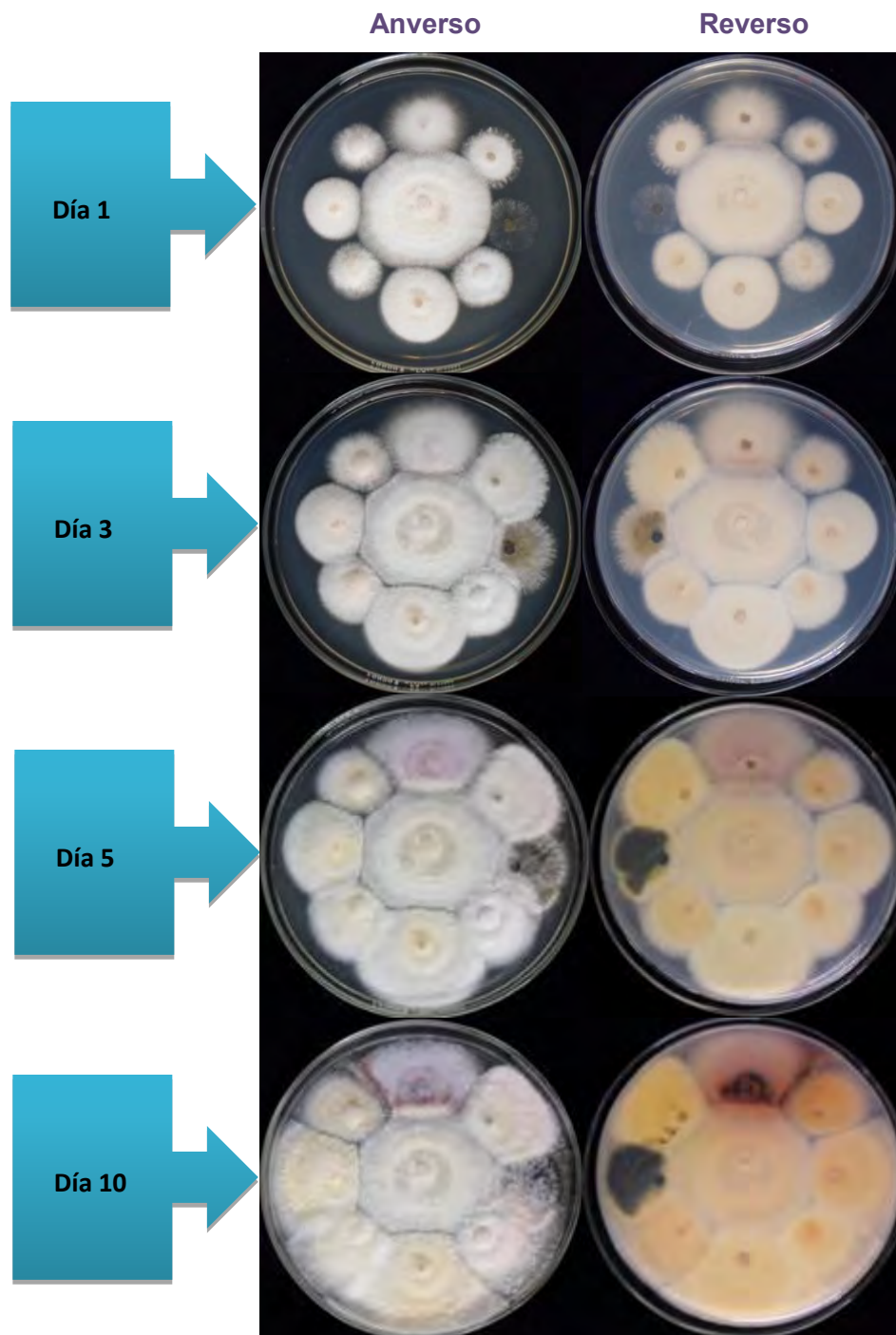


Figura 26. Antagonismo del hongo endófito LAcE6 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de *L. acapulcense*, a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagónica.

En el Cuadro 11 se resumen los porcentajes de inhibición de los fitopatógenos competidores a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagónica con el endófito LAcE6 y que corresponden a las imágenes ilustradas en la Figura 26. Los porcentajes de inhibición aumentan de manera significativa con respecto al tiempo de interacción antagónica. A partir del día 3 todos son significativos y superiores al 35% y en general, al día 10 de interacción son superiores al 60% de inhibición. El endófito LAcE6 presenta un alto potencial antagónico ya que inhibe el crecimiento de sus competidores a lo largo de todo el bioensayo.

Cuadro 11. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense* en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE6. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.

Hongos fitopatógenos	día 1	día 3	día 5	día 10
	% Inhibición			
LAcF1	46.3*	58.5*	69.8*	63.9*
LAcF2	15.4	41.7*	54.0*	61.4*
LAcF3	34.3*	39.5*	52.7*	60.0*
LAcF4	15.4*	39.5*	56.0*	65.6*
LAcF5	18.9*	40.4*	52.3*	53.1*
LAcF6	11.1	36.6*	56.0*	57.1*
LAcF7	19.2*	50.0*	62.5*	70.7*
LAcF8	35.5*	61.1*	68.3*	64.0*

3.7 Antagonismo entre el endófito LAcE7 y los 8 hongos fitopatógenos de la planta *L. acapulcense*

En la Figura 27, se muestra el antagonismo entre el endófito LAcE7 y los 8 hongos fitopatógenos de *L. acapulcense*. Al día uno de interacción antagónica comienza a mostrarse una disminución del crecimiento de los competidores, principalmente sobre los fitopatógenos LAcF1, LAcF2 y LAcF8. El hongo LAcF1 crece hasta hacer contacto con las hifas del endófito y LAcE7 comienza a formar una barrera miceliar.

En general, a los días 3, 5 y 10 se observa un aumento en la inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos, provocada por la presencia del endófito LAcE7. El endófito de prueba continúa creciendo sobre LAcF1 y comienza a crecer sobre LAcF7. De nueva cuenta, LAcF1 produce un pigmento rojizo observable en el reverso de la caja Petri.

Al día 10 de interacción antagónica, LAcE7 forma barreras miceliales con sus competidores, además de formar un sólido de apariencia polvosa que se esparció por toda la caja.

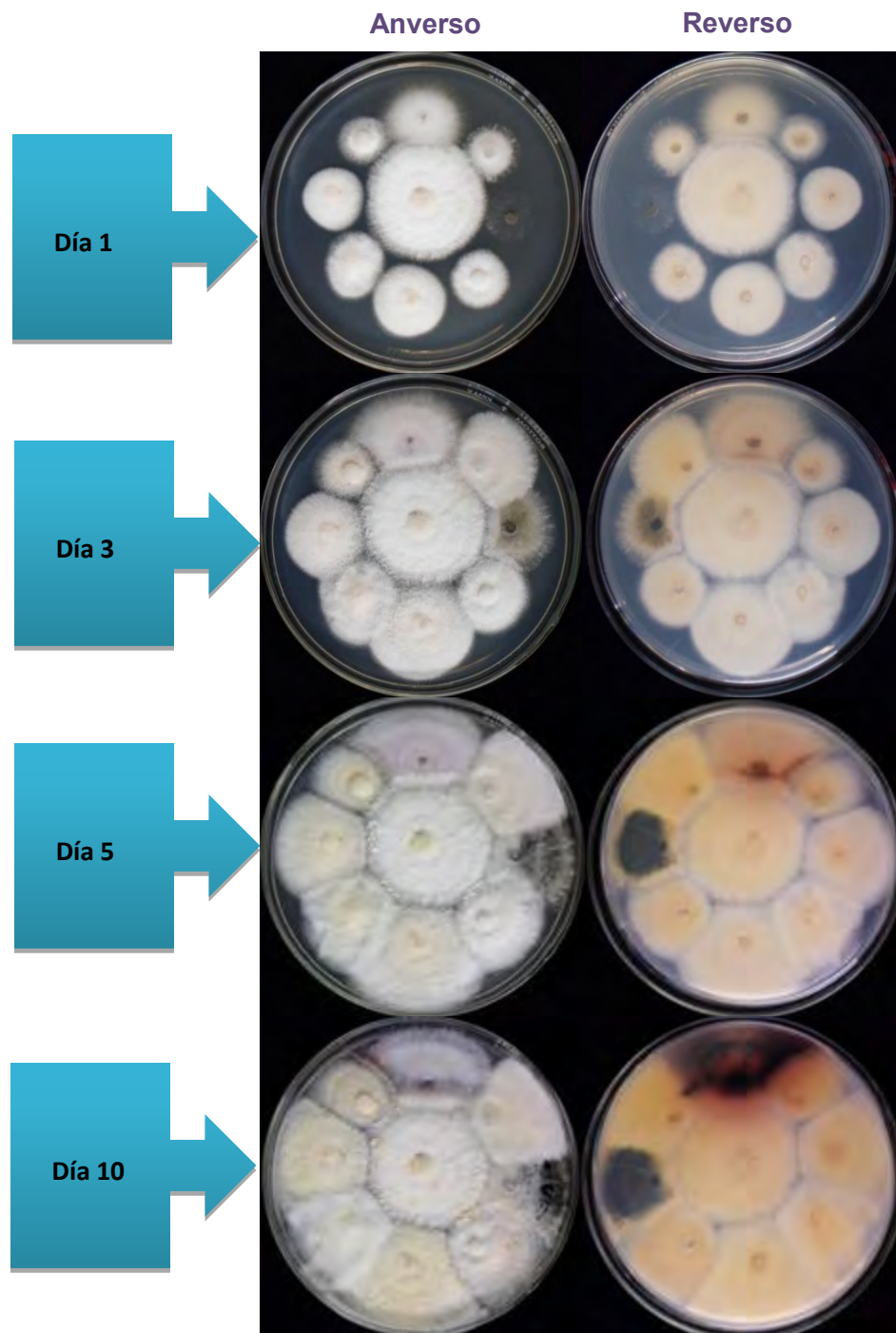


Figura 27. Antagonismo del hongo endófito LAcE7 contra los hongos fitopatógenos LAcF1- LAcF8 aislados de *L. acapulcense*, a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción antagonística.

