



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**HONGOS ENDÓFITOS DE *Gliricidia sepium* CON POTENCIAL
ANTAGÓNICO**

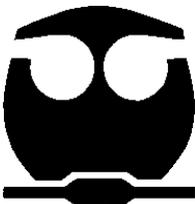
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MÓNICA FLORES RESÉNDIZ



MÉXICO, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
SECRETARIO: Dra. Irma Susana Rojas Tomé
1er. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2° SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

**Instituto de Química
Laboratorio 1-4. Productos Naturales
Instituto de Química. Ciudad universitaria
UNAM**

Asesora del Tema: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Supervisor Técnico: Q.F.B. Rosa Elvira Sánchez Fernández

Sustentante: Mónica Flores Reséndiz

| Índice | Página |
|---|---------------|
| Lista de Figuras..... | vi |
| Lista de Cuadros..... | xiii |
| Lista de Gráficas..... | xv |
| Lista de Abreviaturas..... | xvi |
| I. Introducción..... | 1 |
| II. Antecedentes..... | 3 |
| 1. Agricultura en México..... | 3 |
| 1.1 Problemática en la agricultura..... | 3 |
| 2. Agroquímicos..... | 4 |
| 3. Hongos endófitos..... | 5 |
| 4. Protección a su hospedera..... | 10 |
| 5. Interacciones interespecíficas entre hongos endófitos..... | 11 |
| 6. Agentes de control biológico..... | 12 |
| III. Hipótesis..... | 15 |
| IV. Objetivos..... | 16 |
| 1. Objetivos generales..... | 16 |
| 2. Objetivos particulares..... | 16 |
| V. Materiales y métodos..... | 18 |
| 1. Organismos de prueba..... | 18 |
| 1.1 Hongos endófitos..... | 18 |
| 1.2 Hongos fitopatógenos..... | 18 |
| 2. Composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógenos..... | 18 |
| 2.1 Papa-dextrosa-agar (PDA)..... | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de <i>Gliricidia sepium</i> | 19 |
| 4. Bioensayos de antagonismo directo..... | 20 |
| 4.1 Hongos endófitos vs hongos endófitos..... | 20 |
| 4.2 Hongos endófitos con potencial antagónico vs hongos endófitos con potencial antagónico..... | 23 |
| 4.3 Hongos endófitos con potencial antagónico vs microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola..... | 23 |
| VI. Resultados y discusión..... | 24 |
| 1. Determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de <i>G. sepium</i> | 24 |
| 1.1 Hongos endófitos aislados de <i>G. sepium</i> | 24 |
| 1.2 Hongos fitopatógenos aislados de <i>G. sepium</i> | 52 |
| 2. Bioensayos de antagonismo directo entre hongo endófitos..... | 56 |
| 2.1. Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo I..... | 58 |
| 2.2. Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo II..... | 61 |
| 2.3 Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo III..... | 63 |
| 2.4 Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo IV..... | 66 |
| 2.5 Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo V..... | 68 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6 Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo VI..... | 70 |
| 2.7 Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo VII..... | 73 |
| 2.8 Antagonismo directo entre hongos con potencial antagónico de <i>Gliricidia sepium</i> | 75 |
| 2.9 Antagonismo directo entre hongos endófitos de <i>G. sepium</i> con potencial antagónico vs microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola..... | 78 |
| VII. Conclusiones..... | 84 |
| VIII. Perspectivas..... | 86 |
| IX. Bibliografía..... | 87 |

| Lista de Figuras | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Citocalasina Z10 aislada del hongo endófito <i>Endothia gyrosa</i> . | 6 |
| Figura 2. Glandicolina B aislada del hongo endófito <i>Penicillium</i> sp. | 6 |
| Figura 3. Cloropupukeananina aislada del hongo endófito <i>Pestalotiopsis fici</i> . | 7 |
| Figura 4. Moriniafungina aislada del hongo endófito <i>Morinia logiappendiculata</i> . | 7 |
| Figura 5. Jesterona e hidroxijesterona aisladas del hongo endófito <i>Pestalotiopsis jesteri</i> . | 8 |
| Figura 6. Cordianhídrido B aislado del hongo endófito <i>Dwayaangam colodena</i> . | 8 |
| Figura 7. Compuestos aislados del endófito <i>Edenia gomezpompae</i> . | 9 |
| Figura 8. Bioensayo de antagonismo directo en caja de Petri entre hongos endófitos de <i>Gliricidia sepium</i> . | 22 |
| Figura 9. Endófito GsE1. A. Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). B. Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). C. Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. D. Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. | 26 |
| Figura 10. Endófito GsE2. A. Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). B. Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). C. Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. D. Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. | 27 |

- Figura 11.** Endófito GsE3. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **28**
- Figura 12.** Endófito GsE4. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** **29**
- Figura 13.** Endófito GsE5. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **30**
- Figura 14.** Endófito GsE6. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **31**
- Figura 15.** Endófito GsE7. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **32**
- Figura 16.** Endófito GsE8. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **33**

- Figura 17.** Endófito GsE9. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **34**
- Figura 18.** Endófito GsE10. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **35**
- Figura 19.** Endófito GsE11. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **36**
- Figura 20.** Endófito GsE12. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **37**
- Figura 21.** Endófito GsE13. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **38**
- Figura 22.** Endófito GsE14. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **39**

- Figura 23.** Endófito GsE15. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **40**
- Figura 24.** Endófito GsE16. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **41**
- Figura 25.** Endófito GsE17. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **42**
- Figura 26.** Endófito GsE18. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **43**
- Figura 27.** Endófito GsE19. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **44**
- Figura 28.** Endófito GsE20. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **45**

- Figura 29.** Endófito GsE21. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **46**
- Figura 30.** Endófito GsE22. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **47**
- Figura 31.** Endófito GsE23. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **48**
- Figura 32.** Endófito GsE24. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **49**
- Figura 33.** Endófito GsE25. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **50**
- Figura 34.** Endófito GsE26. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. **51**

| | |
|--|-----------|
| Figura 35. Fitopatógeno GsF1. A. Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). B. Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). C. Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. D. Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. | 52 |
| Figura 36. Fitopatógeno GsF2. A. Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). B. Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). C. Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. D. Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. | 53 |
| Figura 37. Antagonismo directo entre hongos endófitos del grupo I, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento. | 58 |
| Figura 38. Antagonismo directo entre los hongos endófitos del grupo II, 3 semanas después de haber hecho contacto. | 61 |
| Figura 39. Antagonismo directo entre hongos del grupo III, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento. | 64 |
| Figura 40. Antagonismo directo entre hongos del grupo IV, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento. | 66 |
| Figura 41. Antagonismo directo entre hongos del grupo V, 3 semanas después de haber hecho contacto. | 69 |
| Figura 42. Antagonismo directo entre hongos del grupo VI, 3 semanas después de haber hecho contacto sus micelios. | 71 |
| Figura 43. Antagonismo directo entre hongos del grupo VII, 3 semanas después de que sus micelios hicieron contacto. | 73 |

Figura 44. Antagonismo directo entre hongos con potencial antagónico, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento. **76**

Figura 45. Antagonismo directo entre hongos con el mayor potencial antagónico contra microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola, 3 semanas después de haber hecho contacto sus micelios. **80**

| Lista de Cuadros | Página |
|---|---------------|
| Cuadro 1. Tipo de interacciones entre microorganismos y valores numéricos asignados (modificado de Yuen <i>et al.</i> , 1999). | 22 |
| Cuadro 2. Clasificación de los hongos endófitos y fitopatógeos de <i>Gliricidia sepium</i> con base en su tasa de crecimiento. | 54 |
| Cuadro 3. Grupos asignados a los hongos endófitos puros de <i>G. sepium</i> con base en su tasa crecimiento y morfotipo. | 56 |
| Cuadro 4. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los endófitos GsE1-GsE6. | 59 |
| Cuadro 5. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los endófitos GsE16-GsE18. | 62 |
| Cuadro 6. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos GsE19, GsE20 y GsF1. | 65 |
| Cuadro 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos GsE21-GsE23. | 67 |
| Cuadro 8. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos GsE21-GsE23 y el hongo GsF2. | 69 |
| Cuadro 9. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos GsE7-GsE11. | 72 |
| Cuadro 10. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos GsE12-GsE15. | 74 |

Cuadro 11. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los endófitos con mayor potencial antagónico de *G. sepium*. **77**

Cuadro 12. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos de prueba en bioensayos de antagonismo directo en presencia de los endófitos de *G. sepium* con mayor potencial antagónico. **82**

| Lista de Gráficas | Página |
|--|---------------|
| Gráfica 1. Índice de antagonismo de los hongos GsE1-GsE6. | 60 |
| Gráfica 2. Índice de antagonismo de los hongos GsE16-GsE18. | 63 |
| Gráfica 3. Índice de antagonismo de los hongos GsE19, GsE20 y GsF1. | 65 |
| Gráfica 4. Índice de antagonismo de los hongos GsE21-GsE23. | 67 |
| Gráfica 5. Índice de antagonismo de los hongos GsE24-GsE26 y GsF2. | 70 |
| Gráfica 6. Índice de antagonismo de los hongos GsE7-GsE11. | 72 |
| Gráfica 7. Índice de antagonismo de los hongos GsE12-GsE15. | 74 |
| Gráfica 8. Índice de antagonismo de los hongos endófitos con mayor potencial antagónico. | 78 |
| Gráfica 9. Índice de antagonismo de los hongos endófitos con mayor potencial antagónico sobre microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola. | 83 |

Lista de abreviaturas

| | |
|--------------------------|--|
| <i>A. solani</i> | <i>Alternaria solani</i> |
| ANOVA | Análisis de Varianza |
| cm ² | centímetros cuadrados |
| <i>F.oxysporum</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> |
| g | gramos |
| <i>G. sepium</i> | <i>Gliricidia sepium</i> |
| h | horas |
| L | Litros |
| mg | miligramos |
| mL | mililitros |
| PDA | Papa-dextrosa-agar |
| <i>P. aphanidermatum</i> | <i>Pythium aphanidermatum</i> |
| <i>P. capsici</i> | <i>Phytophthora capsici</i> |
| <i>P. parasítica</i> | <i>Phytophthora parasitica</i> |
| REBIOSH | Reserva de la Biósfera de la Sierra de Huautla |
| vs | contra |

I. Introducción

Las enfermedades de las plantas son importantes para el hombre debido a que no sólo perjudican a las plantas, sino también a sus productos. Para los millones de personas que habitan la Tierra y cuya existencia depende de los productos vegetales, las enfermedades de las plantas pueden marcar la diferencia entre una vida normal y una acosada por el hambre, o incluso conducir a la muerte por inanición. Asimismo, provocan que los agricultores sufran pérdidas económicas y propician el aumento en el precio de los productos (Agrios, 2010).

En la actualidad, es necesario el uso intensivo de agroquímicos para reducir las pérdidas ocasionadas por malezas, insectos y microorganismos fitopatógenos, como los hongos, oomicetos, bacterias y virus. Sin embargo, algunos de estos compuestos, han ocasionado resistencia y graves daños toxicológicos y ambientales, haciendo evidente la necesidad de desarrollar nuevos agentes agroquímicos específicos y efectivos, para tratar las enfermedades y combatir las plagas de las plantas, y que en lo posible, sean menos tóxicos para el organismo blanco, los animales, para los seres humanos y con un menor impacto ambiental (Lira-Saldívar, 2007; Gond *et al.*, 2010).

Los productos naturales aislados a partir de plantas y microorganismos representan una alternativa valiosa para la obtención de compuestos biológicamente activos. En las últimas décadas, se ha incrementado el estudio de los productos naturales derivados de hongos debido a su elevado potencial para producir compuestos biológicamente activos y estructuralmente novedosos (Lira-Saldívar, 2007; Gond *et al.*, 2010).

Los hongos son un grupo extenso de microorganismos distribuidos ampliamente en la naturaleza, habitan en ambientes extremadamente competitivos y en consecuencia, algunos de ellos son capaces de producir metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas, y algunos otros, son por sí mismos muy eficientes como agentes de biocontrol (Mejía *et al.*, 2008; Strobel *et al.*, 2004). Particularmente, los hongos endófitos constituyen un campo prometedor para el

descubrimiento de productos naturales con actividad biológica sobre diversos organismos. Los hongos endófitos son microorganismos que viven dentro de los tejidos de las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad. Estos pueden brindarle protección a su hospedera contra herbívoros y/o microorganismos fitopatógenos mediante diferentes mecanismos (Gao *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2009).

El estudio químico y biológico de los hongos endófitos es relativamente reciente, lo cual los hace un campo de estudio muy prometedor. Los estudios llevados a cabo sobre el potencial antagonico de los microorganismos endófitos, pueden ser de gran interés para el conocimiento de la ecología de los hongos y para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica que muestren un potencial promisorio para el desarrollo de nuevos agroquímicos y fármacos (Debbab *et al.*, 2009; Duke *et al.*, 2010; Gond *et al.*, 2010; Li & Tao, 2009; Strobel *et al.*, 2004).

En este contexto, el presente proyecto de tesis se realizó con la finalidad de establecer el potencial antagonico de 26 hongos endófitos aislados de la planta *Gliricidia sepium*, colectada en la zona de alta biodiversidad denominada “Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla” (REBIOSH). Para ello, se llevaron a cabo bioensayos *in vitro* de antagonismo directo entre hongos endófitos y contra cinco microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola. De esta manera, se evidenciaron los candidatos útiles para llevar a cabo estudios químicos biodirigidos, enfocados en la obtención de metabolitos secundarios bioactivos. Con este estudio pretende contribuir también al conocimiento de los hongos endófitos de *G. sepium*, así como inferir su posible papel ecológico en la relación que establecen con su hospedera y su posible aplicación como agentes de biocontrol, o como productores de metabolitos secundarios con potencial antifúngico.

II. Antecedentes

1. Agricultura en México

México cuenta con un territorio nacional de 198 millones de hectáreas, de las cuales 145 millones se dedican a la actividad agropecuaria y cerca de 30 millones son tierras de cultivo. La agricultura en México es más que un sector productivo importante. Más allá de su participación en el Producto Interno Bruto (PIB) nacional, que es de apenas 4% (INEGI, 2009), las múltiples funciones de la agricultura en el desarrollo económico, social y ambiental, determinan que su incidencia en el desarrollo sea mucho mayor de lo que ese indicador implicaría. Prácticamente toda la producción de alimentos se origina en este sector, además de ser una actividad fundamental en el medio rural, en el cual habita todavía una parte altamente significativa de la población nacional. La erradicación de la pobreza representa, sin duda, una prioridad nacional y en esa lucha el desarrollo agrícola y rural tiene un papel preponderante (FAO, 2009).

1.1 Problemática en la agricultura

El crecimiento y el rendimiento de las plantas dependen de la disponibilidad del agua y de los nutrientes del suelo donde se desarrollan, así como de algunos factores ambientales, como la temperatura, la luz y la humedad. También dependen de la protección que tengan contra el ataque de plagas, malezas y microorganismos fitopatógenos. Todos los factores que afectan la salud de las plantas influyen en su crecimiento y producción, lo cual disminuye de manera notable su utilidad para la naturaleza y para la humanidad. Las causas más comunes del crecimiento deficiente de las plantas y de la destrucción de cosechas son los microorganismos fitopatógenos (virus, bacterias, hongos, oomicetos, entre otros), el clima desfavorable, las malezas y las plagas de insectos (Agrios, 2010).

Entre los microorganismos fitopatógenos con mayor importancia agrícola se encuentran los hongos y los oomicetos. Estos últimos han sido asociados con la pudrición de cultivos económicamente importantes como la papa y la zanahoria. Por ejemplo, varias especies de *Pythium* sp., incluyendo *P. irregulare*, *P.*

mastophorum, y *P. ultimum*, causan la podredumbre de las plántulas de zanahoria (Ciancio & Mukerji, 2007; Strobel & Daisy, 2003).

Frecuentemente, los hongos y los oomicetos son confundidos por los agricultores, pues ambos microorganismos presentan un crecimiento filamentosos, producción de micelio y su reproducción es tanto sexual como asexual. Sin embargo, algunas de sus diferencias residen en la constitución de su pared celular. En los hongos está constituida principalmente por quitina, en tanto que, la pared celular de los oomicetos contiene celulosa. Otra diferencia de gran relevancia radica en que los hongos poseen esporas no móviles, mientras que los oomicetos presentan zoosporas móviles. Esto también constituye un importante factor de virulencia por parte de los oomicetos, ya que la dispersión de las zoosporas móviles provoca un aumento sustancial en la incidencia de enfermedades en las plantas (Arnold *et al.*, 2003; Ciancio & Mukerji, 2007; Strobel & Daisy, 2003).

2. Agroquímicos

El empleo de agroquímicos sintéticos ha permitido grandes avances en la productividad de la agricultura pero, por otra parte, algunas de las sustancias que se introducen en el medio ambiente pueden resultar perjudiciales (Reyes *et al.*, 2005). Su uso indiscriminado y durante largos periodos ha generado resistencia entre los microorganismos fitopatógenos, por lo tanto, las concentraciones empleadas para el control de plagas ha incrementado. Esto genera problemas de salud para los trabajadores del campo y los consumidores. Asimismo, conlleva a una mayor bioacumulación en el suelo pues la mayoría de los productos químicos empleados no son biodegradables (Lira-Saldívar, 2007; Gond *et al.*, 2010). En consecuencia, existe una búsqueda constante de compuestos antifúngicos y herbicidas, y de agentes de biocontrol que sean más eficaces y menos dañinos con el planeta.

Los productos naturales constituyen una importante fuente para encontrar compuestos novedosos con actividad biológica útiles en diversas áreas como la medicina, la farmacia y la agricultura, siendo estos compuestos menos agresivos

con el medio ambiente (Debbab *et al.*, 2009; Pachlatko, 1998; Strobel *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2010).

Existe una gran diversidad de organismos productores de compuestos naturales, sin embargo, el interés por los microorganismos se ha incrementado en los últimos años, pues se estima que se conocen menos del 1% de las especies bacterianas y menos del 5% de las especies de hongos (entomopatógenos, fitopatógenos, epífitos y endófitos, entre otros), lo que sugiere que existen millones de especies por descubrir y, por lo tanto, una amplia variedad de compuestos novedosos por estudiar (Davidson, 1995; Gunatilaka, 2006; Strobel *et al.*, 2004).

3. Hongos endófitos

La palabra “endófito” etimológicamente significa “dentro de la planta” (*endon*: dentro, *phyton*: planta) (Kusari & Spiteller, 2011). Los microorganismos endófitos son aquellos que viven en los tejidos de las plantas sin que éstas manifiesten síntomas de enfermedad. Éstos se han encontrado en todas las plantas (pastos, algas, musgos y plantas vasculares) de todos los ecosistemas del Planeta Tierra. Los bosques templados y tropicales presentan una gran biodiversidad de plantas y éstas parecen albergar también una cantidad significativa de hongos endófitos (Arnold, 2007).

Las relaciones ecológicas entre hongos endófitos y sus respectivas plantas hospedadoras son complejas. Un hongo endófito puede sobrevivir en una planta como un simbiote proporcionando sustancias protectoras (por ejemplo, metabolitos secundarios antifúngicos y antibacterianos) que pueden inhibir o matar los patógenos invasores de tejido (Strobel *et al.*, 2004), mientras que la planta también proporciona protección y nutrientes a los hongos.

Análisis estadísticos recientes muestran que el 51% de los metabolitos biológicamente activos obtenidos de hongos endófitos son desconocidos, en comparación con sólo el 38% de sustancias nuevas obtenidas a partir de la microflora del suelo. Los endófitos han sido reconocidos como fuentes importantes de una variedad de metabolitos secundarios estructuralmente novedosos que

presentan actividad anticancerígena, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antioomiceto, insecticidas y herbicidas, entre otras (Saikkonen, 2007; Strobel *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2011). Un ejemplo es el hongo *Endothia gyrosa* IFB-E023 (Cryphonectriaceae), endófito de *Vatica mangachapo* (Dipterocarpaceae), el cual produce el alcaloide citocalasina Z10, un compuesto citotóxico (Figura 1) con actividad en líneas celulares de leucemia K562 (Xu *et al.*, 2009).

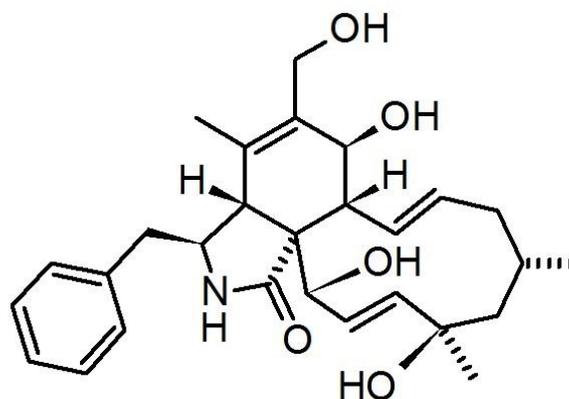


Figura 1. Citocalasina Z10 aislado del hongo endófito *Endothia gyrosa*.

También se ha encontrado que *Penicillium* sp. (Trichocomaceae), endófito de *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) produce un alcaloide α -carbólico, la glandicolina B (Figura 2), con actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli* (Ferreira Koolen *et al.*, 2012).

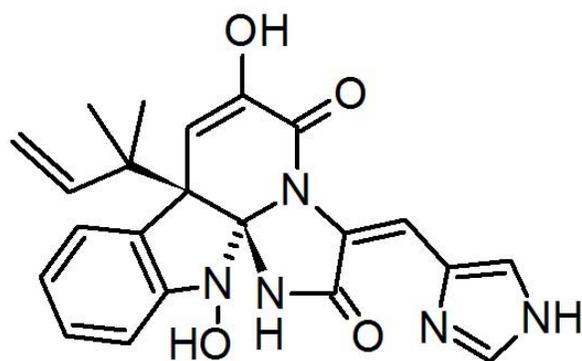


Figura 2. Glandicolina B aislado del hongo endófito *Penicillium* sp.

Entre los endófitos también se encuentran microorganismos productores de compuestos antivirales. Un ejemplo es *Pestalotiopsis fici* (Amphisphaeriaceae), endófito de un árbol no identificado colectado en Hangzhou, República Popular China, el cual produce cloropupukeananina, un compuesto con actividad antiviral (Figura 3) que inhibe la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (HIV-1) (Liu *et al.*, 2008).

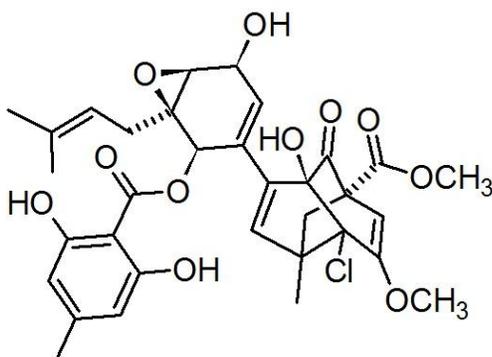


Figura 3. Cloropupukeananina aislado del hongo endófito *Pestalotiopsis fici*.

Un ejemplo de endófito productor de compuestos con propiedades antifúngicas es *Morinia logiappendiculata* (Amphisphaeriaceae), endófito de *Santolina rosmarinifolia* (Asteraceae), *Helichrysum stoechas* (Asteraceae), *Thymus mastichina* (Lamiaceae) y *Calluna vulgarisin* (Ericaceae), el cual produce moriniafungina, un diterpeno tipo sordiarina que inhibe el crecimiento de *Cryptococcus neoformans*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. lusitaniae* (Figura 4) (Basilio *et al.*, 2006).

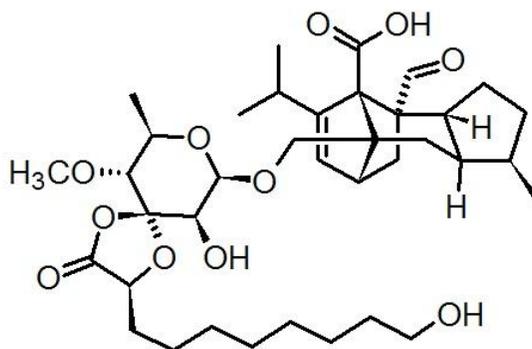


Figura 4. Moriniafungina aislado del hongo endófito *Morinia logiappendiculata*.

Como ejemplo de endófito productor de compuestos con actividad antioomiceto se encuentra *Pestalotiopsis jesteri* (Amphisphaeriaceae), endófito de *Fragariae bodenii* (Gentianaceae), el cual produce jesterona e hidroxijesterona, dos moléculas (Figura 5) con actividad contra los microorganismos *Pythium ultimum*, *Aphanomyces* sp., *Phytophthora citrophthora* y *Phytophthora cinnamomi* (Li & Strobel, 2001).

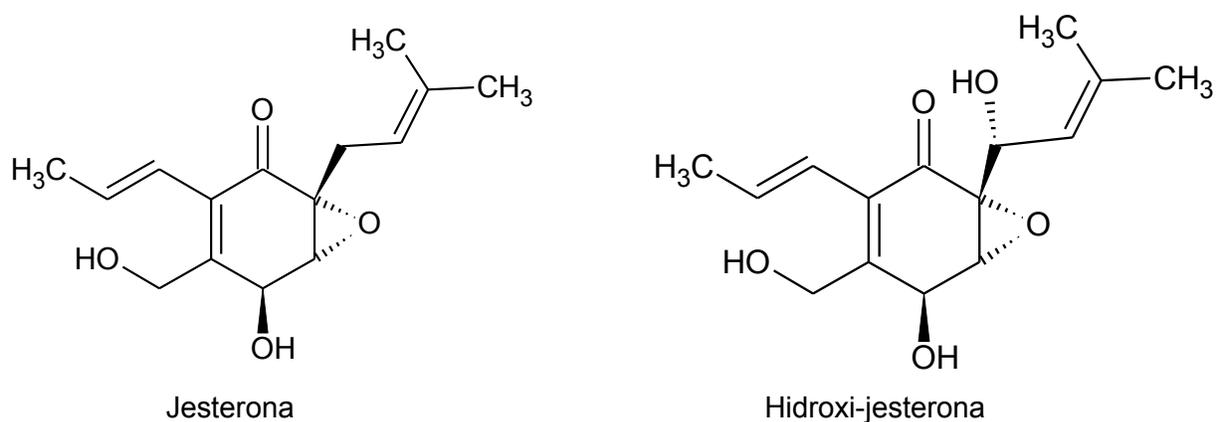


Figura 5. Jesterona e hidroxijesterona aislados del hongo endófito *Pestalotiopsis jesteri*.

El cordianhídrido B (Figura 6) es un metabolito secundario que posee actividad insecticida el cual es producido por *Dwayaangam colodena* (Orbiliaceae) un endófito de *Picea rubens* (Pinaceae) y muestra actividad contra el lepidóptero *Choristoneura fumiferana* (Sumarah et al., 2010).

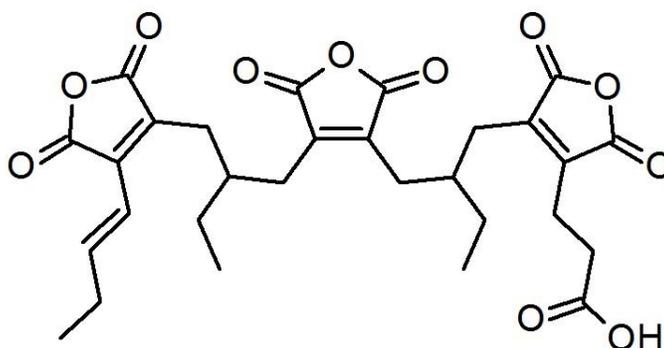


Figura 6. Cordianhídrido B aislado del hongo endófito *Dwayaangam colodena*.

Por último, *Edenia gomezpompae* (Pleosporaceae), endófito de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae) produce cuatro palmarumicinas y cuatro preusomerinas (Figura 7) con actividad antifúngica contra los hongos *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*, y potente actividad antioomiceto contra *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora capsici* (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008). Estos metabolitos secundarios también poseen actividad fitotóxica sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum* y *Echinochloa crus-galli*. Estos compuestos ejercen su efecto fitotóxico a nivel del fotosistema II de la fotosíntesis (Macías-Rubalcava *et al.*, 2014).

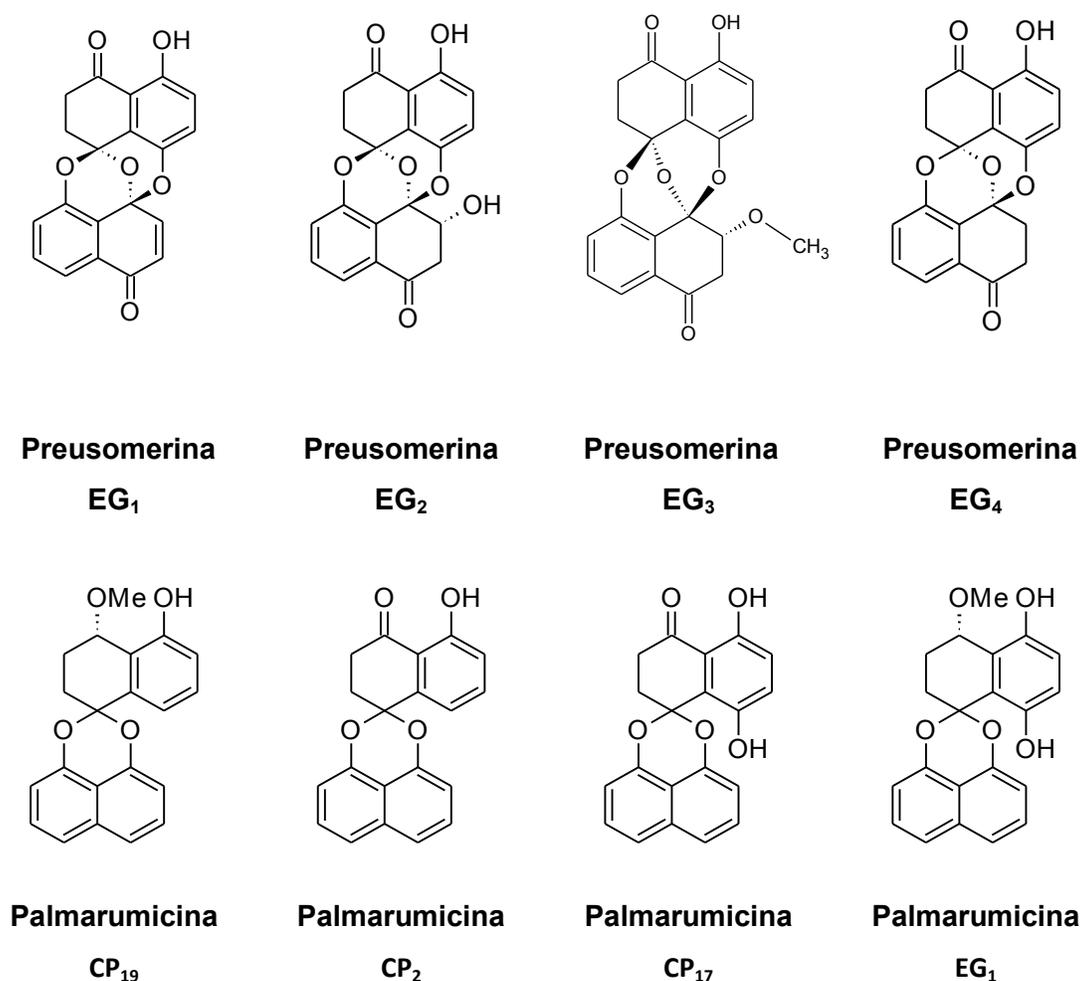


Figura 7. Compuestos aislados del endófito *Edenia gomezpompae*.

4. Protección a su hospedera

Los hongos endófitos benefician a su planta hospedera promoviendo su crecimiento y brindándole protección contra enfermedades e insectos, así como aumentando su resistencia a múltiples factores de estrés. Investigaciones recientes se centran en el estudio de endófitos como agentes de control biológico de patógenos e insectos (Lira-Saldívar, 2007; Mejía *et al.*, 2008). Uno de los principales mecanismos a través del cual los hongos endófitos protegen a su hospedera contra el ataque de patógenos podría ser mediante la inducción de la producción de fitoalexinas y por la ocupación ecológica. Se ha propuesto que los mecanismos por los cuales los hongos endófitos protegen a su planta hospedera son distintos, incluidos los efectos directos, efectos indirectos y los efectos ecológicos (Gao *et al.*, 2010).

1) Efectos directos: mediante enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad contra patógenos, producidos directamente por el hongo endófito. Un ejemplo es la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) del hongo endófito *Muscodor yucatanensis*, aislado de *Bursera simaruba* (Burseraceae), los cuales son letales para los fitopatógenos *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*. Algunos de los VOCs identificados son: octano, 2-pentilfurano, cariofileno, aromadendreno, derivados del naftaleno, entre otros (Gao *et al.*, 2010; Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; Pachlatko, 1998)

2) Efectos indirectos: consisten en la inducción o incremento de la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos a su planta hospedera. Un ejemplo es la resistencia en la cebada (*Hordeum vulgare*, Poaceae) al ataque de microorganismos patógenos debida a la colonización de las raíces por el endófito *Piriformospora indica*. En las plantas inoculadas con el endófito e infectadas con los patógenos *Fusarium culmorum* KF 350 y *Cochliobolus sativus* fue menor la pérdida de la biomasa y la severidad de la enfermedad causada por estos microorganismos. Dichos efectos están relacionados con la estimulación mediada por el endófito *P. indica* para inducir la producción de niveles más altos

de ascorbato, el cual se encuentra en las raíces. El ascorbato funciona como antioxidante y por lo tanto puede proteger a su hospedera de la muerte celular (Waller *et al.*, 2005; Kageyama, Mandyam & Jumpponen, 2008).

3) Efectos ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y predación. Un ejemplo son los estudios realizados a una cepa no patógena de *Fusarium oxysporum* denominada Fo47, la cual inhibe al patógeno *F. oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* y reduce los síntomas de la pudrición de la raíz en el tomate. La inoculación en plantas de tomate de una carga de esporas 50 veces mayor que la del patógeno, asegura que las esporas de la cepa no patógena compitan con las esporas del patógeno por la misma fuente de carbono, lo cual reduce la disponibilidad de nutrientes para este microorganismo. Ambas cepas presentan estrategias similares de colonización, por lo tanto, *F. oxysporum* Fo47 puede ocupar y reducir el número de sitios adecuados para la fijación de esporas y la colonización de la cepa patógena de *Fusarium* (Bolwerk *et al.*, 2005).

Estos mecanismos pueden actuar de manera simultánea bajo diversas condiciones de estrés (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013; Kageyama, Mandyam, & Jumpponen, 2008).

5. Interacciones interespecíficas entre hongos endófitos

Los hongos endófitos, además de interactuar con su planta hospedera, interactúan entre ellos dentro de la planta. Estas interacciones llevadas a cabo entre distintas especies de hongos (interacciones interespecíficas), están regidas por mecanismos físicos o directos, como son las interacciones entre hifas, la interferencia hifal (micoparasitismo) y el contacto de micelio, y por mecanismos químicos o indirectos, los cuales están mediados por la producción de compuestos solubles, metabolitos secundarios, enzimas o por compuestos volátiles efectivos a distancia que limitan el crecimiento del competidor (Arnold *et al.*, 2003; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Estos mecanismos han sido evidenciados en interacciones en cultivos *in vitro* donde los hongos antagonistas producen metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas o

muestran una clara interferencia. Los cambios visibles en la morfología y la fisiología durante las interacciones se asocian con cambios bioquímicos, tales como el aumento de la actividad enzimática y la producción de compuestos orgánicos difusibles (DOCs, por sus siglas en inglés) y VOCs (Arnold *et al.*, 2003; Boddy, 2000; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Rotheray *et al.*, 2011).

En la actualidad, son escasos los estudios que establecen cuál es el modo de acción y cuáles son los compuestos activos implicados en las interacciones interespecíficas dentro de las comunidades fúngicas en la naturaleza (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Rotheray *et al.*, 2011). Realizar el estudio químico y biológico de estas interacciones conduce al descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos estructuralmente diversos y novedosos, lo cual constituye una fuente prometedora de moléculas potencialmente útiles para su uso en la agricultura, la medicina y la industria. Además, mediante estos estudios es posible seleccionar especies útiles como agentes de control biológico (Strobel *et al.*, 2004; Tan & Zou, 2001; Yuen *et al.*, 1999).

6. Agentes de control biológico

La necesidad creciente de métodos alternativos de control de plagas agrícolas amables con el medioambiente se debe a los efectos negativos de los plaguicidas sintéticos, utilizados masivamente en décadas anteriores, así, como a la aparición de resistencia en los organismos considerados plaga, a la pérdida de la biodiversidad, a la contaminación del suelo y el agua, y a los efectos negativos para la salud. Además, la necesidad creciente de producir alimentos en ciertas zonas del planeta es un problema global añadido a los mencionados (Lira-Saldívar, 2007; Tamez-Guerra *et al.*, 2007).

Las enfermedades postcosecha han sido controladas eficazmente mediante el empleo de fungicidas químicos sintéticos. Sin embargo, recientemente se han observado diferentes efectos nocivos particularmente en los consumidores, aspecto que ha propiciado el estudio sobre diferentes alternativas naturales para controlar los patógenos postcosecha. Se han evaluado diferentes opciones, entre

las que se encuentran el empleo de microorganismos antagonistas y de extractos vegetales, entre otros. Estas opciones tienen como factor común lograr el control eficiente de los patógenos postcosecha basados en la actividad antifúngica de los productos empleados (Ciancio & Mukerji, 2007).

Los microorganismos antagonistas como son las bacterias, levaduras y hongos ejercen un efecto de control biológico, el cual se define como el “uso de organismos vivos como agentes para el control de plagas” (Greathead & Waage, 1983), sobre diferentes patógenos de interés, y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales. La selección del microorganismo idóneo se debe realizar considerando principalmente la habilidad para competir con los patógenos por los nutrientes, y su capacidad de sobrevivir en diferentes condiciones ambientales (Ciancio & Mukerji, 2007), sin dañar el cultivo o cosecha. Es importante conocer y comprender el modo de acción de los antagonistas, aspectos que pueden permitir un desarrollo más seguro de los procesos de aplicación de estos y, al mismo tiempo, proporcionar una base para seleccionar nuevos antagonistas efectivos. Como principales métodos de acción se han descrito fundamentalmente: la antibiosis, la producción de enzimas líticas, el parasitismo, la inducción de resistencia, y la competencia por nutrientes y espacio. Cabe destacar que, en general, más de un mecanismo puede estar implicado en el efecto de biocontrol (Lira-Saldívar, 2007).

Un ejemplo que sirve para evidenciar el uso potencial de hongos endófitos como agentes de control biológico, son los estudios realizados a endófitos de *Theobroma cacao*, los cuales restringen el crecimiento *in vitro* de tres patógenos del cacao (*Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roreri*, y *Moniliophthora perniciosa*). Estos resultados también fueron corroborados en invernadero (Arnold *et al.*, 2003; Rubini *et al.*, 2005) y en el campo (Mejía *et al.*, 2008). Investigaciones como estas son particularmente útiles para identificar posibles candidatos para ser usados como agentes de biocontrol y para establecer los mecanismos por los cuales reducen el daño provocado por los patógenos, en este caso particular a *Theobroma cacao* (Arnold *et al.*, 2003; Mejía *et al.*, 2008; Rubini *et al.*, 2005).

Otro grupo de hongos endófitos ampliamente estudiados por su potencial uso como agentes de control biológico es el género *Muscodor*. Este género comprende 14 especies, todas ellas producen VOCs bioactivos, entre los que destacan numerosos alcoholes, cetonas, ésteres, ácidos, compuestos aromáticos simples, derivados de naftaleno, y moterpenos, entre otros. La mezcla VOCs inhibe *in vitro* el crecimiento de hongos, plantas y bacterias, actuando de manera sinérgica, por lo que poseen alto potencial para en la agricultura moderna. Actualmente, *Muscodor albus* es empleada como agente de control biológico, en especial en la protección de cultivos postcosecha (Banerjee *et al*, 2014; Strobel, 2006; Macias-Rubalcava *et al.*, 2010).

III. Hipótesis

Los hongos endófitos, al estar en constante interacción con otros microorganismos dentro de su hospedera, pueden desarrollar la capacidad de antagonizar e inhibir el crecimiento de patógenos potenciales; por esta razón, el estudio de los hongos endófitos de la planta *Gliricidia sepium*, puede llevar al descubrimiento de hongos endófitos con potencial antagónico que podrían ser utilizados como agentes de control biológico.

IV. Objetivos

1. Objetivos generales

Establecer las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de la planta *G. sepium* y seleccionar a los hongos endófitos con mayor potencial antagónico mediante bioensayos de antagonismo directo entre ellos; y contra microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola. Para así contribuir al conocimiento de las relaciones que establecen los hongos endófitos con otros hongos endófitos, microorganismos fitopatógenos y con su planta hospedera y a investigar su posible uso en el desarrollo de agentes de control biológico.

2. Objetivos particulares

- Corroborar la pureza de 26 aislamientos de hongos endófitos y de 2 aislamientos de hongos fitopatógenos de *G. sepium*.
- Establecer las características macro y microscópicas de hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *G. sepium* mediante inspección sensorial y mediante observaciones de su micelio teñido con azul de lactofenol.
- Determinar la tasa de crecimiento de los hongos endófitos en estudio, realizando curvas de crecimiento en agar papa dextrosa.
- Realizar bioensayos *in vitro* de antagonismo directo, entre hongos endófitos con tasa de crecimiento similar, y determinar el porcentaje de inhibición y el índice de antagonismo (IA). Con base en su porcentaje de inhibición y de su IA seleccionar las especies que presenten el mayor potencial antagónico.
- Efectuar bioensayos de antagonismo directo entre los hongos endófitos con mayor potencial antagónico.

- Llevar a cabo antagonismos directos entre los endófitos con mayor potencial antagónico y microorganismos con importancia agrícola: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*.
- Poner en evidencia las posibles interacciones que establecen los hongos endófitos y fitopatógenos dentro de su hospedera, y cómo son capaces de subsistir compitiendo por espacio y nutrientes. Asimismo, evidenciar los mecanismos por los cuales limitan el crecimiento de sus competidores, ya sea por medio de mecanismos físicos (barreras miceliales, mayor producción de micelio, etc.) o químicos (producción de compuestos que difunden en el medio de cultivo o volátiles). Inferir el posible papel de defensa de los endófitos hacia su hospedera por el ataque de microorganismos patógenos.

V. Materiales y métodos

1. Organismos de prueba

1.1 Hongos endófitos

Se emplearon un total de 26 hongos endófitos puros aislados a partir de hojas sanas de la planta *G. sepium* (Fabaceae), colectada en septiembre de 2010 en la „Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH)“, la cual es una zona de alta biodiversidad, ubicada en el municipio de Quilamula, Estado de Morelos, México (Fernández-Saldaña *et al.*, 2007).

1.2 Hongos fitopatógenos

Se emplearon dos hongos fitopatógenos aislados a partir de hojas de *G. sepium* colectadas en la REBIOSH con signos de enfermedad pero sin daño por insectos ni herbívoros.

Como microorganismos de prueba también se utilizaron cinco fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, los hongos *F. oxysporum* y *A. solani* (Eumycota); y los oomicetos *P. capsici*, *P. parasitica* y *P. aphanidermatum* (Oomycota). Las cepas fueron donadas por la Dra. Olga Gómez y la M. en C. Bertha Tlalpal Bolaños del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

2. Composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógenos.

2.1 Papa-dextrosa-agar (PDA)

Se pesaron 200 g de papa fresca previamente pelada y cortada en cubos, se hirvieron durante 20 min con agua destilada. Se filtró la infusión a través de gasa, Se agregaron 20 g de dextrosa y 15 g de agar. Se añadió agua destilada hasta un volumen total de 1000 mL, se homogeneizó y esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

3. Determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *Gliricidia sepium*.

Los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *G. sepium* se sembraron en cajas de Petri empleando medio PDA a partir de cultivos en tubos con agar inclinado. Una vez confirmada la pureza de los hongos, se sembraron por triplicado en cajas de Petri de 9 cm, empleando medio PDA e incubándolos a temperatura ambiente. En cada caja se colocó un inóculo de 5 mm de diámetro del microorganismo previamente incubado en PDA por 8 días a temperatura ambiente y se establecieron las características macro y microscópicas, así como su tasa de crecimiento.

Las características macroscópicas se establecieron mediante inspección visual de tres cultivos en cajas de Petri de cada uno de los microorganismos en estudio, registrando con ayuda de un microscopio estereoscópico: textura, color del micelio en el anverso (parte superior del micelio) y reverso (parte inferior del micelio), superficie, consistencia y tipo de crecimiento del micelio, difusión de pigmentos coloridos en el medio de cultivo, presencia de exudado, así como la presencia de estructuras de reproducción. Las observaciones se realizaron periódicamente hasta que el micelio ya no presentara cambios.

Las características microscópicas se establecieron a partir de tinciones de los micelios con azul de lactofenol, por observación con un microscópico óptico marca Motic (modelo BA410) a 40x y 100x, registrándose así el tipo de micelio (septado o cenocítico), color de las hifas (dematiáceas o incoloras) estructuras reproductivas (esporas o conidios, ascas). Por último, se fotografiaron las estructuras observadas utilizando una cámara digital Moticam 2000 de 2.0 (Digital microscopy).

La tasa de crecimiento de cada microorganismo se determinó midiendo cada dos días su crecimiento radial o irregular, hasta llegar a los límites de las cajas de Petri, y se determinó el área de crecimiento (cm²) utilizando un escáner HP Laser Jet M1005 MFP. A partir de las medidas del área del micelio se realizó una curva

de crecimiento para determinar la tasa de crecimiento de cada hongo endófito. Se utilizaron los valores promedio de las 3 cajas de cultivo y se graficó el crecimiento de los hongos en cm^2 vs días de crecimiento, en donde la pendiente de la fase exponencial corresponde a la tasa de crecimiento. Finalmente, se clasificaron en 5 grupos de acuerdo a su tasa de crecimiento.