En el Cuadro 12 se presentan los porcentajes de inhibición a los días 1, 3, 5 y 10 de interacción y que corresponden a las imágenes de la Figura 27. En general, los porcentajes de inhibición aumentan significativamente durante todo el bioensayo, alcanzando en su mayoría al día 10 de interacción, porcentajes de inhibición superiores al 50%. El endófito LAcE7 también muestra un importante potencial antagonico ya que inhibió el crecimiento de todos sus competidores y ninguno de ellos afectó su crecimiento.

Cuadro 12. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los ocho hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense* en el bioensayo de antagonismo múltiple contra el endófito LAcE7. *Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P<0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones.

Hongos fitopatógenos	día 1	día 3	día 5	día 10
	% Inhibición			
LAcF1	47.6*	67.2*	75.4*	65.5*
LAcF2	30.8*	54.7*	62.3*	65.5*
LAcF3	15.6	33.3*	59.6*	50.0*
LAcF4	24.2*	34.1*	50.0*	53.2*
LAcF5	13.9	38.9*	45.0*	46.7*
LAcF6	7.7	38.5*	52.8*	31.6*
LAcF7	0.0	43.9*	85.7*	90.9*
LAcF8	32.3	60.3*	68.3*	64.4*

Los ensayos de antagonismo múltiple mostraron que la mayoría de los hongos endófitos son fuertes competidores contra los fitopatógenos aislados de su planta hospedera inhibiendo el crecimiento de los fitopatógenos. Cabe destacar que los hongos endófitos LAcE4 y LAcE5, muestran importante potencial antagónico ya que son capaces de inhibir a distancia el crecimiento de sus competidores y/o de difundir un pigmento colorido en el medio de cultivo. Estas observaciones podrían ser el resultado de sus mecanismos de defensa contra sus competidores.

Una vez que se puso en evidencia el potencial antagónico de los endófitos aislados de *L. acapulcense*, mediante bioensayos de antagonismo múltiple, se procedió a establecer las condiciones óptimas de crecimiento en medio líquido.

4. Condiciones de cultivo en pequeña escala

Las condiciones óptimas de cultivo se establecieron con el fin obtener los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos y comprobar que los efectos antagónicos observados son mediados principalmente por la producción de éste tipo de metabolitos bioactivos.

En primer lugar, los hongos endófitos se cultivaron en pequeña escala empleando 1.2 L de medio CPD, incubando a los microorganismos bajo condiciones estáticas y de agitación. Este medio de cultivo favorece el crecimiento de los hongos filamentosos, y en general, permite la producción de metabolitos secundarios con buenos rendimientos (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008, 2010; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). En segundo lugar, se cultivaron en medio arroz (200g) para mejorar los rendimientos de los extractos orgánicos activos del medio de cultivo y micelio (Aly *et al.*, 2008; Debbab *et al.*, 2009; Armendáriz-Guillén, 2013). En ambos casos los cultivos se mantuvieron por 30 días con fotoperíodos de luz fluorescente oscuridad 12:12 h a temperatura ambiente.

4.1 Obtención de extractos orgánicos

Una vez transcurrido el período de incubación, se realizaron preparaciones para verificar la pureza de los cultivos. Posteriormente, en el caso de los cultivos en CPD, el micelio se separó del medio de cultivo mediante filtración utilizando gasa. El micelio húmedo obtenido se sometió a un proceso de maceración con CH_2Cl_2 y AcOEt. Por otra parte, los extractos del medio de cultivo se obtuvieron realizando particiones sucesivas empleando también CH_2Cl_2 y AcOEt como disolventes de extracción.

En general, el crecimiento de los hongos endófitos en medio de cultivo CPD en condiciones estáticas fue favorable, ya que lograron crecer en toda la superficie del medio de cultivo en el período de incubación establecido (30 días). No hubo problemas de contaminación y se obtuvieron rendimientos apropiados de extracto orgánico del medio de cultivo y micelio, permitiendo así, llevar a cabo las diversas pruebas para establecer su potencial biológico. Es importante señalar, que en algunos casos los hongos modificaron sus características macroscópicas observadas inicialmente en los cultivos sólidos en caja de Petri. Esto posiblemente es debido a que el medio CPD les proporcionó distintas condiciones de estrés y los microorganismos tuvieron que adaptarse para continuar su crecimiento. Estas observaciones son evidentes en los cultivos de los hongos LAcE2 y LAcE5, los cuales mostraron un aspecto cremoso y de consistencia mucilaginosa a pesar de no estar contaminados. En el caso del hongo LAcE2 el color de su micelio cambió de blanco con puntos verdes a café oscuro. El micelio del hongo LAcE5 se pigmentó de manera considerable a rojo, lo cual no se había observado en medio de cultivo sólido. De igual forma, el crecimiento del hongo LAcE4 se vio favorecido en cultivo en medio CPD incubado en condiciones estáticas; su crecimiento en PDA es muy lento y con micelio escaso, por el contrario, el crecimiento de su micelio en medio líquido fue mucho más abundante y uniforme.

Con respecto a los cultivos en CPD incubados bajo condiciones de agitación, con excepción de los endófitos LAcE1, LAcE2 y LAcE3 no fue apropiado para el

desarrollo de los hongos endófitos de *L. acapulcense*. Su crecimiento no fue suficiente para obtener extractos orgánicos de su medio de cultivo y micelio.

Posteriormente y con la finalidad de optimizar el crecimiento de los endófitos puros, y por ende el rendimiento de los extractos orgánicos, se decidió cultivarlos en medio de arroz. Con excepción de los endófitos LAcE3 y LAcE4 que tuvieron un crecimiento irregular en la superficie del medio de cultivo, el crecimiento de los microorganismos fue similar al obtenido en PDA.

En el Cuadro 13, se muestran los rendimientos obtenidos para los extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala de los 7 endófitos de *L. acapulcense*, en medio CPD y medio arroz, bajo condiciones de incubación estáticas y de agitación. Los rendimientos más altos se obtuvieron empleando medio arroz, incubando los microorganismos en condiciones estáticas. En general, estos fueron del orden de 1g de extracto por cada 200g de arroz (Cuadro 13).

Cuadro 13. Rendimientos de los cultivos en pequeña escala de los 7 hongos endófitos aislados de *L. acapulcense* en las distintas condiciones de cultivo.

Hongo	Condición de Cultivo	Medio de Cultivo (Me)/ Micelio (Mi)	Extracto Total (mg)	Rendimiento (mg/L o mg/200g)	Clave del Extracto Según su Condición de Cultivo
LAcE1	CPD Estático	Me	76.9	64.1	LAcE1 E Me
		Mi	1,312.9	1,094.1	LAcE1 E Mi
	CPD Agitación	Me	48.7	40.6	LAcE1 A Me
		Mi	113.3	94.4	LAcE1 A Mi
	Arroz/Estático	Me/Mi	3,012.3	1,721.3	LAcE1 Ar
LAcE2	CPD Estático	Me	70.0	58.3	LAcE2 E Me
		Mi	716.7	597.2	LAcE2 E Mi
	CPD Agitación	Me	76.7	63.9	LAcE2 A Me
		Mi	245.5	204.6	LAcE2 A Mi
	Arroz/Estático	Me/Mi	584.9	2,339.6	LAcE2 Ar
LAcE3	CPD Estático	Me	22.9	19.1	LAcE3 E Me
		Mi	517.7	431.4	LAcE3 E Mi
	CPD Agitación	Me	237.3	197.7	LAcE3 A Me
		Mi	352.9	294.1	LAcE3 A Mi
	Arroz/Estático	Me/Mi	215.2	860.8	LAcE3 Ar
LAcE4	CPD Estático	Me	143.4	119.5	LAcE4 E Me
		Mi	603.7	503.1	LAcE4 E Mi
	Arroz/Estático	Me/Mi	1,866.5	7,466.0	LAcE4 Ar
LAcE5	CPD Estático	Me	456.4	380.3	LAcE5 E Me
		Mi	2,389.4	1,991.2	LAcE5 E Mi
	Arroz/Estático	Me/Mi	8,320.5	4,754.6	LAcE5 Ar
LAcE6	CPD Estático	Me	133.3	111.1	LAcE5 E Me
		Mi	464.9	387.4	LAcE5 E Mi
	Arroz/Estático	Me/Mi	1,184.7	1,184.7	LAcE5 Ar
LAcE7	CPD Estático	Me	145.6	121.3	LAcE5 E Me
		Mi	104.3	86.9	LAcE5 E Mi
	Arroz/Estático	Me/Mi	1,487.6	1,487.6	LAcE5 Ar

Por otra parte, con el fin de realizar las pruebas biológicas se analizaron los perfiles cromatográficos de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos con CH_2Cl_2 y AcOEt. La CCF mostró que cada par de extractos (CH_2Cl_2 y AcOEt) presentó similitud cromatográfica en la composición metabólica, por lo cual se unieron. Sin embargo, el perfil cromatográfico del medio de cultivo y micelio no reveló grandes semejanzas por lo cual se evaluaron por separado. A manera de ejemplo en la Figura 28 se muestra el perfil cromatográfico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del endófito LAcE1 cultivado en CPD y medio arroz (Figura 28).

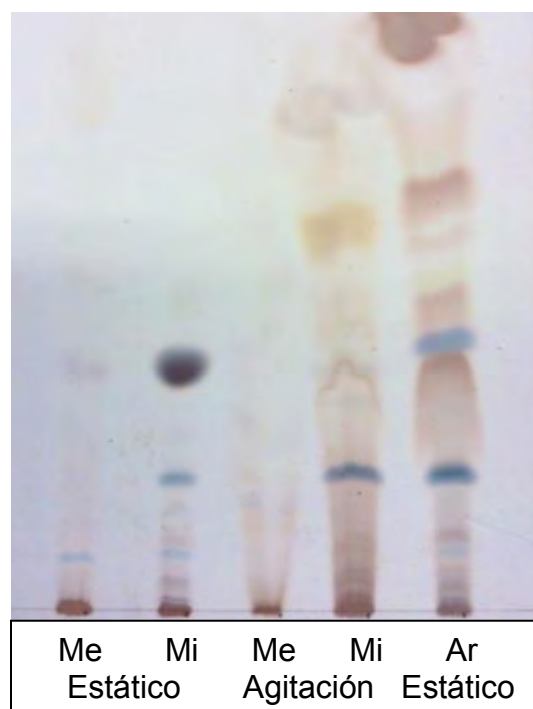


Figura 28. Cromatografía en capa fina comparativa de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, derivados de las distintas condiciones y medios de cultivo empleados para establecer las condiciones óptimas de cultivo del hongo endófito LAcE2. Sistema de elución: CH_2Cl_2 -MeOH 98:2, revelador H_2SO_4 al 10%.