4. Bioensayos de antagonismo directo.

4.1 Hongos endófitos vs hongos endófitos

Los bioensayos de antagonismo directo se realizaron entre hongos endófitos con tasa de crecimiento similar:

- 1) Hongos de crecimiento lento y muy lento de micelio color blanco.
- 2) Hongos de crecimiento lento y micelio de diferentes colores.
- 3) Hongos de crecimiento muy lento y micelio de diferentes colores.
- 4) Hongos de crecimiento muy lento y micelio color blanco en el anverso y café en el reverso.
- 5) Hongos de crecimiento medio y micelio de diferentes colores.
- 6) Hongos de crecimiento medio y micelio de diferentes colores
- 7) Hongos de crecimiento rápido y micelio color verde grisáceo.

Los microorganismos competidores se inocularon por cuadruplicado en cajas de Petri estériles de 9 cm de diámetro, conteniendo 15 mL de medio PDA. Cada endófito se sembró utilizando inóculos de 5 mm de diámetro de los micelios de los microorganismos previamente incubados en PDA por 8 días. Los inóculos se colocaron equidistantes ocupando sólo un extremo de la caja Petri. Las cajas de Petri se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz-oscuridad naturales 12:12 h. Paralelamente, fueron inoculados por triplicado controles de crecimiento de cada endófito. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al

azar y todo el procedimiento experimental se efectuó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar.

Los resultados de crecimiento e interacción macroscópica entre los microorganismos competidores, se registró e interpretó cada 3 días durante tres semanas después de haber hecho contacto sus micelios. En cada determinación se registró el crecimiento de los endófitos y todos los cambios observados en la interacción micelio-micelio.

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

$$\left| \frac{a-b}{b} \times 100 \right| = \% \text{ de inhibición}$$

Donde a y b son los radios de los hongos endófitos competidores en la zona de interacción (a) y en la zona de no interacción (b). En la Figura 8 se muestra el modelo utilizado para realizar los bioensayos de antagonismo directo.

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; Macías-Rubalcava *et al.* 2014; Sandoval-Espinosa, 2014).

El tipo de interacción entre los microorganismos competidores se estableció asignando una categoría y un valor numérico de acuerdo al Cuadro 1. Una vez asignada la categoría correspondiente y su valor numérico, se calculó el índice de antagonismo (IA) de cada microorganismo competidor de la siguiente manera:

$$IA = A (n \times 0) + B1 (n \times 1) + B2 (n \times 1) + C (n \times 2) + D (n \times 3) + E1 (n \times 4) + E2 (n \times 4)$$

Donde *n* es el número de veces que el hongo presentó la categoría de antagonismo correspondiente (modificado de Yuen *et al.*, 1999).

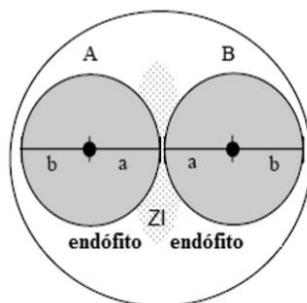


Figura 8. Bioensayo de antagonismo directo en caja de Petri entre los hongos endófitos de *Gliricidia sepium*; *a* (zona de interacción) y *b* (zona de no interacción) representan los radios de crecimiento de cada endófito; *A* representa al “endófito de prueba” y *B* representa al “endófito competidor”; *ZI* indica la zona de interacción micelio-micelio.

Cuadro 1. Tipo de interacciones entre microorganismos y valores numéricos asignados (modificado de Yuen *et al.*, 1999).

| Categoría | Tipo de interacción | Valor numérico |
|------------------|--|-----------------------|
| A | El crecimiento de A se entremezcla con el de B, sin que exista reducción en el crecimiento de alguna de ellas. | 0 |
| B1 | La especie A reduce su crecimiento cuando la especie B crece encima de ella. | 1 |
| B2 | La especie A detiene su crecimiento cuando la especie B crece hasta y alrededor de ella. | 1 |
| C | La especie A crece casi en contacto con B y cesa el crecimiento de ambas especies. | 2 |

Cuadro 1. Tipo de interacciones entre microorganismos y valores numéricos asignados (modificado de Yuen *et al.*, 1999) (continuación).

| Categoría | Tipo de interacción | Valor numérico |
|------------------|---|-----------------------|
| D | Las especies A y B se inhiben a distancia. | 3 |
| E1 | La especie A crece encima de la especie B reduciendo el crecimiento de B. | 4 |
| E2 | La especie A crece hasta y alrededor de la especie B. | 4 |

4.2 Hongos endófitos con potencial antagónico vs hongos endófitos con potencial antagónico

Los hongos endófitos con mayor potencial antagónico de cada grupo (crecimiento rápido, medio y lento) se antagonizaron entre ellos. Los microorganismos se inocularon de acuerdo a sus tasas de crecimiento, empleando la metodología indicada en el punto anterior. Una vez que alcanzaron su máximo crecimiento, se registraron e interpretaron los resultados obtenidos.

4.3 Hongos endófitos con potencial antagónico vs microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola

Los hongos endófitos con mayor potencial antagónico también se sometieron a bioensayos de antagonismo directo vs cinco microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura: *F. oxysporum*, *A. solani*, *P. aphanidermatum*, *P. capsici*, y *P. parasitica*, siguiendo la metodología utilizada para realizar los bioensayos de antagonismo directo entre hongos endófitos, así como para el registro e interpretación los resultados obtenidos.

VI. Resultados y discusión

La presente investigación se realizó con el propósito de establecer el potencial antagonico de hongos endófitos aislados de *G. sepium*, para así, evidenciar la presencia de metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos, útiles en la agricultura, su posible papel protector a su planta hospedera, y su potencial uso como agentes de control biológico.

Los resultados obtenidos se dividen en cuatro secciones: 1) Determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *G. sepium*, 2) Bioensayos de antagonismo directo entre hongos endófitos 3) Bioensayos de antagonismo directo entre hongos endófitos con el mayor potencial antagonico y 4) Bioensayos de antagonismo directo entre hongos endófitos con el mayor potencial antagonico y microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura.

1. Determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *Gliricidia sepium*

El presente estudio se llevó a cabo con 26 aislamientos de hongos endófitos de hojas sanas de la planta *G. sepium* y con dos de hongos fitopatógenos aislados a partir de hojas con síntomas de enfermedad. *G. sepium* colectadas en la „Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla“ (REBIOSH), en el estado de Morelos. El criterio de selección fue ecológico (Guiraldo, 2008), es decir, no presentaba ningún daño por patógenos o herbívoros al momento de su colecta, además de ser una especie que crece en una aérea de gran diversidad biológica. Cabe destacar que no hay reportes en la literatura acerca del aislamiento e identificación de hongos endófitos de *G. sepium*.

Las características macroscópicas de los hongos puros se determinaron a partir de cultivos en PDA, mediante inspección visual con ayuda de un microscopio estereoscópico registrando: textura, color del micelio en el anverso y reverso, superficie,

consistencia y tipo de crecimiento del micelio, difusión de pigmentos coloridos en el medio de cultivo, presencia de exudado, así como la presencia de estructuras de reproducción. También, se determinó la tasa de crecimiento mediante la elaboración de 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 a partir de tinciones de los micelios con azul de lactofenol por observación con un microscópico óptico, registrando el tipo de micelio (septado o cenocítico), color de las hifas (dematiáceas o incoloras) estructuras reproductivas (esporangióforos, conidióforos, ascas) y/o esporas observadas.

A continuación se describen las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos puros, aislados de la planta *G. sepium*.

1.1 Hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium*

GsE1

En el anverso se observa la producción de micelio aéreo color blanco de apariencia algodonosa, superficie plana y de consistencia blanda. El color blanco del micelio permanece con el transcurso del tiempo. Presenta crecimiento radial con bordes regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 9 A). En el reverso, el micelio es color beige con algunas manchas color café claro (Figura 9 B). La tasa de crecimiento de este hongo endófito es de 4.9 cm²/día (Figura 9 C). Las características microscópicas observadas son: hifas muy delgadas, hialinas y septadas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 9 D).

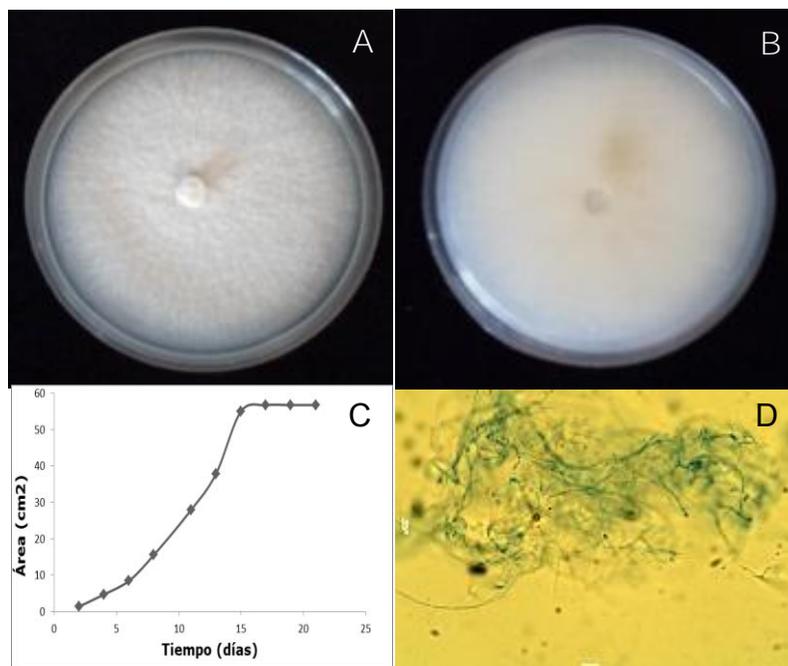


Figura 9. Endófito GsE1. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE2

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa/algodonosa de color blanco, superficie plana y de consistencia blanda. El color del micelio permanece con el transcurso del tiempo. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos difusibles en el medio de cultivo (Figura 10 A). En el reverso, el micelio es color beige con algunas manchas cafés (Figura 10 B). La tasa de crecimiento del hongo endófito GS E2 es de $5.1 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 10 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, hialinas, no se aprecia si están septadas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 10 D).

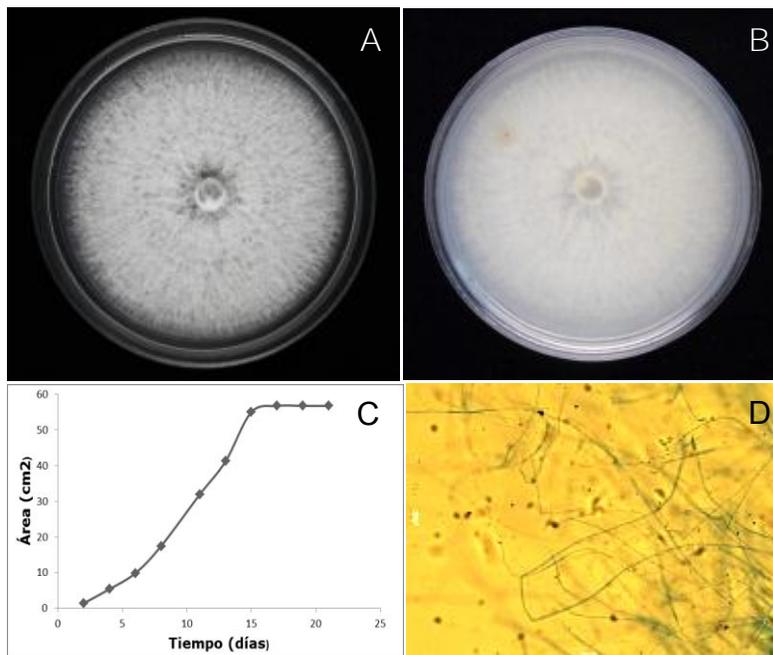


Figura 10. Endófito GsE2. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE3

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere un ligero color beige con manchas café claro. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 11 A). En el reverso, el micelio es color beige con algunas manchas cafés (Figura 11 B). La tasa de crecimiento de este hongo endófito es de $5.0 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 11 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, dematiáceas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 11 D).

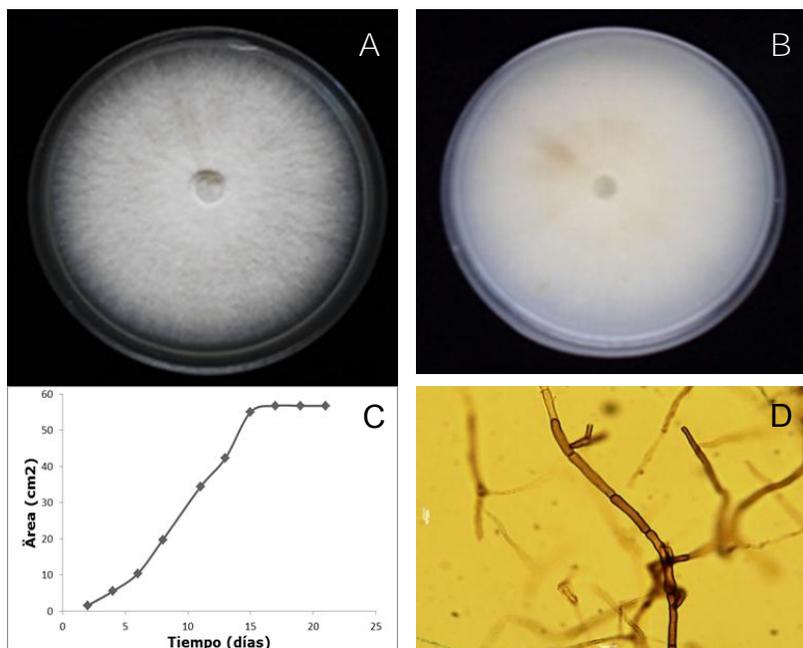


Figura 11. Endófito GsE3. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE4

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa, color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. El color del micelio permanece con el transcurso del tiempo. Su crecimiento es radial estrellado. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 12 A). En el reverso, el micelio es color blanco (Figura 12 B). La tasa de crecimiento de este hongo endófito es de $5.3 \text{ cm}^2/\text{ día}$ (Figura 12 C). Las características microscópicas observadas son: hifas hialinas, esqueléticas observadas a 100x. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 12 D).

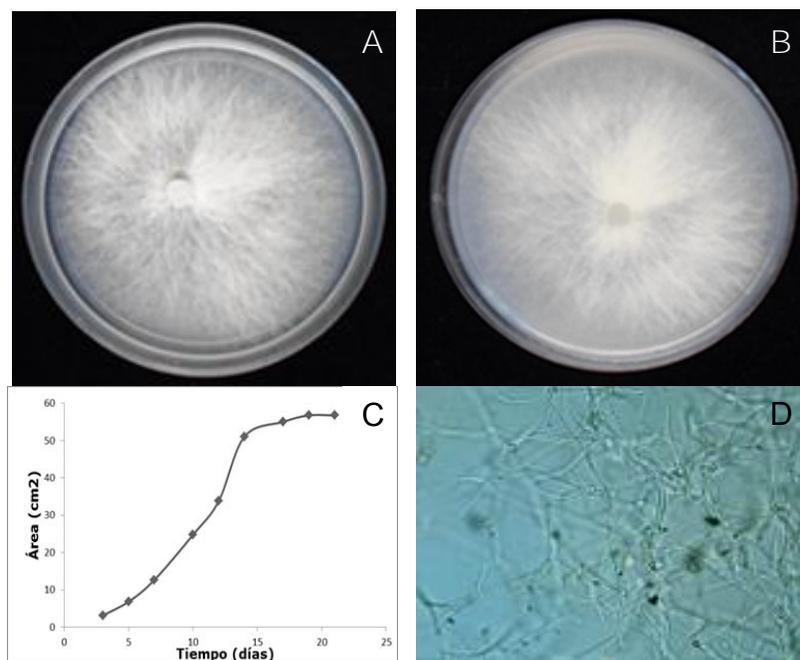


Figura 12. Endófito GsE4. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 100X, teñida con azul de lactofenol.

GsE5

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa/flocosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere un ligero color beige. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 13 A). En el reverso, el micelio es color durazno (Figura 13 B). La tasa de crecimiento del hongo endófito GsE5 es de $4.7 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 13 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, hialinas, cenocíticas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 13 D).

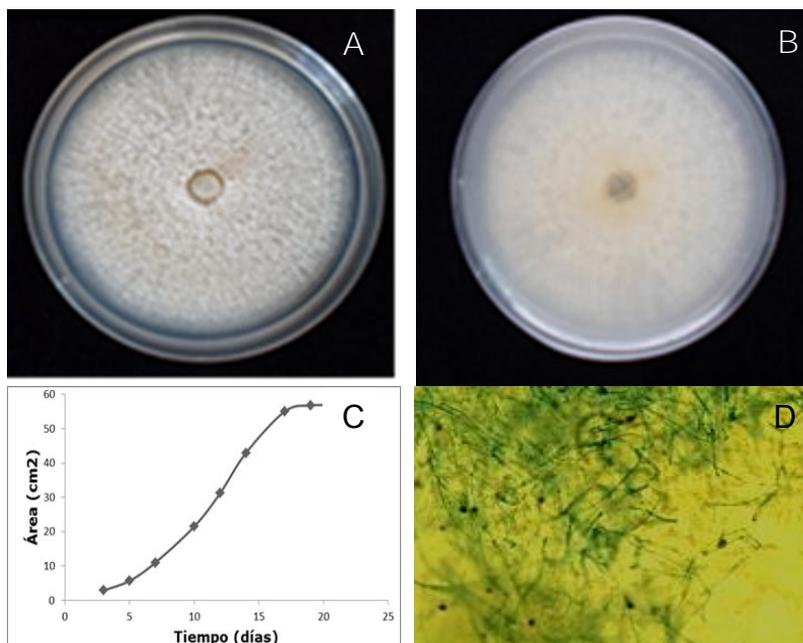


Figura 13. Endófito GsE5. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE6

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa/esponjosa inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere un ligero color beige con manchas cafés. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 14 A). En el reverso, el micelio es color beige (Figura 14 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $6.2 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 14 C). Las características microscópicas observadas son: hifas muy delgadas, hialinas, cenocíticas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 14 D).

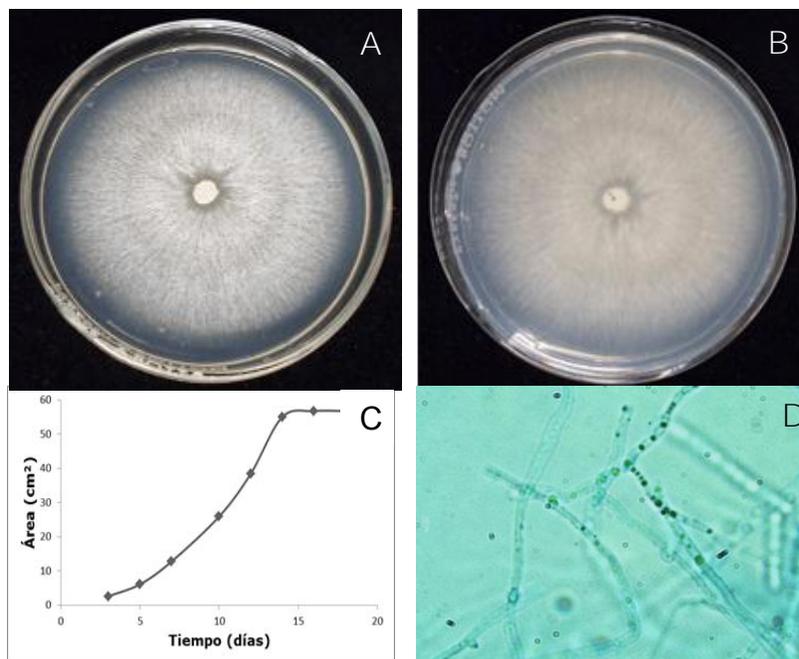


Figura 14. Endófito GsE6. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE7

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa/esponjosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere una coloración grisácea y verde olivo, con manchas negras. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son irregulares. Produce exudado color amarillo y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 15 A). En el reverso, el micelio inicialmente es color blanco con anillos concéntricos cafés y centro verde limón. Con el paso del tiempo adquiere una coloración negra con manchas verde limón en la orilla (Figura 15 B). La tasa de crecimiento del hongo endófito GsE7 es de $8.7 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 15 C). Las características microscópicas observadas son: hifas gruesas, dematiáceas, septadas y esporas redondas de color café (Figura 15 D).

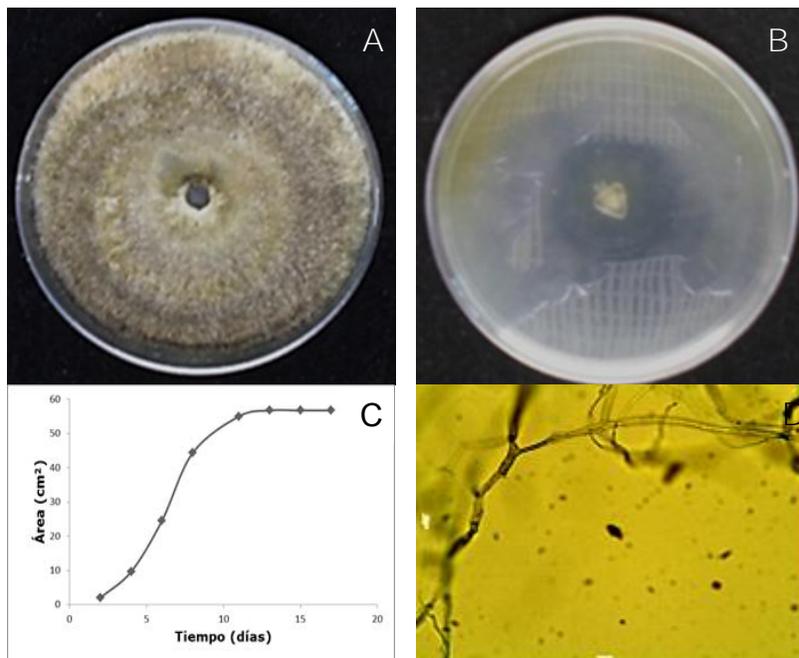


Figura 15. Endófito GsE7. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE8

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia algodonosa y polvosa, inicialmente de color blanco, de superficie umbonada y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el hongo produce polvo (esporas) color café, y el centro adquiere éste color, su superficie se vuelve plana. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado color ámbar y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 16 A). En el reverso, el micelio del endófito GsE10 es de color blanco con algunas zonas cafés, se observa el crecimiento de las hifas hacia la izquierda formando un “remolino” (Figura 16 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $10.0 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 16 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, hialinas, septadas y esporas ovaladas de color café parecidas a las producidas por hongos del género *Nodulisporium* sp. (Ireland *et al.*, 2008) (Figura 16 D).

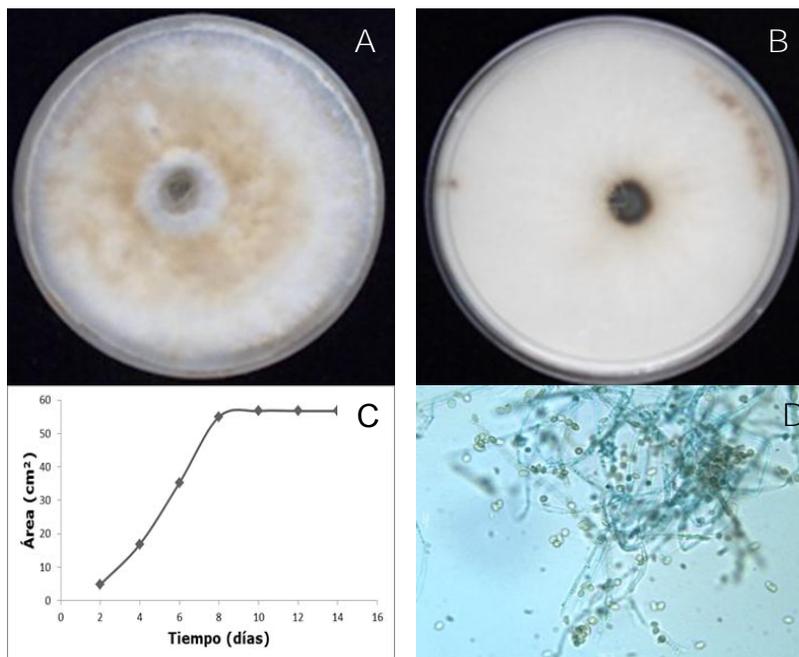


Figura 16. Endófito GsE8. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE9

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia algodonosa y polvoso, inicialmente de color blanco con centro amarillo, de superficie umbonada y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el hongo produce esporas de color café y algunas zonas se pigmentan de color ámbar, su superficie se vuelve plana. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado color ámbar y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 17 A). En el reverso, el micelio es color blanco con algunas zonas cafés (Figura 17 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $11.1 \text{ cm}^2/\text{ día}$ (Figura 17 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, dematiáceas, septadas y esporas ovaladas color café, algunas se encuentran libres y otras agrupadas en racimos parecidas a las producidas por hongos del género *Nodulisporium* sp. (Ireland *et al.*, 2008) (Figura 17 D).

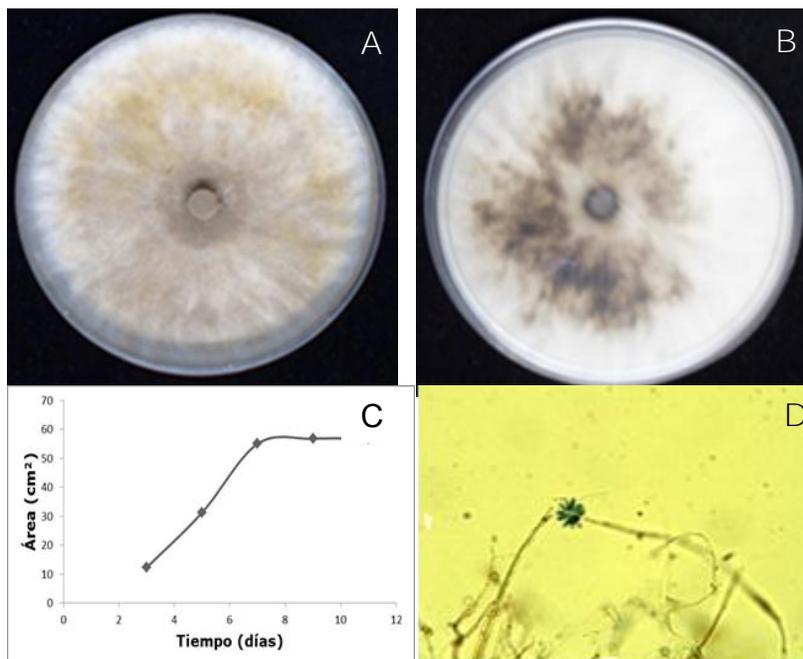


Figura 17. Endófito GsE9. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE10

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa y polvosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo produce esporas de color café que cubren todo el micelio blanco. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y amarillo. No produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 18 A). En el reverso, el micelio del endófito GsE10 es de color blanco con centro café (Figura 18 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $9.4 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 18 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, dematiáceas, septadas y esporas ovaladas de color café parecidas a las producidas por hongos del género *Nodulisporium* sp. (Figura 18 D) (Ireland *et al.*, 2008).

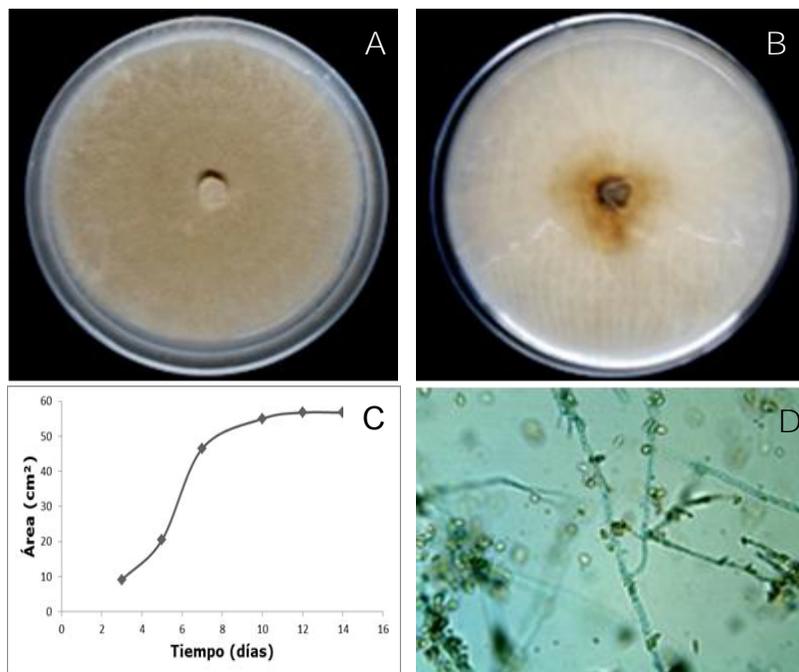


Figura 18. Endófito GsE10. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE11

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa/flocosa, de color rosa/durazno y centro color ámbar, de superficie plana y consistencia blanda. El color del micelio permanece con el transcurso del tiempo. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 19 A). En el reverso, el micelio es color durazno con centro color café claro (Figura 19 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $11.7 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 19 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, hialinas, septadas y macroconidias parecidas a las producidas por hongos del género *Fusarium* sp. (Riveros *et al.*, 2001) (Figura 19 D).

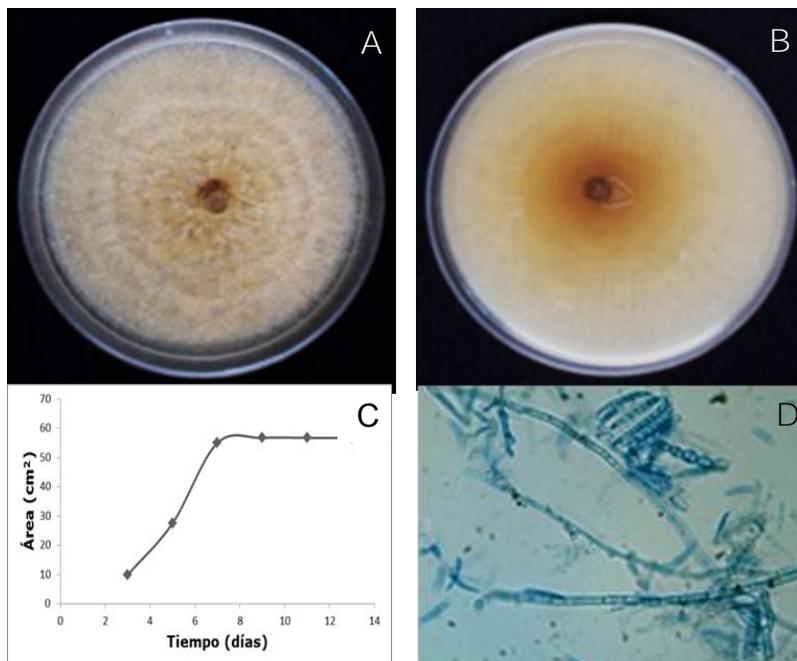


Figura 19. Endófito GsE11. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE12

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere una pigmentación color verde grisáceo. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 20 A). En el reverso, el micelio inicialmente es de color blanco y gradualmente adquiere una coloración negra (Figura 20 B). La tasa de crecimiento del hongo endófito GsE12 es de $13.4 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 20 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, dematiáceas, septadas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 20 D).

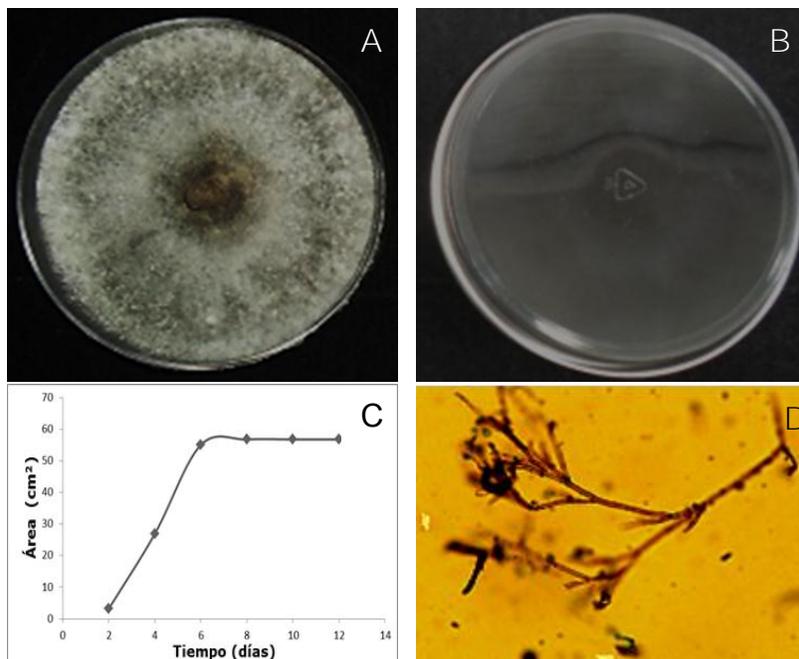


Figura 20. Endófito GsE12. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE13

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color blanco y centro grisáceo, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio se pigmenta de color verde olivo-grisáceo con algunas zonas negras. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado color amarillo y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 21 A). En el reverso el micelio es inicialmente de color blanco con centro amarillo, con el paso del tiempo adquiere una coloración completamente negra (Figura 21 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $13.4 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 21 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, dematiáceas, septadas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 21 D).

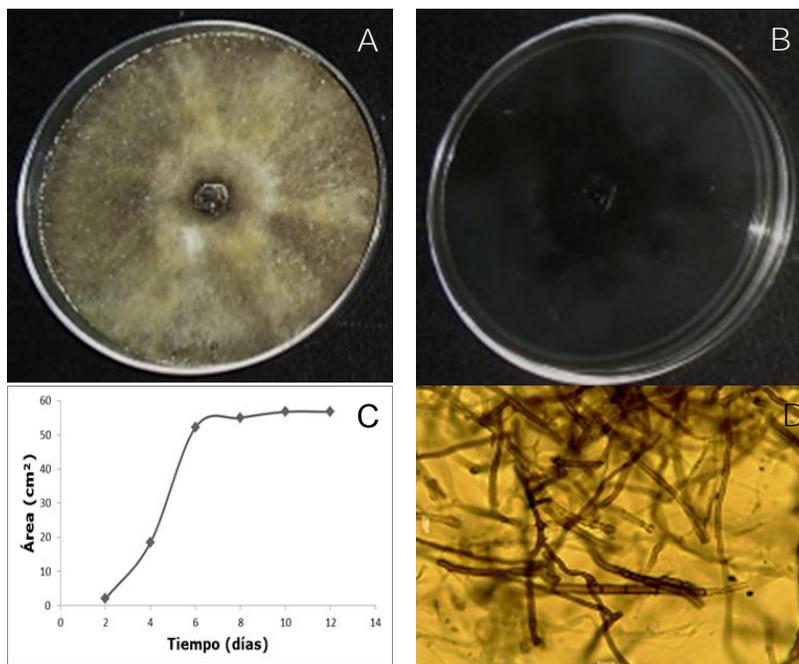


Figura 21. Endófito GsE13. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA reverso. **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol. .

GsE14

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa/algodonosa, inicialmente de color blanco y centro verde grisáceo, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo adquiere una pigmentación gris oscuro-verdosa. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 22 A). En el reverso, el micelio inicialmente es de color blanco con centro verde botella, con el paso del tiempo se torna color negro (Figura 22 B). La tasa de crecimiento del hongo endófito GsE14 es de $12.5 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 22 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, dematiáceas, septadas y esporas ovaladas de color café (Figura 22 D).

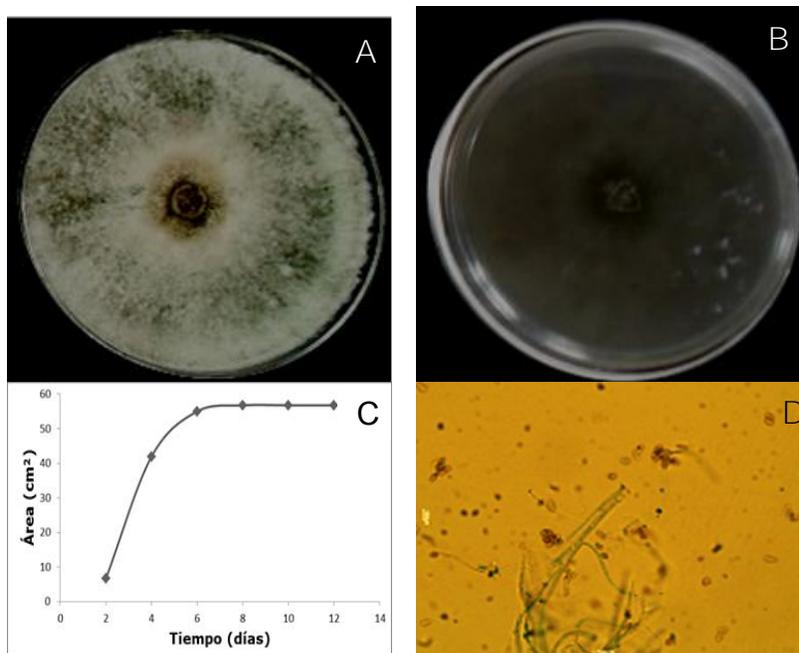


Figura 22. Endófito GsE14. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE15

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa/esponjosa, inicialmente color blanco con centro gris verdoso, superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio se pigmenta completamente de color gris verdoso y forma estromas color café. Su crecimiento radial y sus bordes son regulares. Produce exudado color verde botella y amarillo. No produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 23 A). En el reverso, el micelio inicialmente es de color blanco, con el paso del tiempo se pigmenta completamente color negro (Figura 23 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $12.3 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 23 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, dematiáceas, septadas y esporas ovaladas de color café (libres y en fiálides) (Figura 23 D).

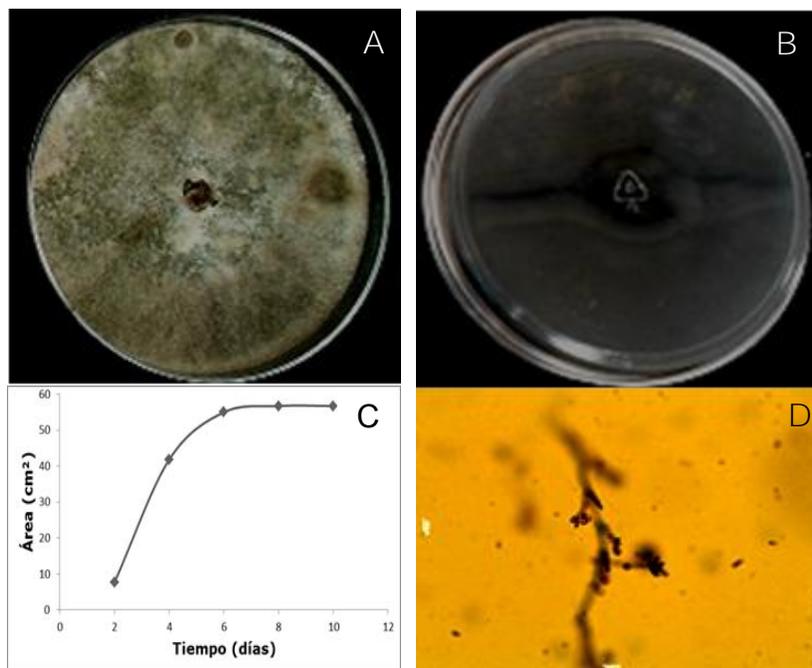


Figura 23. Endófito GsE15. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE16

En el anverso se observa micelio aéreo e inmerso de apariencia vellosa y esponjosa, de superficie plana y consistencia blanda. El micelio aéreo es de color blanco y el micelio inmerso es de color amarillo, con el transcurso del tiempo permanece constante. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 24 A). En el anverso, el micelio es color beige con centro color amarillo (Figura 24 B). La tasa de crecimiento del hongo endófito GsE16 es de 2.3 cm²/día (Figura 24 C). Las características microscópicas observadas son: hifas hialinas, esqueléticas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 24 D).

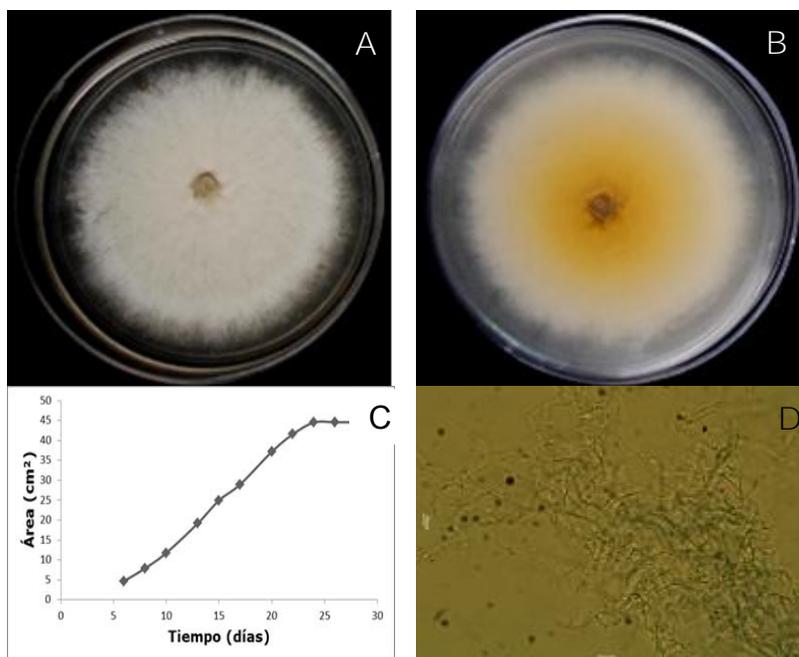


Figura 24. Endófito GsE16. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE17

En el anverso se observa micelio aéreo e inmerso de apariencia vellosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere una pigmentación completamente café. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 25 A). El anverso, el micelio es color beige (Figura 25 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $2.4 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 25 C). Las características microscópicas observadas son: hifas esqueléticas, dematiáceas, septadas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 25 D).

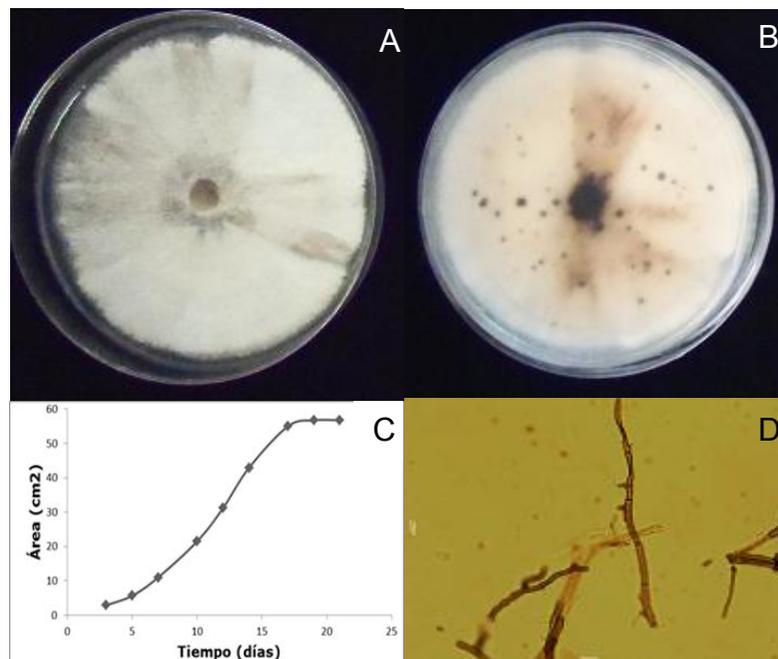


Figura 25. Endófito GsE17. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE18

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia plumosa, inicialmente de color beige con bordes color verde botella, de superficie plana y consistencia dura. Con el tiempo el micelio adquiere una coloración verde botella. Su crecimiento es radial y sus bordes son lobulados. Produce exudado color ámbar y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo, las características macroscópicas son similares a las mostradas por las colonias de hongos pertenecientes al género *Xylaria* sp. (Deacon, 2005) (Figura 26 A). En el reverso, el micelio es color beige con zonas color negro (Figura 26 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $3.3 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 26 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, dematiáceas, septadas y algunas esporas redondas de color café (Figura 26 D).

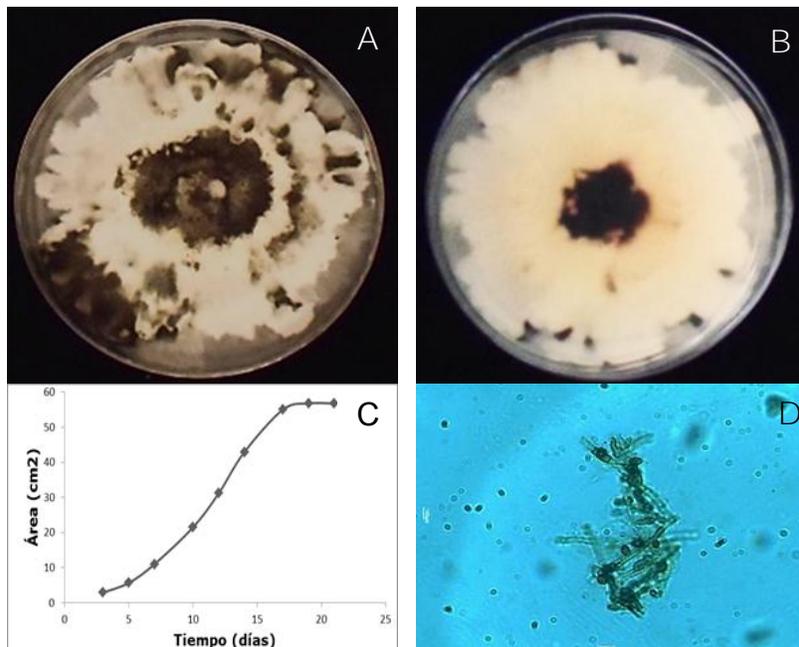


Figura 26. Endófito GsE18. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE19

En el anverso se observa micelio aéreo e inmerso de apariencia plumosa/velosa, de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. El color del micelio permanece con el transcurso del tiempo. Su crecimiento es radial limitado, forma anillos concéntricos y sus bordes son lobulados. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 27 A). En el reverso el micelio inicialmente es color blanco, con el paso del tiempo adquiere una coloración amarillo paja (Figura 27 B). Las tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $1.4 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 27 C). Las características microscópicas observadas son: hifas muy delgadas, hialinas, cenocíticas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 27 D).