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

5. Efecto antifúngico

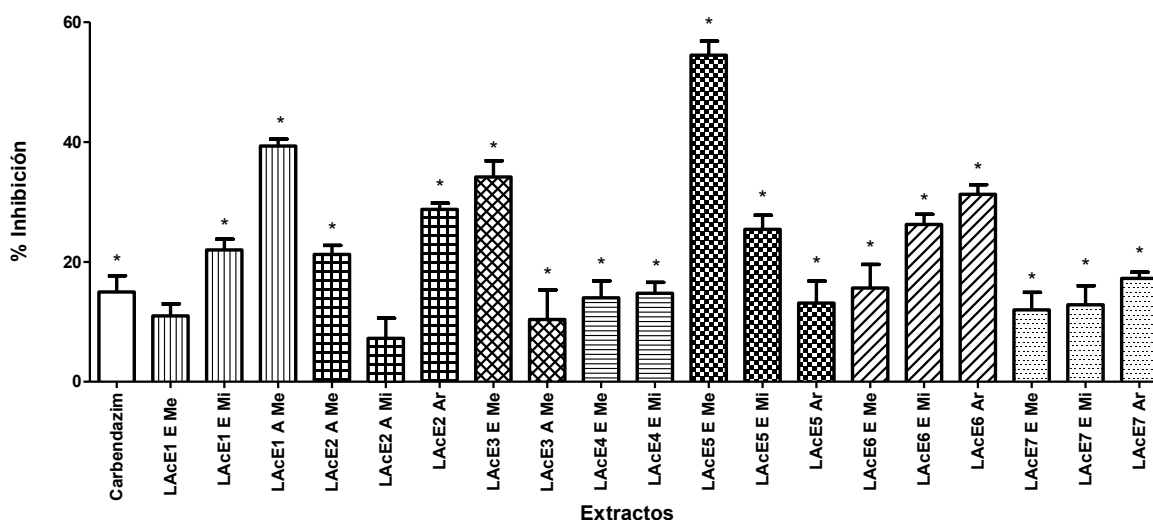
La actividad antifúngica de los extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala se evaluó cuantitativamente por medio de bioensayos de dilución en caja de Petri sobre el crecimiento radial de 4 microorganismos fitopatógenos, con importancia agrícola. Así como, sobre el crecimiento de 8 fitopatógenos aislados de la planta *L. acapulcense* (LAcF1-LAcF8).

5.1 Efecto antifúngico sobre microorganismos fitopatógenos de importancia agrícola

Los microorganismos seleccionados corresponden a dos hongos y dos oomicetos, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Pythium aphanidermatum* y *Phytophthora parasitica*, respectivamente.

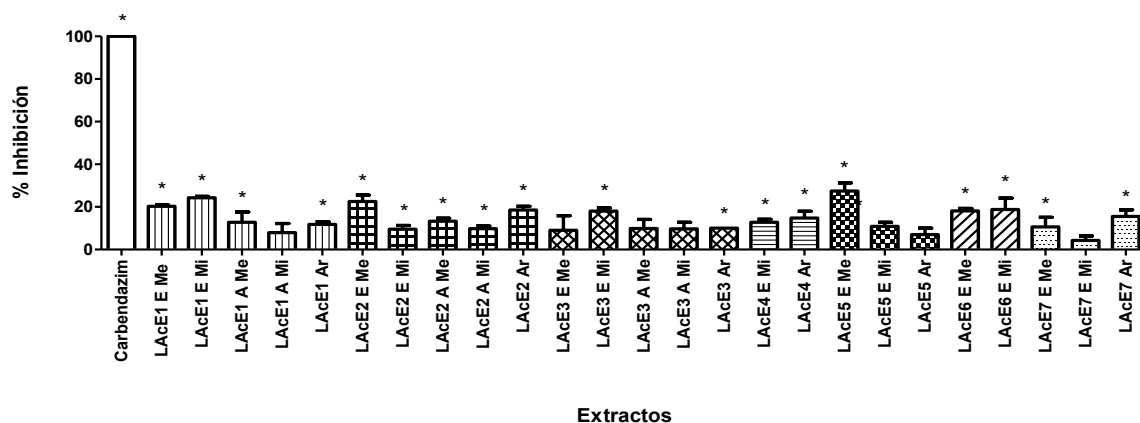
En las Gráficas 1 a la 4, se muestra el efecto antifúngico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos en CPD (estático y agitación) y MA, graficando solo aquellos extractos que presentaron efectos inhibitorios sobre los microorganismos de prueba aun sin ser significativos.

En la Gráfica 1, se observa en general que la mayoría de los extractos orgánicos evaluados provocan efectos inhibitorios significativos sobre el crecimiento de *A. alternata*, superiores al 15%. Cabe destacar que 9 de los extractos evaluados resultaron ser más efectivos que el control positivo, el fungicida comercial Carbendazim, el cual es un fungicida sistémico (DuPont, 2014). Siendo, los extractos orgánicos del medio de cultivo del endófito LAcE1 (39.33%) cultivado en CPD bajo condiciones de agitación, el extracto del medio de cultivo de los hongos LAcE3 (34.15%) y LAcE5 (54.47%) en condiciones estáticas en CPD, los que mostraron el mayor potencial antifúngico sobre el crecimiento de *A. alternata*.



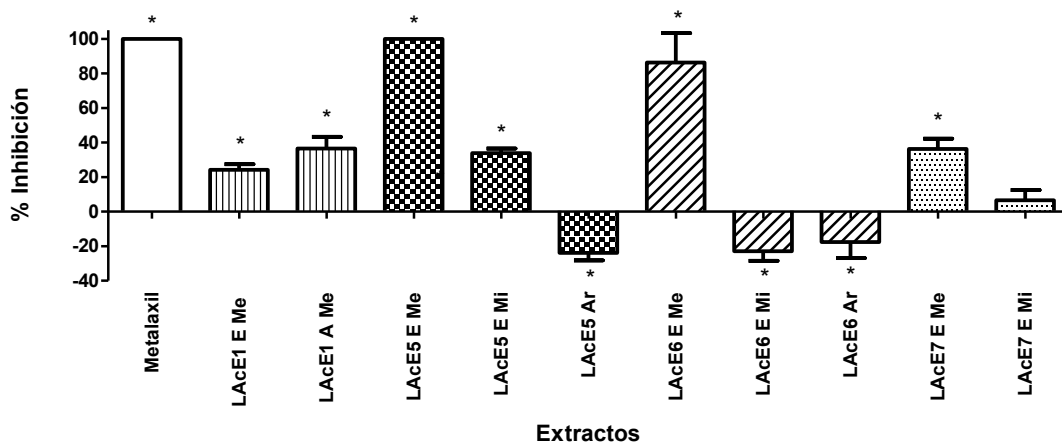
Gráfica 1. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1–LacE7, sobre el crecimiento del hongo *Alternaria alternata*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

En la Gráfica 2, se observa en general que la mayoría de los extractos orgánicos evaluados, sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum* muestran porcentajes de inhibición significativos alrededor del 10%. Los extractos orgánicos del micelio del endófito LAcE1 (24.25%) obtenidos en condiciones estáticas cultivados en CPD, y los del medio de cultivo de los endófitos LAcE2 (22.5%) y LAcE5 (27.46%) cultivados también bajo condiciones de incubación estáticas en CPD, muestran la mayor inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. Ninguno de los extractos orgánicos muestran porcentajes de inhibición comparables a la del control positivo el Carbendazim, el cual presenta 100% de inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* a la misma concentración de prueba que fue de 250 ppm.



Gráfica 2. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1–LacE7, sobre el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

En la Gráfica 3 se presenta el efecto de los extractos orgánicos evaluados, sobre el crecimiento del oomiceto *Phytophthora parasitica*, observándose porcentajes de inhibición estadísticamente significativos y superiores al 20%. Los extractos del medio de cultivo de los endófitos LAcE5 (100%) y LAcE6 (86.38%) cultivados en medio CPD en condiciones estáticas, son los más activos sobre el crecimiento de este oomiceto, su actividad biológica es comparable con la del Metalaxil, empleado como control positivo. En contraste, los extractos orgánicos derivados del cultivo en medio arroz de los endófitos LAcE5 (-23.82%) y LAcE6 (-17.55%) y del extracto del micelio del endófito LAcE6 (-22.88%) cultivados en CPD muestran actividad estimulante significativa sobre el crecimiento de *P. parasitica*.

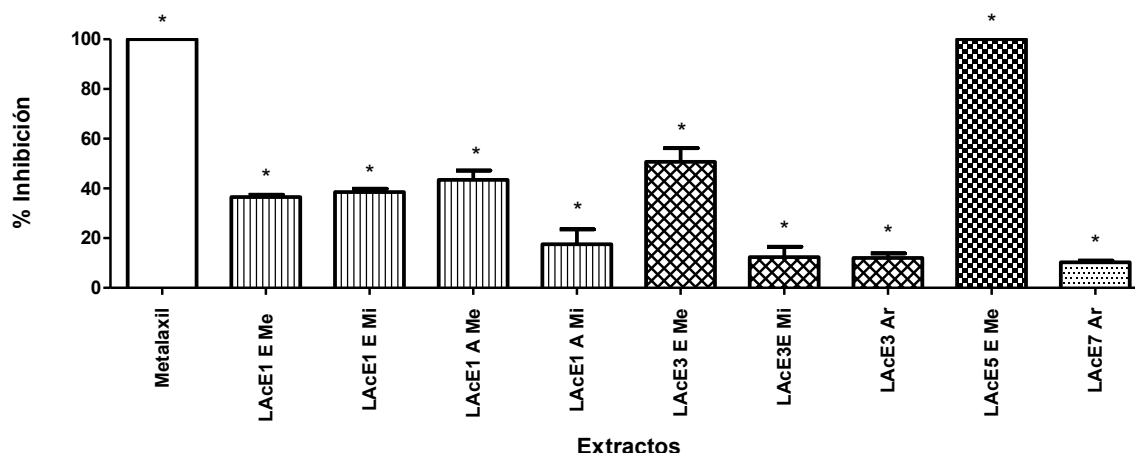


Gráfica 3. Efecto antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1–LacE7, sobre el crecimiento del oomiceto *Phytophthora parasitica*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

En la Gráfica 4 se presenta el efecto de los extractos orgánicos sobre el crecimiento de *Pythium aphanidermatum*. En general, los extractos orgánicos muestran porcentajes de inhibición significativos superiores al 30%. De nueva cuenta, el extracto orgánico derivado del medio de cultivo del endófito LAcE5 cultivado en CPD muestra un porcentaje de inhibición del 100% sobre el crecimiento del oomiceto *Pythium aphanidermatum* y comparable al del Metaxil, utilizado como control positivo. El extracto del medio de cultivo en condiciones estáticas en CPD del endófito LAcE3 también muestra importante potencial antioomiceto inhibiendo su crecimiento en un 50.73%.

Cabe destacar que el endófito LAcE5 inhibe de manera significativa el crecimiento de los 4 microorganismos de prueba. Además, en todos los casos mostró los mayores porcentajes de inhibición. Los hongos *A. alternata* y *F. oxysporum* fueron inhibidos en un 54.47% y 27.46%, respectivamente y los oomicetos *Pythium aphanidermatum* y *Phytophthora parasitica* en un 100%. El hongo LAcE5 constituye un candidato idóneo para la obtención de metabolitos secundarios para el control de estos fitopatógenos, en particular de los oomicetos. Por otra parte, es

importante señalar que la mayor actividad biológica se presentó en los extractos derivados de los cultivos en CPD, confirmándose que las características y composición del medio de cultivo influyen en la producción de metabolitos secundarios bioactivos (Gunatilaka, 2006; Kusari *et al.*, 2012).



Gráfica 4. Efecto antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1–LAcE7, sobre el crecimiento del oomiceto *Pythium aphanidermatum*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

5.2 Efecto antifúngico sobre hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense*

Para evaluar el efecto de los extractos orgánicos de los endófitos aislados de *L. acapulcense* sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos aislados de la misma hospedera, se seleccionaron a los endófitos con los mayores porcentajes de inhibición, sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola. Los endófitos seleccionados corresponden a LAcE1 E Me, LAcE2 E Me, LAcE3 E Mi, LAcE4 Ar y LAcE5 E Me.

En el Cuadro 14 se muestran los extractos orgánicos evaluados, sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense*. Los endófitos LAc E1, LAcE3, LAcE4 y LAcE5 inhiben significativamente el crecimiento de al menos 3 de los fitopatógenos de prueba, sin embargo en algunos casos la

inhibición es menor al 15%. De nueva cuenta, el extracto derivado del medio de cultivo del hongo LAcE5 en condiciones de incubación estática muestra la mejor actividad antifúngica, inhibiendo significativamente el crecimiento de 6 de los 8 hongos fitopatógenos evaluados. Es posible que este hongo endófito esté involucrado en los mecanismos de defensa de *L. acapulcense* (Gao *et al.*, 2010).

Cuadro 14. Efecto antifúngico de 5 de los extractos orgánicos más activos, sobre el crecimiento radial de los 8 hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense*.

Controles positivos/ Extractos	% de Inhibición sobre el Crecimiento de los Hongos Fitopatógenos							
	LAcF1	LAcF2	LAcF3	LAcF4	LAcF5	LAcF6	LAcF7	LAcF8
Carbendazim	100 ± 0.0*	100 ± 0.0*	48.7 ± 0.0*	48.7 ± 0.0*	42.6 ± 2.2*	47.1 ± 2.3*	100 ± 0.0*	100 ± 0.0*
Metalaxil	-3.9 ± 2.2	5.9 ± 0.0	7.7 ± 0.0	-3.4 ± 2.1	7.8 ± 2.9	-11.0 ± 2.5*	-4.2 ± 1.1	0 ± 0.0
LAcE1 E Me	2.3 ± 2.4	5.9 ± 0.0	12.2 ± 3.3*	9.6 ± 2.7*	0.0 ± 0.0	0 ± 0.0	20.1 ± 3.4*	26.5 ± 4.0*
LAcE2 E Me	3.3 ± 1.5	5.9 ± 0.0	14.5 ± 5.3 *	4.8 ± 2.7	12.6 ± 2.9	0 ± 0.0	9.6 ± 1.8	11.7 ± 1.0*
LAcE3 E Mi	4.5 ± 2.6	4.7 ± 2.4	8.7 ± 2.3*	10.3 ± 2.7*	0 ± 0.0	1.5 ± 2.2	21.6 ± 1.8*	26.2 ± 2.8 *
LAcE4 Ar	5.8 ± 2.7	20.0 ± 3.3*	15.4 ± 2.8*	16.0 ± 2.7*	8.6 ± 2.6	0 ± 0.0	8.9 ± 1.7	8.3 ± 3.5*
LAcE5 E Me	19.0 ± 1.4*	14.5 ± 1.9*	18.7 ± 3.5*	21.8 ± 2.4*	15.2 ± 5.8	0 ± 0.0	65.2 ± 2.0*	65.9 ± 1.2*

* Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones realizadas.

A continuación se procedió a establecer la actividad fitotóxica de los extractos fúngicos mediante un bioensayo de dilución en agar, empleando dos semillas de prueba.

6. Efecto fitotóxico sobre semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*

La actividad fitotóxica de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña escala, se evaluó cuantitativamente, sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de las semillas de *Solanum lycopersicum* y *Amaranthus hypochondriacus*, por medio del bioensayo de dilución en agar, utilizando cajas Petri y una concentración de prueba de 100 ppm.

6.1 Efecto sobre la germinación

Con excepción de los extractos orgánicos del medio de cultivo en CPD del hongo LAcE5 en condición de incubación estática, y de los extractos orgánicos derivados del cultivo en medio arroz de los hongos LAcE4 y LAcE5 que inhibieron en 100% la germinación de la semilla de *A. hypochondriacus*, ninguno de los extractos fúngicos evaluados inhiben significativamente el proceso de germinación de *A. hypochondriacus*.

Por otra parte, la germinación de las semillas de *S. lycopersicum* solo fue inhibida significativamente y en un 100% por el extracto del medio de cultivo en CPD del hongo LAcE5 en la condición estática.

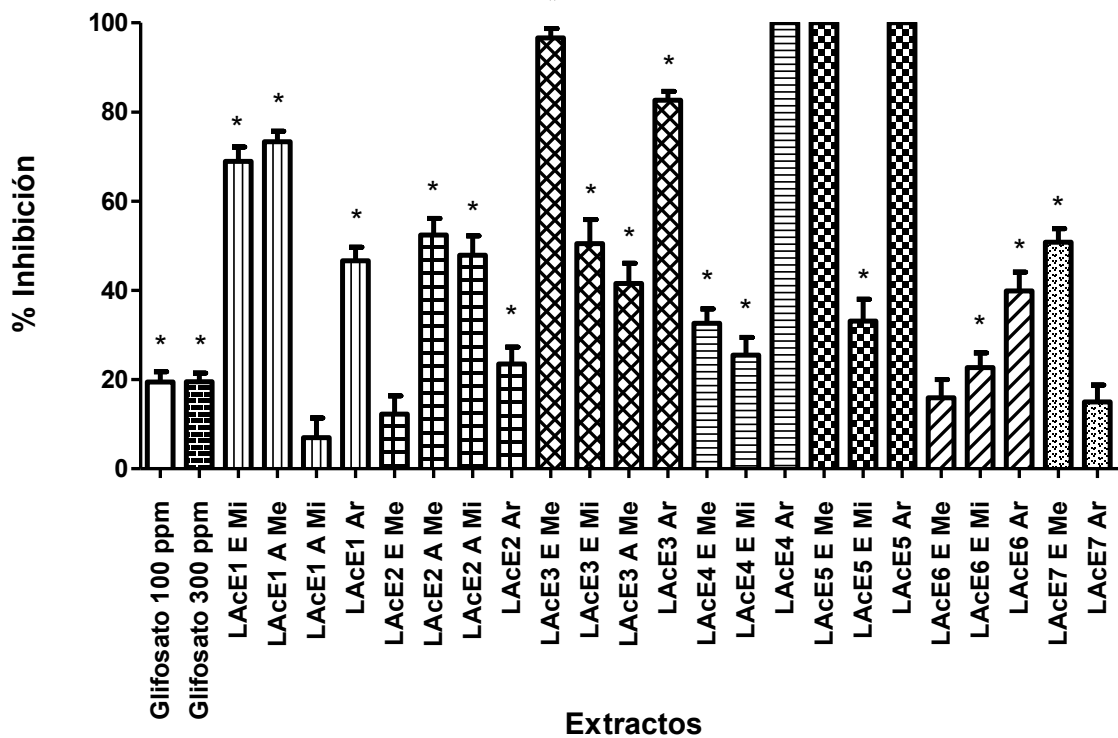
Cabe resaltar que a ninguna de las 2 concentraciones de prueba el control positivo, el Glifosato, logró inhibir significativamente la germinación de las dos semillas de prueba.

6.2 Efecto sobre el crecimiento de la raíz

En la Gráficas 5 y 6 se muestra el efecto de los extractos orgánicos sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*, omitiendo aquellos extractos que presentan actividad nula.

En la Gráfica 6, se observa en general que la mayoría de los extractos evaluados inhiben significativamente el crecimiento de la raíz *A. hypochondriacus* en más del 40%. Los extractos orgánicos de los endófitos LAcE4 y LAcE5 cultivados en medio arroz y el extracto del medio de cultivo del hongo LAcE5 cultivado en CPD en condiciones estáticas presentan el mayor potencial fitotóxico, inhibiendo en un 100% el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus*. Por otra parte, siete de los extractos orgánicos evaluados presentan porcentajes de inhibición significativos mayores al 60% (LAcE1 E Mi, LAcE1 A Me, LAcE3 E Me, LAcE3 Ar, LAcE4 Ar, LAcE5 E Me y LAcE5 Ar).