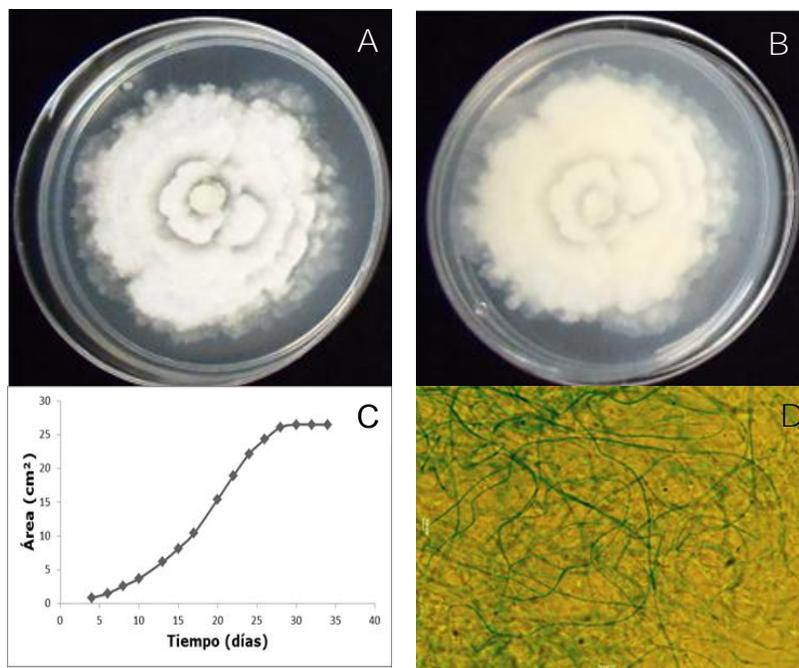


Figura 27. Endófito GsE19. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE20

En el anverso se observa micelio inmerso de color café y micelio aéreo inicialmente de color blanco, apariencia algodonosa y de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio se pigmenta de color café con zonas blancas y de apariencia esponjosas. Su crecimiento es radial limitado y sus bordes son regulares. Produce exudado de color café-anaranjado y no produce pigmentos que difundan al medio de cultivo (Figura 28 A). En el reverso, el micelio es color café (Figura 28 B). La tasa de crecimiento del hongo endófito GsE 20 es de $1.1 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 28 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, hialinas, septadas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 28 D).

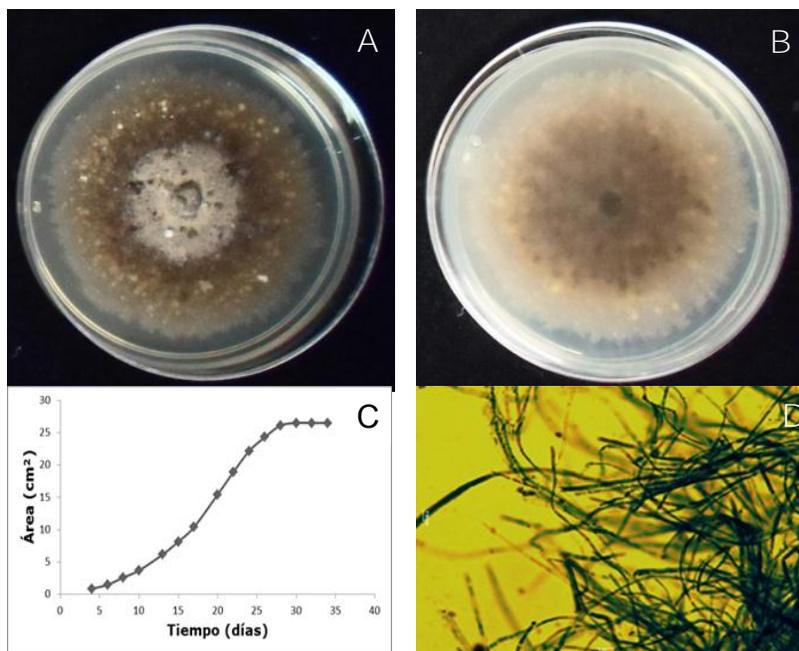


Figura 28. Endófito GsE20. **A** .Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B**. Crecimiento de 25 días en medio PDA reverso. **C**. Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D**. Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE21

En el anverso se observa micelio inmerso de color café y micelio aéreo de color blanco con zonas color beige, de apariencia algodonosa y de superficie plana y consistencia blanda. El color del micelio permanece con el transcurso del tiempo. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 29 A). En el reverso, el micelio es color blanco con café (Figura 29 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $3.1 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 29 C). Las características microscópicas observadas son: hifas hialinas, esqueléticas, no se distinguen septos. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 29 D).

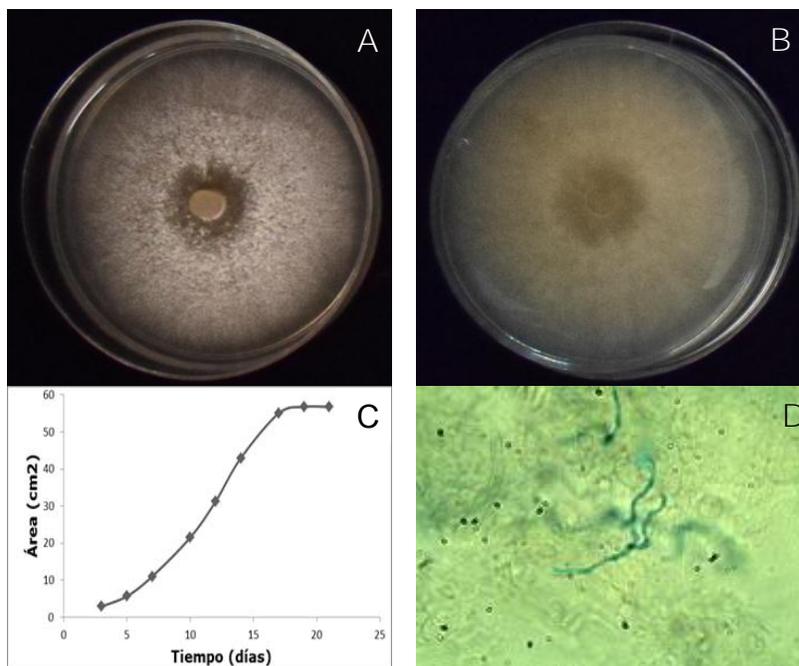


Figura 29. Endófito GsE21. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE22

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio se torna color blanco con gris. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado color ámbar. No produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 30 A). En el reverso, el micelio es color beige con café (Figura 30 B). La tasa de crecimiento del hongo endófito GsE22 es de $3.0 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 30 C). Las características microscópicas observadas son: hifas hialinas, esqueléticas, no se distinguen septos. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 30 D).

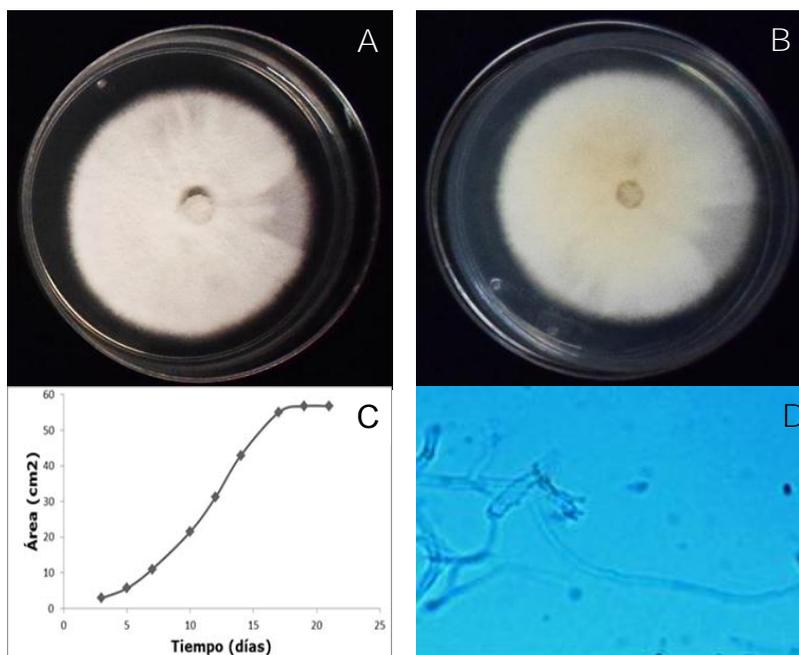


Figura 30. Endófito GsE22. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE23

En el anverso se observa micelio aéreo e inmerso de apariencia plumosa y algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo adquiere un ligero color beige. Su crecimiento es radial y sus bordes son irregulares. Produce exudado color durazno e incoloro. No produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 31 A). En el reverso, el micelio inicialmente es de color beige, con el paso del tiempo el centro adquiere una coloración café (Figura 31 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $3.0 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 31 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, hialinas, septadas y esporas redondas en cadena (Figura 31 D).

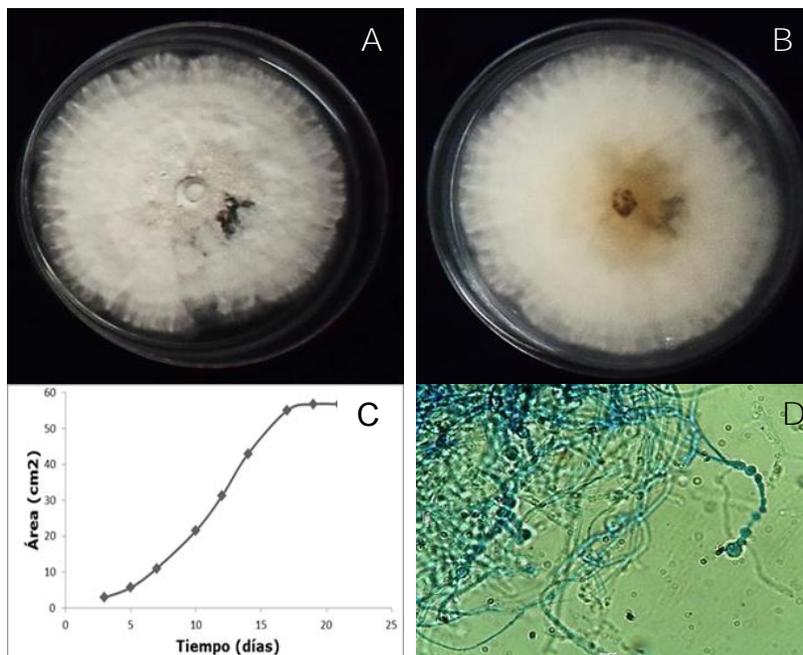


Figura 31. Endófito GsE23. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE24

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa/algodonosa, de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. El color del micelio permanece con el transcurso del tiempo. Su crecimiento es radial, forma un anillo concéntrico color café y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 32 A). En el reverso, el micelio es color beige (Figura 32 B). La tasa de crecimiento del hongo endófito GsE24 es de $4.9 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 32 C). Las características microscópicas observadas son: hifas muy delgadas, hialinas, y cenocíticas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 32 D).

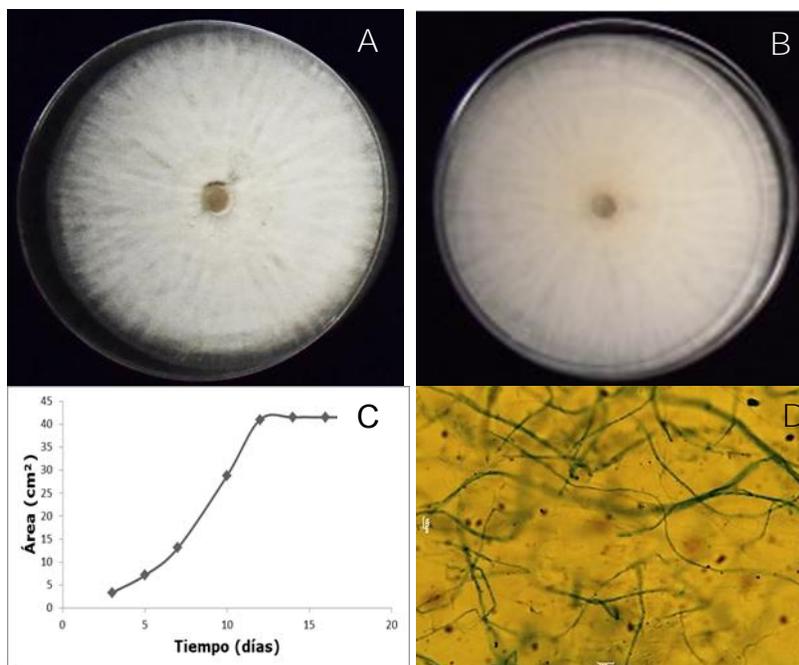


Figura 32. Endófito GsE24. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE25

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa/algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere una coloración beige. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado color durazno y ámbar. No produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 33 A). En el reverso, el micelio inicialmente es de color blanco y con el paso del tiempo se torna color café claro (Figura 33 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $4.3 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 33 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, hialinas, se aprecian algunos clamidoconidios (Figura 33 D).

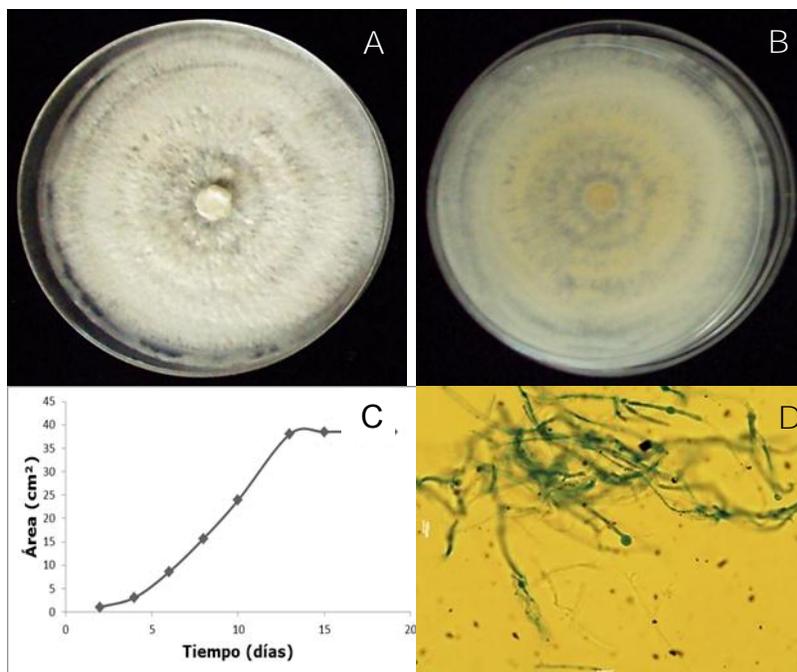


Figura 33. Endófito GsE25. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsE26

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo algunas zonas del micelio se pigmentan de color café. Su crecimiento es radial y sus bordes son irregulares. No produce exudado ni pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 34 A). En el reverso, el micelio inicialmente es de color blanco, con el paso del tiempo adquiere una coloración café en algunas zonas (Figura 34 B). La tasa de crecimiento de éste hongo endófito es de $4.0 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 34 C). Las características microscópicas observadas son: hifas muy delgadas, hialinas, cenocíticas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 34 D).

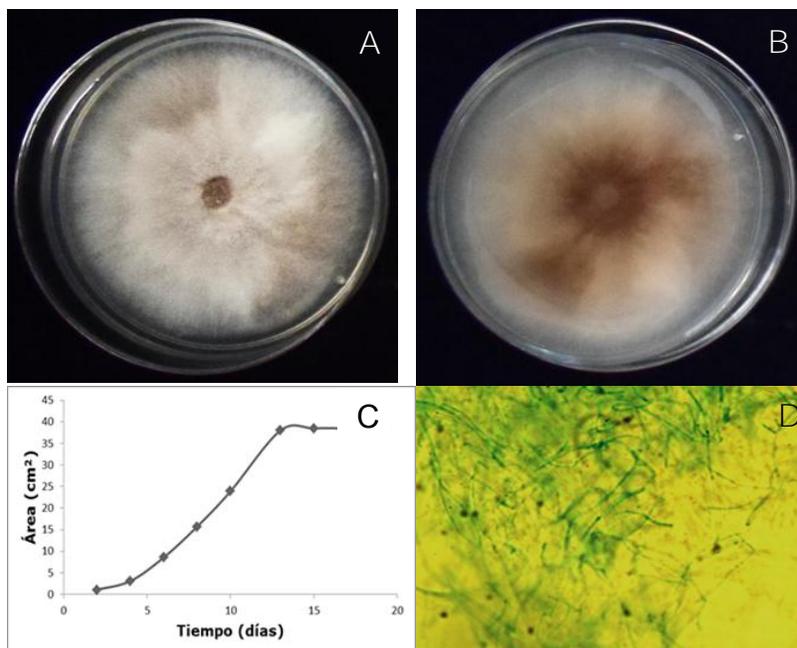


Figura 34. Endófito GsE26. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

1.2 Hongos fitopatógenos aislados de *Gliricidia sepium*

GsF1

En el anverso se observa micelio inmerso y aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color gris oxford con la orilla blanca, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo se pigmenta de color verde oscuro en algunas zonas y orilla blanca. Su crecimiento es radial limitado y sus bordes son irregulares. Produce exudado hialino y de color negro. No produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo (Figura 35 A). En el reverso, el micelio es de color negro con la orilla blanca (Figura 35 B). La tasa de crecimiento del hongo fitopatógeno GsF1 es de $1.1 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 35 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, dematiáceas, septadas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción (Figura 35 D).

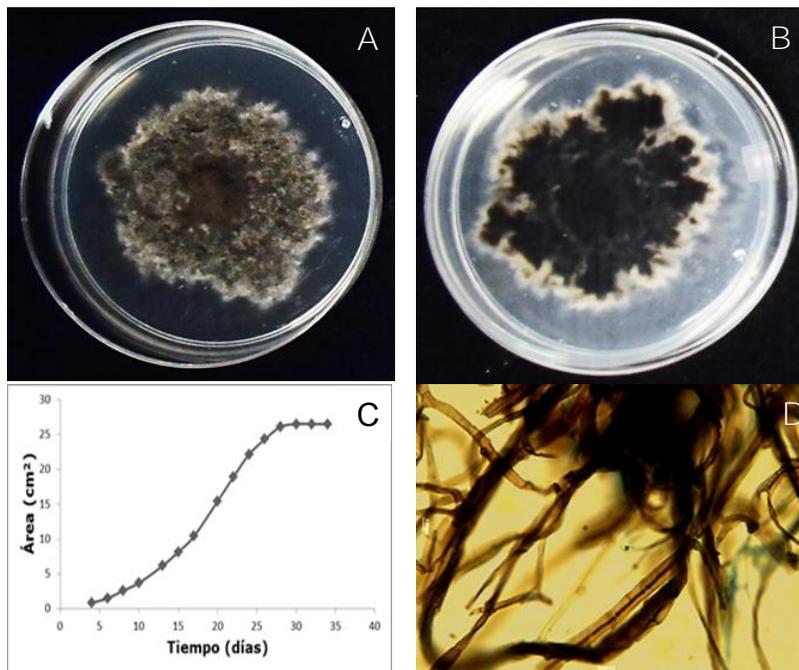


Figura 35. Fitopatógeno GsF1. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

GsF2

En el anverso se observa micelio aéreo de apariencia vellosa/algodonosa, de color lila en el centro y orilla blanca, de superficie plana y consistencia blanda. El color del micelio permanece con el transcurso del tiempo. Su crecimiento es radial y sus bordes son irregulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo. (Figura 36 A). En el reverso, el micelio es de color morado y orilla blanca (Figura 36 B). La tasa de crecimiento de éste hongo fitopatógeno es de $4.2 \text{ cm}^2/\text{día}$ (Figura 36 C). Las características microscópicas observadas son: hifas delgadas, hialinas, septadas, esporas ovaladas agrupadas al final de la hifa y esporas libres (Figura 36 D).

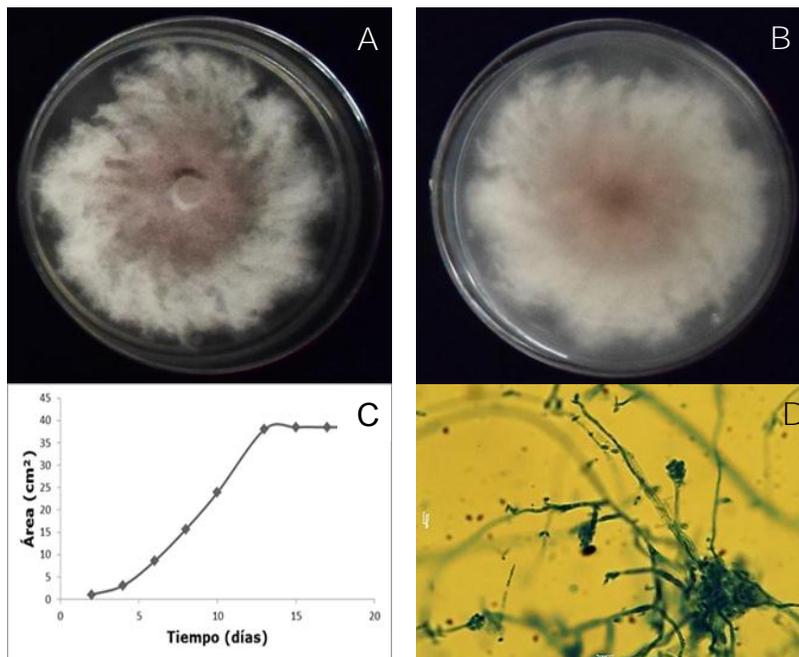


Figura 36. Fitopatógeno GsF2. **A.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (anverso). **B.** Crecimiento de 25 días en medio PDA (reverso). **C.** Curva de crecimiento del cultivo puro en PDA. **D.** Observación microscópica en 40X, teñida con azul de lactofenol.

Cabe mencionar que la homogeneidad observada durante la determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *G. sepium*, permitió corroborar su pureza. Por otra parte y considerando que las cuatro repeticiones empleadas en esta determinación crecieron a la misma tasa de crecimiento, permitió confirmar que los aislamientos en estudio pertenecen a un solo morfotipo.

En el caso particular de los hongos GsE8, GsE9, GsE10, GsE11 y GsE18 el análisis detallado de sus características macro y microscópicas, llevadas a cabo en medio PDA y mediante la observación de preparaciones frescas de sus micelios, fue posible establecer que probablemente pertenecen a los géneros *Nodulisporium* sp., *Fusarium* sp. y *Xylaria*, respectivamente. Sin embargo, para identificar el género y especie inequívocamente, de todos los hongos aislados de *G. sepium* es necesario un análisis profundo de las características macro y microscópicas observadas en diferentes medios de cultivo y realizar estudios moleculares.

Con base en la tasa de crecimiento de cada hongo, se clasificaron arbitrariamente en 5 categorías. En el Cuadro 2 se muestra la categoría en la cual se ubicaron los 26 hongos endófitos y los 2 hongos fitopatógenos aislados de *Gliricidia sepium*.