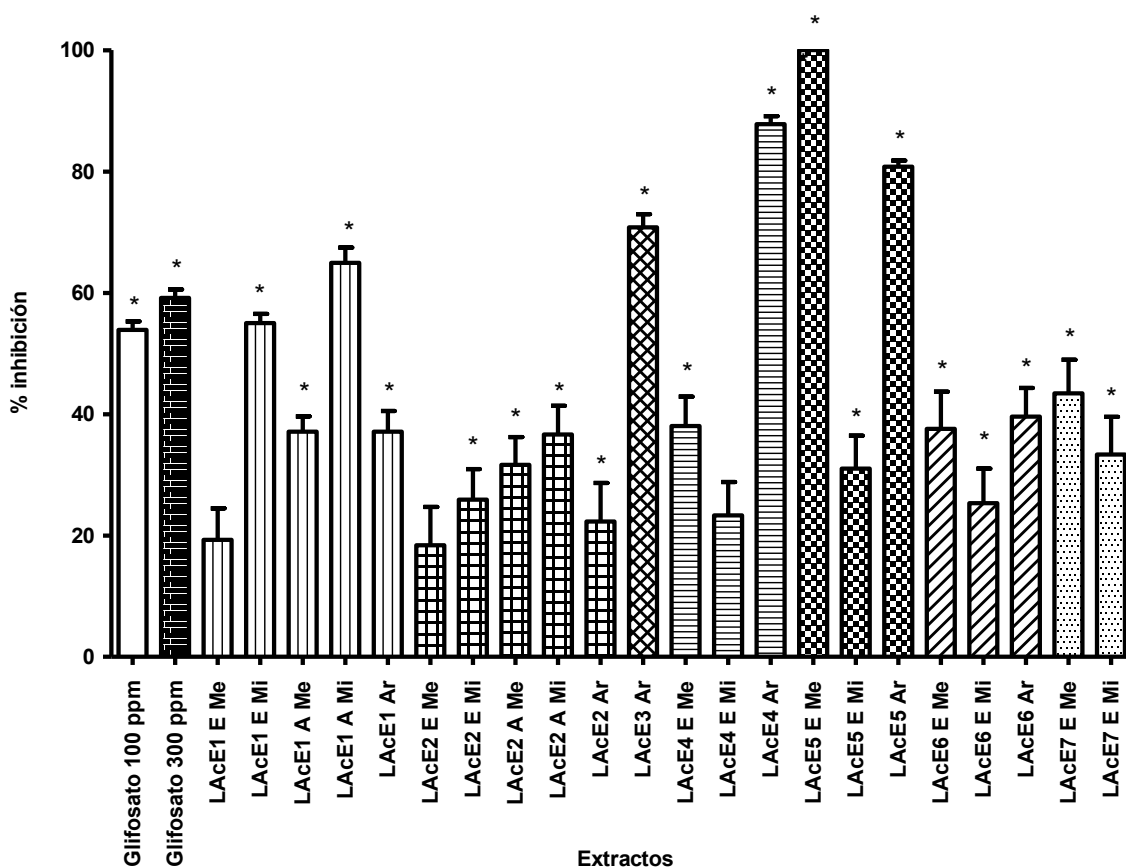
Cabe resaltar que la mayoría de los extractos evaluados presentan porcentajes de inhibición mayores que el control positivo, el herbicida comercial Glifosato aun a la máxima concentración de prueba que fue de 300 ppm.



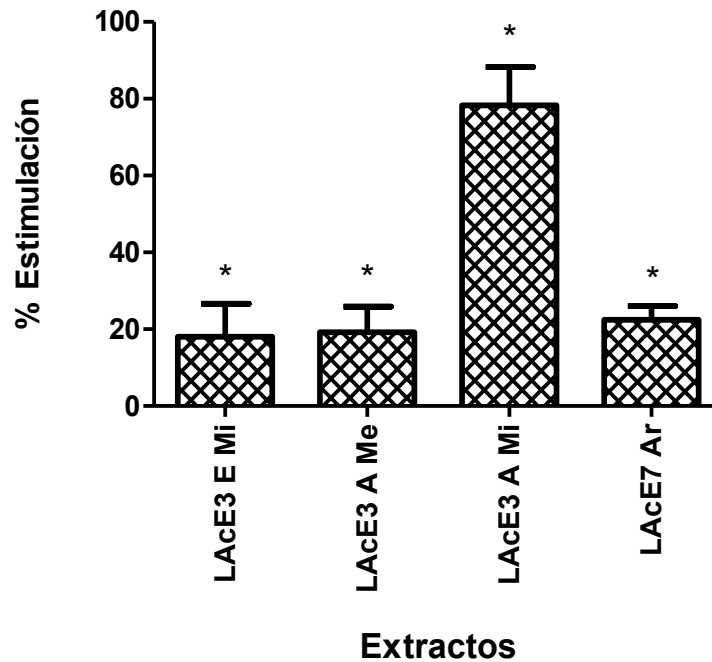
Gráfica 5. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1-LAcE7, sobre el crecimiento de la raíz de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones

En la Gráfica 6 se muestran los % de inhibición sobre el crecimiento de la raíz de la semilla de *S. lycopersicum*. En general todos los extractos evaluados muestran porcentajes de inhibición significativos superiores al 30%. De nueva cuenta, el extracto del endófito LAcE5 derivado del cultivo en condiciones estáticas en CPD inhibe al 100% el crecimiento de la raíz de la semilla de *S. lycopersicum*. Los extractos LAcE1 A Mi, LAcE3 Ar y LAcE5 Ar muestran también importante actividad herbicida, inhibiendo el crecimiento de la raíz de las semillas de *S. lycopersicum* en más del 60% y los extractos del medio de cultivo de los hongos LAcE4 Ar y LAcE5 E en más del 80%. Los efectos fitotóxicos demostrados por los extractos fúngicos, son comparables al del control positivo el Glifosato (100 y 300 ppm).

Por otra parte, los extractos orgánicos de los endófitos LAcE3 derivado del micelio cultivado en CPD en condiciones estáticas, el extracto derivado del medio de cultivo y del micelio de LAcE3 cultivado en CPD en agitación y del extracto del hongo LAcE7 cultivado en medio arroz en condición estática, estimulan significativamente el crecimiento de la raíz de *S. lycopersicum* (Grafica 7). El extracto del medio de cultivo en condiciones de agitación del hongo LAcE3 muestra el mayor porcentaje de estimulación (78.26%) sobre el crecimiento de las semillas de *S. lycopersicum* (Macías-Rubalcava *et al.*, 2014).



Gráfica 6. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de los hongos endófitos LAcE1–LacE7, sobre el crecimiento de la semilla de *Solanum lycopersicum*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.



Gráfica 7. Porcentajes de estimulación del crecimiento de la semilla de *Solanum lycopersicum* ocasionado por 4 extractos orgánicos derivados de hongos endófitos de *L. acapulcense*. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

En general, todos los extractos orgánicos de los hongos endófitos aislados de *L. acapulcense* demostraron un mayor potencial fitotóxico que antifúngico. Es bien conocido que los endófitos son capaces de producir diversas exoenzimas y micotoxinas las cuales son necesarias para infectar y colonizar a sus plantas hospedadoras, actuando a nivel de membranas o de la fotosíntesis, entre otras. (Schulz & Boyle, 2005; Khan *et al.*, 2012). Esta particularidad de los hongos endófitos los ubica como candidatos potenciales para el descubrimiento de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica. El extracto del hongo LAc E5 derivado del cultivo en condiciones estáticas en CPD, presenta la mejor actividad biológica, constituyendo así, un candidato idóneo para realizar un estudio químico biodirigido con el fin de aislar compuestos con potencial uso en la agricultura.

Por último se llevó a cabo la determinación del perfil químico por CG-MS de los extractos orgánicos del hongo LAcE5 considerando que mostró la mayor actividad fitotóxica y antifúngica.

7. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos derivados del hongo LAcE5 utilizando CG-EM

La identificación preliminar de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo LAcE5 cultivado en CPD en condiciones estáticas, y que presentó la mayor actividad biológica sobre el crecimiento de las plantas y microorganismos de prueba, se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Cabe mencionar que únicamente fue posible analizar la composición química de los metabolitos presentes en el extracto orgánico del micelio debido a que no se observó ningún pico en el cromatograma generado en el análisis GC-MS para el extracto del medio de cultivo. En la Figura 29 se muestra el perfil cromatográfico obtenido para el extracto derivado del micelio del hongo LAcE5. La identificación de los compuestos presentes en el extracto orgánico se realizó por la comparación de sus espectros de masas con los de la base de datos del NIST. En la Figura 30 se muestra a manera de ejemplo los espectros de masas comparativos entre el nonanal presente en el extracto analizado y el de la base de datos del NIST.

En el Cuadro 15, se resumen los metabolitos secundarios identificados, observándose que el endófito produce una diversidad de compuestos entre los que destacan ácidos carboxílicos, aldehídos, alcanos, derivados de esterol y del tricoteceno. Los compuestos más abundantes son: un derivado de esterol (29.45%), un derivado de tricoteceno (24.94%), el ácido octadecanoico (14.63%), el nonanal (8.98%), el decanal (4.23%), el 2-undecenal (2.98%), el ácido hexanoico (2.25%), el 1-pirrolidin-carboxialdeído (2.23%), el 7-fenil-6-hepten-2-ona (1.41%), el ácido nonanoico (1.24%) y el ácido *N*-acetil-(dl)-aspártico (1.24%).

El potencial fitotóxico y antifúngico evidenciado por el extracto del micelio de LAcE5 sobre el crecimiento de plantas y de los microorganismos fitopatógenos de prueba, así como el potencial antagónico observado por el endófito en los bioensayos de antagonismo directo, podría estar asociado a la presencia de los metabolitos secundarios identificados por GC-MS.

Cabe mencionar que este tipo de compuestos han sido aislados a partir de diferentes fuentes naturales, así por ejemplo, el hongo *Trichoderma hartzium* aislado de *Theobroma cacao* produce ácido nonanoico, el cual inhibe el crecimiento de los patógenos *Crinipellis perniciosus* y *Moniliophthora roreri* (Herre *et al.*, 2007).

Por otra parte, es ampliamente conocido que los tricotecenos son producidos por una gran variedad de especies del género *Fusarium*, así por ejemplo el 3,7,15-triacetildeoxinivalenol presenta una gran actividad fitotóxica para cultivos de *Lemna pausicostata* y baja citotoxicidad en mamíferos, por lo cual puede considerarse como un compuesto con potencial uso como bioherbicida (Abbas *et al.*, 2013).

Por último, estudios recientes demostraron que el aceite esencial de *Citrus reticulata* blanco, un árbol productor de frutos cítricos similares a los del naranjo, están constituidos en su mayoría por una serie de hidrocarburos, entre los cuales se pueden citar, el citronelol, el octanal, el citral, el decanal, el nonanal, el β -pineno, el linalool, el limoneno y el γ -terpineno, entre otros. El aceite esencial de esta especie altera la morfología de las hifas de *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum*, dos de los agentes infecciosos de los frutos cítricos de *C. reticulata*, causando la pérdida de citoplasma y la consecuente distorsión de su micelio. También alteran la conductividad celular, la liberación de los constituyentes celulares y el contenido total lipídico de las células fúngicas, interrumpiendo así la integridad de la membrana celular y la fuga de los componentes celulares, causando muerte celular (Tao *et al.*, 2014).

Cuadro 15. Metabolitos secundarios identificados en el extracto del micelio del cultivo en CPD en condición estática del hongo LAcE5.

Nombre de compuesto	Área %	R.T. (s)	Índice de retención KOVATS	PM	Fórmula
Octano	0.31	175.2	870.9	114	C ₈ H ₁₈
Ácido hexanoico	2.25	391.8	1179.7	116	C ₆ H ₁₂ O ₂
Nonanal	8.98	417.8	1234.7	142	C ₉ H ₁₈ O
Decanal	4.43	468.2	1351.2	156	C ₁₀ H ₂₀ O
Ácido nonanoico	1.24	510.9	1457.9	158	C ₉ H ₁₈ O ₂
Ácido n-acetil-dl-aspártico	1.24	511.2	1458.7	175	C ₆ H ₉ NO ₅
2-undecenal	2.98	532.8	1516.5	168	C ₁₁ H ₂₀ O
1-pirrolidin-carboxialdehído	2.23	775.1	2326.3	99	C ₅ H ₉ NO
Ácido octadecanoico	14.63	780.3	2346.8	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Ácido 2-(4-hidroxi-4metil-tetrahidro-piran-3-ilamino)-3-(1H-indol-2-il)-propionico	1.12	852.4	2629.9	318	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₄
Desconocido (análogo de un estero)	3.74	893.2	2790.4	333	C ₂₁ H ₃₅ NO ₂
7-fenil-6-hepten-2-ona	1.41	898.3	2810.4	188	C ₁₃ H ₁₆ O
Desconocido (análogo de un tricoteceno)	24.94	899.3	2814.1	354	C ₁₇ H ₂₂ O ₈
Desconocido (análogo de un estero)	29.45	899.8	2816.3	304	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
Desconocido	1.04	948.0	3005.7	314	C ₁₆ H ₂₆ O ₆

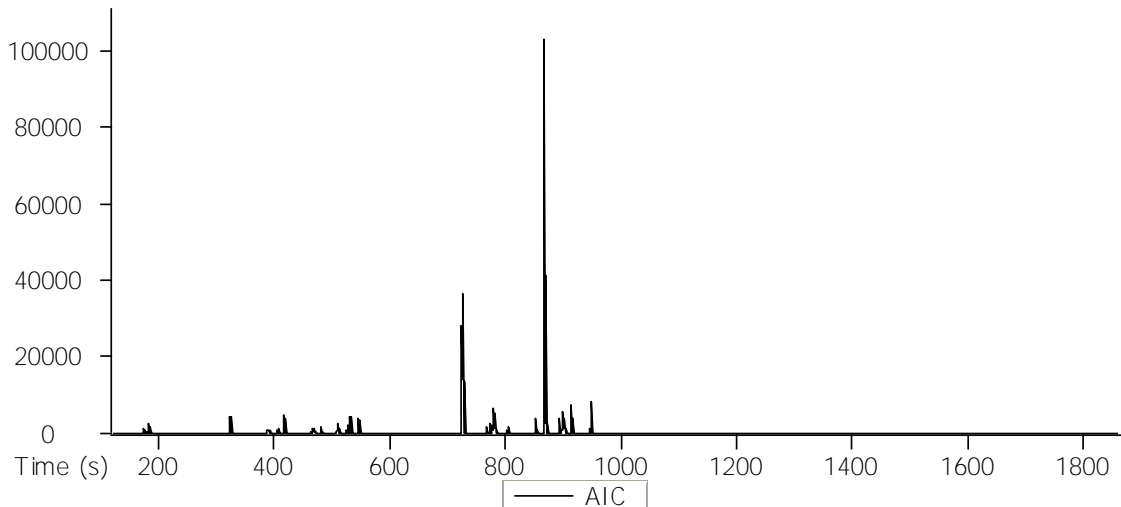


Figura 29. Cromatografía de Gases del extracto del micelio del cultivo del hongo LAcE5.

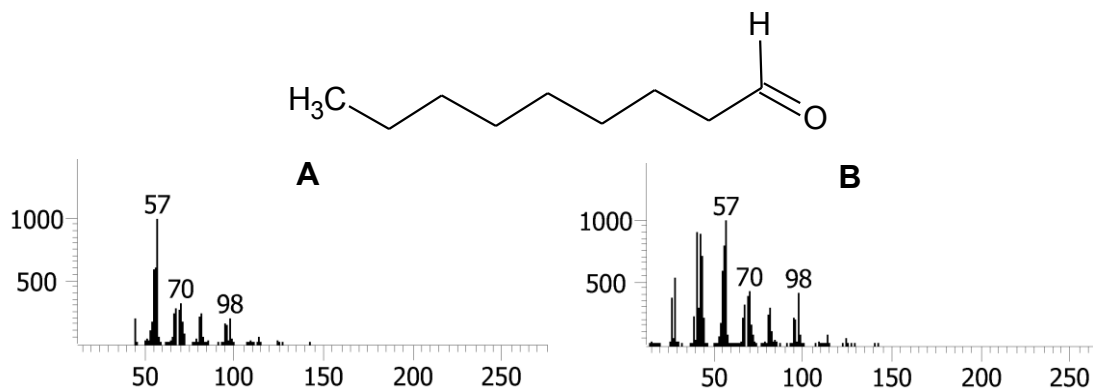


Figura 30. Estructura y espectros de masas comparativos entre el Nonanal presente en el extracto del micelio de LAcE5 (**A**) y el registrado la biblioteca de espectros NIST (**B**).

VII. Conclusiones

Se obtuvieron 789 aislamientos de hongos endófitos y 134 de hongos fitopatógenos de la planta *Lysiloma acapulcense*, confirmando que las plantas que viven en una zona de alta biodiversidad como es la REBIOSH están colonizadas por una amplia gama de microorganismos.

El aislamiento y purificación de hongos endófitos y fitopatógenos a partir de hojas de *L. acapulcense* permitió obtener 7 y 8 cepas puras, respectivamente.

El análisis detallado de las características macroscópicas y microscópicas permitió determinar la pureza, la tasa de crecimiento y en algunos casos, el género de los aislamientos puros de las hojas de *L. acapulcense*. Como es el caso del hongo endófito LAcE5 que corresponde al género y especie *Fusarium oxysporum* var. *redolens*.

Los bioensayos de antagonismo múltiple permitieron poner en evidencia, con excepción del hongo LAcE3, el potencial antagónico de los endófitos puros. En general los hongos endófitos inhibieron significativamente a los hongos fitopatógenos. Destacando al endófito LAcE5 que al día 10 de interacción antagónica, produce un pigmento rojizo que se difunde en el medio de cultivo, probablemente como una medida de protección contra sus competidores fitopatógenos y al endófito LAcE4 con un alto potencial antagónico, inhibiendo a distancia el crecimiento de sus competidores.

Los bioensayos de antagonismo múltiple, representan las posibles interacciones que establecen los hongos endófitos y fitopatógenos en su hospedera, y cómo son capaces de subsistir compitiendo por espacio y nutrientes, limitando a su vez, el crecimiento de sus competidores, ya sea por medio de mecanismos físicos (barreras miceliales, cordones hifales etc.) o químicos (producción de compuestos que difunden en el medio de cultivo o volátiles), y al mismo tiempo permiten inferir el posible papel de defensa de los endófitos hacia su hospedera por el ataque de microorganismos patógenos.

El cultivo en pequeña escala de los hongos endófitos puros de *L. acapulcense* en medio CPD incubados en condiciones estáticas, permitió el crecimiento favorable de todos los microorganismos. Con excepción de los hongos LAcE1, LAcE2 y LAcE3, el cultivo de los endófitos de *L. acapulcense* en CPD bajo condiciones de agitación no fue apropiado, por lo que no se obtuvieron los extractos orgánicos. El cultivo de los hongos endófitos en medio arroz, con excepción de los hongos LAcE3 y LAcE4, permitió el desarrollo de micelio abundante y de elevado rendimiento de sus extractos orgánicos. En todos los casos los extractos orgánicos derivados del medio arroz presentan los mejores rendimientos, en general del orden de 1 g por 200 g arroz.

De los 27 extractos obtenidos y evaluados, 14 presentaron una actividad antifúngica significativa contra *A. alternata*, comparable a la del control positivo, el fungicida comercial Carbendazim. El extracto del medio de cultivo en condiciones estáticas del endófito LAcE5 presenta el mayor potencial antifúngico sobre *A. alternata*, inhibiendo su crecimiento en un 54.5%.

El extracto derivado del cultivo del hongo LAcE5 en CPD bajo condiciones de incubación estáticas, muestra el mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento del hongo *F. oxysporum* (27.5%). En ninguno de los casos los extractos orgánicos evaluados muestran un porcentaje de inhibición comparable con el control positivo, el fungicida comercial Carbendazim a la concentración de prueba que fue de 250 ppm.

Los extractos del medio de cultivo en condiciones estáticas en CPD de los endófitos LAcE5 y LAcE6 inhiben significativamente el crecimiento del oomiceto *Phytophthora parasitica* en un 100% y 83.4%, respectivamente. Este efecto es comparable al del control positivo, Metalaxil.

El extracto orgánico derivado del medio de cultivo del endófito LAcE5 cultivado en CPD inhibe en un 100% el crecimiento radial del oomiceto *Pythium apahanidermatum*. El efecto inhibitorio es comparable con el del control positivo, Metalaxil.