Cuadro 2. Clasificación de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Gliricidia sepium* con base en su tasa de crecimiento.

| Tasa de crecimiento (cm²/día) | Hongos |
|---|--|
| Muy lenta 1.0-4.0 | GsE16, GsE17, GsE18, GsE19, GsE20, GsE21, GsE22, GsE23, GsE26, GsF1 |
| Lenta (4.1-6.5) | GsE1, GsE2, GsE3, GsE4, GsE5, GsE6, GsE24, GsE25, GsF2 |

Cuadro 2. Clasificación de los hongos endófitos y fitopatógeos de *Gliricidia sepium* con base en su tasa de crecimiento (continuación).

| Tasa de crecimiento (cm ² /día) | Hongos |
|---|----------------------------|
| Moderada (6.6-9.0) | GsE7 |
| Rápida (9.1-12.0) | GsE8, GsE9, GsE10, GsE11 |
| Muy rápida (12.1-13.5) | GsE12, GsE13, GsE14, GsE15 |

Con respecto a la tasa de crecimiento de los hongos en estudio mostrada en las Figuras 12 C-15 C, se observa que en las curvas de crecimiento, no se aprecia la fase de latencia de los microorganismos. Esto se atribuye a que los inóculos se tomaron de cultivos en condiciones óptimas de crecimiento, por lo tanto, el hongo no tuvo que adaptarse debido a que se inoculó en un medio de cultivo con la misma composición. Es por esto que, como primera fase de crecimiento se observa la logarítmica o exponencial, seguida de la fase estacionaria que indica que el cultivo ha llegado al equilibrio celular, es decir, que la tasa de crecimiento es igual a la tasa de muerte. Esta fase es la más importante si lo que se desea obtener son los metabolitos secundarios biosintetizados (French & Hebert, 1980; Hernandez *et al.*, 2003).

2. Bioensayos de antagonismo directo entre hongos endófitos

Una vez que se confirmó la pureza de los aislamientos, se procedió a realizar bioensayos *in vitro* de antagonismo directo entre hongos endófitos aislados de *G. sepium* con el fin de seleccionar a los endófitos con mayor potencial antagónico. En el Cuadro 3 se muestran los grupos en los cuáles fueron asignados los hongos endófitos en estudio, con base en su tasa crecimiento y su morfotipo establecido de acuerdo con el color de su micelio.

Cuadro 3. Grupos asignados a los hongos endófitos puros de *G. sepium* con base en su tasa crecimiento y morfotipo.

| Grupo | Tasa de Crecimiento | Morfotipos | Hongos endófitos |
|-------|---------------------|---|-------------------------------------|
| I | Muy lenta y lenta | Micelio Blanco | GsE1, GsE2, GsE3, GsE4, GsE5, GsE6. |
| II | Muy lenta | Micelio de diferente color al blanco | GsE16, GsE17, GsE18. |
| III | Muy lenta | Micelio de diferente color al blanco | GsE19, GsE20, GsF1. |
| IV | Muy lenta | Micelio color blanco en el anverso y café en el reverso | GsE21, GsE22, GsE23 |
| V | Lenta | Micelio de diferente color al blanco | GsE24, GsE25, GsE26, GsF2. |
| VI | Media | Micelio de diferente color al blanco | GsE7, GsE8, GsE9, GsE10, GsE11. |
| VII | Rápida | Micelio color verde grisáceo | GsE12, GsE13, GsE14, GsE15. |

2.1. Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo I

En la Figura 37 se muestra a manera de ejemplo el antagonismo entre los hongos endófitos GsE1 vs GsE3 y los hongos GsE2 vs GsE4, a las 3 semanas después de que alcanzaron su máximo crecimiento. En ambos casos se observa que el tipo de interacción es similar, los hongos de prueba compiten fuertemente por espacio y nutrientes creciendo sin entremezclar sus micelios. Los endófitos GsE1 y GsE2 crecen casi en contacto con sus competidores GsE3 GsE4, respectivamente y cesan su crecimiento antes de que sus hifas hagan contacto (interacción tipo C; Cuadro 1).

En general, todos los antagonismos entre los endófitos de este grupo, presentan el mismo tipo de interacción. En ningún bioensayo realizado los hongos crecieron por encima de su competidor, ni tampoco mostraron inhibición considerable a distancia. Este comportamiento puede atribuirse, además de la fuerte competencia por espacios y nutrientes, a la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, por parte de ambos endófitos, y que se difunden en el medio de cultivo (no necesariamente coloridos), cesando el crecimiento de ambas especies y, en consecuencia, sus micelios no hacen contacto (Boddy, 2000). Sin embargo, no hay inhibición aparente debida a la presencia de metabolitos secundarios volátiles (VOCs), efectivos a distancia, debido a que ambos competidores crecen de manera normal, deteniendo su crecimiento hasta que se encuentran cerca.



Figura 37. Antagonismo directo entre hongos endófitos del grupo I, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento. **A.** Antagonismo entre los hongos GsE2 vs GsE4. Anverso (izq.) y reverso (der.). **B** Antagonismo entre los hongos GsE1 vs GsE3. Anverso (izq.) y reverso (der.).

En el Cuadro 4 se presentan los porcentajes de inhibición de los 6 hongos endófitos antagonizados entre sí, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento en las cajas de Petri. Como es de esperarse, debido a la fuerte competencia entre los microorganismos de este grupo, los porcentajes de inhibición provocados por los endófitos de prueba sobre el crecimiento de sus competidores no muestra valores altos, a pesar de ser estadísticamente significativos. En general, se observa que los porcentajes de inhibición no son mayores al 30.0%. El hongo GsE1 no inhibió de manera significativa a ninguno de sus competidores. En contraste, el hongo GsE6 inhibe significativamente a la mayoría de sus competidores. Asimismo, el hongo GsE6 no fue inhibido de manera significativa por ninguno de sus competidores.

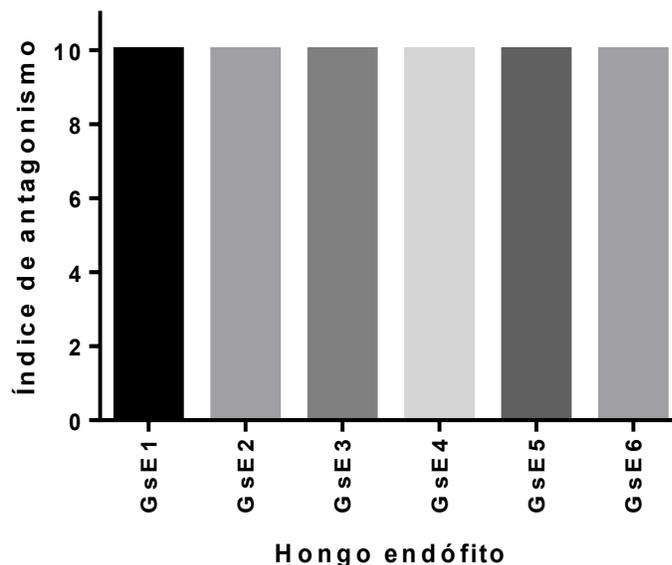
Por otra parte, no se observó modificación macroscópica de ninguno de los micelios de los hongos competidores.

Cuadro 4. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los endófitos GsE1-GsE6 en bioensayos de antagonismo directo, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento en la caja de Petri.

| Hongo endófito | GsE1 | GsE2 | GsE3 | GsE4 | GsE5 | GsE6 |
|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------|
| GsE1 | ---- | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 9.3±0.4 | 0.0±0.0 | 4.7±0.2 |
| GsE2 | 23.1±2.2* | ---- | 7.4±2.5 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 12.5±2.6 |
| GsE3 | 25.0±3.7* | 27.4±2.2* | ---- | 4.8±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| GsE4 | 19.7±2.0* | 19.7±2.0* | 14.3±2.1* | ---- | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| GsE5 | 14.3±2.1 | 22.2±1.6* | 14.5±2.5 | 12.9±3.8 | ---- | 5.0±0.3 |
| GsE6 | 15.3±2.4* | 22.9±2.5* | 10.1±2.5 | 18.5±2.0* | 28.3±1.8* | ---- |

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

En la Gráfica 1 se muestra el índice de antagonismo (IA) calculado para cada hongo competidor. Todos los endófitos de este grupo presentan un IA de 10. Este valor corrobora que todos los hongos endófitos dentro de esta categoría compiten fuertemente y, al mostrar todos ellos una interacción tipo C (Cuadro 1), los valores asignados a su IA son iguales para todos los microorganismos, indicando que todos poseen un importante potencial antagónico. En consecuencia, en esta categoría el IA no aporta suficiente información para establecer cuál o cuáles endófitos son los que presentan mayor potencial antagónico. Por lo anterior y para reducir el número de endófitos en estudio con potencial antagónico, de este grupo sólo se tomó en cuenta el porcentaje de inhibición. Como se indicó anteriormente, el endófito GsE6 es el hongo que inhibe significativamente al mayor número de competidores, inhibiendo significativamente a cuatro de los cinco microorganismos y también es el único hongo de este grupo que no es inhibido de manera significativa por sus competidores (Cuadro 4). Con base en esta información se seleccionó al hongo GsE6 como el hongo con mayor potencial antagónico del grupo I (hongos endófitos de crecimiento muy lento de morfotipo blanco).



Gráfica 1. Índice de antagonismo de los hongos endófitos GsE1-GsE6.

2.2. Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo II

En la Figura 38 se muestran las interacciones antagónicas entre los hongos GsE16 vs GsE17, GsE16 vs GsE18 y GsE17 vs GsE18, pertenecientes a los endófitos del grupo II, observándose que los competidores no entremezclan sus hifas. Ambos microorganismos detienen su crecimiento, debido posiblemente a la producción de metabolitos secundarios y/o enzimas que difunden en el medio de cultivo (Boddy, 2000; Rotheray et al., 2011). En el caso particular de la interacción entre GsE16 y GsE17 (Figura 38 A) se observa en la zona de interacción antagónica una disminución en la producción de las hifas del hongo GsE17. Por otra parte, en la Figura 38 B y C se aprecia que el hongo GsE18 crece encima de sus competidores y detiene su crecimiento. Además, en la Figura 38 B se observa que el endófito GsE18 crece por completo encima y debajo del micelio del hongo GsE16, mientras que en el caso del competidor GsE17 su crecimiento es solo por encima y en forma moderada, sin embargo, si inhibe su crecimiento de manera significativa.



Figura 38. Antagonismo directo entre los hongos endófitos del grupo II, 3 semanas después de haber hecho contacto. **A.** Antagonismo entre los hongos GsE16 vs GsE17. Anverso (izq.) y reverso (der.). **B.** Antagonismo entre los hongos GsE16 vs GsE18. Anverso (izq.) y reverso (der.). **C.** Antagonismo entre los hongos GsE17 vs GsE18. Anverso (izq.) y reverso (der.).

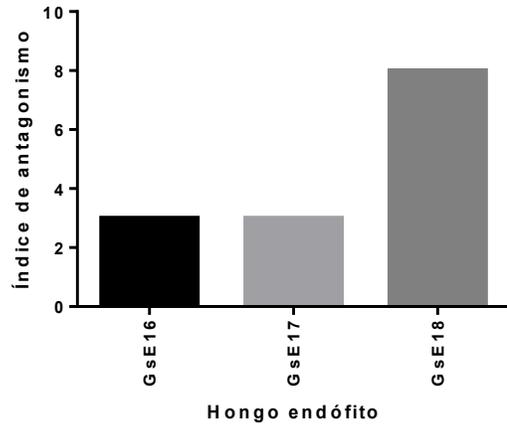
En el Cuadro 5 se muestran los porcentajes de inhibición de los 3 hongos de este grupo, 3 semanas después de que hicieron contacto sus micelios. De manera muy clara se aprecia que el hongo GsE18 es el único que inhibió a sus competidores de manera significativa, inhibiendo al hongo GsE16 en un 100.0%.

Cuadro 5. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los endófitos GsE16-GsE18 en bioensayos de antagonismo directo, 3 semanas después de haber hecho contacto sus micelios.

| Hongo endófito | GsE16 | GsE17 | GsE18 |
|----------------|-------------------|------------------|---------|
| GsE16 | ---- | 15.9±2.3 | 0.0±0.0 |
| GsE17 | 15.7±2.4 | ---- | 0.0±0.0 |
| GsE18 | 100.0±0.0* | 27.1±2.5* | ---- |

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

En la Gráfica 2 se observa el IA calculado para los hongos del grupo II. El endófito GsE18 presenta el mayor IA, este microorganismo, al crecer por encima de sus competidores pertenece a la categoría E1, una de las dos categorías de interacción entre microorganismos con mayor puntaje (Cuadro 1). En contraste, los hongos GsE16 y GsE17 pertenecen a la categoría B1 con menor número de puntos. Con base en el porcentaje de inhibición y el índice de antagonismo, se seleccionó al endófito GsE18 como el hongo con mayor potencial antagónico de este grupo (hongos endófitos de crecimiento muy lento de diferentes colores).



Gráfica 2. Índice de antagonismo de los hongos endófitos GsE16-GsE18.

2.3 Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo III

En la Figura 39 se muestran las interacciones antagónicas entre los hongos GsE19 vs GsE20, GsE19 vs GsF1 y GsE20 vs GsF1. En la Figura 39 A se observa que el endófito GsE19 crece moderadamente por encima de su competidor. En la Figura 39 B se observa que ambos microorganismos detienen su crecimiento, debido posiblemente a la producción de metabolitos secundarios y/o enzimas que se difunden en el medio de cultivo (Evans *et al.*, 2008; Rotheray *et al.*, 2011). Por otra parte, en la Figura 39 C se observa en la zona de interacción antagónica que el endófito GsE20 produce compuestos color café que se difunden al medio de cultivo, también se aprecia al producción de una barrera micelial que impide el crecimiento de su competidor y ambos hongos cesan su crecimiento (Boddy, 2000).

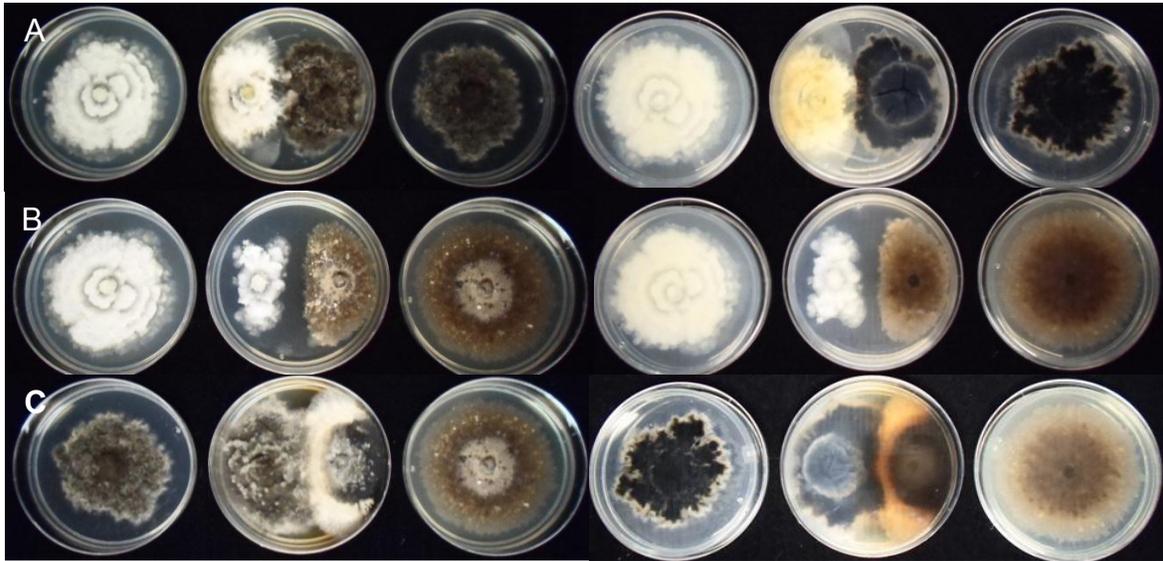


Figura 39. Antagonismo directo entre hongos del grupo III, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento. **A** Antagonismo entre los hongos GsE19 vs GsF1. Anverso (izq.) y reverso (der.). **B** Antagonismo entre los hongos GsE19 vs GsE20. Anverso (izq.) y reverso (der.). **C** Antagonismo entre los hongos GsF1 vs GsE20. Anverso (izq.) y reverso (der.).

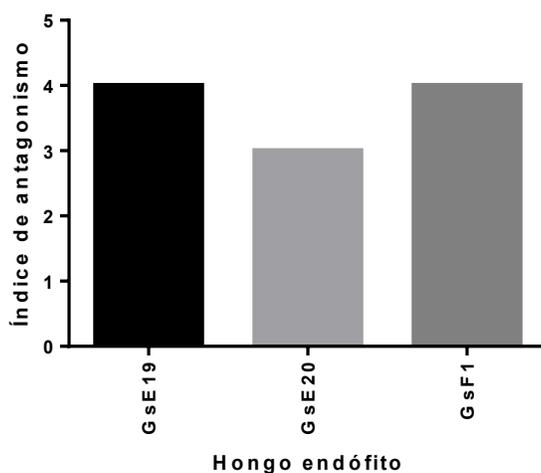
En el Cuadro 6 se muestran los porcentajes de inhibición de los hongos competidores, 3 semanas después de que hicieron contacto sus micelios. Aunque en las imágenes de los bioensayos de antagonismo directo entre los hongos de esta categoría podemos notar interacciones interesantes que permiten inferir posibles mecanismos de defensa físicos como es la formación de barreras miceliales, y químicos como la producción de pigmentos que difunden en el medio (potenciales metabolitos secundarios), ninguno de los hongos antagonizados inhibió de manera significativa a sus dos competidores. Indicando de nueva cuenta que son endófitos con alto potencial antagónico y que posiblemente estos microorganismos desempeñen un importante papel de defensa hacia su hospedera (Boddy, 2000; Hall & Brunswick, 2007; Mejía *et al.*, 2008).

Cuadro 6. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos GsE19, GsE20 y GsF1 en bioensayos de antagonismo directo, 3 semanas después de haber hecho contacto sus micelios.

| Hongo | GsE19 | GsE20 | GsF1 |
|--------------|------------------|---------|---------|
| GsE19 | ---- | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| GsE20 | 39.1±1.4* | ---- | 0.0±0.0 |
| GsF1 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | ---- |

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

En la Gráfica 3 se muestra el IA calculado para los hongos del grupo III. Se aprecia que, en general, ninguno obtuvo valores de IA mayores a 4, debido a que no se observaron interacciones que fueran del todo inhibitorias hacia el competidor, es por esto que, con base en los porcentajes de inhibición donde se determinó que ninguno de los hongos inhibió de manera significativa a sus dos competidores y observando que ningún hongo presenta un IA mayor a 4, no se seleccionó a ningún hongo perteneciente al grupo III (hongos endófitos de crecimiento muy lento y micelio de diferentes colores).



Gráfica 3. Índice de antagonismo de los hongos GsE19, GsE20 y GsF1.

2.4 Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo IV

En la Figura 40 se muestran las interacciones antagónicas entre los endófitos GsE21 vs GsE22, GsE21 vs GsE23 y GsE22 vs GsE23. Se observa que en los tres casos (Figura 40 A, B y C) los competidores dejan un espacio entre ellos en la zona de interacción, ambos microorganismos cesan su crecimiento y por lo tanto sus hifas no llegan a entremezclarse, esto se debe posiblemente a la producción de metabolitos secundarios y/o enzimas (Boddy, 2000; Rotheray *et al.*, 2011). Además, el hongo GsE21 crece alrededor de sus competidores (Figura 40 A y B) e inhibe, de manera moderada, el crecimiento de estos.

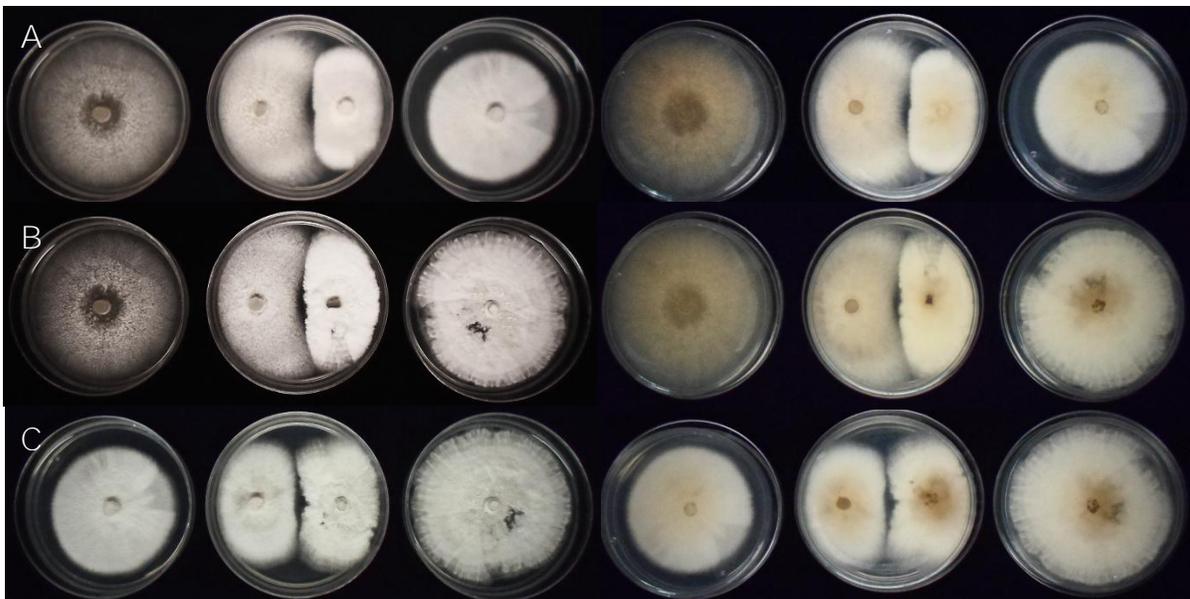


Figura 40. Antagonismo directo entre hongos del grupo IV, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento. **A.** Antagonismo entre los hongos GsE21 vs GsE22. Anverso (izq.) y reverso (der.). **B.** Antagonismo entre los hongos GsE21 vs GsE23. Anverso (izq.) y reverso (der.). **C.** Antagonismo entre los hongos GsE22 vs GsE23. Anverso (izq.) y reverso (der.).

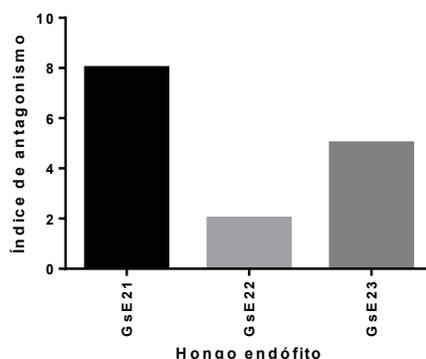
En el Cuadro 7 se muestran los porcentajes de inhibición de los hongos endófitos antagonizados pertenecientes al grupo IV. Como se observa, ninguno de los endófitos inhibe de manera significativa el crecimiento de sus competidores.