El endófito LAcE5 muestra el mayor potencial antifúngico, inhibiendo de manera significativa el crecimiento de los 4 microorganismos de prueba, mostrando los mejores porcentajes de inhibición.

Con excepción del hongo fitopatógeno LAcF6, el extracto orgánico derivado del medio de cultivo en CPD del hongo LAcE5 en condiciones estáticas, también inhibe significativamente y con los mejores porcentajes de inhibición, el crecimiento de los hongos fitopatógenos aislados de *L. acapulcense*. Es posible que la maquinaria biosintética de éste microorganismo forme parte de los mecanismos de defensa de su hospedera.

De los 27 extractos fúngicos, únicamente los extractos orgánicos obtenidos del cultivo en medio arroz de los hongos LAcE4 y LAcE5, y del extracto derivado del medio de cultivo en condición estática del hongo LAcE5, inhiben significativamente la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* en un 100%. El extracto del cultivo en CPD del endófito LAcE5, es el único que inhibe significativamente la germinación de las semillas de *S. lycopersicum* en un 100%.

En general, los extractos fúngicos inhiben significativamente el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y de *S. lycopersicum* en un 40% y 30%, respectivamente, presentando mayores porcentajes de inhibición que el herbicida comercial, Glifosato. El extracto del endófito LAcE5 cultivado en CPD en condiciones estáticas, inhibe en un 100% el crecimiento de la raíz de las dos semillas de prueba.

La identificación preliminar de los metabolitos secundarios presentes en el extracto activo del micelio del hongo endófito LAcE5 cultivado en condiciones estáticas en CPD mediante CG-MS, permitió establecer que el endófito produce una diversidad de compuestos entre los que destacan ácidos carboxílicos, aldehídos, alcanos, derivados de esterol y del tricoteceno. Algunos de los compuestos identificados en los extractos orgánicos de LAcE5 corresponden a metabolitos bioactivos aislados previamente a partir de diferentes fuentes naturales. Los compuestos producidos

por LAcE5 podrían actuar conjuntamente para producir los efectos antifúngico, fitotóxico y antagónico observados.

El hongo endófito LAcE5 cultivado en CPD en condiciones estáticas constituye un candidato idóneo para realizar un estudio químico biodirigido con el fin de aislar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica demostrada por el extracto orgánico del medio de cultivo.

El presente proyecto contribuye al conocimiento de los posibles beneficios que los hongos endófitos ofrecen a su planta hospedera. Se evidenció la existencia de una gran variedad de interacciones entre hongo endófito-hongo endófito, hongo endófito-hongo fitopatógeno y entre planta-hongo endófito, y que son mediados por mecanismos de defensa físicos o químicos, indirectos o directos los cuales juegan un importante papel ecológico en la protección de su hospedera. Además, la actividad biológica mostrada por los extractos orgánicos permite evidenciar la presencia de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y fitotóxica, producidos por este particular grupo de microorganismos, generando un amplio interés en el desarrollo o búsqueda de compuestos novedosos que presenten actividad biológica con aplicación en el campo de la agricultura moderna.

VIII. Perspectivas

- Clasificar taxonómicamente las especies de hongos endófitos (7) y fitopatógenos (8) aislados de *L. acapulcense*.
- Cultivar en mediana escala a los hongos con mayor potencial biológico, empleando las condiciones óptimas de crecimiento establecidas, así como obtener los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio.
- Realizar el estudio químico biodirigido de los extractos fúngicos con mayor actividad biológica derivados de los cultivos en mediana escala.
- Aislar y purificar a los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica demostrada por los extractos orgánicos y determinar cuantitativamente el efecto fitotóxico y antifúngico.
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados, mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas y de difracción de rayos X.
- Determinar los efectos citotóxicos de los extractos y compuestos puros, sobre diferentes líneas celulares y macrófagos, con el fin de establecer posibles efectos tóxicos sobre el hombre y los animales.
- Profundizar en el estudio de las complejas relaciones (físicas y químicas) que se establecen entre endófito-endófito, endófito-fitopatógeno y endófito-planta hospedera.

IX. Bibliografía

- Abbas, H. K., Yoshizawa, T., & Shier, W. T. (2013). **Toxicon Cytotoxicity and phytotoxicity of trichothecene mycotoxins produced by *Fusarium* spp.** *Toxicon*, 74, 68–75.
- Adelaide, T. U. of. (2014). **Mycology**. Consultado Abril 15, 2014 from [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Acremonium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Acremonium/)
- Agrios, G. N. (2010). **Introducción a la fitopatología**. LIMUSA, 2a ed., p. 819.
- Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Müller, W. E. G., Kozytska, S., Hentschel, U., Proksch, P., (2008). **Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides***. *Phytochemistry*, 69(8), 1716–1725.
- Armendáriz-Guillén, B. (2013). **Hongos Endófitos Productores de Metabolitos Secundarios con Potencial Fitotóxico y Antifúngico**. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química UNAM.
- Arnold, E. A. (2007). **Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers**. *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3), 51–66.
- Bacon, C. W., Hinton, D. M., Porter, J. K., Glenn, A. E., & Kuldau, G. (2004). **Fusaric acid , a *Fusarium verticillioides* metabolite , antagonistic to the endophytic biocontrol bacterium *Bacillus mojavensis***. *Canadian Journal of Botany*, 82, 878–885.

- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (2006). **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. *The American Phytopathological Society*, St Paul, Minnesota, 218.
- Basilio, A., Justice, M., Harris, G., Bills, G., Collado, J., De la Cruz, M., Diez, M. T., (2006). **The discovery of moriniafungin, a novel sordarin derivative produced by *Morinia pestalozzioides***. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(2), 560–566.
- Beakes, G. W., Glockling, S. L., & Sekimoto, S. (2012). **The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”**. *Protoplasma*, 249, 3–19.
- Bianchi, F. J. J. A., Booij, C. J. H., & Tschamntke, T. (2006). **Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control**. *The Royal Society*, 273(1595), 1715–1727.
- Boddy, L. (2000). **Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes**. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 185–194.
- Brown, J. K. M., & Hovmøller, M. S. (2002). **Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease**. *Science*, 297(5581), 537–541.
- Bultman, T. L., & Leuchtmann, A. (2008). **Biology of the *Epichloe botanophila* Interaction: an Intriguing Association between Fungi and Insects**. *Fungal Biology Reviews*, 22(3-4), 131–138.
- CONAGUA. (2009). **Semblanza Histórica del Agua en México**. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*, 82.

- Davidson, B. S. (1995). **New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms.** *Current Opinion in Biotechnology*, 6(3), 284–291.
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). **Natural products in crop protection.** *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4022–4034.
- Debbab, A., Aly, A. H., Edrada-ebel, R. A., & Proksch, P. (2009). **Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium* sp . isolated from *Salvia officinalis* growing in Morocco.** *Biotechnology Agronomy, Society and Enviroment*, 13(2), 229–234.
- Duke, S. O., Cantrell, C. L., Meepagala, K. M., Wedge, D. E., Tabanca, N., & Schrader, K. K. (2010). **Natural toxins for use in pest management.** *Toxins*, 2(8), 1943–1962. doi:10.3390/toxins2081943
- DuPont. (2014). **DuPontAgro.** *Ficha tecnica.* Consultada Abril 27, 2014, from:http://agrosoluciones.dupont.com/esp/ficha_tecnica.php?producto=44&tipo_problema=3&problema=34
- Faeth, S. H. (2002). **Are endophytic fungi defensive plant mutualists ?** *OIKOS* 98, 1, 25–36.
- FAO. (2001). **El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2001.** p. 295.
- FAO. (2002). **World agriculture : towards World agriculture : towards 2015 / 2030.** p. 106.
- FAO. (2009). **La FAO en México Más de 60 años de cooperación 1945-2009.** p.370.

- Fernández-Saldaña, C.-M., Munévar, D. I., Ortiz Sánchez, A., Moreno, E. E., & Aragón Cadenas, A. N. (2007). **Una visita a la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (Morelos , México)**. *Revista estudios sociales , Universidad de Guadalajara, México*. pp. 189–219.
- Ferreira-Koolen, H. H., Ribeiro-Soares, E., Moura-Araújo da Silva, F., Alves-de-Almeida, R., & Duarte-Leao-de-Souza, A. (2012). **An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. an endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L. f.** *Química Nova*, 35(4), 771–774.
- Forbes, B. (2009). **Diagnóstico Microbiológico**. *Médica Panamericana*. p. 1026
- *FQPA*. (1996). **Food Quality Protection Act**. Consultada Abril 13, 2014, from <http://www.epa.gov/opp00001/regulating/laws/fqpa/>.
- French, E. R., & Hebert, T. T. (1980). **Métodos de Investigación Fitopatológica**. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura*, San José, Costa Rica. p. 289.
- Ganesan, A. (2008). **The impact of natural products upon modern drug discovery**. *Current opinion in chemical biology*, 12(3), 306–17.
- Gao, F., Dai, C., & Liu, X. (2010). **Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens**. *African Journal of Microbiology Research*, 4(13), 1346–1351.
- Gao, F., Yong, Y., & Dai, C. (2011). **Effects of endophytic fungal elicitor on two kinds of terpenoids production and physiological indexes in**

***Euphorbia pekinensis* suspension cells.** *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18), 4418–4425.

- Gond, S. K., Verma, V. C., Mishra, A., Kumar, A., & Kharwar, R. N. (2010). **Role of Fungal Endophytes in Plant Protection.** *Management of Fungal Plant Pathogens*, (Eds A. Ary y A. E. Perello).
- González, M. C., Anaya, A. L., Glenn, A. E., Cava, M. L. M. I., Bautista, B. E. H., & Hanlin, R. I. (2009). ***Muscodor yucatanensis*, a new endophytic ascomycete from Mexican chakah, *Bursera simaruba*.** *Mycotaxon*, 110(1), 363–372.
- González, M. C., Anaya, A. L., Glenn, A. E., Saucedo-García, A., Macías-Rubalcava, M. L., & Hanlin, R. T. (2007). **A new endophytic ascomycete from El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, México.** *Mycotaxon*, 101, 251–260.
- González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M. S., Malouin, F., & Bouarab, K. (2009). **Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens.** *International journal of molecular sciences*, 10(8), 3400–19.
- Govers, F., & Gijzen, M. (2006). ***Phytophthora* genomics: the plant destroyers genome decoded.** *The American Phytopathological Society*, 19(12), 1295–1301.
- Grosch, R., Scherwinski, K., Lottmann, J., & Berg, G. (2006). **Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community.** *Mycological research*, 110(12), 1464–1474.

- Guiraldo-Abreu, A., & Cuellar, A. (2008). **Strategies for the Selection of Medicinal Plants to be Studied.** *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13.
- Gunatilaka, A. A. L. (2006). **Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence.** *Journal of natural products*, 69(3), 509–26.
- Guzmán, G. (1998). **Las especies de *Psilocybe* (Fungi, Basidiomycotina, Agaricales) conocidas de Jalisco (México) y descripción de dos nuevas para la ciencia.** *Acta Botánica Mexicana*, 43, 23–32.
- Hernandez, A., Alfaro, I., & Arrieta, R. (2003). **Microbiología Industrial.** AUNED, San José, Costa Rica, p.247.
- Herre, E. A., Mejía, L., Kyllö, D., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A., & Van Bael, S. (2007). **Ecological Implications of Anti-pathogen Effects of Tropical Fungal Endophytes and Mycorrhizae.** *Ecology society of America*, 88(3), 550–558.
- Herre, E. A., Van Bael, S. A., Maynard, Z., & Robbins, N. (2005). **Tropical plants as chimera : some implications of foliar endophytic fungi for the study of host-plant defence , physiology and genetics.** *Biotic Interactions in the Tropics.*, 1, 226–238.
- Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z., Xing, J., Corke, H., & Sun, M. (2007). **A Potential Antioxidant Resource: Endophytic Fungi from Medicinal Plants.** *Economic Botany*, 61(1), 14–30.

- Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z., & Su, W. (2001). **Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*.** *FEMS immunology and medical microbiology*, 31(2), 163–167.
- Hughes, C. C., Kennedy-Smith, J. J., & Trauner, D. (2003). **Synthetic studies toward the Guanacastepenes.** *Organic letters*, 5(22), 4113–4115.
- Isaka, M., Berkaew, P., Intereya, K., & Komwijit, S. (2007). **Antiplasmodial and antiviral cyclohexadepsipeptides from the endophytic fungus *Pullularia* sp. BCC 8613.** *Tetrahedron Letters*, 63, 6855–6860.
- Khan, A. L., Hamayun, M., Hussain, J., Kang, S.-M., & Lee, I.-J. (2012). **The newly isolated endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. LK1 produces ascotoxin.** *Molecules*, 17(1), 1103–12.
- Kharwar, R. N., Mishra, A., Gond, S. K., Stierle, A., & Stierle, D. (2011). **Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges.** *Natural Product Reports*, 28(7), 1208–1228.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). **Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites.** *Chemistry & biology*, 19(7), 792–798.
- Latijnhouwers, M., Wit, P. J. G. M. De, & Govers, F. (2003). **Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants.** *Trends in microbiology*, 11(10), 462–469.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). **The *Fusarium* Laboratory Manual.** Publishing. USA. p. 388.

- Lezcano, J. C., Martínez, B., & Alonso, O. (2009). **Caracterización cultural y morfológica e identificación de 12 aislamientos fungosos de semillas de *Leucaena leucocephala* cv . Perú.** *Pastos y Forrajes*, 32(3), 1–14.
- Li, J. Y., & Strobel, G. A. (2001). **Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*.** *Phytochemistry*, 57, 261–265.
- Li, Y.-C., & Tao, W.-Y. (2009). **Paclitaxel-producing fungal endophyte stimulates the accumulation of taxoids in suspension cultures of *Taxus cuspidate*.** *Scientia Horticulturae*, 121(1), 97–102.
- Lira-Saldívar, R. H. (2007). **Bioplaguicidas y control biológico.** *CIQA*, 1, 231.
- Liu, J. Y., Song, Y. C., Zhang, Z., Wang, L., Guo, Z. J., Zou, W. X., & Tan, R. X. (2004). ***Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites.** *Journal of biotechnology*, 114(3), 279–287.
- Ma, Y. M., Li, Y., Liu, J. Y., Song, Y. C., & Tan, R. X. (2004). **Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*.** *Fitoterapia*, 75(5), 451–456.
- Macías-Rubalcava, M. L., Hernández-Bautista, B. E., Jiménez-Estrada, M., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., Hernández-Ortega, S., Saucedo-García, A., Muria-Gonzalez, J. M., Anaya, A. L. (2008). **Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*.** *Phytochemistry*, 69(5), 1185–96.

- Macías-Rubalcava, M. L., Hernández-Bautista, B. E., Oropeza, F., Duarte, G., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., Anaya, A. L. (2010). **Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*.** *Journal of chemical ecology*, 36(10), 1122–31.
- Macías-Rubalcava, M. L., Ruiz-Velasco Sobrino, M. E., Meléndez-González, C., & Hernández-Ortega, S. (2014). **Naphthoquinone Spiroketals and Organic Extracts from the Endophytic Fungus *Edenia gomezpompae* as Potential Herbicides.** *Journal of agricultural and food chemistry*, 1.
- O'Brien, P. a, Williams, N., & Hardy, G. E. S. (2009). **Detecting *Phytophthora*.** *Critical reviews in microbiology*, 35(3), 169–181.
- Pachlatko, J. P. (1998). **Natural Products in Crop Protection.** *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 52(112), 29–47.
- Park, M. S., Han, J. Y., Choi, G. J., Choi, J. H., Jang, K., & Kin, J. C. (2010). **Potential of the volatile-producing fungus *Nodulisporium* sp. CF016 for the control of postharvest diseases of apple.** *The Plant Pathology Journal*, 26(3), 253–259.
- Patrick, Y. (1997). **Major Microbial Diversity Initiative Recommended.** *ASM News*, 417–421.
- Phillips, A. J., Anderson, V. L., Robertson, E. J., Secombes, C. J., & West, P. Van. (2007). **New insights into animal pathogenic oomycetes.** *Trends in Microbiology*, 19(1), 13–19.

- Promputtha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D., & Jeewon, R. (2007). **A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence.** *Microbial ecology*, 53(4), 579–90.
- Qin, J.-C., Zhang, Y.-M., Gao, J.-M., Bai, M.-S., Yang, S.-X., Laatsch, H., & Zhang, A.-L. (2009). **Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*.** *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(6), 1572–1574.
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, a E., & Redman, R. S. (2009). **Fungal endophytes: diversity and functional roles.** *The New phytologist*, 182(2), 314–330.
- Rosa, L. H., Vieira, M. L. A., Cota, B. B., Johann, S., Alves, T. M. A., Zani, C. L., & Rosa, C. A. (2011). **Endophytic Fungi of Tropical Forests : A Promising Source of Bioactive Prototype Molecules for the Treatment of Neglected Diseases.,** *Drug development: A case study based insight into modern strategies. INTECH.*
- Schmit, J. P., & Mueller, G. M. (2006). **An estimate of the lower limit of global fungal diversity.** *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 99–111.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). **The endophytic continuum.** *Mycological Research*, 109(6), 661–686.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Ro, A., & Krohn, K. (2002). **Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites.** *Mycological Research*, 106, 996–1004.

- SEMARNAT. (2005). **Conservación y manejo de la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla.** Consultado Abril 15, 2014. From http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=551
- Shen, L., Ye, Y.-H., Wang, X.-T., Zhu, H.-L., Xu, C., Song, Y.-C., Li, H., et al. (2006). **Structure and total synthesis of aspernigerin: a novel cytotoxic endophyte metabolite.** *European Journal of Chemistry*, 12(16), 4393–4396.
- Son, S. W., Kim, H. Y., Choi, G. J., Lim, H. K., Jang, K. S., Lee, S. O., Lee, S., Sung, N. D. Kim, J. C. (2008). **Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*.** *Journal of applied microbiology*, 104(3), 692–698.
- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). **Plant disease: a threat to global food security.** *Annual review of phytopathology*, 43, 83–116.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). **Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products.** *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 491–502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). **Natural products from endophytic microorganisms.** *Journal of natural products*, 67(2), 257–68.
- Sumarah, M. W., Puniani, E., Sørensen, D., Blackwell, B. A., & Miller, J. D. (2010). **Phytochemistry Secondary metabolites from anti-insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens*.** *Phytochemistry*, 71(7), 760–765.

- Sánchez-Fernández, R. E. (2010). **Potencial Alelopático de Extractos del Micelio y Medio de Cultivo de un Hongo Endófito Aislado de *Lonchocarpus castilloi* (Fabaceae)**. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, C.-M., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). **Hongos endófitos : fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina**. *TIP Revista especializada en ciencia quimico-biológicas*, 16(2), 132–146.
- Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). **Endophytes: a rich source of functional metabolites**. *Natural product reports*, 18(4), 448–59.
- Tao, N., Jia, L., & Zhou, H. (2014). **Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum***. *Food Chemistry*, 153, 265–271.
- Tyler, B. M. (2007). ***Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete**. *Molecular plant pathology*, 8(1), 1–8.
- Ulloa, M., & Hanlin, R. (1978). **Atlas de Micología Básica**. Concepto S.A. ed. México.
- Varughese, T., Riosa, N., Higginbotham, S., Arnold, A. E., Coley, P. D., Kursar, T. A., Gerwick, W., Cubilla-Rios, L. (2013). **Antifungal Depsidone Metabolites from *Cordyceps dipterigena*, an Endophytic Fungus Antagonistic to the Phytopathogen *Gibberella fujikuroi***. *Tetrahedron Left*, 53(13), 1624–1626.

- Wicklow, D. T., Roth, S., Deyrup, S. T., & Gloer, J. B. (2005). **A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*.** *Mycological Research*, 109(5), 610–618.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P., Lupin, Q. (2010). **Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes.** *Microbiological research*, 165(6), 437–449.
- Zar, J. H. (2010). ***Biostatistical Analysis*.** Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 5, p. 944.
- Zhu, J., Nagasawa, H., Nagura, F., Mohamad, S. B., Uto, Y., & Hori, H. (2000). **Elucidation of Strict Structural Requirements of Brefeldin A as an Inducer of Differentiation and Apoptosis.** *Bioorganic & medicinal chemistry*, 8, 455–463.