Cuadro 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos GsE21-GsE23 en bioensayos de antagonismo directo, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento.

| Hongo endófito | GsE21 | GsE22 | GsE23 |
|----------------|---------|----------|----------|
| GsE21 | ----- | 13.3±2.9 | 11.4±2.0 |
| GsE22 | 0.0±0.0 | ----- | 0.0±0.0 |
| GsE23 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | ----- |

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

En la Gráfica 4 se muestra el IA calculado para los endófitos del grupo IV. Se aprecia que al valor más alto pertenece al hongo GsE21, esto es la consecuencia de su crecimiento alrededor de sus competidores (Figura 40 A y B), por lo tanto pertenece a la categoría E2, la cual es una de las dos categorías de interacciones entre microorganismos con más puntos (Cuadro 1). Cabe mencionar que el hongo GsE21 crece completamente alrededor de sus competidores después de 5 semanas de interacción antagónica. Con base en estas observaciones y en su IA, se eligió al hongo GsE21 como el endófito más antagónico del grupo IV (hongos endófitos de crecimiento muy lento y micelio color blanco en el anverso y café en el reverso).



Gráfica 4. Índice de antagonismo de los hongos GsE21-GsE23.

2.5 Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo V

En la Figura 41 se muestran tres ejemplos de los bioensayos de antagonismo realizados entre hongos del grupo V, los endófitos GsE24, GsE25 y GsE26 vs el fitopatógeno GsF2. En la Figura 41 A se observa que el hongo GsE24 se defiende ante su competidor mediante la producción de prolongaciones que salen de su micelio en forma de “dedos”, que crecen sobre el micelio del hongo GsF2 y forman una barrera que impide que éste siga creciendo. En el reverso de la caja de Petri se observa que el hongo GsF2 produce pigmento rojizo que difunde en el medio de cultivo. Sin embargo, éste no impide que el endófito GsE24 crezca sobre su micelio. En la Figura 41 B se observa que el endófito GsE25 cambia morfológicamente cuando está en antagonismo con su competidor GsF2, el endófito GsE25 produce micelio más esponjoso y grueso. Asimismo crece sobre el micelio de GsF2 e inhibe por completo su crecimiento. En el reverso de la caja de Petri se aprecia que el hongo GsF2 produce un pigmento rojizo que difunde en el medio de cultivo. Sin embargo, una vez más, no es lo suficientemente potente para impedir que el endófito GsE25 crezca sobre su micelio. Por último, en la Figura 41 C se muestra un ejemplo en donde el hongo GsF2 cesa el crecimiento de su competidor creciendo alrededor de éste.

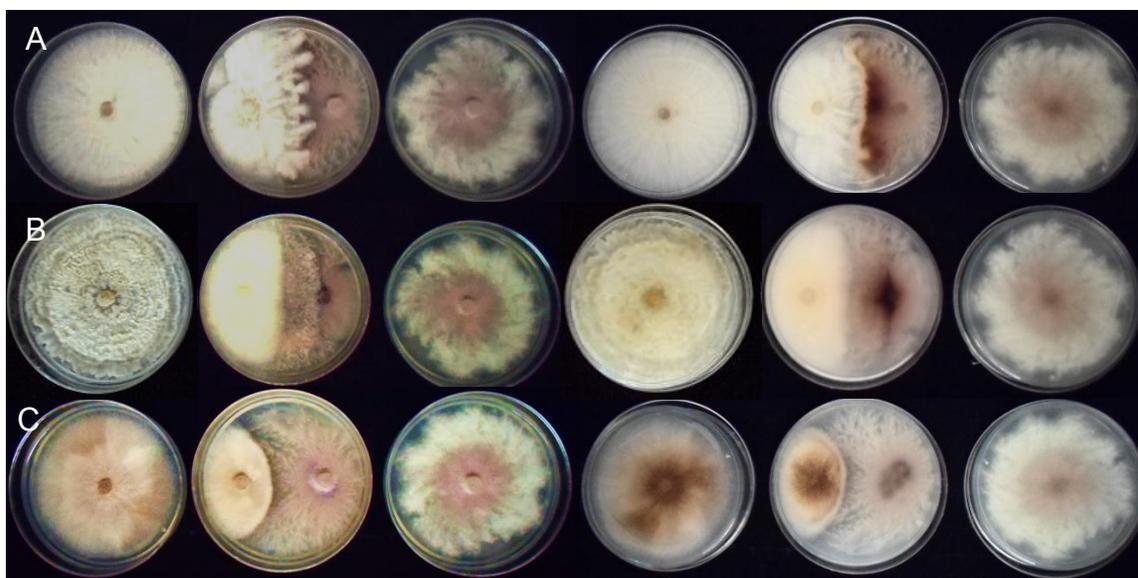


Figura 41. Antagonismo directo entre hongos del grupo V, 3 semanas después de haber hecho contacto. **A** Antagonismo entre los hongos GsE24 vs GsF2. Anverso (izq.) y reverso (der.). **B** Antagonismo entre los hongos GsE25 vs GsF2. Anverso (izq.) y reverso (der.). **C** Antagonismo entre los hongos GsE26 vs GsF2. Anverso (izq.) y reverso (der.).

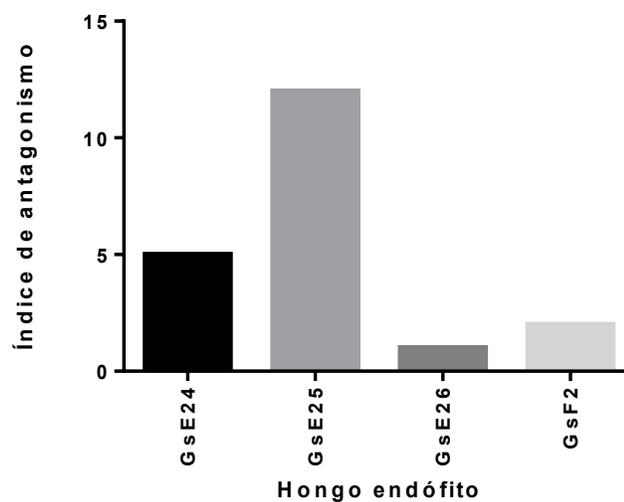
En el Cuadro 8 se muestran los porcentajes de inhibición de los cuatro hongos antagonizados pertenecientes al grupo V. Se aprecia que los endófitos GsE24 y GsE25 presentan un alto potencial antagónico al inhibir de manera significativa el crecimiento del fitopatógeno GsF2. Particularmente, el endófito GsE25 inhibe en un 100.0% al hongo GsF2.

Cuadro 8. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos GsE21- GsE23 y el hongo GsF2 en bioensayos de antagonismo directo, 3 semanas después de haber hecho contacto sus micelios.

| Hongo | GsE24 | GsE25 | GsE26 | GsF2 |
|--------------|----------|---------|------------------|-------------------|
| GsE24 | ---- | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 57.9±0.0* |
| GsE25 | 0.0±0.0 | ---- | 17.0±2.9* | 100.0±0.0* |
| GsE26 | 10.1±2.5 | 0.0±0.0 | ---- | 0.0±0.0 |
| GsF2 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 34.1±3.2* | ---- |

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

En la Gráfica 5 se presenta el IA calculado para los hongos del grupo V. Los hongos GsE24 y GsE25 presentan los valores más altos al inhibir a uno y dos de sus competidores, respectivamente. Ambos microorganismos pertenecen a la categoría E1 pues inhiben a sus competidores al crecer por encima de ellos (Cuadro 1). Con base en el IA y los porcentajes de inhibición determinados, se eligieron a los endófitos GsE24 y GsE25 como los hongos con mayor potencial antagonístico del grupo V (hongos endófitos de crecimiento lento y micelios de diferentes colores).



Gráfica 5. Índice de antagonismo de los hongos GsE24-GsE26 y GsF2.

2.6 Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo VI

En la Figura 42 se muestran a manera de ejemplo los bioensayos de antagonismo realizados entre los endófitos GsE7 vs GsE9, GsE7 vs GsE10 y GsE8 vs GsE10. En la Figura 42 A se observa que el hongo GsE9 crece sobre su competidor GsE7 e inhibe su crecimiento. En la Figura 42 B se observa que el endófito GsE10 inhibe el crecimiento de su competidor, el hongo GsE7, creciendo sobre este.

Por último, se muestra la interacción entre los hongos GsE10 y GsE8, ambos endófitos crecen entremezclando sus micelios, sin inhibirse (Figura 42 C).

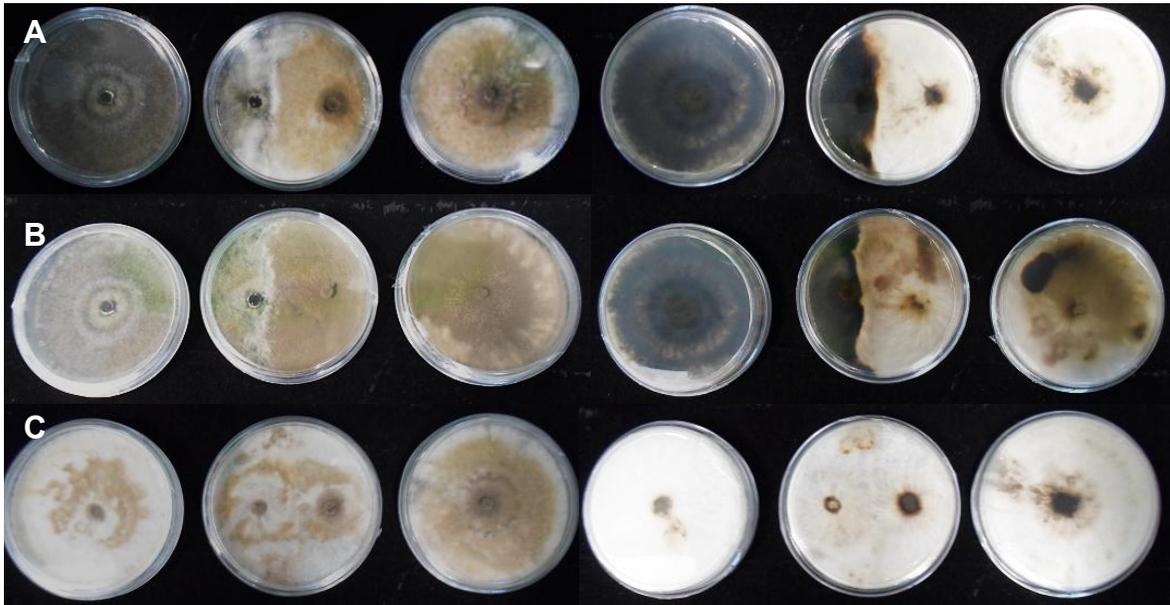


Figura 42. Antagonismo directo entre hongos del grupo VI, 3 semanas después de haber hecho contacto sus micelios. **A.** Antagonismo entre los hongos GsE7 vs GsE9. Anverso (izq.) y reverso (der.). **B.** Antagonismo entre los hongos GsE7 vs GsE10. Anverso (izq.) y reverso (der.). **C.** Antagonismo entre los hongos GsE8 vs GsE10. Anverso (izq.) y reverso (der.).

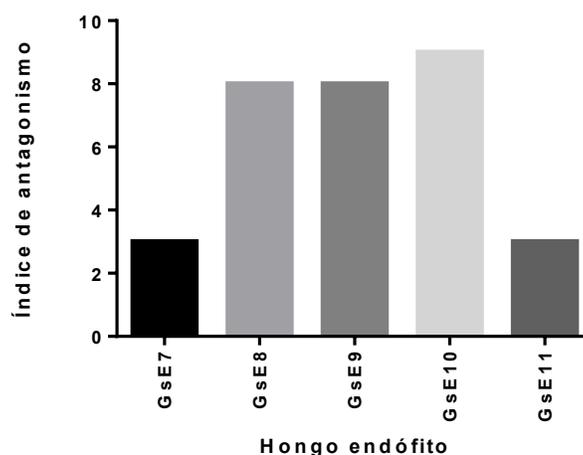
En el Cuadro 9 se presentan los porcentajes de inhibición de los cinco hongos antagonizados. Los endófitos GsE7 y GsE11 no inhiben significativamente a ninguno de sus competidores. En general, los hongos de morfotipo café (GsE8, GsE9 y GsE10) inhiben más del 40% el crecimiento del endófito GsE7. El endófito GsE10 es el único que inhibe de manera significativa al endófito GsE11. También se aprecia que entre los endófitos de morfotipo café no hay inhibición, ya que sus micelios crecen entremezclados.

Cuadro 9. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos GsE7-GsE11 en bioensayos de antagonismo directo, 3 semanas después de haber hecho contacto sus micelios.

| Hongo Endófito | GsE7 | GsE8 | GsE9 | GsE10 | GsE11 |
|----------------|------------------|----------|----------|----------|------------------|
| GsE7 | ---- | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| GsE8 | 53.5±1.5* | ---- | 21.9±1.2 | 12.4±3.0 | 16.2±2.8 |
| GsE9 | 45.7±3.1* | 2.2±3.1 | ---- | 14.0±0.5 | 17.0±1.7 |
| GsE10 | 63.4±1.3* | 6.3±2.8 | 14.9±2.5 | ---- | 27.9±0.9* |
| GsE11 | 19.6±3.1 | 11.1±2.8 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | ---- |

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

En la Gráfica 6 se muestra el IA calculado para cada hongo del grupo VI. Los hongos de morfotipo café muestran los valores de IA más altos. El endófito GsE10 presenta el mayor valor de IA, debido a la inhibición provocada sobre el endófito GsE11 al crecer por encima de éste (categoría E1, Cuadro 1). Con base en el IA y en los porcentajes de inhibición, se eligió al hongo GsE10 como el hongo con mayor potencial antagónico del grupo VI (hongos endófitos de tasa de crecimiento media y micelios de diferentes colores).



Gráfica 6. Índice de antagonismo de los hongos GsE7-GsE11.

2.7 Antagonismo directo entre hongos pertenecientes al Grupo VII.

En la Figura 43 se muestran los bioensayos de antagonismo realizados entre los hongos GsE13 vs GsE15 y GsE12 vs GsE15, tres de los cuatro hongos endófitos de esta categoría. En la Figura 43 A se observa que el endófito GsE13 forma una barrera de micelio con estromas que inhiben el paso de su competidor. Este tipo de interacción se observó en todos los bioensayos realizados con el endófito GsE13. En la Figura 43 B se muestra el antagonismo entre los endófitos GsE12 vs GsE15. Como se puede apreciar, los hongos crecen entremezclando sus micelios y no es fácil diferenciar el crecimiento de cada hongo competidor. En general, los bioensayos de antagonismo entre los endófitos del grupo VII, que no involucran al hongo GsE13, presentaron este tipo de interacción antagónica; es decir, todos los hongos entremezclan su micelio con el de su competidor sin existir ningún tipo de inhibición.

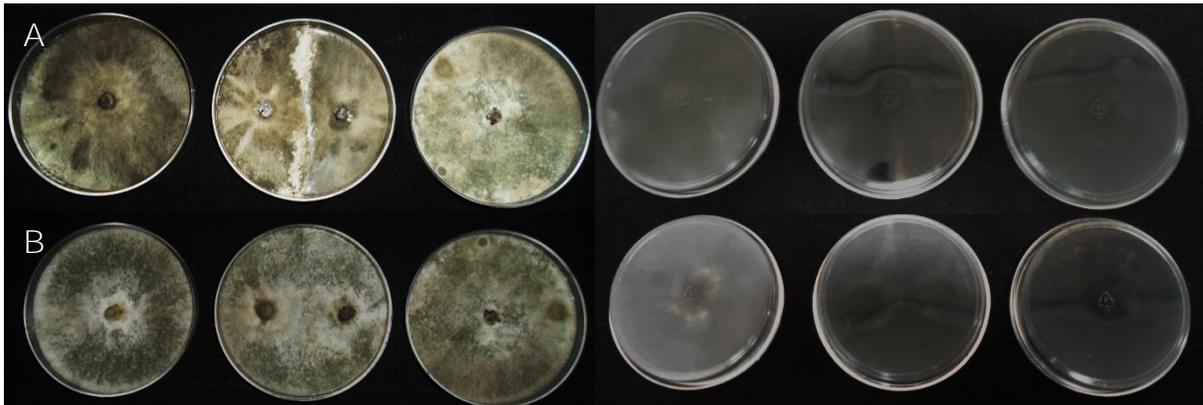


Figura 43. Antagonismo directo entre hongos del grupo VII, 3 semanas después de que sus micelios hicieron contacto. **A.** Antagonismo entre los hongos GsE13 vs GsE15. Anverso (izq.) y reverso (der.). **B.** Antagonismo entre los hongos GsE12 vs GsE15. Anverso (izq.) y reverso (der.).

En el Cuadro 10 se presentan los porcentajes de inhibición en los bioensayos de antagonismo calculados para los hongos del grupo VII. En general, ningún endófito inhibe más del 25.0% el crecimiento de sus competidores y tampoco

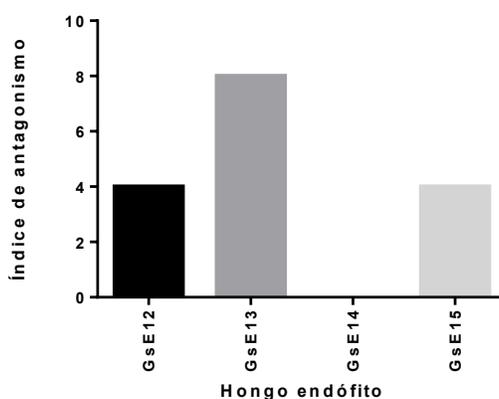
inhiben a más de dos competidores. En el caso particular del hongo GsE13 se observa que ninguno de sus competidores pudo inhibirlo de manera significativa.

Cuadro 10. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los hongos GsE12-GsE15 en bioensayos de antagonismo directo, 3 semanas después de haber hecho contacto sus micelios.

| Hongo endófito | GsE12 | GsE13 | GsE14 | GsE15 |
|----------------|------------------|----------|------------------|------------------|
| GsE12 | ---- | 11.1±2.3 | 21.5±2.1* | 8.3±3.0 |
| GsE13 | 14.3±2.1 | ---- | 21.0±2.5* | 15.6±2.3 |
| GsE14 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | ---- | 20.0±2.4* |
| GsE15 | 19.1±2.1* | 10.4±2.3 | 5.7±2.3 | ---- |

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

En la Gráfica 7 se muestra el IA de los endófitos GsE12-GsE15. El hongo GsE13 muestra el mayor IA, es el único hongo que logró producir una barrera de micelio y estromas encima de sus competidores inhibiendo así su crecimiento. Estas características pertenecen a la categoría E1, la cual, es una categoría con alto valor (Cuadro 1). Con base en el porcentaje de inhibición y el IA, se eligió al hongo GsE13 como el más antagónico del grupo VII (hongos endófitos de crecimiento rápido de micelio color verde grisáceo).



Gráfica 7. Índice de antagonismo de los hongos GsE12-GsE15.

2.8 Antagonismo directo entre hongos con potencial antagónico de *Gliricidia sepium*.

En la Figura 44 se muestran tres ejemplos de las interacciones antagónicas entre los hongos de *G. sepium* con mayor potencial antagónico. En la Figura 44 A se observa el antagonismo entre los hongos endófitos GsE18 vs GsE13, se aprecia que el hongo GsE18 crece encima de su competidor GsE13 y cesa el crecimiento de este. En el reverso de la caja de Petri se observa la producción de pigmentos color café, que se difunden en el medio de cultivo en la zona de interacción antagónica, probablemente estos pigmentos correspondan a metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas y sean los responsables de la inhibición del crecimiento de sus competidores. Aunado a estas características el endófito GsE18 se comporta como micoparásito, haciendo evidente su posible empleo en la agricultura moderna como un agente de control biológico o como productor de moléculas bioactivas (Boddy, 2000; Mejía *et al.*, 2008). En la Figura 44 B se observa el antagonismo entre los hongos GsE13 vs GsE10. En la zona de interacción antagónica el hongo GsE13 produce una barrera micelial que impide el crecimiento de su competidor, ambos microorganismos cesan su crecimiento. Por último, en la Figura 44 C se muestra la interacción entre los hongos GsE6 vs GsE21, en este caso particular, los hongos crecen dejando un espacio entre ellos, lo cual se atribuye, además de la fuerte competencia por espacios y nutrientes, a la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, posiblemente por parte de ambos endófitos, y que se difunden en el medio de cultivo (no necesariamente coloridos) cesando el crecimiento de ambas especies; en consecuencia sus micelios no hacen contacto (Boddy, 2000; Rotheray *et al.*, 2011).

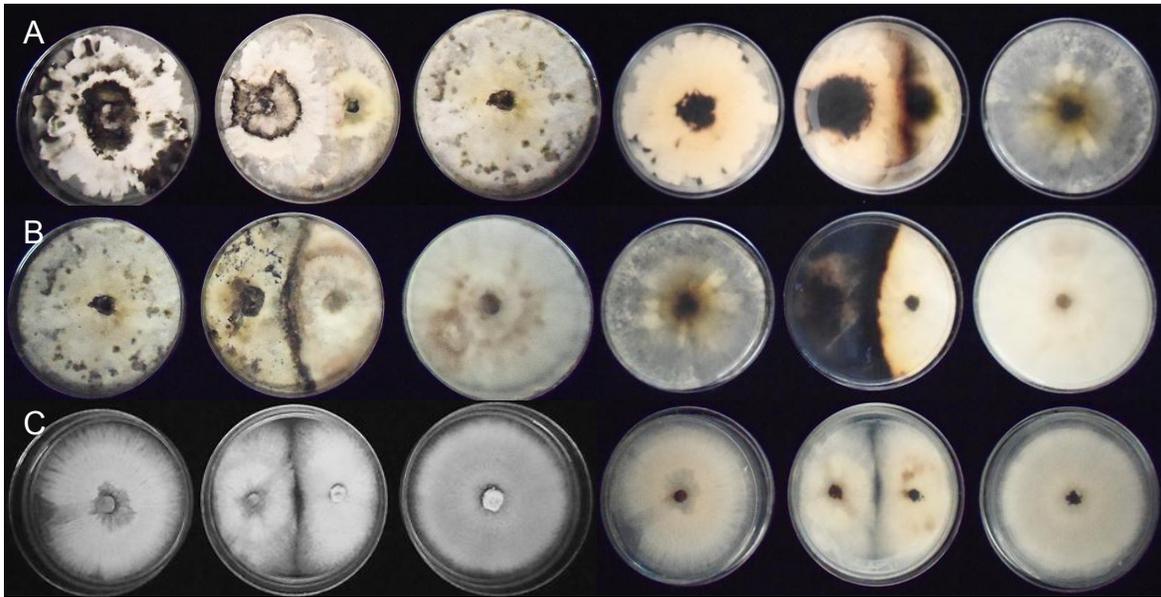


Figura 44. Antagonismo directo entre hongos con potencial antagónico, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento. **A.** Antagonismo entre los hongos GsE18 vs GsE13. Anverso (izq.) y reverso (der.). **B.** Antagonismo entre los hongos GsE13 vs GsE10. Anverso (izq.) y reverso (der.). **C.** Antagonismo entre los hongos GsE6 vs GsE21. Anverso (izq.) y reverso (der.).

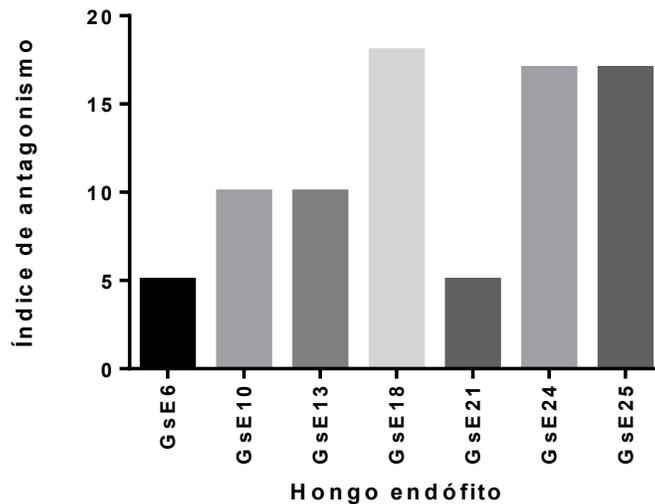
En el Cuadro 11 se presentan los porcentajes de inhibición calculados en los bioensayos de antagonismo de los hongos endófitos de *G. sepium* con mayor potencial antagónico. Los hongos GsE6 y GsE21 no inhiben de manera significativa a ninguno de sus competidores, mientras que ellos son inhibidos por al menos dos de los endófitos competidores. Los hongos GsE24 y GsE25 inhiben de manera significativa y en más del 45.0%, al menos a tres de sus competidores y son los únicos endófitos que no son inhibidos de manera significativa por ningún microorganismo. El hongo GsE18 inhibe en un 100.0% a tres de sus competidores y su crecimiento sólo es inhibido por la presencia de los hongos GsE24 y GsE25. Cabe destacar que los endófitos GsE18, GsE25 y GsE26 presentan un comportamiento como micoparásitos, pues crecen encima de sus competidores y los utilizan como sustrato, por lo tanto, cesan su crecimiento (Boddy, 2000; Harry *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2013).

Cuadro 11. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los endófitos con mayor potencial antagónico de *G. sepium* en bioensayos de antagonismo directo, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento.

| Hongo endófito | GsE6 | GsE10 | GsE13 | GsE18 | GsE21 | GsE24 | GsE25 |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|---------|
| GsE6 | ---- | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| GsE10 | 20.9±2.6 | ---- | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 100.0±0.0* | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| GsE13 | 100.0±0.0* | 0.0±0.0 | ---- | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| GsE18 | 100.0±0.0* | 100.0±0.0* | 100.0±0.0* | ---- | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| GsE21 | 14.9±2.2 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | ---- | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| GsE24 | 23.9±3.1 | 96.9±2.7* | 43.2±3.2 | 100.0±0.0* | 62.7±1.6* | ---- | 0.0±0.0 |
| GsE25 | 65.2±2.6* | 88.9±2.7* | 16.6±2.1 | 45.5±0.0* | 4.4±0.1 | 0.0±0.0 | ---- |

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

En la Gráfica 8 se muestra el IA calculado para los hongos endófitos que presentaron mayor potencial antagónico. Como es de esperarse, los hongos GsE18, GsE24 y GsE25 fueron asignados la categoría E1 de acuerdo con el tipo de interacción que presentaron (Cuadro 1), mostrando los mayores IA.



Gráfica 8. Índice de antagonismo de los hongos endófitos con mayor potencial antagónico.

Como parte del establecimiento del potencial antagónico de los hongos endófitos de *G. sepium*, los hongos endófitos GsE6, GsE10, GsE13, GsE18, GsE21, GsE24 y GsE25 también se antagonizaron en presencia de cinco microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura: *A. solani*, *F. oxysporum*, *P. aphanidermatum*, *P. capsici* y *P. parasitica*. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

2.9 Antagonismo directo entre hongos endófitos de *G. sepium* con potencial antagónico vs microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola.

En la Figura 45 se muestran cinco ejemplos representativos de los bioensayos de antagonismo directo realizados entre los hongos endófitos de *G. sepium* con

mayor potencial antagónico sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos: *A. solani*, *F. oxysporum*, *P. aphanidermatum*, *P. capsici* y *P. parasitica*. En la Figura 45 A se observa el antagonismo entre el endófito GsE18 y el fitopatógeno *A. solani*. En el anverso y reverso de la caja de Petri se aprecia que el hongo GsE18 crece encima de su competidor, comportándose quizá como un micoparásito; por lo tanto inhibe el crecimiento de su competidor. En la Figura 45 B, se presenta el antagonismo entre el endófito GsE24 y el fitopatógeno *F. oxysporum*. Se aprecia que el endófito cambia su morfotipo, su micelio se torna color café verdoso cuando está en interacción con su competidor, lo cual puede ser parte de sus mecanismos de defensa permitiéndole crecer por encima del fitopatógeno y, comportarse como un micoparásito al utilizar como sustrato el micelio del fitopatógeno (Boddy, 2000; Hu *et al.*, 2013; Rotheray *et al.*, 2011). En la Figura 45 C se presenta el antagonismo entre el endófito GsE21 y el fitopatógeno *P. aphanidermatum*. En esta interacción el endófito GsE21 cambia su morfología produciendo micelio de apariencia muy algodonosa, al mismo tiempo crea una barrera micelar que impide el crecimiento del fitopatógeno competidor y crece por encima de este. En la Figura 45 D se muestra el antagonismo entre el hongo GsE10 y *P. capsici*. Se aprecia de manera muy clara que el hongo GsE10 crece completamente por encima de su competidor por lo cual es probable que su comportamiento sea el de un micoparásito. En la Figura 45 E se muestra el antagonismo entre el hongo GsE16 y *P. parasitica*. En el anverso de la caja de Petri se aprecia que el endófito GsE6 produce micelio de apariencia muy algodonosa que en primera instancia crea una barrera micelar para después crecer por encima de su competidor. En el reverso de la caja se observa la producción de pigmentos morados por parte del fitopatógeno, en respuesta al ataque del endófito y que se difunden en el medio de cultivo en la zona de interacción antagónica; sin embargo, no son lo suficientemente potentes para impedir que el endófito GsE6 crezca sobre su micelio. En general, todos los endófitos que fueron seleccionados inhiben a los fitopatógenos mediante el crecimiento de su micelio sobre su competidor, por lo cual todos estos probablemente establecen una relación de micoparasitismo y constituyen

candidatos potenciales para el desarrollo de agentes de control biológico (Boddy, 2000; Evans *et al.*, 2008; Lira-Saldívar, 2007; Rotheray *et al.*, 2011).



Figura 45. Antagonismo directo entre hongos con el mayor potencial antagónico contra microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola, 3 semanas después de haber hecho contacto sus micelios. **A.** Antagonismo entre GsE18 vs *A. solani*. Anverso (izq.) y reverso (der.). **B.** Antagonismo entre GsE24 vs *F. oxysporum*. Anverso (izq.) y reverso (der.). **C.** Antagonismo entre GsE21 vs *Pythium aphanidermatum*. Anverso (izq.) y reverso (der.). **D.** Antagonismo entre GsE10 vs *Phytophthora capsici*. Anverso (izq.) y reverso (der.). **E.** Antagonismo entre GsE6 vs *Phytophthora parasitica*. Anverso (izq.) y reverso (der.).

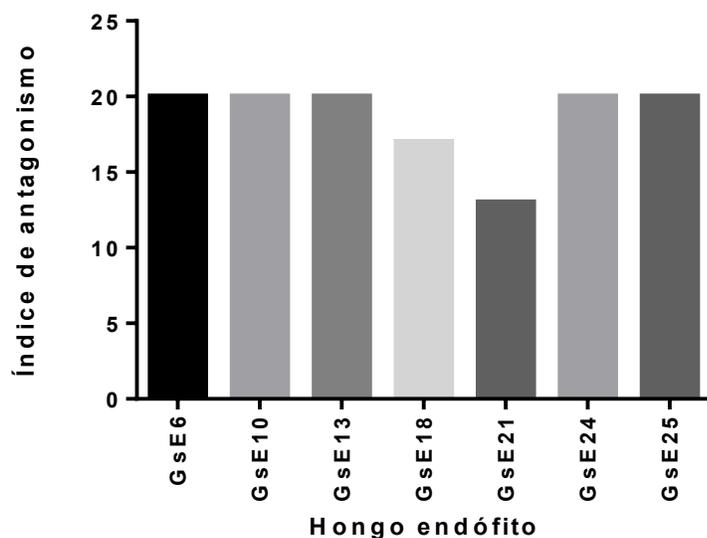
En el Cuadro 12 se muestran los porcentajes de inhibición en los bioensayos de antagonismo directo entre los hongos endófitos seleccionados contra los cinco microorganismos con importancia agrícola. Se observa que con excepción del endófito GsE21, todos los hongos endófitos inhiben de manera significativa al menos a cuatro de sus competidores fitopatógenos. Cabe destacar que, aunque inhiben de manera significativa a sus competidores, los microorganismos que más se ven afectados son los oomicetos. En general, todos los endófitos inhiben el crecimiento de estos microorganismos de manera significativa; en el caso de los hongos GsE6, GsE10 y GsE24, la inhibición de su crecimiento es del 100.0%. También se aprecia que el endófito GsE21 no inhibe el crecimiento de los dos hongos verdaderos de prueba, mostrando un efecto selectivo hacia los oomicetos. Los hongos GsE13 y GsE24 son los únicos dos endófitos que inhiben significativamente a sus cinco competidores

En la Gráfica 9 se muestra el IA calculado para los hongos endófitos que presentaron mayor potencial antagónico sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola. Como se aprecia todos los endófitos presentan valor alto de IA, debido a que en su mayoría el tipo de interacción antagónica que mostraron pertenece a la categoría E1 (Cuadro 1), al crecer por encima de su competidor y establecer una relación de micoparasitismo (Boddy, 2000; Hu *et al.*, 2013; Rotheray *et al.*, 2011).

Cuadro 12. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos de prueba en bioensayos de antagonismo directo en presencia de los endófitos de *G. sepium* con mayor potencial antagónico, 3 semanas después de haber alcanzado su máximo crecimiento.

| Hongo endófito/ microorganismo de prueba | <i>A. solani</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>P. aphanidermatum</i> | <i>P. capsici</i> | <i>P. parasitica</i> |
|--|-------------------|---------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|
| GsE6 | 72.9±2.3* | 16.7±2.9 | 100.0±0.0* | 100.0±0.0* | 100.0±0.0* |
| GsE10 | 48.3±2.9* | 0.0±0.0 | 100.0±0.0* | 100.0±0.0* | 100.0±0.0* |
| GsE13 | 100.0±0.0* | 83.1±2.0* | 57.6±2.5* | 38.6±1.6* | 98.5±2.9* |
| GsE18 | 98.3±2.9* | 33.9±2.3* | 0.0±0.0 | 59.9±2.5* | 18.0±2.2 |
| GsE21 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 29.9±3.0* | 100.0±0.0* | 17.5±2.2 |
| GsE24 | 100.0±0.0* | 35.1±0.2* | 100.0±0.0* | 100.0±0.0* | 100.0±0.0* |
| GsE25 | 100.0±0.0* | 24.1±2.7* | 12.5±3.5 | 100.0±0.0* | 100.0±0.0* |

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



Gráfica 9. Índice de antagonismo de los hongos endófitos con mayor potencial antagonístico sobre microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola.

Los hongos GsE6, GsE10, GsE13, GsE18, GsE21, GsE24 y GsE25 aislados de *G. sepium* constituyen especies prometedoras para llevar a cabo su estudio químico biodirigido, con el fin de aislar metabolitos secundarios con potencial antifúngico, útiles para el desarrollo de agroquímicos alternativos, y al mismo tiempo, confirmar si los efectos antagónicos observados en los bioensayos de antagonismo directo en presencias de otros endófitos y de los microorganismos fitopatógenos de prueba, son mediados por la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica.

Además, constituyen una fuente viable para el desarrollo de agentes de control biológico, en particular sobre el hongo fitopatógeno *A. solani* y los oomicetos *P. capsici* y *P. parasitica*.

VII. Conclusiones

El análisis detallado de las características macroscópicas y microscópicas de 26 hongos endófitos y de 2 hongos fitopatógenos, de hojas sanas y enfermas de *G. sepium*, respectivamente, permitió determinar la pureza de los microorganismos y su tasa de crecimiento. Asimismo, permitió inferir el posible género de los hongos endófitos GsE8, GsE9 y GsE10 los cuales presentan características similares a los hongos de los géneros *Nodulisporium*, así como de los endófitos GsE11 y GsE18, que muestran características propias de los géneros *Fusarium* y *Xylaria*, respectivamente.

Con base en su tasa de crecimiento, se encontraron diez endófitos de crecimiento muy lento, nueve de crecimiento lento, uno de crecimiento medio, cuatro de crecimiento rápido y cuatro de crecimiento muy rápido.

Mediante bioensayos de antagonismo directo llevados a cabo entre hongos endófitos con la misma tasa de crecimiento, se seleccionaron a los hongos endófitos GsE6, GsE10, GsE13, GsE18, GsE21, GsE24 y GsE25 como los hongos endófitos con mayor potencial antagónico de *G. sepium*.

En general, todos los hongos seleccionados inhibieron significativamente el crecimiento de sus competidores, mostrando los mayores porcentajes de inhibición, y los valores más altos de índice de antagonismo. El principal mecanismo por medio del cual inhibieron el crecimiento de sus competidores, es aparentemente es físico debido a que crecieron encima de ellos, utilizándolos como sustrato, y por lo tanto comportándose como micoparasitos.

Los hongos endófitos GsE24 y GsE25 inhiben de manera significativa y en más del 45.0%, al menos a tres de sus competidores, y son los únicos endófitos que no son inhibidos de manera significativa por ningún microorganismo competidor.

Los bioensayos *in vitro* de antagonismo directo, representan las posibles interacciones que establecen los hongos endófitos y fitopatógenos dentro de su hospedera, y cómo son capaces de subsistir compitiendo por espacio y nutrientes. Asimismo, permiten evidenciar los mecanismos por los cuales limitan el

crecimiento de sus competidores, ya sea por medio de mecanismos físicos (barreras miceliares, mayor producción de micelio, etc.) o químicos (producción de compuestos que difunden en el medio de cultivo o volátiles). Los bioensayos de antagonismo directo, permiten inferir el posible papel de defensa de los endófitos hacia su hospedera por el ataque de microorganismos patógenos.

Los hongos endófitos GsE6, GsE10, GsE13, GsE18, GsE21, GsE24 y GsE25 presentaron potencial antagónico sobre el crecimiento los microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola: *A. solani*, *F. oxysporum*, *P. aphanidermatum*, *P. capsici* y *P. parasitica*. En general, inhiben de manera significativa a sus competidores, siendo los oomicetos los microorganismos fitopatógenos más afectados. El principal mecanismo por el cual inhibieron a sus competidores fitopatógenos fue estableciendo una relación de micoparasitismo al crecer encima de ellos.

Los hongos GsE13 y GsE24 son los únicos que inhiben significativamente el crecimiento de sus cinco competidores fitopatógenos.

Los efectos antagónicos observados en todos los antagonismos llevados a cabo entre hongos endófitos de *G. sepium*, son resultado de la suma de los mecanismo físicos y químicos.

Los hongos endófitos GsE6, GsE10, GsE13, GsE18, GsE21, GsE24 y GsE25 constituyen una fuente viable para el desarrollo de agentes de control biológico.

La presente investigación contribuye al conocimiento de los hongos endófitos, de las distintas interacciones que establecen con otros endófitos y con microorganismos fitopatógenos, así como al posible beneficio que los hongos endófitos ofrecen a su planta hospedera por medio de mecanismos de defensa físicos o químicos, indirectos o directos los cuales juegan un importante papel ecológico en la protección de su hospedera.

VIII. Perspectivas

- Clasificar taxonómicamente hasta especie a los hongos endófitos aislados de *G. sepium*.
- Cultivar en pequeña escala a los hongos endófitos más antagónicos de *G. sepium* y obtener los extractos orgánicos derivados de los cultivos.
- Determinar cuantitativamente el potencial antifúngico de los extractos orgánicos sobre el crecimiento de microorganismos con importancia agrícola y evaluar su actividad fitotóxica sobre la germinación, crecimiento de raíz y la respiración durante el proceso de germinación de semillas de prueba.
- Seleccionar a los endófitos con la mayor bioactividad y cultivarlos en mediana escala. Obtener sus extractos orgánicos y verificar su potencial biológico.
- Realizar el fraccionamiento químico biodirigido de los extractos orgánicos de los hongos endófitos más activos. Aislar y caracterizar a los metabolitos secundarios responsables de la actividad antifúngica y/o herbicida.
- Evaluar la actividad biológica de los metabolitos secundarios mayoritarios aislados de las fracciones activas sobre microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola y sobre especies vegetales de prueba.
- Evaluar la producción de metabolitos secundarios de los hongos seleccionados en condiciones de antagonismo, estudiando los perfiles cromatográficos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en la zona más cercana al área donde se establece la interacción antagónica, para confirmar si la relación de competencia, es mediada por un aumento en el metabolismo secundario.
- Determinar preliminarmente la toxicidad de los extractos orgánicos y compuestos puros con el fin de establecer posibles efectos tóxicos sobre el hombre y los animales.

IX. Bibliografía

- Agrios. (2010). **Introducción a la fitopatología** (6-14).
- Arnold, E. (2007). **Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers**. *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3), 51–66.
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kyllö, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). **Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree**, 100(26).
- Banerjee, D., Pandey, A., Jana, M., & Strobel, G. (2014). ***Muscodor albus* MOW12 an Endophyte of *Piper nigrum* L. (Piperaceae) Collected from North East India Produces Volatile Antimicrobials**. *Indian Journal of Microbiology*, 54(1), 27–32.
- Boddy, L. (2000). **Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes**. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 185–194.
- Ciancio, A., & Mukerji, K. G. (2007). **General Concepts in Integrated Pest and Disease Management**. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Davidson, B. S. (1995). **New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms**. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(3), 284–291.
- Deacon, J. **Fungal Biology**. Blackwell Publishing. 2005.
- 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**, 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.
- Evans, J., Eyre, C., Rogers, H. J., Boddy, L., & Müller, C. T. (2008). **Changes in volatile production during interspecific interactions between four wood rotting fungi growing in artificial media**. *Fungal Ecology*, 1(2-3), 57–68.
- 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)**. In *Revista estudios sociales* , Universidad de Guadalajara, México (pp. 189–219).

- French, E. R., & Hebert, T. T. (1980). **Métodos de Investigación Fitopatológica** (p. 289).
- Gao, F., Dai, C., & Liu, X. (2010). **Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens**, 4(13), 1346–1351.
- Gond, S. K., Verma, V. C., Mishra, A., Kumar, A., & Kharwar, R. N. (2010). **Role of Fungal Endophytes in Plant Protection**.
- Guiraldo-Abreu, A., & Cuellar, A. (2008). **Strategies for the Selection of Medicinal Plants to be Studied**. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13.
- Gunatilaka, 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.
- Hall, F., & Brunswick, N. (2007). **Ecological implications of anti-pathogen effects**, 88(3), 550–558.
- Harry, C., Keith, A., & Sarah, E. (2003). **Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree**, 2(May), 149–160.
- Hernandez, A., Alfaro, I., & Arrieta, R. (2003). **Microbiología Industrial** (Universidad, p. 247).
- Hu, X., Webster, G., Xie, L., Yu, C., Li, Y., & Liao, X. (2013). **A new mycoparasite, *Aspergillus* sp. ASP-4, parasitizes the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum***. *Crop Protection*, 54, 15–22.
- INEGI, 2009. Recuperado el día 28 de octubre de 2014 de la página: <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?s=est&c=6130>
- Ireland, C., Peekhaus, N., Lu, P., Sangari, R., Zhang, A., Masurekar, P., & An, Z. (2008). **The tryptophan synthetase gene TRP1 of *Nodulisporium* sp.: Molecular characterization and its relation to nodulisporic acid a production**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3), 451–459.
- Kusari, S., & Spiteller, M. (2011). **Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes?**, *Natural Product Reports*, 28(7), 1203–1207.

- La FAO en México. (2009). Recuperado el día 31 de octubre de 2014 de la página: http://coin.fao.org/cms/world/mexico/InformacionSobreEIPais/agricultura_y_des_rural.html
- 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.
- Lira-Saldívar, R. H. (2007). **Bioplaguicidas y control biológico**. CIQA, 1, 231.
- Macías-Rubalcava, M. L., Hernández-Bautista, B. E., Jiménez-Estrada, M., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., Anaya, A. L. (2008). **Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae***. *Phytochemistry*, 69(5), 1185–1196.
- Macías-Rubalcava, M. L., Ruiz-Velasco Sobrino, M. E., Meléndez-González, C., & Hernández-Ortega, S. (2014). **Naphthoquinone Spiroketal and Organic Extracts from the Endophytic Fungus *Edenia gomezpompae* as Potential Herbicides**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1.
- Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Bael, S. Van, Arnold, E., Hebbbar, P., Herre, E. A. (2008). **Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens**. *Biological Control*, 46(1), 4–14.
- Pachlatko, J. P. (1998). **Natural Products in Crop Protection**. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 52(112), 29–47.
- Riveros B.F., Muñoz, G., González, L., Rojas, L., Alvarez, M., & Hinrichsen P., (2001). **Comparison between DNA and morphological analysis for identification of *Fusarium* species isolated from muskmelon (*Cucumis melo* L.)**, *Agric. Téc.* v.61 n.3, Chillán jul. 2001.
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, E., & Redman, R. S. (2009). **Fungal endophytes: diversity and functional roles**. *The New Phytologist*, 182(2), 314–30.

- Rotheray, T. D., Chancellor, M., Jones, T. H., & Boddy, L. (2011). **Grazing by collembola affects the outcome of interspecific mycelial interactions of cord-forming basidiomycetes**. *Fungal Ecology*, 4(1), 42–55.
- Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W. V., & Maki, C. S. (2005). **Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches Broom Disease**, 24–33.
- Saikkonen, K. (2007). **Forest structure and fungal endophytes**. *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3), 67–74.
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Mendez, M.C., & Macías-Rubalcava, M.L. (2013). **Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina**, 16(2), 132–146.
- Sandoval-Espinosa, Y.K.M.(2014). **Metabolitos secundarios de hongos endófitos de *L. acapulcense***. Tesis de Licenciatura. (UNAM. México, D.F. 2014).
- Strobel, G. (2006). **Harnessing endophytes for industrial microbiology**. *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), 240–4.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). **Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 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.
- Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). **Endophytes: a rich source of functional metabolites**, (March), 448–459.
- Yang, S. X., Gao, J. M., Zhang, Q., & Laatsch, H. (2011). **Toxic polyketides produced by *Fusarium* sp., an endophytic fungus isolated from *Melia azedarach***. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(6), 1887–1889. doi:10.1016/j.bmcl.2010.12.043
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Qin, L. (2010). **Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes**. *Microbiological Research*, 165(6), 437–49.

Yuen, T. K., Hyde, K. D., & Hodgkiss, I. J. (1999). **Interspecific Interactions among Tropical and Subtropical Freshwater Fungi**. *Microbial Ecology*, 37(4), 257–262.

Zar, J. H. (2010). **Biostatistical Analysis** (Vol. 5th). Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey.