



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

POTENCIAL ANTAGÓNICO DE HONGOS ENDÓFITOS DE

Mimosa affinis* Y *Sapium macrocarpum

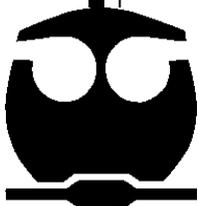
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

RODRIGO VILLANUEVA SILVA



MÉXICO, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

VOCAL: Dr. José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

1ª. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2º SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

**INSTITUTO DE QUÍMICA
LABORATORIO 1-4. PRODUCTOS NATURALES
UNAM**

ASESORA DEL TEMA: DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. MARBELLA CLAUDIA GARCÍA MÉNDEZ

SUSTENTANTE: RODRIGO VILLANUEVA SILVA

Índice

Lista de Figuras.....	vii
Lista de Cuadros	xiii
Lista de Ecuaciones	xiv
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
1. Agricultura en México	3
2. Control de enfermedades de las plantas	4
3. Alternativas para el control de plagas.....	5
4. Hongos	5
5. Hongos endófitos.....	7
6. Competencia entre hongos	11
7. Estrategias de selección de hospederas para el aislamiento de hongos endófitos	12
8. Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla	13
9. Metabolitos secundarios de hongos endófitos.....	14
III. Hipótesis	19
IV. Objetivos	20
1. Objetivo general	20
2. Objetivos particulares	20
V. Materiales y métodos.....	22
1. Hongos endófitos.....	22
2. Cultivo del material biológico en medio sólido	22

3.	Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos.....	23
1.	Características macroscópicas	23
2.	Características microscópicas	24
4.	Determinación de la tasa de crecimiento.....	25
5.	Bioensayos de antagonismo directo.....	26
VI.	Resultados y discusión	28
1.	Determinación de la tasa de crecimiento de los hongos endófitos puros	28
2.	Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos puros aislados de la planta <i>Mimosa affinis</i> y <i>Sapium macrocarpum</i>	31
1.	Hongos endófitos de <i>Mimosa affinis</i>	31
2.	Hongos endófitos de <i>Sapium macrocarpum</i>	39
3.	Bioensayos de antagonismo directo entre los hongos endófitos de <i>Mimosa affinis</i> y entre los de <i>Sapium macrocarpum</i>	55
VII.	Conclusiones	71
VIII.	Perspectivas	74
IX.	Bibliografía.....	76

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Esquema de las relaciones filogenéticas entre los principales grupos de Eukaryotas (Modificado de Judelson, 2007).....	6
Figura 2. Hipótesis del antagonismo balanceado (Shulz & Boyle, 2005).	10
Figura 3. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE1 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).	32
Figura 4. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE2 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 7 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (f) y a 100x (e).....	33
Figura 5. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE3 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 10 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 100x (d-f).....	34
Figura 6. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE4 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (f) y a 100x (e).....	35

Figura 7. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE5 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 15 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) (e) y (f).....	36
Figura 8. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE6 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).	37
Figura 9. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE7 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 21 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e), y a 100x (f).	38
Figura 10. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME1 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 15 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).	39
Figura 11. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME2 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).	40

-
- Figura 12.** Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME3 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 21 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x y (f).41
- Figura 13.** Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME4 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).42
- Figura 14.** Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME5 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 21 días de incubación. (c) El hongo produce exudado amarillo cristalino. (d) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (f).43
- Figura 15.** Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME6 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).44
- Figura 16.** Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME7 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).45

-
- Figura 17.** Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME8 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).46
- Figura 18.** Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME9 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).47
- Figura 19.** Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME10 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).48
- Figura 20.** Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME11 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 21 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d), (e) y (f).....49
- Figura 21.** Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME12 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 18 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).50

Figura 22. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME13 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 21 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).	51
Figura 23. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME14 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d), (e) y (f).....	52
Figura 24. Modelo de antagonismo directo, (A) hongo endófito de prueba, (B) hongo endófito competidor (a) radio de interacción (b) radio de no interacción.	55
Figura 25. Antagonismo directo entre los hongos endófitos MAE4 (izquierda) y MAE3 (derecha) con tasa de crecimiento lenta, aislados de <i>Mimosa affinis</i> . Las fotografías del anverso (A) y del reverso (B) fueron tomadas a los 14 días de interacción antagónica.....	58
Figura 26. Antagonismo directo entre los hongos endófitos MAE7 (izquierda) y MAE6 (derecha) con tasa de crecimiento muy lento aislados de <i>Mimosa affinis</i> . La fotografía del anverso del cultivo fue tomada a los 10 días de incubación.	60
Figura 27. Antagonismo directo entre los hongos endófitos SME1 (izquierda) y SME2 (derecha) con tasa de crecimiento muy rápida, aislados de <i>Sapium macrocarpum</i> . Las fotografías del anverso (A) y del reverso (B) fueron tomadas a los 10 días de interacción antagónica.....	62

Figura 28. Antagonismo directo entre los hongos endófitos con tasa de crecimiento lenta aislados de *Sapium macrocarpum*. (A) anverso del antagonismo entre SME4 (izquierda) y SME10 (derecha). (B) reverso del antagonismo entre SME4 y SME10. (C) anverso del antagonismo entre SME9 (izquierda) y SME5 (derecha). (D) reverso del antagonismo entre SME9 y SME5. (E) anverso del antagonismo entre SME9 (izquierda) y SME4 (derecha). (F) reverso del antagonismo entre SME9 y SME4. Las fotografías del anverso y reverso fueron tomadas a los 14 días de interacción.66

Figura 29. Antagonismo directo entre los hongos endófitos con tasa de crecimiento muy lenta aislados de *Sapium macrocarpum*. (A) anverso del antagonismo entre SME13 (izquierda) y SME12 (derecha). (B) reverso del antagonismo entre SME13 y SME12. (C) anverso del antagonismo entre SME13 (izquierda) y SME14 (derecha).(D) reverso del antagonismo entre SME13 y SME14 (derecha).(E) anverso del antagonismo entre SME12 (izquierda) y SME14 (derecha). (F) reverso del antagonismo entre SME12 y SME14. Las fotografías del anverso y reverso fueron tomadas a los 21 días de interacción antagónica.70

Lista de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Grupos y clases de hongos endófitos (Rodríguez <i>et al.</i> , 2009; Sánchez-Fernández <i>et al.</i> , 2013).	9
Cuadro 2. Clasificación arbitraria de los hongos endófitos de acuerdo a su tasa de crecimiento.	29
Cuadro 3. Tasa de crecimiento de los hongos endófitos puros aislados de <i>Mimosa affinis</i>	30
Cuadro 4. Tasa de crecimiento de los hongos endófitos puros aislados de <i>Sapium macrocarpum</i>	30
Cuadro 5. Especies de hongos endófitos identificados	54
Cuadro 6. Tipos de interacción y valores numéricos asignados (modificado de Yuen <i>et al.</i> , 1999).	56
Cuadro 7. Porcentajes de inhibición e índices de antagonismo de los hongos endófitos de <i>Mimosa affinis</i> con tasa de crecimiento lenta a los 14 días de interacción antagónica.....	59
Cuadro 8. Porcentajes de inhibición e índices de antagonismo de los hongos endófitos de <i>Mimosa affinis</i> con tasa de crecimiento muy lenta. Los valores fueron obtenidos a los 21 días de interacción antagónica.....	61
Cuadro 9. Porcentajes de inhibición e índices de antagonismo de los hongos endófitos de <i>Sapium macrocarpum</i> , con tasa de crecimiento muy rápida a los 10 días de interacción antagónica.	63
Cuadro 10. Porcentajes de inhibición e índice de antagonismo de los hongos endófitos de <i>Sapium macrocarpum</i> , con tasa de crecimiento lento a los 14 días de interacción antagónica.	67

Cuadro 11. Porcentajes de inhibición e índices de antagonismo de los hongos de *Sapium macrocarpum* con tasa de crecimiento muy lenta. Los valores fueron obtenidos a los 21 días de interacción antagónica.....69

Lista de Ecuaciones

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de inhibición (% I)..... 27

Ecuación 2. Cálculo del índice de antagonismo (IA) 27

I. Introducción

Actualmente, la imperante necesidad por el descubrimiento de nuevos compuestos de utilidad en la agricultura, que ayuden a resolver los problemas que la aquejan, es cada vez mayor. Las principales dificultades que enfrenta la agricultura moderna son: la presencia de microorganismos en los cultivos con importancia agrícola y forestal, en particular la incidencia de las infecciones por hongos, la resistencia de los agentes patógenos, la invasión de plantas nocivas, la aparición de virus potencialmente nocivos, los problemas toxicológicos y ambientales ocasionados por el uso indiscriminado de los agentes agroquímicos sintéticos, entre otras (Strobel *et al.*, 2004; Agrios, 2004).

Por otro lado, las causas inmediatas de la malnutrición son complejas y multidimensionales. Entre ellas figura la insuficiente disponibilidad de alimentos inocuos, variados y nutritivos (FAO, 2009). En este sentido, parte de la pérdida de la producción agrícola, y de la calidad de los alimentos, es la presencia de enfermedades en las plantas con importancia en la agricultura (Agrios, 2004).

Las plagas y las enfermedades siempre han repercutido en la producción de alimentos, ya sea directamente causando pérdidas en las cosechas y, en la producción pecuaria, o indirectamente por la disminución de los ingresos, debido a la escases de las cosechas de los cultivos de importancia comercial. Es importante mencionar que las pérdidas económicas ocasionadas en las plantas, por microorganismos fitopatógenos, el ataque de insectos y el crecimiento competitivo de malezas, son más importantes en países en desarrollo que en los países desarrollados, debido a la escases de recursos destinados para su estudio (Agrios, 2004). Adicionalmente, el cambio climático ha traído como consecuencia la modificación de las temperaturas, la humedad y los gases de la atmósfera propiciando el crecimiento y la capacidad con que se generan las plantas, hongos e insectos, alterando la interacción entre las plagas, sus enemigos naturales y sus huéspedes (FAO, 2009).

El uso de plaguicidas sintéticos para proteger los cultivos y combatir las plagas, ha desencadenado otros problemas como la contaminación de los recursos hídricos, el aire del ambiente, la lluvia y los suelos, así como problemas para la salud (Bolognesi & Merlo, 2011). Dado esta situación, se busca reemplazar el uso de agroquímicos sintéticos por productos naturales que presenten un menor impacto ambiental.

Actualmente, los hongos endófitos representan una fuente excepcional de productos naturales bioactivos y se han obtenidos a partir de estos, metabolitos secundarios con potencial uso en el ámbito farmacéutico y agroquímico (Strobel *et al.*, 2004).

En este contexto, el presente trabajo de investigación se desarrolló con la finalidad de poner en evidencia el potencial antagónico de hongos endófitos aislados de las plantas *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarpum*, colectadas en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH), con la finalidad de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las complejas relaciones que establecen con sus hospederas, y con otros hongos endófitos. Además, proponer algunos hongos endófitos como agentes de biocontrol y/o aportar conocimientos para el desarrollo de antifúngicos de origen natural que sean eficaces y nobles con el ambiente.

Así, el presente proyecto comprende: 1) La descripción de las características macroscópicas y microscópicas de hongos endófitos puros aislados de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum*, 2) La determinación de su tasa de crecimiento en el medio de cultivo agar-papa-dextrosa (PDA), 3) La evaluación del potencial antagónico entre los hongos endófitos con tasa de crecimiento similar de cada planta hospedera, 4) La selección de los hongos endófitos con el mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento radial de sus competidores y con el mayor índice de antagonismo, como posibles candidatos para el desarrollo de agentes de control biológico o como productores de metabolitos secundarios bioactivos.

II. Antecedentes

1. Agricultura en México

La agricultura en México está situada como una de las principales actividades primarias del país. De acuerdo a la información del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en 2012 las actividades primarias en México tuvieron una participación del 3.4% en el Producto Interno Bruto (PIB), siendo la agricultura la rama de las actividades primarias con mayor participación, con un 65.9%, seguida de la ganadería con un 28.8%. Adicionalmente, el 11.7% de la población estuvieron ocupadas en la agricultura (Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario 2013).

México es el octavo productor mundial de agroalimentos; es el primer productor mundial de aguacate y de jugo de cítricos concentrado, el segundo en harina de maíz, el tercero en limón, lima, chile, pimienta y alfalfa, el cuarto en vegetales congelados, y el quinto en la cosecha de brócoli, coliflores, espárragos y toronjas. Adicionalmente, se ubica entre los principales países exportadores de alimentos a nivel mundial, ocupando los primeros lugares en la exportación de aguacate, cebolla, frambuesa, espárrago, pepino, tomate, calabaza y chile. Sin embargo, la producción nacional es insuficiente para abastecer la demanda interna de algunos alimentos básicos (Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario 2013).

Los problemas a los que se enfrenta la agricultura impactan sobre la economía nacional, y modifican la cantidad de productos agroalimentarios que puedan estar disponibles para el consumo nacional e internacional. Además, la actividad agropecuaria está expuesta a diversos factores, como son las contingencias climáticas, plagas y enfermedades que pueden alterar los resultados esperados y mermar el ingreso y el bienestar de los productores tras la siembra, captura o cría (Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario 2013).

2. Control de enfermedades de las plantas

En el actual escenario mundial, el manejo de enfermedades de las plantas es necesario, con el fin de mantener la disponibilidad y la seguridad alimentaria de la población humana que sigue en constante incremento (Agrios, 2004; Jayaprakashvel & Mathivanan 2011). Ya que directa o indirectamente, las plantas constituyen la principal fuente de alimentación tanto de animales como de humanos. En este sentido, los animales dependen de las plantas para su alimentación y los humanos dependemos, en parte, de los productos como leche, huevo y carne obtenida de ellos (Agrios, 2004).

La falta de control óptimo, de las enfermedades de las plantas resulta en menos alimento y en consecuencia, en el incremento de su valor comercial, o bien, en alimentos de mala calidad. Es importante resaltar que las pérdidas económicas en conjunto, debido a enfermedades de plantas, el ataque de insectos y el crecimiento competitivo de malezas, son más altas en países en desarrollo (Agrios, 2004; Strange & Scott, 2005).

Por otro parte, el cambio climático y algunos agentes biológicos pueden afectar a las plantas en los ecosistemas naturales y agrícolas. Los agentes biológicos que causan enfermedades en las plantas son los mismos o muy similares a los que causan enfermedades en los seres humanos (Agrios, 2004). Estos incluyen microorganismos patógenos, tales como viroides, virus, bacterias, hongos, oomicetos, protozoos y nematodos (Jayaprakashvel & Mathivanan, 2011; Strange & Scott, 2005; Agrios, 2004). Sin embargo, los hongos y los oomicetos cubren la mayoría de los patógenos eucariotas de las plantas (Latijnhouwers *et al.*, 2003).

La alta toxicidad de los plaguicidas utilizados, la aparición de patógenos resistentes a los fungicidas comúnmente utilizados, y la persistencia de algunos plaguicidas en animales y en el medio ambiente, han impulsado el desarrollo de nuevas estrategias en el control de enfermedades de las plantas (Agrios, 2004).

3. Alternativas para el control de plagas

De las estrategias que se han desarrollado para el control de las enfermedades de las plantas las más importantes son el control biológico y el uso de agroquímicos de origen natural (Strobel & Daisy, 2003), la búsqueda de microorganismos no patógenos que se puedan aplicar a las plantas antes o después de la infección con un patógeno, y que puedan antagonizar al patógeno y/o mantener a la planta sin infección (Agris, 2004). Se ha demostrado recientemente que incluso algunos hongos y bacterias patógenos de plantas pueden ser controlados por el tratamiento previo de la planta con una cepa no virulenta o hipovirulenta de la misma especie, en particular de hongos (Agris, 2004).

4. Hongos

Los hongos constituyen un grupo de organismos diversos y extenso, dentro del dominio Eukarya (**Figura 1**) (Madigan *et al.*, 2009; Latijnhouwers *et al.*, 2003).

Estos microorganismos son quimioorganótrofos, es decir, obtienen energía de la oxidación de compuestos orgánicos (Maczulak, 2011; Madigan *et al.*, 2009) y poseen un tipo de nutrición absorbente (Arx, 1981). Los hongos secretan enzimas que hidrolizan polímeros orgánicos naturales (almidón y celulosa) y posteriormente, transportan las subunidades al interior de las células (Maheshwari, 2005). La mayoría de los hongos son aerobios (Madigan *et al.*, 2009) y para su crecimiento necesitan fuentes de carbono (carbohidratos), nitrógeno (proteínas y/o sales de nitrógeno), agua, potasio, fósforo, calcio y magnesio, y en menor cantidad de hierro, cobre, zinc y molibdeno. Además, pueden sintetizar las vitaminas necesarias para su crecimiento y reproducción (Bonifaz, 2012).

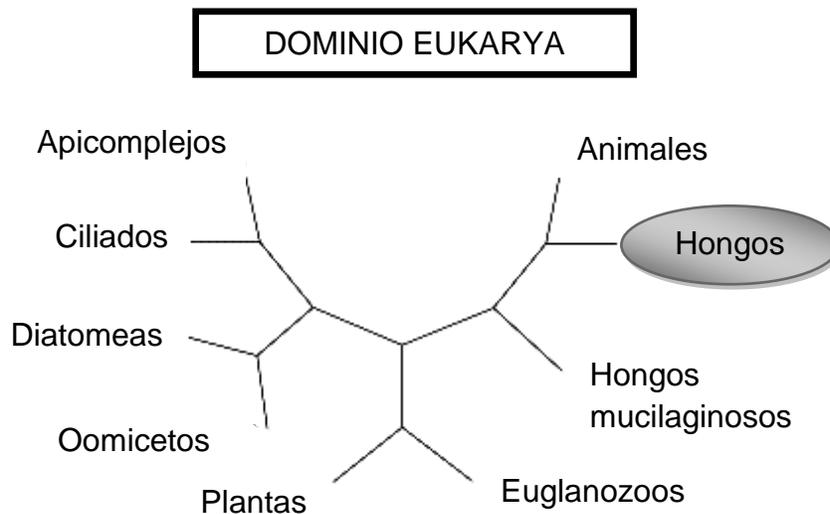


Figura 1. Esquema de las relaciones filogenéticas entre los principales grupos de Eukaryotas (Modificado de Judelson, 2007)

Estructuralmente, la membrana celular de los hongos contiene proteínas y lípidos, siendo el ergosterol el principal componente (Bonifaz, 2012). Además, poseen una pared celular compuesta de polisacáridos (quitina, glucanos, mananos, quitosano y galactosano), lípidos y proteínas, que le confieren rigidez a la célula (Bonifaz, 2012; Maheshwari, 2005; Madigan *et al.*, 2009).

La morfología de los hongos es variada, desde organismos microscópicos unicelulares, como las levaduras, y multicelulares filamentosas como los mohos y hasta formas macroscópicas como las setas. En el caso de los hongos filamentosos, las células forman estructuras microscópicas tubulares denominadas hifas y el conjunto de estas, forma el micelio que puede observarse a simple vista. Las hifas pueden presentar divisiones o septos (hifas septadas) o carecer de estos (hifas cenocíticas) y pueden presentar pigmentación por la presencia de melanina (dematiácias) (Bonifaz, 2012; Mier *et al.*, 2013).

La mayoría de los hongos filamentosos se reproducen principalmente de modo asexual mediante crecimiento y elongación de las hifas, y mediante la producción de conidios (Maheshwari, 2005; Bonifaz, 2012). Algunos hongos, realizan

reproducción sexual mediante la fusión de gametos unicelulares o por la fusión de hifas, produciendo como resultado esporas (Maczulak, 2011; Madigan *et al.*, 2009).

Un gran número de hongos son parásitos de plantas y pueden causar muchas de las enfermedades con relevancia económica en plantas cultivadas en todo el mundo. Sin embargo, otras especies de hongos pueden establecer asociaciones simbióticas con las plantas facilitándoles la adquisición de nutrientes (Madigan *et al.*, 2009) y/o otorgándoles defensas contra el medio ambiente u otros organismos (Schulz & Boyle, 2005). Por otro lado, existen hongos saprobios que descomponen material orgánico muerto como restos de hojas, troncos caídos y plantas muertas. Adicionalmente, algunos hongos son patógenos de animales, incluido el hombre (Bonifaz, 2012; Madigan *et al.*, 2009).

Los hongos filamentosos se encuentran entre los grupos de microorganismos más importantes que se están explorando intensamente debido a los metabolitos secundarios que producen y que tienen potencial aplicación clínica, biotecnológica, y para el desarrollo de nuevos agroquímicos (Suryanarayanan *et al.*, 2009).

La identificación taxonómica de los hongos se lleva a cabo mediante el estudio de la morfología colonial, el análisis microscópico del desarrollo de estructuras sexuales o asexuales en diferentes medios de cultivo y mediante el uso de métodos moleculares (Maczulak, 2011; Schulz & Boyle, 2005).

5. Hongos endófitos

La palabra endófito significa literalmente “dentro de la planta” (endon Gr, dentro; phyton, planta) (Schulz & Boyle, 2005). Las bacterias y los hongos son los microorganismos más comúnmente encontrados como endófitos. Sin embargo, los hongos son los endófitos más frecuentemente aislados (Strobel *et al.*, 2004). En este sentido, los hongos endófitos comprenden un grupo diverso de

microorganismos. Se cree que de las 300, 000 especies de plantas vasculares que existen en la tierra, cada planta es hospedera de uno o más endófitos, y se estima que puede haber al menos 1 millón de especies de hongos endófitos (Strobel *et al.*, 2004). Los hongos aislados con mayor frecuencia son del grupo de hongos imperfectos o deuteromicetos; básicamente, producen esporas asexuales sobre diferentes cuerpos fructíferos. Además, es bastante común aislar endófitos que no producen ningún tipo de cuerpos fructíferos (*Mycelia sterilia*) (Strobel *et al.*, 2004).

Los hongos endófitos colonizan los tejidos de la planta hospedera entre y/o dentro de las células sin causar efectos negativos inmediatos o síntomas visibles de alguna enfermedad. Los endófitos crecen dentro de las raíces, tallos y/u hojas (Rodríguez *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 1999; Tan & Zou, 2001). La interacción entre los hongos endófitos y sus hospederas varía del mutualismo al antagonismo, dependiendo de la especie, el estado fisiológico, la química de la planta hospedera, el estrés ambiental, y otras condiciones abióticas (Arnold *et al.*, 2003; Macías-Rubalcava *et al.*, 2010). A pesar de que los hongos endófitos crecen a expensas del metabolismo de la hospedera, los endófitos les confieren una ventaja adaptativa y competitiva. Algunos hongos endófitos producen metabolitos secundarios que pueden actuar como fitohormonas, aumentando el crecimiento de las hospederas, o con efectos alelopáticos, que las protegen del ataque de patógenos y de herbívoros (Bayman, 2007; Strobel, 2004; Tan & Zou, 2001).

Rodríguez y colaboradores (2009) agruparon a los hongos endófitos en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos (**Cuadro 1**). Esta clasificación toma en cuenta diversas características como son: su taxonomía, sus hospederas, su evolución, y sus funciones ecológicas (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

En el caso de los endófitos de los pastos la infección endofítica es intercelular, y de forma sistémica sobre los órganos de la planta y las semillas, por lo que los hongos pueden transmitirse de manera vertical (Schulz & Boyle, 2005). Por otro lado, se ha descrito que las hojas de los árboles emergen sin endófitos y posteriormente son colonizadas, los hongos endófitos de las plantas leñosas se

transmiten principalmente de forma horizontal entre hospederas (Rodríguez *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Grupos y clases de hongos endófitos (Rodríguez *et al.*, 2009; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Criterio	Clavicipitáceos	No Clavicipitáceos		
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Rango de hospederos	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
Tejidos que colonizan	Tallos y rizomas	Tallos, hojas y rizomas	Tallos, hojas, corteza, flores, frutos	Raíces
Colonización <i>in planta</i>	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
Biodiversidad <i>in planta</i>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
Transmisión	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Función ecológica	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia a la sequía y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros.	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia al estrés biótico y abiótico y protegen contra los hongos patógenos por acción de los metabolitos secundarios.	Inducen resistencia a las enfermedades, protección contra los herbívoros y modifican la sensibilidad al estrés abiótico mediante la producción de los metabolitos secundarios.	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros.

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

La hipótesis del antagonismo balanceado muestra la posible interacción entre los endófitos y la planta hospedera, y entre los hongos fitopatógenos y la hospedera (**Figura 2**). Enfatizando en el antagonismo activo que existe entre estos organismos para tratar de explicar la ausencia de síntomas aparentes de enfermedad, cuando un hongo endófito crece dentro de la planta. Los endófitos producen factores de virulencia herbicidas contra la planta hospedera para superar las defensas de la planta e infectar y colonizar sus tejidos. A la vez, la hospedera activa sus mecanismos de defensa contra el microorganismo. Tanto la planta como los microorganismos producen metabolitos que resultan tóxicos para el otro organismo. Si ambos organismos toleran la interacción, se establece un antagonismo balanceado sin el desarrollo de enfermedad. Sin embargo, la perturbación de este equilibrio, por cambios ambientales o senescencia de la hospedera, resultan a favor del hongo endófito y éste podría expresarse como patógeno (Schulz & Boyle, 2005).

Cabe mencionar que los hongos endófitos se encuentran colonizando a sus hospedaras en mosaicos de microorganismos, estableciendo entre ellos complejas interacciones, que les permiten sobrevivir (Gamboa *et al.*, 2002).

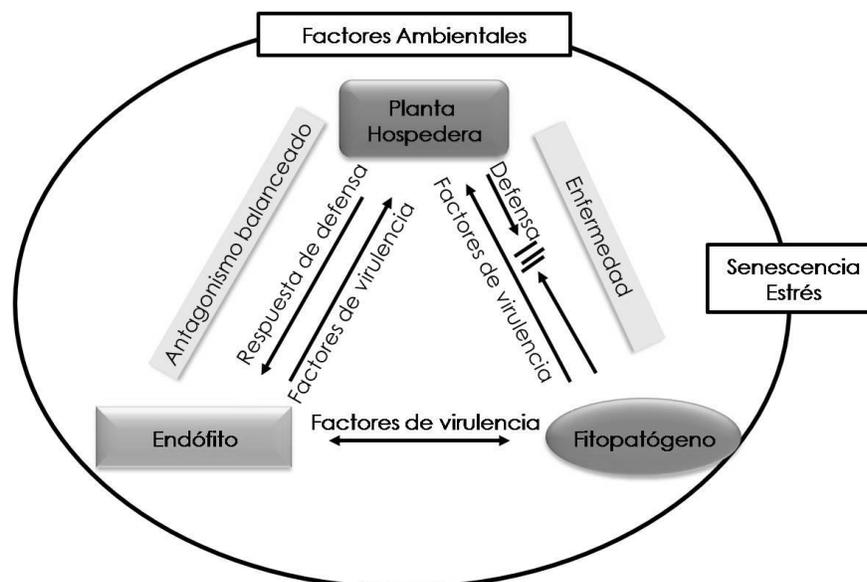


Figura 2. Hipótesis del antagonismo balanceado (Shulz & Boyle, 2005).

6. Competencia entre hongos

Cuando la relación entre dos o más especies se ve afectada de forma negativa ocurre la competencia interespecífica. Este tipo de relación puede ocurrir entre hongos (Smith & Smith, 2007; Yuen, *et al.*, 1999). La competencia entre organismos es comúnmente considerada ya sea por interferencia o por explotación (Boddy, 2000; Smith & Smith, 2007). La primera se refiere a la situación en la que un competidor inhibe a otro y la competencia por explotación, por otro lado, se produce cuando un organismo utiliza un recurso y en consecuencia reduce su disponibilidad para otro. En las circunstancias en las que los hongos están restringidos a una sola fuente de nutrientes ambos tipos de competencia no pueden ser divididos (Boddy, 2000).

La competencia entre hongos puede estar mediada por diferentes mecanismos antagónicos como la producción de compuestos volátiles o que difunden en el medio y que inhiben a distancia el crecimiento. Otros mecanismos involucran el contacto directo entre hifas como la interferencia hifal y el micoparasitismo. La primera ocurre cuando una hifa hace contacto con otra hifa o espora, y resulta en la muerte de los compartimentos en contacto. Por otro lado, el micoparasitismo, o parasitismo de una hifa por otra, inicia con el contacto entre éstas, seguido de la penetración u opresión y el crecimiento sobre la superficie de las hifas del competidor. Adicionalmente, en cultivos *in vitro* la morfología del micelio cambia durante las interacciones, con la formación de barreras de micelio resistente a la invasión como resultado del engrosamiento del micelio en interacción, o la producción de pigmentos inter e intracelulares (Boddy, 2000).

El antagonismo a distancia por lo general se atribuye a compuestos que presentan la capacidad de difundir o volatilizar, que esencialmente son agentes antifúngicos naturales (Boddy, 2000; Gloer, 2007). En este sentido, se han estudiado los compuestos orgánicos volátiles (VOCs por sus siglas en inglés) producidos por especies de *Muscodor* y se ha observado su actividad contra muchos hongos patógenos de plantas y bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En

consecuencia, el género *Muscodor* es potencialmente importante para el biocontrol (Suwannarach *et al.*, 2013).

Dado que los antifúngicos potenciales pueden ser producidos por los hongos antagónicos, en algunas interacciones competitivas, los estudios de los patrones de interacción pueden producir estrategias efectivas para el desarrollo de agentes de control biológico (Yuen *et al.*, 1999).

7. Estrategias de selección de hospederas para el aislamiento de hongos endófitos

Debido a que el número de especies de plantas es muy grande, Yue y colaboradores (2010) proponen utilizar estrategias racionales o criterios de selección de hospederas para limitar rápidamente la búsqueda de nuevos hongos endófitos con potencial biológico (Yu *et al.*, 2010). Estas estrategias son:

- Plantas que habiten en situaciones ambientales únicas, especialmente aquellas con biología extraordinaria, y que posean nuevas estrategias para su supervivencia.
- Plantas sin síntomas de enfermedad que crecen rodeadas de otras plantas infectadas por diversos patógenos o atacadas por herbívoros (criterio ecológico), las cuales pueden estar colonizadas por endófitos productores de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas e insecticidas (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).
- Plantas con antecedentes etnobotánicos, que se relacionan con algún uso específico o aplicaciones relacionadas a los intereses de la investigación.
- Plantas endémicas, que tienen una longevidad inusual o que han habitado en extensiones de tierra poco convencionales.
- Plantas que crecen en zonas de alta biodiversidad y que por lo tanto, pueden alojar endófitos igualmente diversos.

Considerando este último criterio, aquellos ecosistemas que tienen la mayor biodiversidad parecen ser los que también tienen un amplio número, y los más diversos en microorganismos. La diversidad biológica implica diversidad química estructural debido a la constante innovación química que se requiere para sobrevivir en ecosistemas donde la competencia evolutiva para sobrevivir es más activa (Strobel *et al.*, 2004).

8. Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla

La Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH) es una extensión natural ubicada en el Estado de Morelos, México, con una superficie total de 59,030 hectáreas; se compone por selva baja caducifolia (SBC) y algunas áreas con bosque templado, principalmente dominado por encinos (Saldaña-Fernández *et al.*, 2007; Dorado *et al.*, 2006).

La REBIOSH es una zona que cuenta con gran diversidad biológica. En cuanto a vegetación, en la REBIOSH existen varias especies que dominan el territorio, siendo las más comunes *Conzattia multiflora*, *Lysiloma acapulcense*, *L. divaricata* (Fabaceae), y varias especies de los géneros *Bursera* (Burseraceae) y *Ceiba* (Bombacaceae). Adicionalmente, se encuentran arbustos espinosos mimosoideos (Fabaceae), con especies de los géneros *Acacia*, *Mimosa* y *Prosopis*, entre otras (Dorado *et al.*, 2006).

Por otra parte, en la REBIOSH habitan diversas especies de árboles no dominantes, con uso etnobotánico, como son *Gliricidia sepium* (Fabaceae), *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae), *Hippocratea acapulcensis* (Celastraceae), *Leucaena macrophylla* (Fabaceae), *Piper leucophyllum* (Piperaceae), y *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae), entre otras (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013; Saldaña-Fernández *et al.*, 2007).

Las plantas *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarpum* son especies nativas de la REBIOSH. Por un lado, *M. affinis* se caracteriza por ser una planta pequeña y anual, de la cual se desconocen antecedentes etnobotánicos (Wang *et al.*, 1999; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana). Por otro, *Sapium macrocarpum*, conocida popularmente como árbol de leche de fruto grande, amatillo y lechón, entre otros, es una planta que secreta látex el cual se usa contra la picadura de alacrán, fiebre y algunos problemas de la piel como verrugas. Cabe mencionar, que los estudios químicos y de actividad biológica de ambas plantas son escasos y no hay estudios previos sobre sus hongos endófitos (Ruiz-Terán *et al.*, 2008; Silvestre-Castañeda, 2008).

9. Metabolitos secundarios de hongos endófitos

Los hongos endófitos son una excelente fuente de metabolitos secundarios activos. Las investigaciones realizadas por Schulz (2002), permitieron establecer que de 135 metabolitos aislados y caracterizados a partir de hongos endófitos el 51% muestran nuevas estructuras, esto es considerablemente mayor que las producidas por aislamientos fúngicos de suelo (Schulz *et al.*, 2002). Además de esta razón, existen varias para estudiar a los hongos endófitos como fuente de nuevos compuestos bioactivos. Por un lado, al ser microorganismos poco estudiados es más probable que los metabolitos aislados sean núcleos estructuralmente novedosos. Además, las complejas interacciones que se establecen entre endófitos y entre los endófito con su hospedera pueden favorecer la síntesis de metabolitos secundarios biológicamente activos (Schulz *et al.*, 2002).

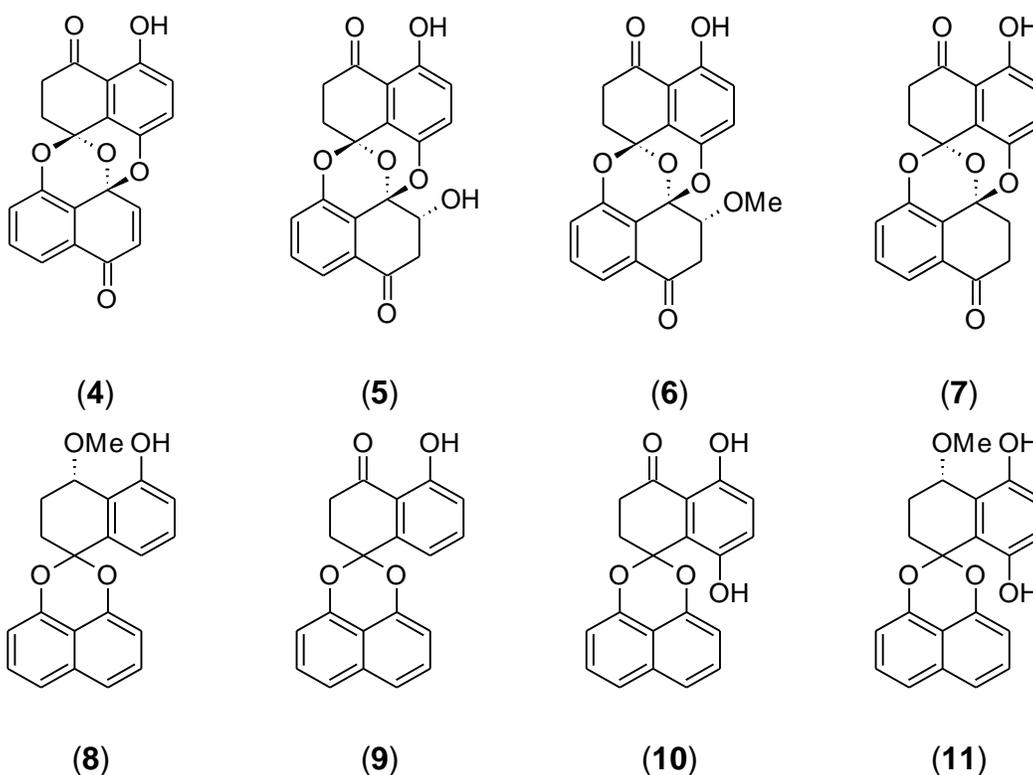
Actualmente, existen en la literatura numerosos reportes de la diversidad fúngica de los hongos endófitos que se han aislado, así como de la diversidad estructural y actividad biológica de los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos (Yu *et al.*, 2010; Suryanarayanan *et al.*, 2009; Gunatilaka *et al.*, 2006;

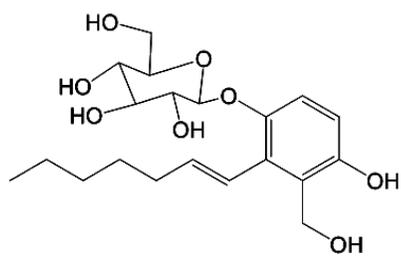
Strobel *et al.*, 2004; Tan & Zou, 2001). Estos producen una amplia variedad de metabolitos pertenecientes a diversos grupos como esteroides, xantonas, fenoles, isocumarinas, derivados de perileno, quinonas, furanodionas, terpenoides, depsipéptidos, citocalasinas, palmarumicinas, preusomerinas, benzopiranoas y enniantinas, entre otros (Schulz *et al.*, 2002). Las actividades biológicas de los metabolitos de hongos endófitos incluyen principalmente, antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antioxidantes y anticancerígenas (Gunatilaka, 2006). A continuación se presentan ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos, destacando el tipo de estructura química, el microorganismo del que fue aislado y la planta hospedera.

De éstos, el Taxol (**1**) (Paclitaxel®), diterpeno aislado por primera vez de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*, Taxaceae) y que se utiliza como fármaco en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013; Tan & Zou, 2001). Es un ejemplo de los metabolitos secundarios que en un inicio fueron aislados de una planta y que la investigación posterior de sus hongos endófitos, determinó que los metabolitos secundarios que produce la hospedera también los producen algunos de sus hongos endófitos (Strobel & Daisy, 2003). *Taxomyces andreanae* fue el primer hongo endófito al que se le atribuyó la producción de **1** (Stierle & Strobel, 1995). Posteriormente, se descubrió que **1** es producido en cultivo por otros hongos endófitos de *Taxus* sp. y otras plantas hospederas (Strobel, 2003). Se especula que la capacidad de cualquier endófito para biosintetizar **1** puede haber surgido del intercambio de material genético entre el árbol del tejo hacia uno o más microorganismos que viven en estrecha asociación con él, y que en la naturaleza podría poseer cierta actividad antifúngica (Strobel, 2003).

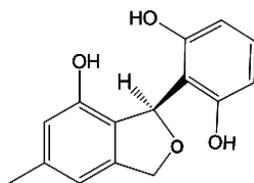
lycopersicum y *Echinochloa crus-gali*. Las palmarumicinas y preusomerinas estudiadas ejercen su efecto fitotóxico a nivel del fotosistema II de la fotosíntesis (Macías-Rubalcava *et al.*, 2014a; 2014b).

También, se han aislado otros metabolitos de hongos endófitos con actividad antifúngica; por ejemplo, la pestalósida (**12**) un β -glucósido aromático, aislado de *Pestalotiopsis microspora* un hongo endófito de *Torreya taxifolia*. Adicionalmente, se aislaron la pestacina (**13**) y la isopestacina (**14**), dos isobenzofuranos, aislados del mismo endófito, *P. microspora* de *Terminalia morobensis* (Gunatilaka, 2006; Strobel *et al.*, 2004); La criptocandina A (**15**) un lipopéptido obtenido del hongo endófito *Cryptosporiopsis quercina* aislado de *Tripterigeum wilfordii*, una planta medicinal nativa de Euroasia (Strobel *et al.*, 2004). Otros metabolitos con actividad antimicrobiana aislados son el ácido coletotrico (**16**) aislado de *Colletotrichum gloeosporioides*, un hongo endófito de los tallos de *Artemisia mongolica*, que inhibe el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Sarcina lutea* y al hongo fitopatígeno *Helminthosporium sativum* (Zou *et al.* 2000).

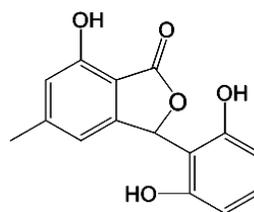




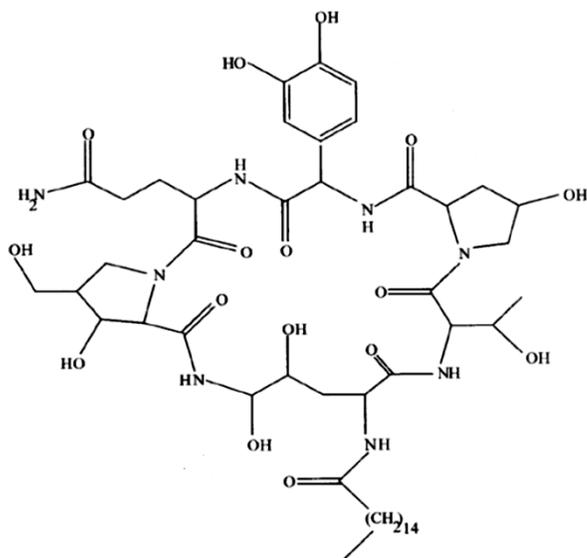
(12)



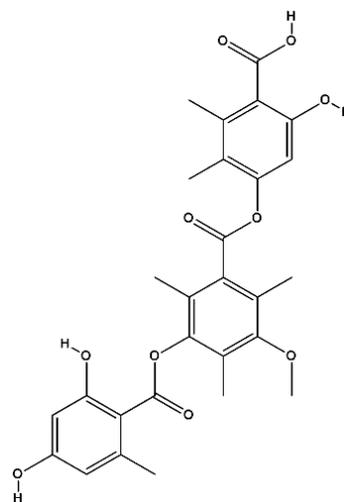
(13)



(14)



(15)



(16)

III. Hipótesis

El estudio de los hongos endófitos aislados de *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarpum*, mediante bioensayos de antagonismo directo *in vitro*, permitirá poner en evidencia aquellos microorganismos que podrían ser una fuente novedosa de metabolitos secundarios con potencial actividad antifúngica o agentes de control biológico.

IV. Objetivos

1. Objetivo general

Describir las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos puros aislados de las plantas *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarpum* colectadas en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH), así como establecer el potencial antagónico de los hongos endófitos de cada planta hospedera, mediante bioensayos de antagonismo directo entre hongos endófitos con tasa de crecimiento similar, con el fin de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones que establecen con sus hospederas y con otros hongos endófitos. Asimismo, contribuir al posible desarrollo de nuevos agentes de control biológico, y antifúngicos de origen natural que sean eficaces y nobles con el ambiente.

2. Objetivos particulares

- Describir las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos puros aislados de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum* colectadas en la REBIOSH, mediante inspección visual y observaciones microscópicas de su micelio.
- Determinar la tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados *M. affinis* y *S. macrocarpum*, realizando curvas de crecimiento en agar papa dextrosa.
- Identificar a nivel de género a los hongos endófitos en estudio, mediante el análisis detallado de sus características morfológicas, empleando técnicas de microcultivo y tinción simple.

-
- Realizar bioensayos de antagonismo directo entre hongos endófitos con tasa de crecimiento similar, de cada planta hospedera, y determinar el porcentaje de inhibición y el índice de antagonismo.
 - Seleccionar a los hongos endófitos con mayor porcentaje de inhibición y mayor índice de antagonismo, como posibles candidatos para el desarrollo de agentes de control biológico o como productores de metabolitos secundarios bioactivos.

V. Materiales y métodos

1. Hongos endófitos

Los hongos endófitos se aislaron a partir de hojas sanas de las plantas *Mimosa affinis* (Fabaceae) y *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae), colectadas en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH), ubicada en el municipio de Quilamula en el estado de Morelos, México, en septiembre de 2010. El aislamiento y la purificación de los microorganismos se llevaron a cabo por el grupo de trabajo del Laboratorio 1-4 del Instituto de Química de la UNAM, a partir de la resiembra sucesiva de los hongos hasta obtener morfotipos puros.

Para esta investigación se emplearon 7 hongos endófitos puros aislados de *M. affinis* y 14 hongos endófitos puros aislados de *S. macrocarpum*.

A cada uno de los endófitos se le asignó una clave compuesta por dos letras mayúsculas, MA para los hongos endófitos de *M. affinis* y SM para los aislados de *S. macrocarpum*, seguido de la letra E para denotar que los hongos son endófitos y un número consecutivo que incrementa conforme su tasa de crecimiento disminuye.

2. Cultivo del material biológico en medio sólido

Los hongos endófitos se cultivaron empleando agar-papa-dextrosa (PDA). El medio de cultivo PDA se preparó de la siguiente manera: las papas frescas se lavaron con agua y jabón, se descortezaron y cortaron en cubos. Para cada litro de medio de cultivo se emplearon 200 g de papa y se hirvieron con agua destilada durante 20 min. La infusión de papa se filtró a través de un colador fino y se adicionaron 20 g de dextrosa, 10 g de agar bacteriológico y agua destilada hasta

completar el volumen de 1.0 L. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 min a 121°C (Sandoval-Espinoza, 2014; Mier *et al.*, 2013)

El cultivo del material fúngico en PDA se realizó en campana de flujo laminar. Para los cultivos en PDA, se tomaron muestras del micelio con una asa bacteriológica, esterilizada a la flama, o con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro y se transfirieron a cajas Petri de 10 cm de diámetro conteniendo 10 mL de medio PDA. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente con fotoperíodo luz fluorescente-oscuridad 12:12 h.

3. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos

1. Características macroscópicas

Las características macroscópicas de cada hongo endófito se establecieron observando los cultivos en cajas de Petri en medio PDA, y registrándose el aspecto del micelio con ayuda de un microscopio estereoscópico. La descripción de las características macroscópicas se realizó considerando: color del micelio en la parte superior (anverso) e inferior (reverso), textura, consistencia, tipo de crecimiento, elevación, borde, producción de exudado y producción de pigmento difusible en el medio de cultivo.

Las características macroscópicas de los hongos endófitos se determinaron mediante la observación de los cultivos en medio PDA, con ayuda de un microscopio estereoscópico MOTIC® (TYPE102M). Registrándose, el color, aspecto (algodonoso, aterciopelado, lanoso, flocoso, zonado, pulverulento, húmedo, etc.), consistencia (suave o blando, duro, elástico, etc.), y superficie del micelio aéreo (anverso) (umbonado, velloso, liso, etc.) y profundo (reverso), así como, la presencia de pigmentos difusibles en el medio de cultivo y/o la presencia

de exudado (Mier *et al.*, 2013). Las observaciones se realizaron periódicamente, hasta que los microorganismos cubrieron toda la superficie de las cajas de Petri (Armendáriz-Guillén, 2013, Sandoval-Espinoza, 2014).

2. Características microscópicas

Para realizar el análisis de las características microscópicas de cada uno de los hongos endófitos, se realizaron microcultivos e improntas del desarrollo miceliar a partir de cultivos en caja de Petri. Posteriormente, para cada muestra obtenida se realizaron preparaciones en fresco utilizando los colorantes rojo congo, azul de lactofenol o fucsina ácida.

Para la preparación de los microcultivos, en la campana de flujo laminar, se realizó un corte de 1 cm² de medio de cultivo PDA en caja de Petri, utilizando un bisturí estéril o una aguja estéril y se transfirió al centro de un porta objetos sostenido sobre un triángulo de vidrio, contenido en una caja de Petri de 10 cm y con agua destilada, previamente esterilizados. Posteriormente, se transfirieron muestras del micelio con un asa bacteriológica estéril, en cada una de las caras del segmento de agar perpendiculares al portaobjetos. El segmento de agar, se cubrió con un cubreobjetos o portaobjetos estéril. La caja de Petri se incubó a temperatura ambiente con fotoperíodo luz fluorescente-oscuridad 12:12 h por un periodo de 7 a 14 días, o hasta observar crecimiento del hongo sobre el portaobjetos. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiraron los segmentos de agar y se realizaron preparaciones en fresco del desarrollo miceliar en el portaobjetos y el cubreobjetos (Mier *et al.*, 2013; Sandoval-Espinoza, 2014).

Las improntas de micelio se realizaron a partir del desarrollo de los hongos endófitos en cajas de Petri con medio de cultivo PDA. Se colocó un segmento de cinta adhesiva transparente a una asa estéril y se tocó delicadamente la superficie de la colonia. Posteriormente, la impresión de micelio se transfirió a un portaobjetos limpio con una gota de colorante.

Para la tinción con fucsina ácida se cubrieron las muestras con el colorante (fucsina ácida al 0.1% en ácido láctico) y se tiñeron durante 2 min. Acabado el tiempo de tinción se lavó el exceso de colorante con una solución de etanol al 70% y se dejó evaporar el exceso de disolvente a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionó una gota de ácido láctico al 85% y se cubrió la preparación con un cubreobjetos para su observación microscópica.

Por otra parte, las muestras de micelio desarrollado por la técnica de microcultivo y las impresiones del micelio, también se cubrieron con el colorante azul de lactofenol o con rojo congo. Las preparaciones se tiñeron durante 2 minutos y se cubrieron con un cubreobjetos para su observación microscópica.

Las preparaciones se observaron en un microscopio MOTIC® (modelo BA410) a 40x y 100x, y se tomaron micrografías utilizando una cámara MOTICAM® 2000. La descripción de las características microscópicas se realizó considerando el tipo de hifas (septada o cenocítica, hialina o dematiácea), la presencia de orgánulos internos (vacuolas, núcleos, etc.), y la posible presencia de conidios y estructuras de reproducción (esporangióforos, conidióforos, basidióforos, ascas) (Mier *et al.*, 2013).

4. Determinación de la tasa de crecimiento

En una campana de flujo laminar, se realizaron los cortes de micelio con un sacabocados estéril de 7 mm de diámetro. El inóculo se transfirió con ayuda de una asa estéril al centro de una caja Petri de 10 cm, por cuadruplicado. Los endófitos se incubaron como se describe en el inciso 2 de esta sección. El crecimiento radial y/o irregular de los endófitos se registró continuamente en hojas de acetato hasta que el micelio cubrió todo el medio de cultivo contenido en la caja de Petri. Posteriormente, se escanearon los registros utilizando un escáner HP® Laser Jet M1005MFP y se obtuvieron las áreas en cm² de los hongos utilizando el programa ImageJ, para cada determinación. El área del micelio se graficó en

función de los días de crecimiento y se estableció su tasa de crecimiento (T.C.) en cm² por día.

5. Bioensayos de antagonismo directo

Los bioensayos de antagonismo directo se realizaron entre hongos endófitos de una misma planta hospedera con T.C. similar. Para llevar a cabo el bioensayo, se realizaron cortes en el micelio de cada uno de los hongos competidores, cultivados previamente durante aproximadamente 14 días en medio PDA, con ayuda de un sacabocados de 7 mm de diámetro esterilizado a la flama, y enfriado a temperatura ambiente.

Los cultivos en interacción antagónica se realizaron tomando con un asa estéril un corte del micelio del hongo endófito de prueba, y colocándolo en el extremo de una caja de Petri de 10 cm conteniendo 10 mL de PDA, a una distancia de 40 mm del inóculo del hongo competidor. Se realizaron cultivos control del crecimiento de los hongos de prueba, inoculando cada hongo de prueba en el centro de una caja de Petri con el mismo medio de cultivo (**Figura 24**). Todo el procedimiento experimental se efectuó en una campana de flujo laminar.

Los cultivos control y en interacción antagónica se incubaron a temperatura ambiente con fotoperíodo luz fluorescente-oscuridad 12:12 h. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones.

Durante el bioensayo de antagonismo se observaron y registraron las características macroscópicas de cada uno de los hongos en interacción antagónica, midiendo los radios en interacción y no interacción, de los diferentes hongos competidores. Los bioensayos se concluyeron a los 10 días para los hongos endófitos con T.C. muy rápida, a los 14 días para los endófitos con T.C. lenta y a los 21 días para los de T.C. muy lenta. Los resultados se obtuvieron como porcentaje de inhibición (% I) del crecimiento de los hongos competidores a

partir de la **Ecuación 1**, donde **a** corresponde al radio de interacción antagonica, y **b**, al radio de no interacción.

$$\% I = \left| \frac{(a-b)}{b} * 100 \right|$$

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de inhibición (% I).

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de t-student pareada de dos colas ($\alpha=0.05$) utilizando el programa GraphPadPrism 5.01 (Sandoval-Espinoza, 2014).

Por otra parte, se estableció el índice de antagonismo, con base en el tipo de interacción antagonica observada entre los diferentes hongos competidores, comparándola con las interacciones descritas en el **Cuadro 6**, y asignando el valor numérico correspondiente. El índice de antagonismo se estableció mediante la **Ecuación 2**, en donde “n” es el número de veces que el hongo de prueba presenta las diferentes categorías de interacción.

$$IA=(n*A1)+(n*A2)+(n*B)+(n*C)+(n*D)+(n*E)$$

Ecuación 2. Cálculo del índice de antagonismo (IA)

VI. Resultados y discusión

La presente investigación se desarrolló con el propósito de establecer el potencial antagónico que presentan los hongos endófitos aislados de *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarpum*, dos especies vegetales colectadas en una zona de alta biodiversidad, mediante la realización de bioensayos de antagonismo directo entre los diferentes endófitos puros, llevados a cabo con base en su tasa de crecimiento. Poniendo así, en evidencia a los hongos endófitos que constituyan candidatos útiles para la obtención de compuestos bioactivos con base en el efecto inhibitorio provocado sobre el crecimiento de sus competidores y que posiblemente sea mediado por la producción de metabolitos secundarios difusibles en el agar, y que muestren una actividad antifúngica importante.

A partir de los aislamientos realizados por el equipo de trabajo del laboratorio 1-4 del Instituto de Química de la UNAM se obtuvieron 7 y 14 morfotipos puros de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum*, respectivamente. La colecta de las hojas sanas de las hospederas, se llevó a cabo en la “Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH)” ubicada en el Estado de Morelos, México (Saldaña Fernández *et al.*, 2007). Cabe mencionar que durante las resiembras realizadas para la purificación de los microorganismos endófitos de *M. affinis* y *S. macrocarpum*, se observó que estos hongos mostraban potencial antagónico frente a otros hongos que emergían del mismo segmento de hoja por lo que ya son microorganismos preseleccionados.

Con base en las características macro y microscópicas y en la tasa de crecimiento de cada uno de los hongos endófitos puros, se asignó la clave de identificación.

1. Determinación de la tasa de crecimiento de los hongos endófitos puros

La tasa de crecimiento (T.C.) para cada hongo endófito puro se estableció mediante la construcción de curvas de crecimiento, graficando el área en cm² vs

tiempo en días, en donde, la pendiente indica la tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$). En el **Cuadro 2** se presentan las cuatro categorías de crecimiento establecidas de forma arbitraria de acuerdo a los valores de T.C. obtenidos.

Cuadro 2. Clasificación arbitraria de los hongos endófitos de acuerdo a su tasa de crecimiento.

Grupo	Intervalo de tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$)
Muy rápidos	Más de 15.5
Rápidos	Entre 10.5 y 7.5
Lentos	Entre 3.5 y 7.4
Muy lentos	Menor a 3.4

En los **Cuadros 3 y 4** se presentan la relación de los hongos endófitos estudiados y los valores de T.C. establecidos, así como, la categoría de crecimiento y clave asignada. Los hongos endófitos con T.C. mayores a $15.5 \text{ cm}^2/\text{día}$ se agruparon dentro de la categoría de crecimiento muy rápido. Estos hongos se caracterizaron por cubrir la superficie del medio de cultivo (PDA) contenido en una caja de Petri de 10 cm, en aproximadamente dos días. Los hongos con T.C. entre 10.5 y $7.5 \text{ cm}^2/\text{día}$ se incluyeron en la categoría de crecimiento rápido, los cuales cubrieron la superficie del medio de cultivo entre 7 y 8 días de incubación. Las T.C. de los hongos endófitos de crecimiento lento y muy lento se asignaron a los hongos que crecen entre 3.5 y $7.4 \text{ cm}^2/\text{día}$ y menores a $3.4 \text{ cm}^2/\text{día}$, respectivamente. Estos hongos llegan a cubrir el medio de cultivo en un tiempo mayor a 8 días de incubación. Cabe destacar que los valores de T.C. son altos debido a que fueron obtenidos a partir del área del micelio sobre la superficie del medio de cultivo ($\text{cm}^2/\text{día}$).

Cuadro 3. Tasa de crecimiento de los hongos endófitos puros aislados de *Mimosa affinis*.

Clave del endófito	Tasa de crecimiento (cm ² /día)	Categoría de crecimiento
MAE1	53.41	Muy rápido
MAE2	13.36	Rápido
MAE3	6.61	Lento
MAE4	5.59	Lento
MAE5	4.40	Lento
MAE6	2.29	Muy lento
MAE7	0.45	Muy lento

Cuadro 4. Tasa de crecimiento de los hongos endófitos puros aislados de *Sapium macrocarpum*.

Clave del endófito	Tasa de crecimiento (cm ² /día)	Categoría de crecimiento
SME1	53.88	Muy rápido
SME2	51.05	Muy rápido
SME3	10.69	Rápido
SME4	6.60	Lento
SME5	5.88	Lento
SME6	5.67	Lento
SME7	4.89	Lento
SME8	4.76	Lento
SME9	4.46	Lento
SME10	3.60	Lento
SME11	3.58	Lento
SME12	2.86	Muy lento
SME13	2.62	Muy lento
SME14	2.06	Muy lento

2. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos puros aislados de la planta *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarpum*.

A continuación, se describen las características más relevantes para cada uno de los endófitos en estudio.

1. Hongos endófitos de *Mimosa affinis*

Hongo endófito MAE1

El hongo endófito MAE1 presenta en el anverso de la colonia micelio abundante blanco, flocoso, consistencia suave y de crecimiento radial. Con el tiempo, las hifas aéreas crecen considerablemente y se tornan verde y amarillo en zonas irregulares o formando halos concéntricos (**Figura 3.a**). En el reverso de la colonia el micelio es blanco (**Figura 3.b**). Este hongo produce escasamente exudado cristalino incoloro y un aroma dulce característico. Además, crece muy rápidamente con una T.C. de 53.4 cm²/día, por lo que es capaz de llenar la superficie del medio de cultivo en la caja de Petri en dos días (**Figura 3.c**). El micelio está constituido por hifas septadas y hialinas. En el interior de las hifas se observan múltiples orgánulos. Adicionalmente, las hifas se ramifican y de estas surgen estructuras redondas terminales (**Figura 3.d, 3.e y 3.f**). Bajo estas condiciones de cultivo no se observan estructuras de reproducción que permitan establecer el género del hongo.

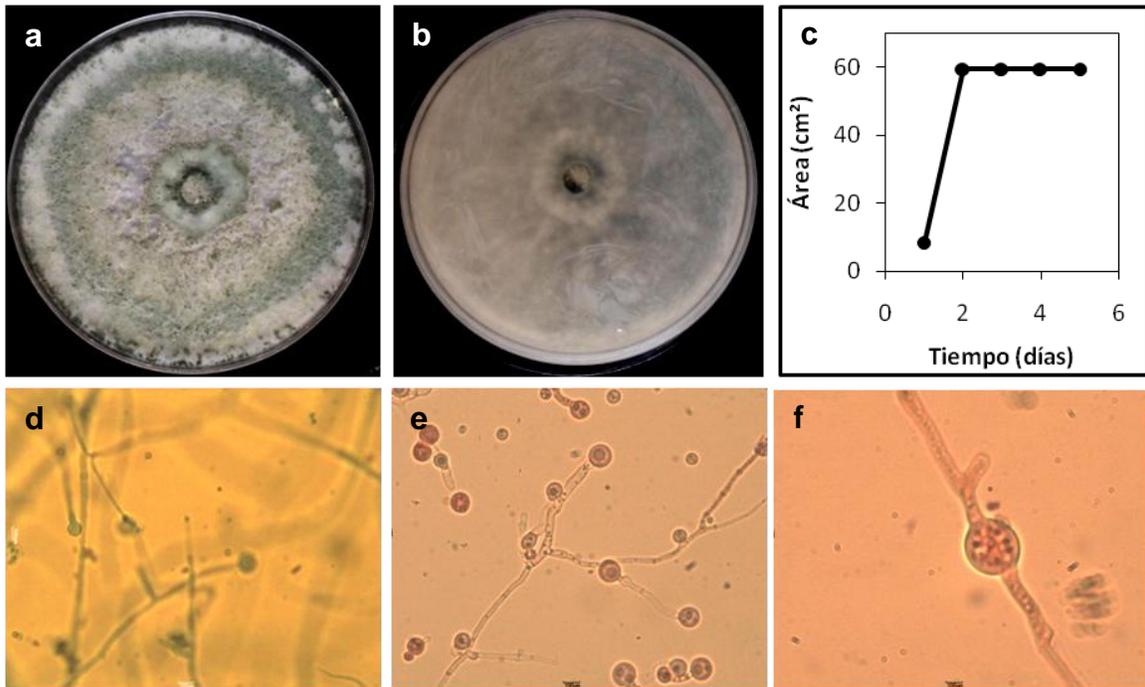


Figura 3. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE1 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).

Hongo endófito MAE2

El hongo endófito MAE2 presenta en el anverso y reverso de la colonia micelio blanco que se colorea ligeramente naranja con el paso del tiempo. La apariencia del micelio es lanosa, abundante y suave. Crece radialmente con borde ondulado (**Figura 4.a** y **4.b**). Produce exudado cristalino incoloro. El hongo crece rápidamente con una T.C. de $13.36 \text{ cm}^2/\text{día}$, es capaz de llenar una caja Petri con medio PDA en 7 días (**Figura 4.c**). El micelio del hongo se conforma por hifas hialinas, septadas con múltiples orgánulos internos. A partir de las hifas surgen conidios ovalados (**Figura 4.d**, **4.e** y **4.f**). Bajo estas condiciones de cultivo no se

observan estructuras de reproducción que permitan establecer el género del hongo.

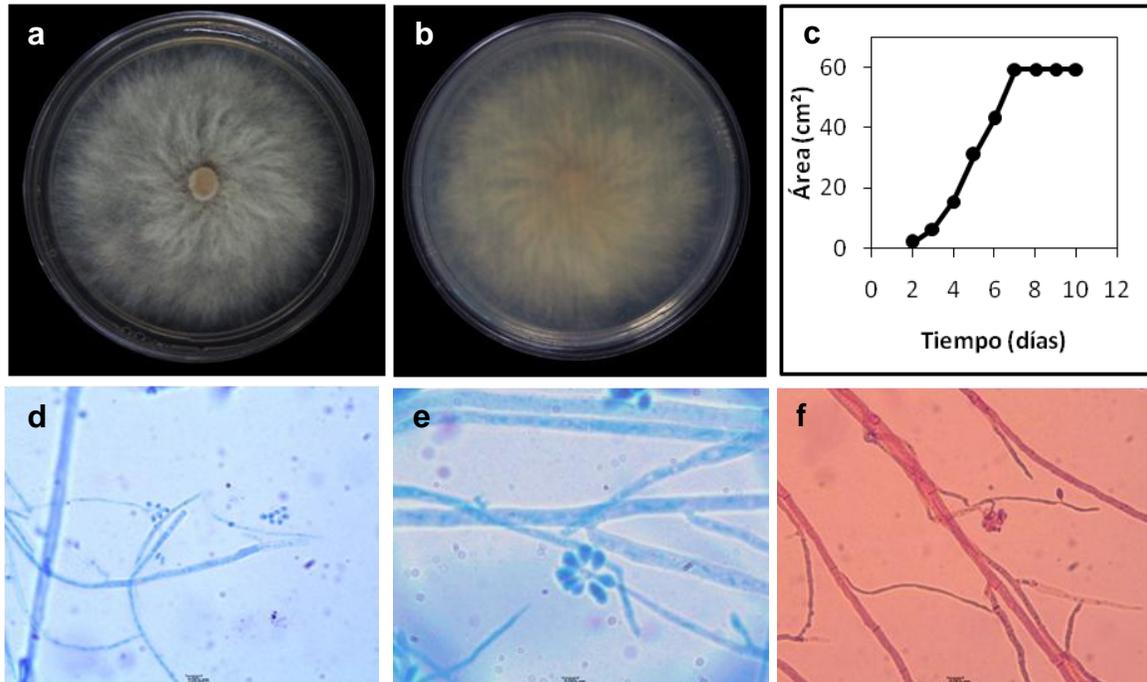


Figura 4. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE2 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 7 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (f) y a 100x (e).

Hongo endófito MAE3

El hongo endófito MAE3 presenta en el anverso y reverso de la colonia micelio blanco, húmedo, elástico y liso con halos concéntricos de apariencia vellosa. Crece radialmente con borde ondulado (**Figura 5.a** y **5.b**). El hongo crece lentamente en medio PDA con una T.C. de $6.61 \text{ cm}^2/\text{día}$ y llena la superficie del medio de cultivo en 10 días (**Figura 5.c**). El micelio se compone por hifas hialinas, septadas y curvadas con múltiples orgánulos. Bajo las condiciones de cultivo

MAE3 forma conidios septados delgados y alargados en forma de vaina, los cuales presentan orgánulos circulares a lo largo de la estructura. Adicionalmente, forma conidios ovalados y septados de menor tamaño. Estas estructuras son similares a las que producen las especies del género *Fusarium*, por lo que este hongo endófito podría pertenecer a este género (**Figura 5.d, 5.e y 5.f**) (Leslie & Summerell, 2006).

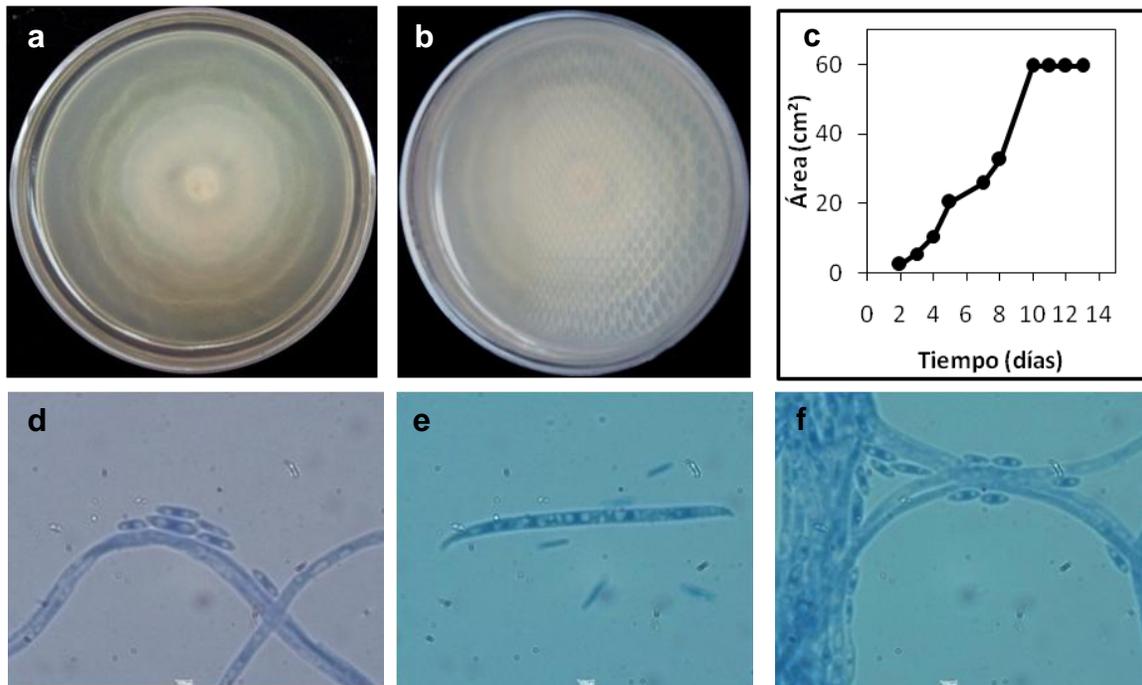


Figura 5. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE3 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 10 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 100x (d-f).

Los conidios formados en PDA no son tan equíparos en tamaño o forma como los desarrollados en otros medios de cultivos, como en agar hoja de clavel (CLA) o agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA), por lo tanto son mucho menos confiables para su uso con fines de identificación. Sin embargo, la morfología de las colonias, la pigmentación y la tasa de crecimiento de la mayoría de las especies de

Fusarium cultivadas en PDA son razonablemente consistentes con las descritas en otros medios de cultivo (Leslie & Summerell, 2006).

Hongo endófito MAE4

El hongo endófito MAE4 presenta en el anverso y reverso de la colonia micelio blanco, de apariencia algodonosa, abundante y de consistencia suave, su crecimiento es radial y produce pigmento amarillo que difunde en el medio de cultivo (**Figura 6.a y 6.b**). El hongo crece lentamente en medio PDA con una T.C. de $5.59 \text{ cm}^2/\text{días}$ (**Figura 6.c**). El micelio de este hongo se conforma por hifas delgadas, hialinas y septadas, con múltiples orgánulos internos. Las hifas forman espirales y asas. Bajo estas condiciones de cultivo MAE4 no produce estructuras de reproducción (**Figura 6.d, 6.e y 6.f**).

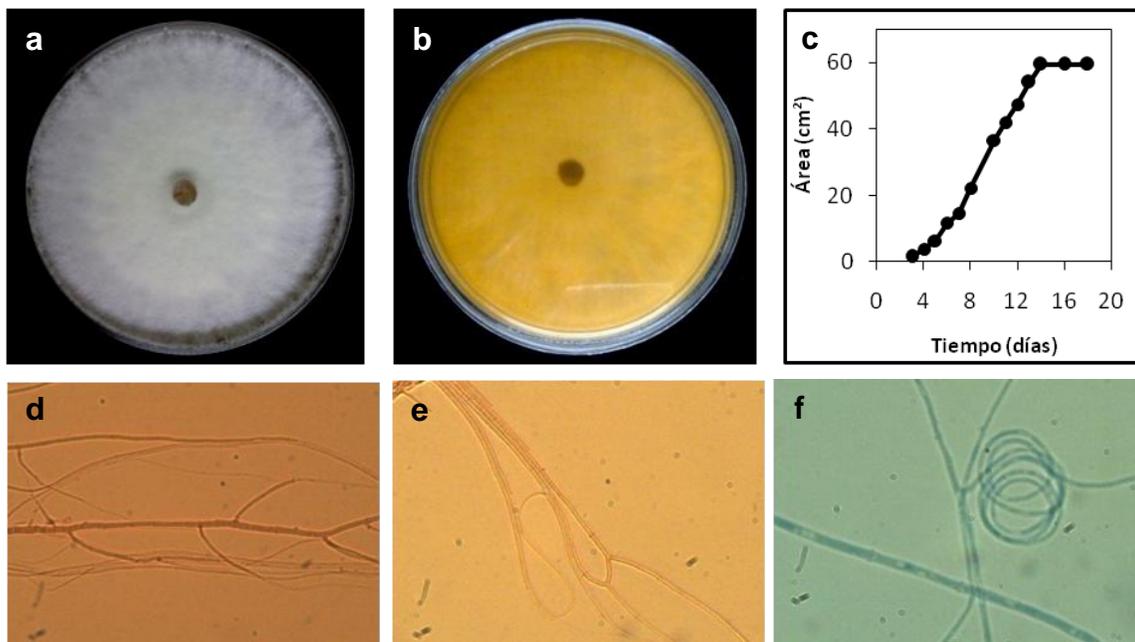


Figura 6. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE4 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (f) y a 100x (e).

Hongo endófito MAE5

El hongo endófito MAE5 presenta en el anverso y reverso de la colonia micelio blanco que con el tiempo se colorea ligeramente naranja. Es de textura lanosa, borde irregular, duro y con hifas muy largas, produce exudado cristalino y no produce pigmento que difunde en el medio de cultivo (**Figura 7.a y 7.b**). En un cultivo viejo (30 días), el micelio forma agregados duros naranja que se pueden observar tanto en el anverso como en el reverso de la colonia. El hongo crece lentamente con una T.C. de 4.40 cm²/día (**Figura 7.c**). El micelio se compone de hifas hialinas, septadas y ramificadas. Bajo estas condiciones de incubación, el hongo MAE5 produce conidios pequeños ovalados y no se observan estructuras de reproducción que permitan inferir su género (**Figura 7.d, 7.e. y 7.f**).

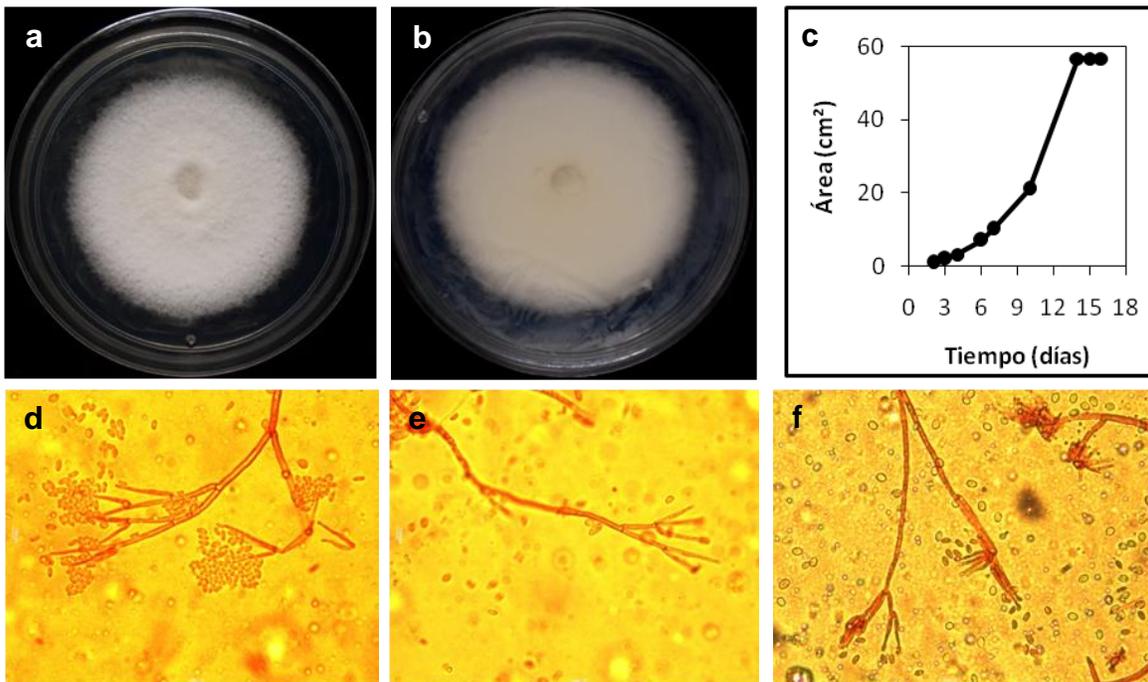


Figura 7. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE5 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 15 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) (e) y (f).

Hongo endófito MAE6

El hongo endófito MAE6 presenta en el anverso de la colonia micelio verde olivo con aspecto zonado y consistencia rígida. Crece radialmente hundiendo ligeramente el agar y rompiéndolo (**Figura 8.a**). El reverso de la colonia es negra con un borde blanco (**Figura 8.b**). El hongo crece con una T.C. de $2.29 \text{ cm}^2/\text{día}$ por lo que crece muy lentamente, tarda aproximadamente 23 días en llenar la superficie de una caja de Petri (**Figura 8.c**). El micelio de este hongo está compuesto por hifas septadas y dematiácias, estas pueden conectarse lateralmente. Bajo estas condiciones el endófito produce conidios ovalados encadenados, que se desprenden con facilidad (**Figura 8.d, 8.e y 8.f**) y tampoco se observan estructuras de reproducción que permitan inferir el género.

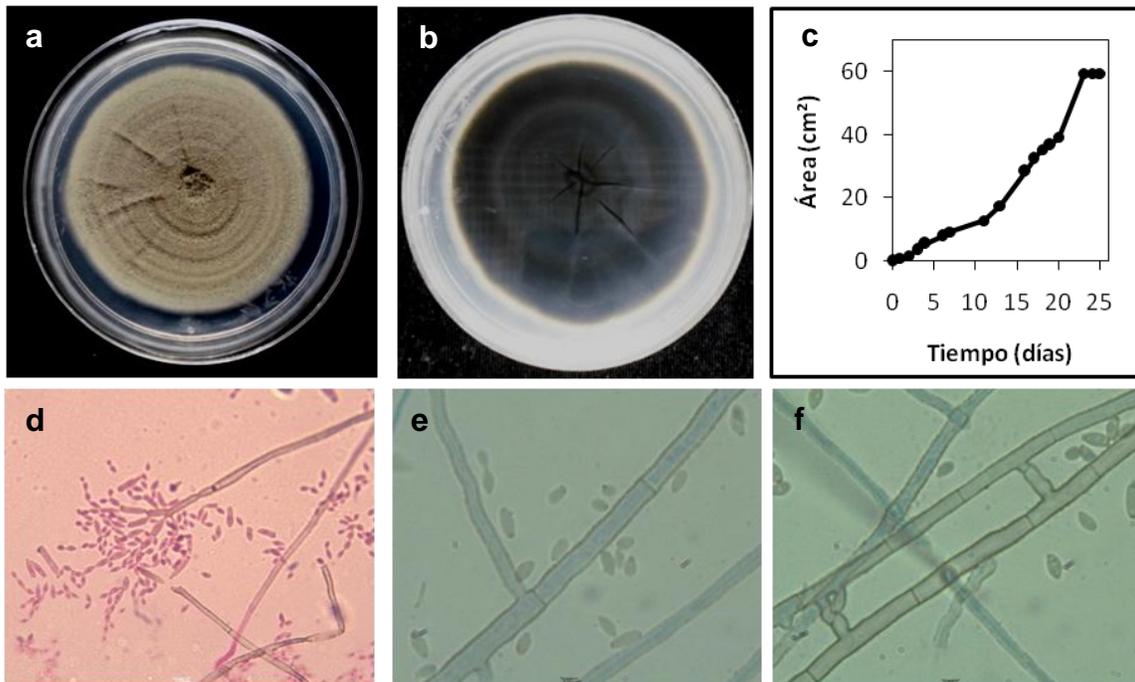


Figura 8. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE6 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).

Hongo endófito MAE7

El hongo endófito MAE7 presenta en el anverso de la colonia un micelio de apariencia aterciopelada. El centro es verde claro con regiones de micelio entre amarillo, verde y blanco; con el paso del tiempo el micelio se vuelve verde uniforme. La colonia es irregular con borde ondulado y presenta surcos radiales. Produce abundante exudado amarillo cristalino, y la consistencia del micelio es dura (**Figura 9.a**). El reverso de la colonia es amarilla con halos claros y oscuros alternos, rompe el agar y produce pigmento amarillo claro que difunde en el medio de cultivo (**Figura 9.b**). El hongo crece muy lentamente con una T.C. de 0.45 cm²/día y con crecimiento limitado (**Figura 9.c**). El micelio está conformado por hifas hialinas, septadas y ramificadas con múltiples orgánulos internos. Bajo las condiciones de cultivo el hongo MAE7 produce estructuras similares a las del género *Aspergillus* (**Figura 9.d, 9.e y 9.f**) (Watanabe, 2010; Arx, 1981).

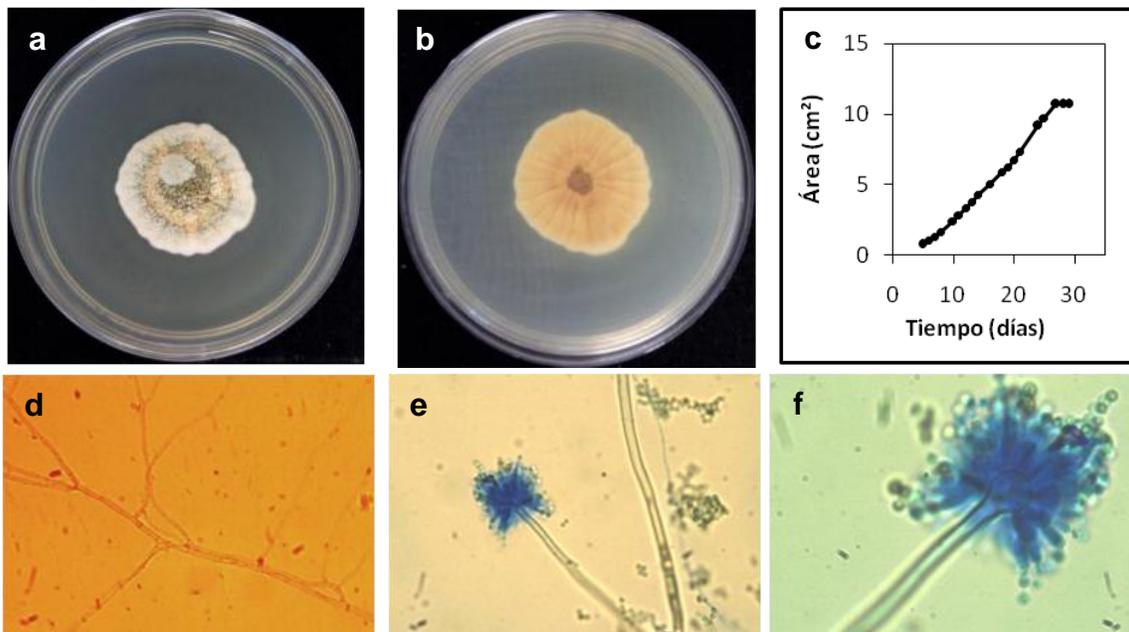


Figura 9. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito MAE7 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 21 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e), y a 100x (f).

2. Hongos endófitos de *Sapium macrocarpum*

Hongo endófito SME1

El hongo endófito SME1 presenta en el anverso de la colonia un micelio blanco que con el paso del tiempo se colorea ligeramente grisáceo. Su textura es algodonosa, su consistencia es suave y de crecimiento radial. Produce ligeramente exudado cristalino (**Figura 10.a**). En el reverso de la colonia, el micelio es blanco (**Figura 10.b**). El hongo crece muy rápidamente con una T.C.de 53.88 cm²/día llenando la superficie del medio de cultivo en dos días (**Figura 10.c**). El micelio se conforma por hifas hialinas, septadas y ramificadas. Bajo las condiciones de incubación las hifas del micelio forman estructuras que surgen de las hifas en forma de saco con conidios redondos en el interior (**Figura 10.d, 10.e** y **10.f**). Sin embargo, bajo estas condiciones de cultivo no se observan estructuras de reproducción que permitan inferir el género del hongo.

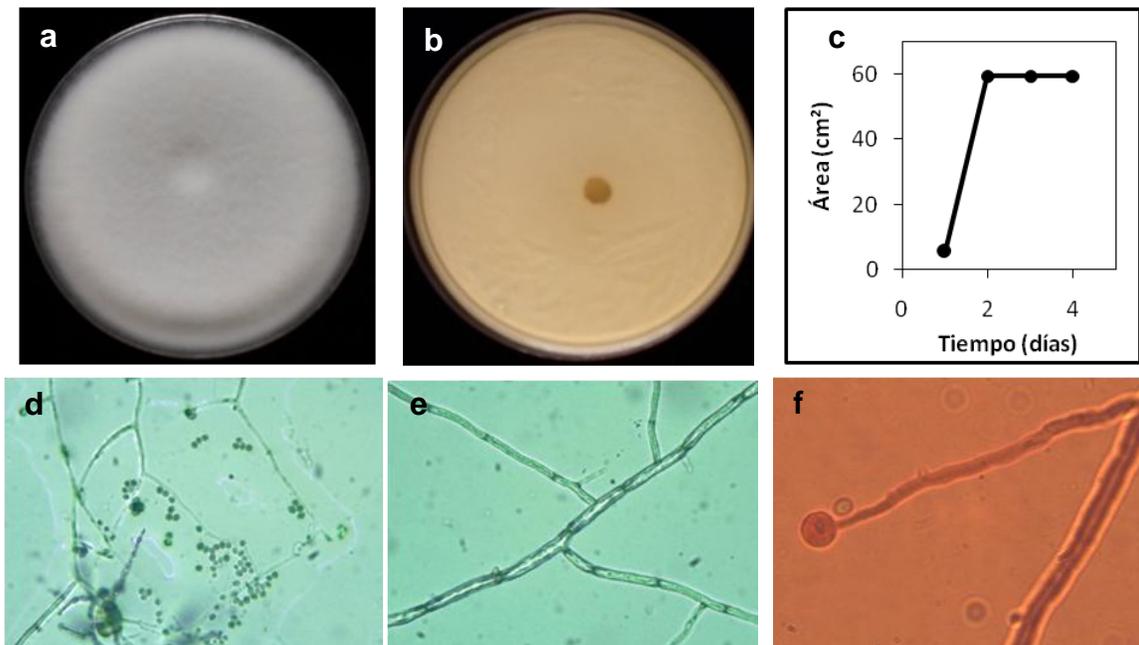


Figura 10. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME1 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 15 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).

Hongo endófito SME2

El hongo endófito SME2 presenta en el anverso de la colonia un micelio blanco, algodonoso, ligeramente elevado, de textura suave, flocoso y crecimiento radial. Con el tiempo el micelio se compacta y se colorea de verde y amarillo, formando halos concéntricos o irregulares (**Figura 11.a**). En el reverso de la colonia, el micelio es blanco y el medio de cultivo se colorea ligeramente amarillo (**Figura 11.b**). Este endófito produce escasamente exudado amarillo cristalino y un aroma dulce característico que posiblemente esté relacionado con la producción de metabolitos secundarios volátiles. El hongo crece rápidamente con una T.C. de $51.05 \text{ cm}^2/\text{día}$, por lo que es capaz de cubrir la superficie del medio de cultivo en dos días (**Figura 6.9c**). El micelio está formado por hifas septadas, de las cuales surgen sacos redondos conteniendo conidios de la misma forma y de menor tamaño (**Figura 11.d, 11.e y 11.f**). Cabe destacar, que las características macroscópicas y microscópicas del hongo SME2 son similares a las de MAE1.

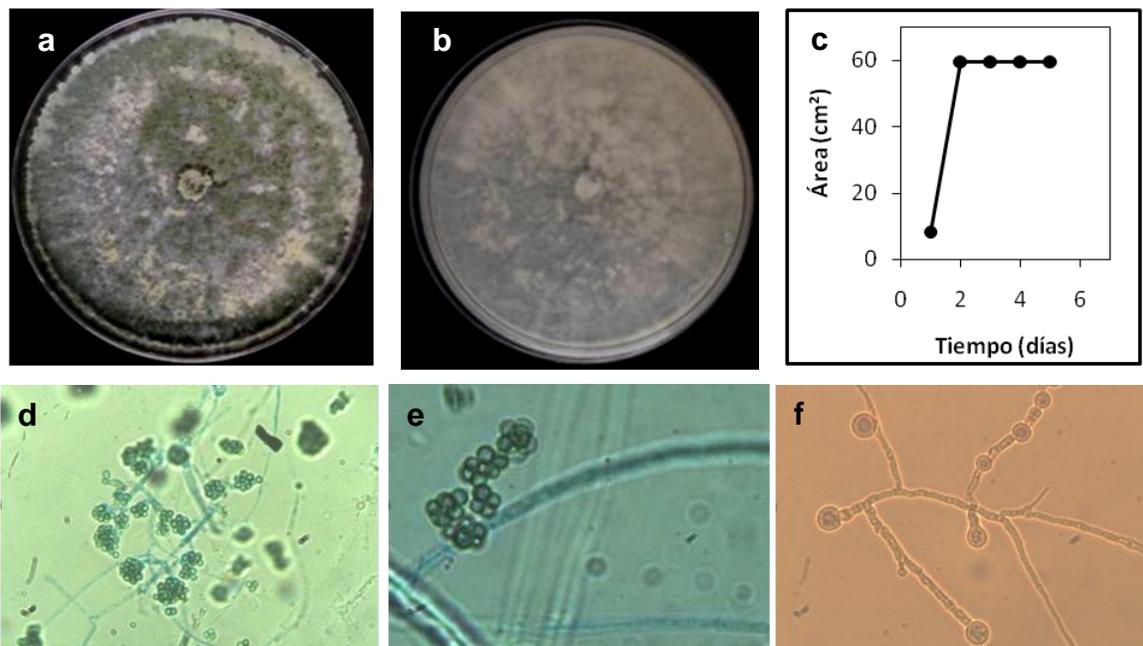


Figura 11. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME2 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).

Hongo endófito SME3

El hongo endófito SME3 presenta en el anverso de la colonia un micelio blanco, flocoso, y de consistencia suave. Con el paso del tiempo, se forman agregados de micelio con consistencia rígida. A partir de los 14 días de incubación se observa una coloración café en algunas regiones del micelio y a los 21 días es evidente la producción de exudado café oscuro (**Figura 12.a**). En el reverso, el micelio es blanco (**Figura 12.b**). Con el tiempo, el hongo produce un pigmento café, difusible en el medio de cultivo. La T.C. de este endófito es de $10.69 \text{ cm}^2/\text{día}$. En las condiciones de incubación tarda 8 días en cubrir la superficie del medio de cultivo (**Figura 12.c**). El micelio se conforma de hifas septadas, hialinas y ramificadas con múltiples orgánulos internos (**Figura 12.d, 12.e y 12.f**). Bajo las condiciones de incubación no se observaron estructuras de reproducción.

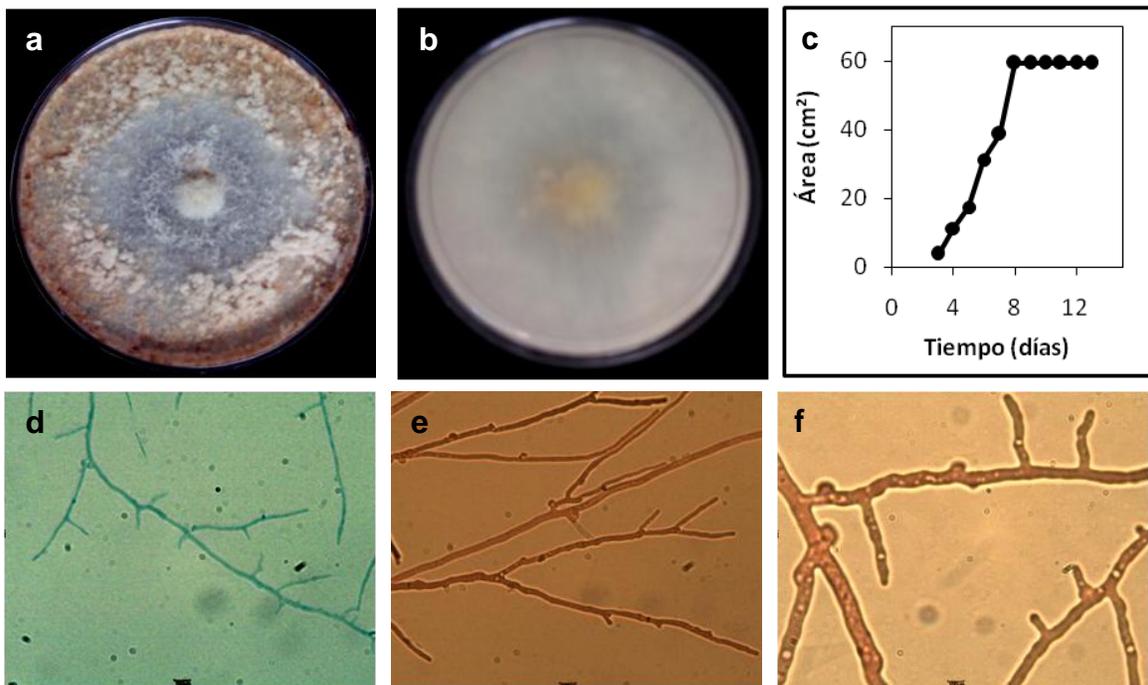


Figura 12. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME3 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 21 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).

Hongo endófito SME4

El hongo endófito SME4 presenta en el anverso de la colonia un micelio blanco que se colorea ligeramente naranja con el paso del tiempo, su apariencia es flocosa. Crece irregularmente con borde ondulado (**Figura 13.a**). En el reverso de la colonia, el micelio es naranja con borde blanco y no se observa la producción de pigmentos que difunden en el medio de cultivo (**Figura 13.b**). El hongo crece lentamente con una T.C. de $6.60 \text{ cm}^2/\text{día}$ (**Figura 13.c**). El micelio se compone de hifas septadas ramificadas, algunas en forma de espiral de las cuales surgen fiálides. Bajo las condiciones de cultivo se producen conidios ovalados septados; además de conidios alargados en forma de vaina, similares a los producidos por el género *Fusarium* (**Figura 13.d, 13.e y 13.f**) (Leslie & Summerell, 2006).

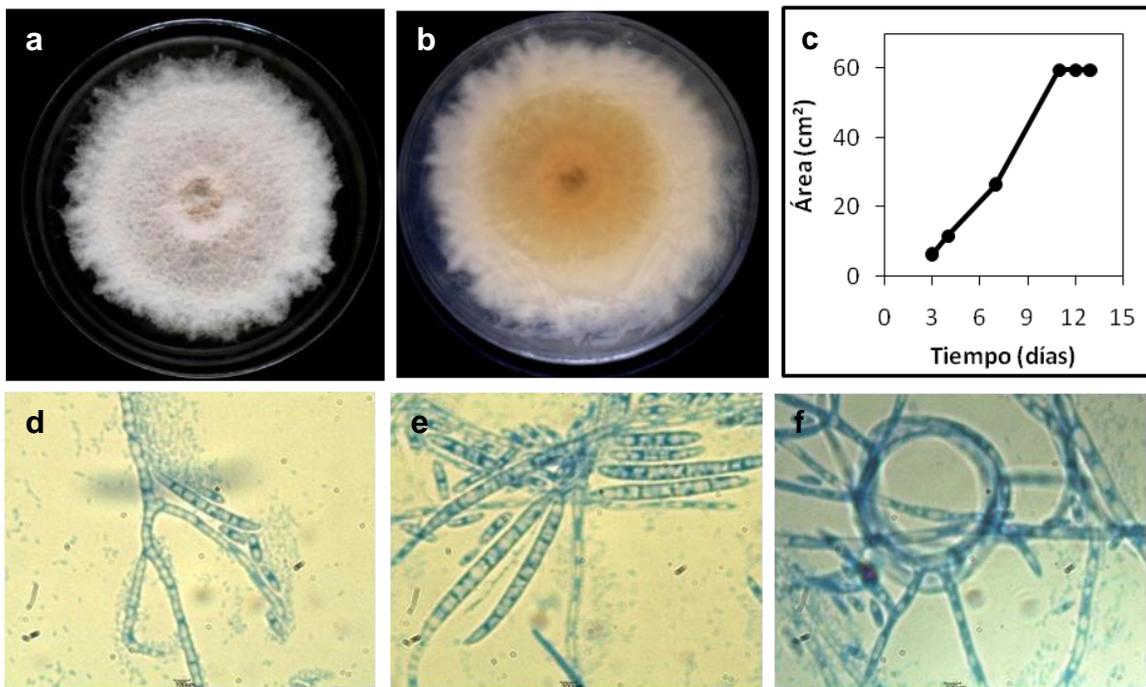


Figura 13. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME4 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).

Hongo endófito SME5

El hongo endófito SME5 presenta un micelio blanco y genera halos café que con el tiempo colorean toda la colonia. La superficie es corrugada, rígida y el borde posee forma de plumas (**Figura 14.a**). El micelio forma estructuras aéreas rígidas redondas y tubulares café con extremos blancos, similares a las que produce el género *Xylaria* (**Figura 14. c**) (Fournier *et al.*, 2010). Produce un exudado amarillo cristalino (**Figura 14.c**). En el reverso, la colonia es blanca o ligeramente amarilla con el centro y borde color café (**Figura 14.b**). Este endófito crece irregularmente en medio PDA con una T.C. de 3.71 cm²/día (**Figura 14.d**). El hongo produce un pigmento café que difunde en el medio de cultivo. El micelio se conforma por hifas septadas, dematiácias y ramificadas que se conectan lateralmente (**Figura 14.e y 14.f**). Bajo las condiciones de cultivo utilizadas no se producen estructuras de reproducción.

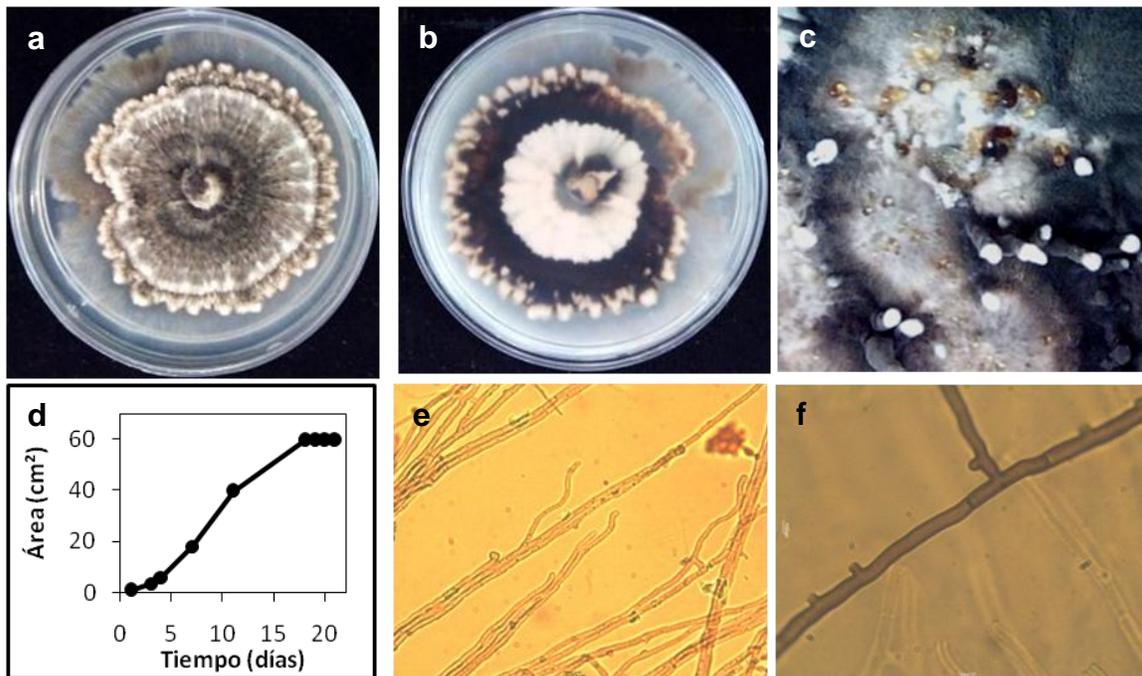


Figura 14. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME5 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 21 días de incubación. (c) El hongo produce exudado amarillo cristalino. (d) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (f).

Hongo endófito SME6

El hongo endófito SME6 presenta micelio amarillo de apariencia lanosa y consistencia suave y crece irregularmente con borde ondulado. En algunas regiones el micelio es plano y húmedo, de consistencia elástica (**Figura 15.a**). En el reverso de la colonia se observa que el micelio es ligeramente amarillo (**Figura 15.b**). El hongo crece lentamente con una T.C. de $5.7 \text{ cm}^2/\text{día}$ (**Figura 15.c**). El micelio se compone de hifas septadas y ramificadas, con múltiples orgánulos internos (**Figura 15.d**). Bajo las condiciones de cultivo el hongo SME6 produce conidios ovalados, septados y binucleados (**Figura 15.e**) y alargados en forma de vaina (**Figura 15.f**). Estos conidios son similares a los producidos por el género *Fusarium* (Leslie & Summerell, 2006).

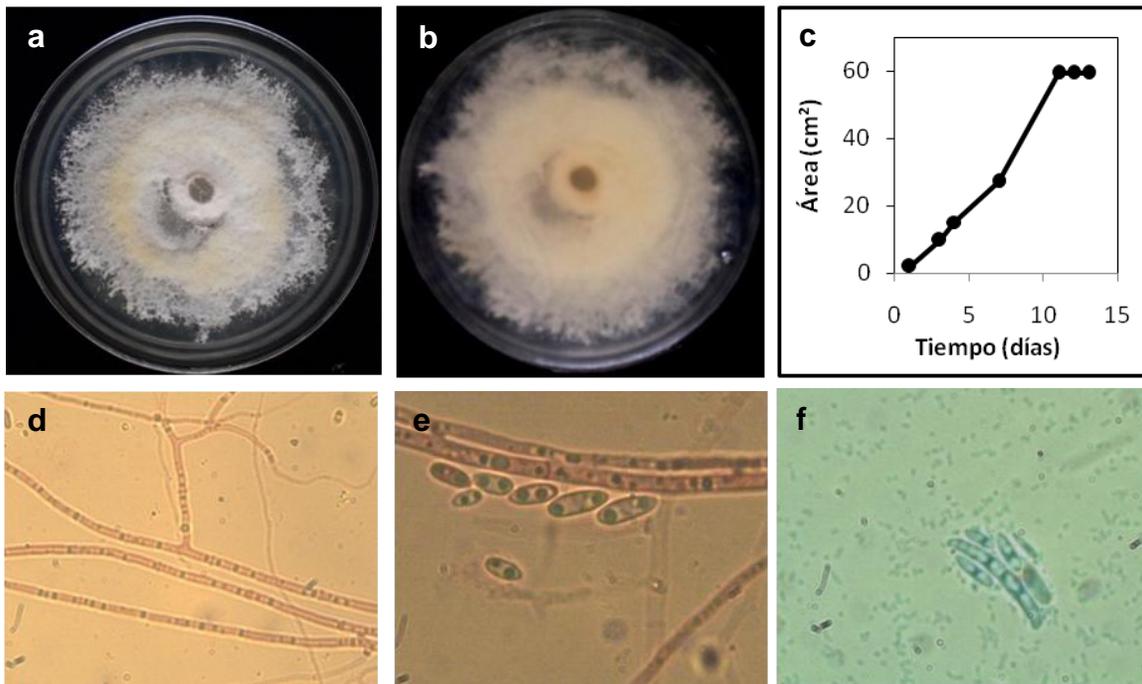


Figura 15. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME6 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).

Hongo endófito SME7

El hongo endófito SME7 presenta en el anverso de la colonia micelio color blanco, plano, húmedo y de consistencia elástica. Muestra zonas escasas de micelio algodonoso, con borde irregular (**Figura 16.a**). En el reverso de la colonia es ligeramente amarillo (**Figura 16.b**). El hongo crece lentamente con una T.C. de $4.89 \text{ cm}^2/\text{día}$ (**Figura 16.c**). El micelio se conforma de hifas septadas, con múltiples orgánulos internos, ramificadas y con hifas en espiral de la que surgen fiálides delgadas (**Figuras 16.d, 16.e y 16.f**). Se observan conidios ovalados dispersos (**Figura 16.e**). Bajo estas condiciones de cultivo, no se observan estructuras de reproducción que permitan inferir el género del hongo SME7.

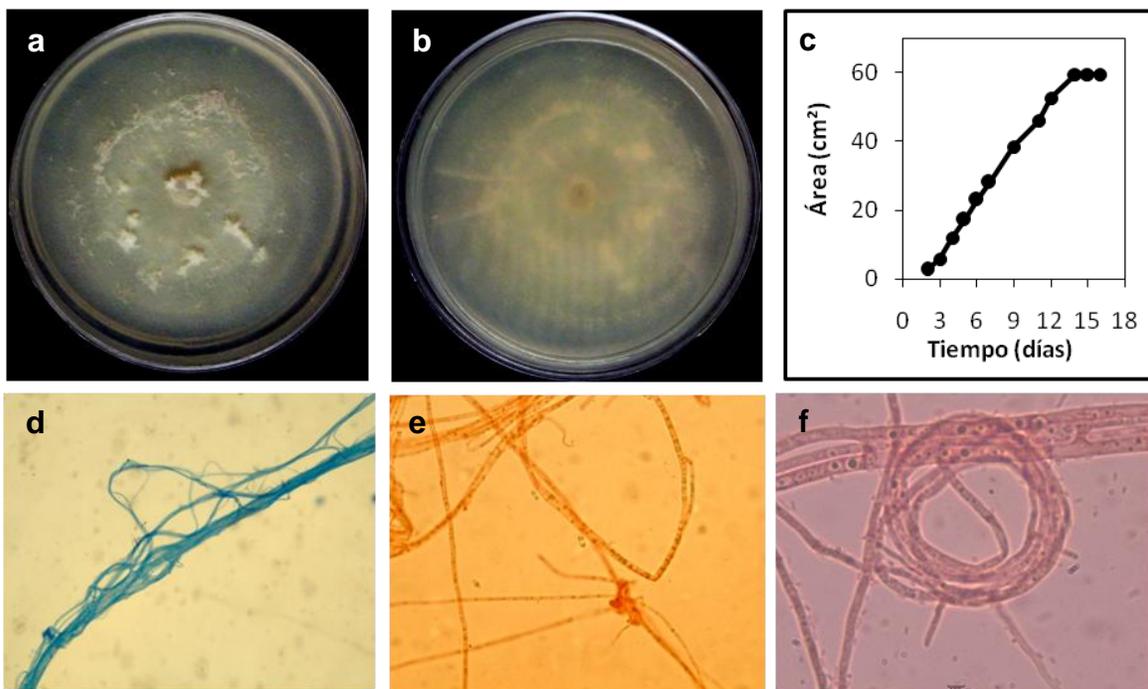


Figura 16. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME7 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).

Hongo endófito SME8

El hongo endófito SME8 presenta en el anverso de la colonia micelio de color blanco, de textura lanosa, suave, con micelio abundante. Produce escaso exudado cristalino (**Figura 17.a**). Con el transcurso del tiempo el micelio se colorea ligeramente de color naranja y forma agregados de micelio color naranja. En el reverso, el micelio es amarillo claro (**Figura 17.b**). El hongo endófito crece lentamente con una T.C. de $4.76 \text{ cm}^2/\text{día}$ (**Figura 17.c**). El micelio se conforma de hifas septadas y ramificadas, con múltiples orgánulos internos (**Figura 17.d, 17.e**) y se observan conidios ovalados (**Figura 17.f**). Sin embargo, bajo las condiciones de cultivo empleadas no se producen estructuras de reproducción que permitan inferir el género hongo SME8.

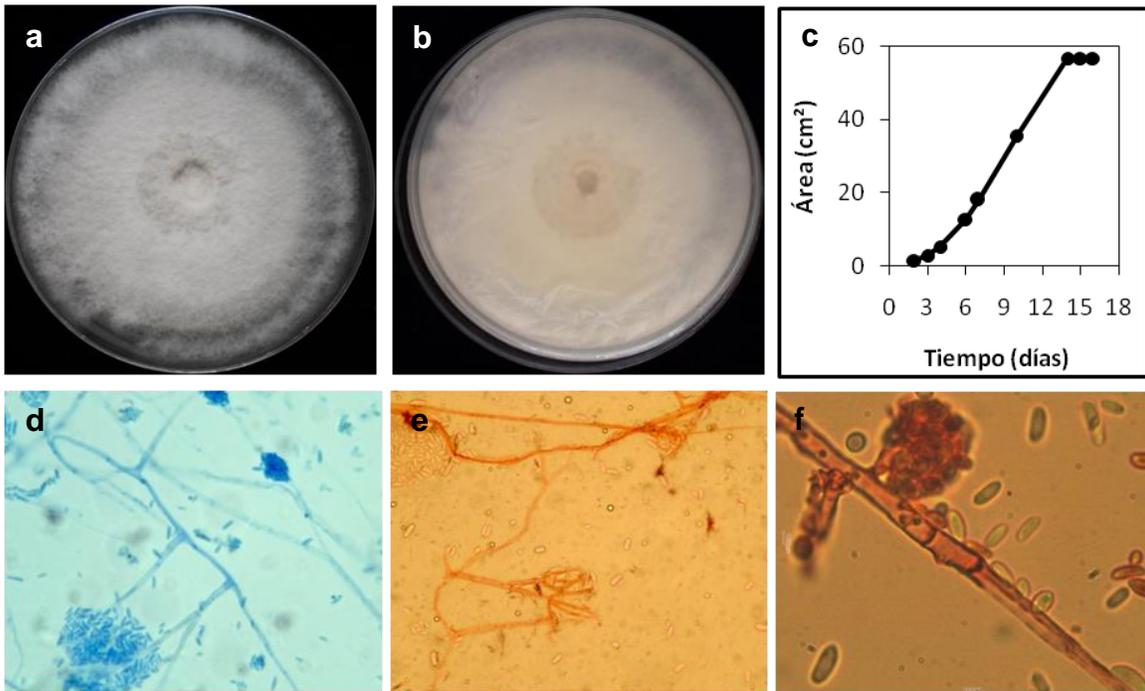


Figura 17. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME8 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).

Hongo endófito SME9

El hongo endófito SME9 presenta en el anverso y reverso de la colonia micelio abundante color rosado en el centro, con borde blanco lanoso, su consistencia es suave (**Figura 18.a y 18.b**). Produce exudado cristalino incoloro. El hongo crece lentamente con una T.C. de $4.46 \text{ cm}^2/\text{día}$ (**Figura 18.c**). El micelio se conforma de hifas hialinas, septadas y ramificadas con múltiples orgánulos. Las hifas forman espirales, de las cuales surgen fiálides delgadas (**Figura 18.f**). Bajo las condiciones de cultivo el hongo produce dos tipos de conidios: ovalados, septados y binucleados, y en forma de vaina (**Figura 18.d y 18.e**). Estos conidios son similares a los producidos por el género *Fusarium* (Leslie & Summerell, 2006).

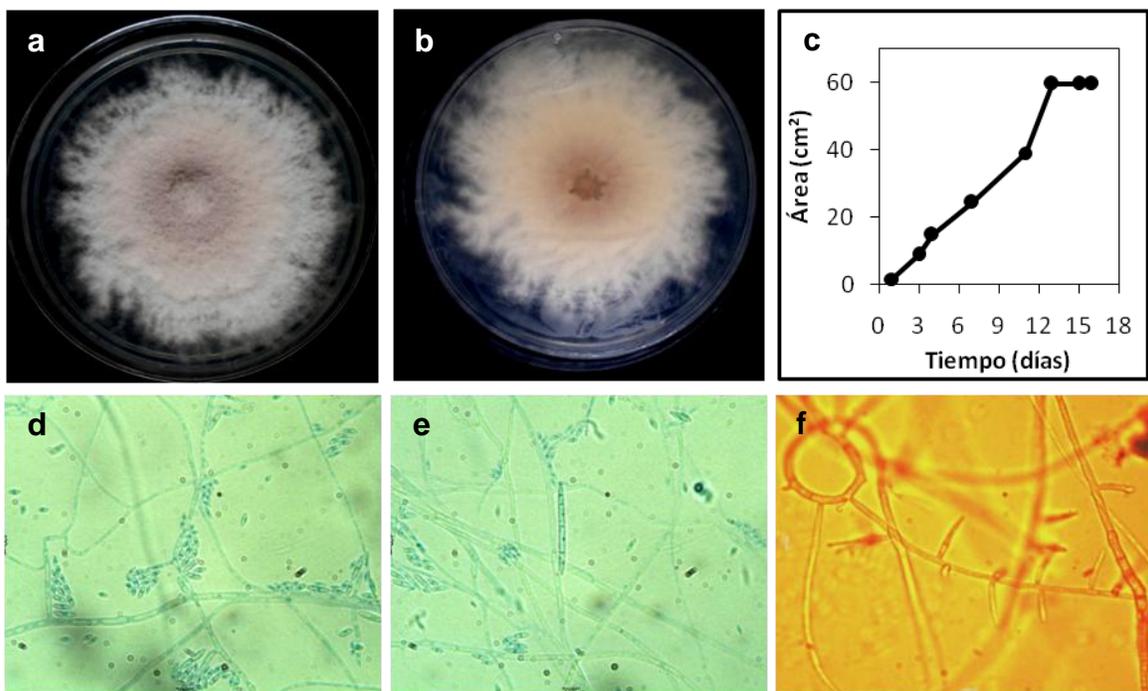


Figura 18. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME9 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).

Hongo endófito SME10

El hongo endófito SME10 presenta en el anverso de la colonia micelio color blanco con centro violeta, debido a la producción de exudado del mismo color. Su textura es algodonosa, ligeramente umbonado y consistencia suave (**Figura 19.a**). Con el transcurso del tiempo el borde del micelio se oscurece. En el reverso de la colonia, el micelio es blanco con el centro violeta (**Figura 19.b**) y con el tiempo produce halos concéntricos grises. El hongo crece lentamente con una T.C. de $3.60 \text{ cm}^2/\text{día}$ (**Figura 19.c**). El micelio se conforma de hifas delgadas hialinas, septadas con múltiples orgánulos internos, las cueles pueden ramificarse y formar espirales. Bajo las condiciones de incubación, el endófito SME10 no produjo estructuras de reproducción (**Figura 19.d, 19.e y 19.f**).

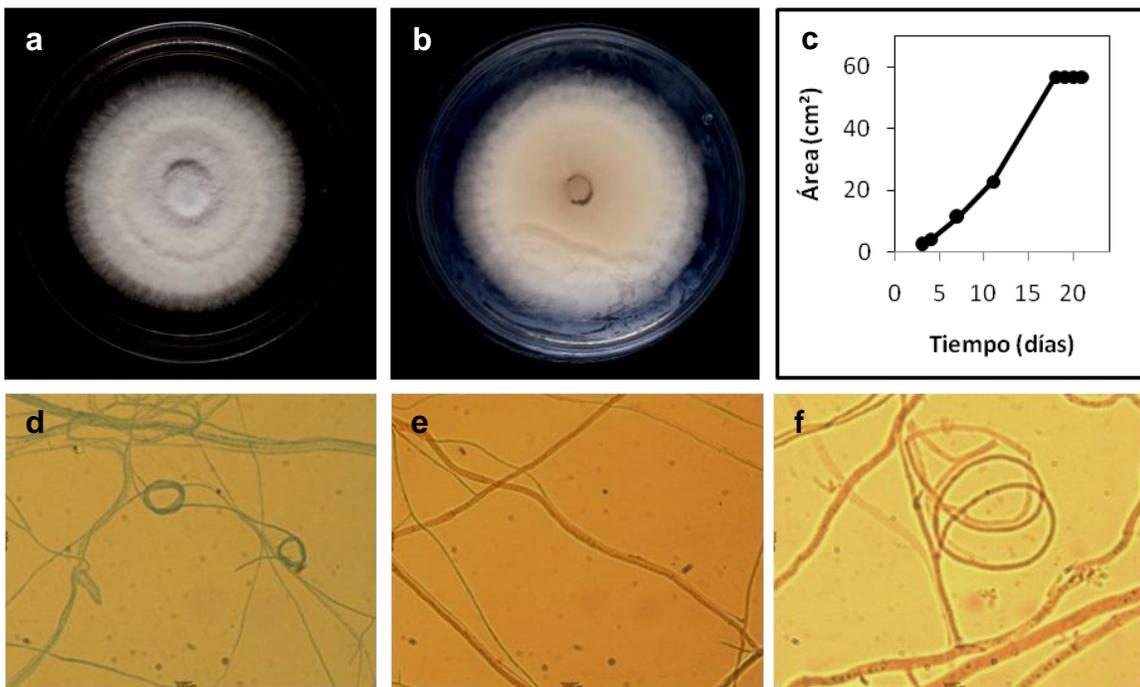


Figura 19. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME10 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).

Hongo endófito SME11

El hongo endófito SME11 inicialmente presenta en el anverso de la colonia micelio blanco abundante, de consistencia rígida, con zonas de micelio escaso. En el reverso de la colonia el micelio es color blanco. A los 21 de incubación el micelio, en el anverso y el reverso, se colorea ligeramente café formando halos (**Figura 20.a y 20.b**). El hongo endófito crece con una T.C. de $3.58 \text{ cm}^2/\text{día}$ (**Figura 20.c**). El micelio se conforma de hifas hialinas, delgadas, septadas, que se ensanchan entre cada septo y con múltiples orgánulos internos (**Figura 20.d, 20.e y 20. f**). Bajo las condiciones de incubación el hongo SME11 no produce estructuras de reproducción.

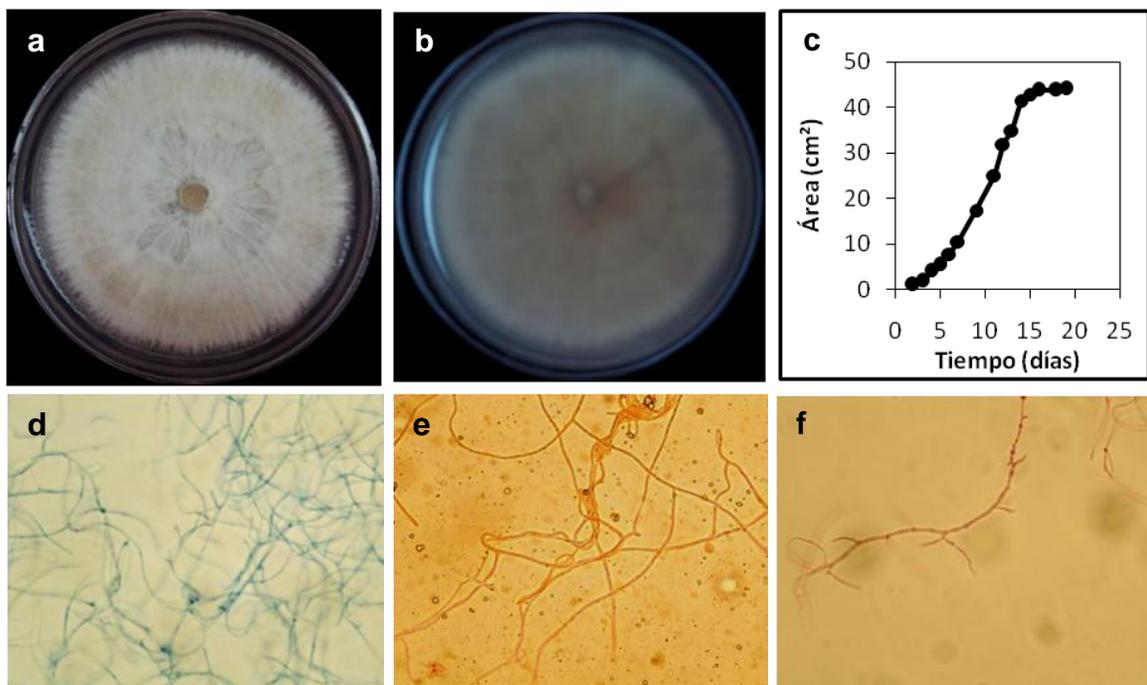


Figura 20. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME11 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 21 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d), (e) y (f).

Hongo endófito SME12

El hongo endófito SME12 presenta en el anverso de la colonia micelio color blanco abundante, de apariencia rugosa, rígido, y con borde irregular. Produce exudado cristalino amarillo claro (**Figura 21.a**). En el reverso, el micelio es blanco con el centro amarillo claro (**Figura 21.b**). Con el paso del tiempo el micelio se torna color gris con motas negras. El hongo crece muy lentamente con una T.C. de 2.86 cm²/día (**Figura 21. c**). El micelio del hongo se conforma de hifas septadas y ramificadas con múltiples organelos internos (**Figura 21.d, 21.e y 21.f**). Bajo las condiciones de incubación el hongo SME12 no produjo estructuras de reproducción.

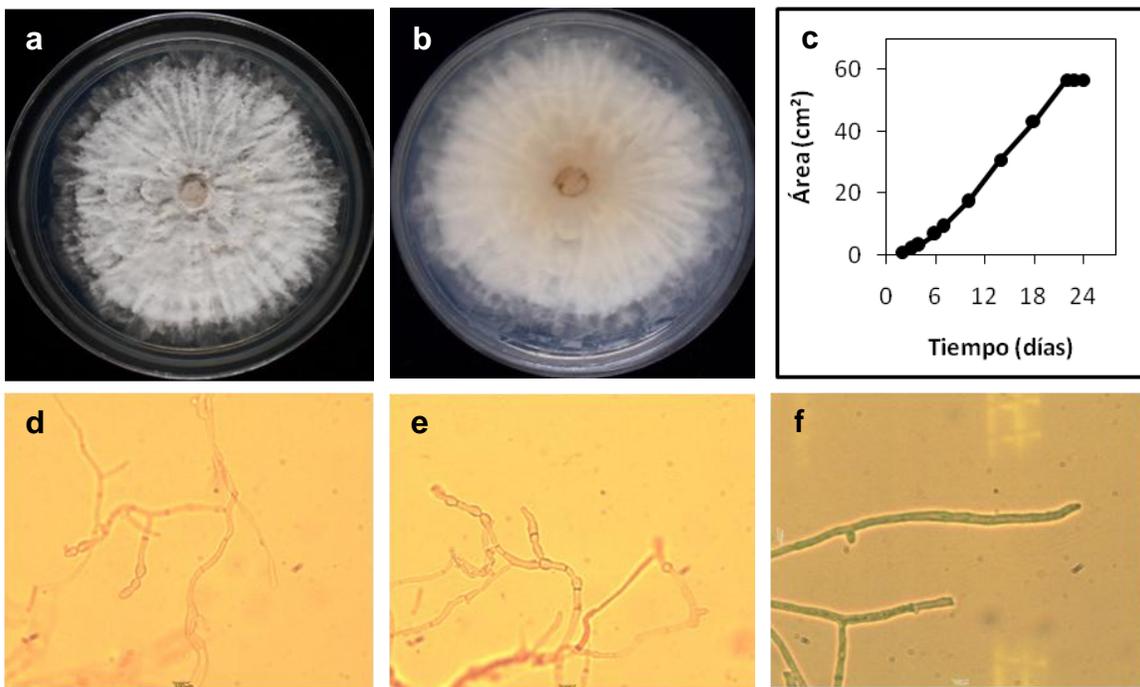


Figura 21. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME12 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 18 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y (e) y a 100x (f).

Hongo endófito SME13

El hongo endófito SME13 presenta el anverso y reverso de la colonia micelio anillado, con halos de color naranja, morado y blanco alternos (**Figura 22.a y 22.b**). En el anverso del micelio es abundante, de apariencia algodonosa, suave y con borde irregular (**Figura 22.a**). Produce exudado amarillo cristalino y no origina pigmentos difusibles en el medio de cultivo. El hongo crece muy lentamente con una T.C. de $2.62 \text{ cm}^2/\text{día}$. El micelio se conforma por hifas septadas, hialinas y con múltiples orgánulos internos, de las cuales surgen fiálides delgadas (**Figura 22.d, 22.e y 22.f**). Bajo las condiciones de cultivo el hongo produce conidios ovalados alargados septados y binucleados, similares a los producidos por el género *Fusarium* (Leslie & Summerell, 2006).

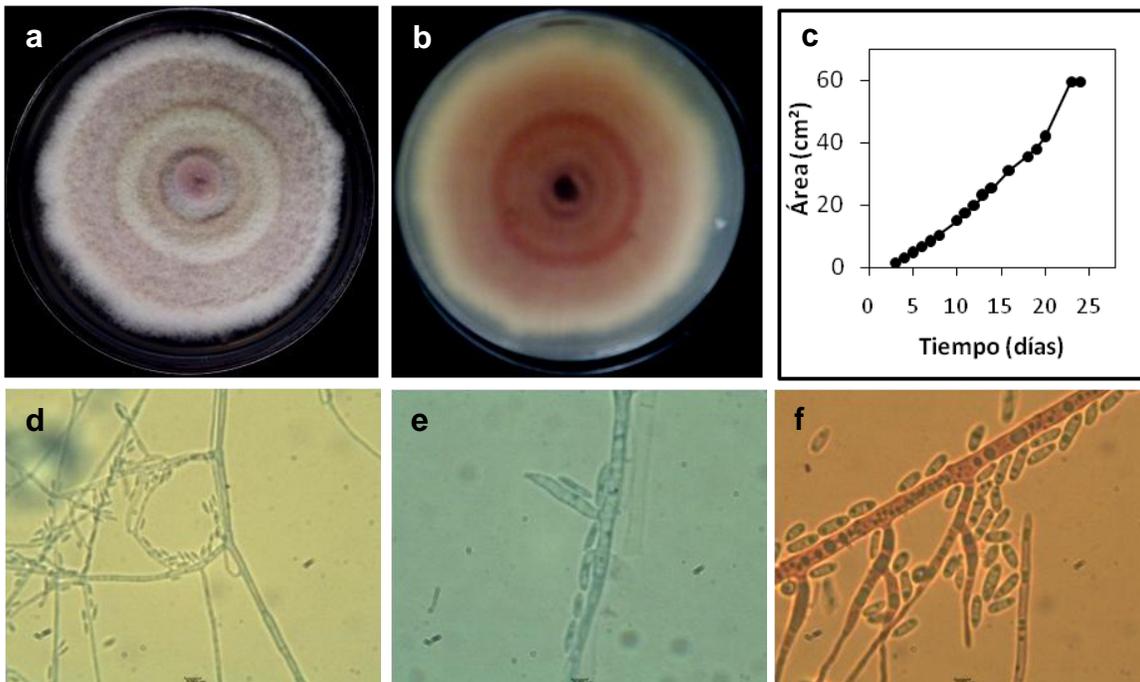


Figura 22. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME13 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 21 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d) y a 100x (e) y (f).

Hongo endófito SME14

El hongo endófito SME14 presenta en el anverso y reverso de la colonia micelio blanco (**Figura 23.a y 23.b**). En el anverso el micelio es de apariencia lanosa y con halos de micelio elevados. Su consistencia es suave, y no produce pigmentos difusibles en el medio de cultivo. Crece muy lentamente con borde entero con una T.C. de $2.06 \text{ cm}^2/\text{día}$ (**Figura 23.c**). El micelio se conforma por hifas septadas delgadas, de las cuales surgen hifas gruesas que se ramifican y engrosan (**Figura 23.d, 23.e y 23.f**). Bajo las condiciones de incubación el hongo SME14 no formó estructuras de reproducción.

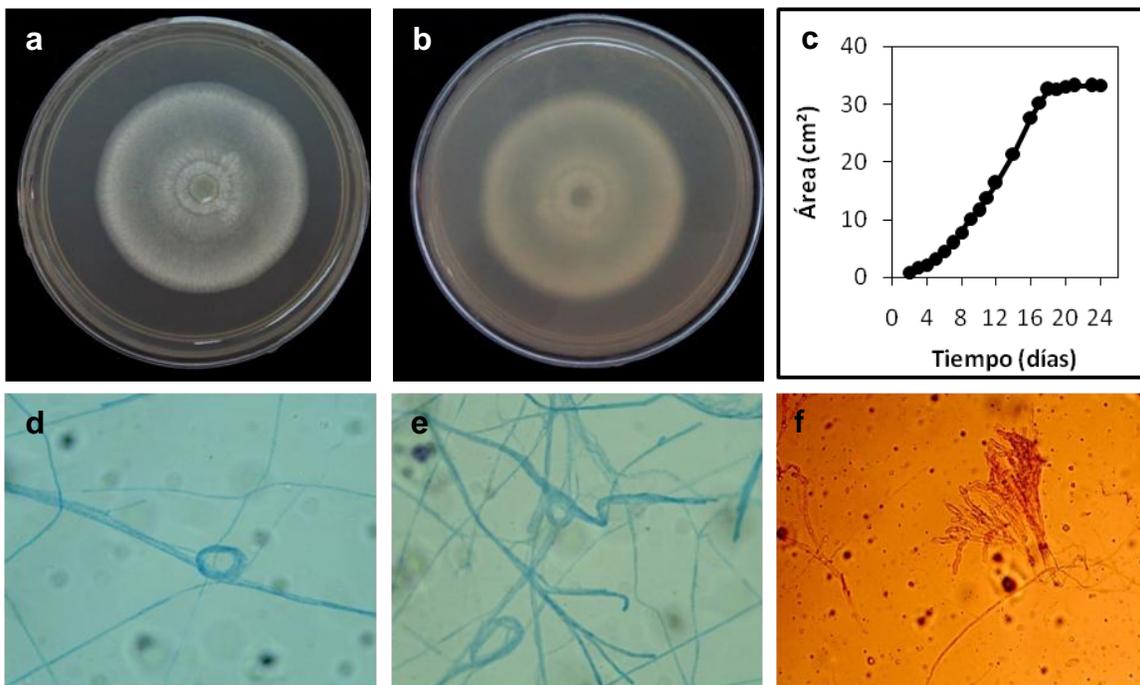


Figura 23. Características macroscópicas, microscópicas y curva de crecimiento del hongo endófito SME14 cultivado en medio PDA. Fotografías del anverso (a) y reverso (b) del micelio de una colonia del hongo a los 14 días de incubación. (c) Curva de crecimiento. Micrografías ópticas a 40x (d), (e) y (f).

El análisis detallado de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos aislados de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum* colectadas en la REBIOSH, una zona de alta diversidad biológica, permitió determinar su pureza, su tasa de crecimiento e inferir el género de algunos de los aislamientos en estudio. Se identificaron cinco hongos endófitos posiblemente pertenecientes al género *Fusarium*. El endófito MAE3, aislado de la planta *M. affinis* y los endófitos SME4, SME6, SME9 y SME13 aislados de *S. macrocarpum* (Arx, 1981; Leslie & Summerell, 2006; Watanabe, 2010). Cabe destacar que estos aislamientos muestran características macroscópicas diferentes entre sí, y en consecuencia deben pertenecer a especies distintas o a variantes morfológicas (Leslie & Summerell, 2006). Además, se identificó un hongo endófito aislado de *M. affinis* (asilamiento MAE7) como posible miembro del género *Aspergillus* (Arx 1981; Watanabe 2010) y un hongo endófito perteneciente al género *Xylaria* (asilamiento SME5) aislado de *S. macrocarpum*.

De manera paralela, y en colaboración con la Dra. Patricia E. Lappe Oliveras del laboratorio de Macromicetos y Levaduras, del Instituto de Biología, UNAM, se llevó a cabo la confirmación de los géneros identificados, y la descripción taxonómica hasta especies de cuatro de los hongos endófitos en estudio. En el **Cuadro 5** se presenta el listado de los hongos identificados a nivel de género y especie.

El análisis de las características macroscópicas y microscópicas de los aislamientos SME4, SME6, SME9 y SME13 en diferentes medios de cultivo (Leslie & Summerell, 2006) permitió corroborar que pertenecen al género *Fusarium*. Los hongos endófitos SME4 y SME6 corresponden a la especie *F. solani*. Los endófitos SME9 y SME13 pertenecen a las especies *F. commune* y *F. avenaceum*, respectivamente. Actualmente, se está confirmando de manera inequívoca la taxonomía de las especies de *Fusarium*, mediante estudios de biología molecular.

Cuadro 5. Especies de hongos endófitos identificados

Hongo endófito	Género	Especie
MAE3	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp.
MAE7	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
SME4	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium solani</i>
SME5	<i>Xylaria</i>	<i>Xylaria</i> sp.
SME6	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium solani</i>
SME9	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium commune</i>
SME13	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>

3. Bioensayos de antagonismo directo entre los hongos endófitos de *Mimosa affinis* y entre los de *Sapium macrocarpum*

Una vez que se realizó la descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos puros de las plantas *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarpum*, y de su clasificación en diferentes categorías de acuerdo con su tasa de crecimiento (muy rápidos, rápidos, lentos y muy lentos), se diseñaron bioensayos de antagonismo directo *in vitro* entre los hongos endófitos pertenecientes a la misma categoría.

Los bioensayos se realizaron entre los hongos endófitos de la misma planta inoculando dos hongos diferentes a una distancia de 40 mm en una caja de Petri con medio de cultivo PDA (**Figura 24**). Como control de crecimiento se cultivaron los hongos competidores por separado, inoculándolos en el centro de cajas de Petri en el mismo medio de cultivo, para comparar las características morfológicas de los hongos.

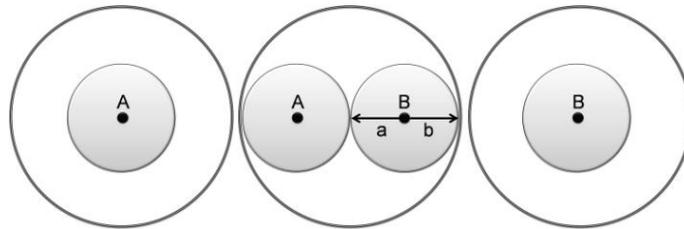
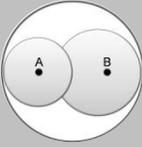
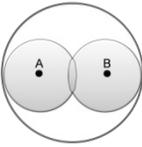
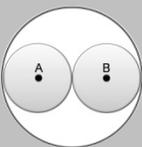
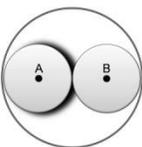
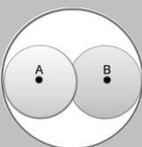
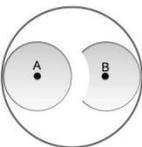


Figura 24. Modelo de antagonismo directo, (A) hongo endófito de prueba, (B) hongo endófito competidor (a) radio de interacción (b) radio de no interacción.

Mediante bioensayos de antagonismo directo se evaluaron las interacciones entre los hongos de crecimiento lento y muy lento de *M. affinis*, y las interacciones entre los hongos muy rápidos, lentos y muy lentos de *S. macrocarpum*. Cabe mencionar que los hongos de crecimiento muy rápido de *M. affinis* y rápido de ambas plantas no se evaluaron debido a que en su categoría solo existe un endófito.

Cuadro 6. Tipos de interacción y valores numéricos asignados (modificado de Yuen *et al.*, 1999).

Categoría	Tipos de interacción	Valor
A1	 El crecimiento de A es inhibido por la especie B	0
A2	 El crecimiento de A se entremezcla con el de B, sin que exista reducción en el crecimiento de alguna de ellas.	0
B	 La especie A crece en contacto con B y cesa el crecimiento de ambas especies.	1
C	 La especie A forma un halo oscuro al estar en contacto con B.	2
D	 La especie A crece sobre la especie B reduciendo el crecimiento de B.	3
E	 La especie A inhibe a distancia a la especie B.	4

Los índices de antagonismo (IA) fueron calculados para cada hongo endófito de prueba (A) sumando los puntos asignados por cada categoría:

$$IA=(n*A1)+(n*A2)+(n*B)+(n*C)+(n*D)+(n*E)$$

“n” es el número de veces que el hongo presentó la categoría de antagonismo.

Para determinar el potencial antagónico que presentan los hongos endófito de *M. affinis* y *S. macrocarpum* sobre sus competidores se calculó, el porcentaje de

inhibición (%I), comparando los radios de interacción con los de no interacción del hongo competidor B ($\% I = \frac{a-b}{b} \times 100$). Además, se determinó el índice de antagonismo (IA) de cada microorganismo competidor, con base en un modificado de las categorías de antagonismo (A1, A2, B, C, D, E) establecidas por Yuen y colaboradores (1999), de acuerdo con el tipo de interacción mostrado por hongos en interacción antagónica. Las categorías se asignaron con base en las observaciones macroscópicas obtenidas al término de los bioensayos de antagonismo, a cada una de ellas se le atribuyó un valor numérico, el cual permitió calcular el IA. En el **Cuadro 6** se muestran las categorías de los tipos de interacciones *in vitro*, y los valores numéricos asignados.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los bioensayos de antagonismo, realizados entre los hongos endófitos de *M. affinis* y *S. macrocarpum* con tasa crecimiento similar.

Hongos endófitos con tasa de crecimiento lento aislados de *Mimosa affinis*

En la **Figura 25** se muestra a manera de ejemplo, fotografías del cultivo en interacción antagónica entre los hongos endófitos MAE3 y MAE4 de tasa de crecimiento lenta, aislados de *M. affinis* a los 14 días de interacción antagónica. El hongo MAE4 crece rodeando completamente el micelio de su competidor, y en la zona de interacción se observa mayor densidad de hifas (**Figura 25 A**). El hongo MAE3 produjo, como respuesta a la interacción, un pigmento amarillo claro en el borde de la colonia. La presencia de ambos microorganismos en interacción generó cambios morfológicos en el micelio de los dos hongos competidores (**Figura 25 B**).

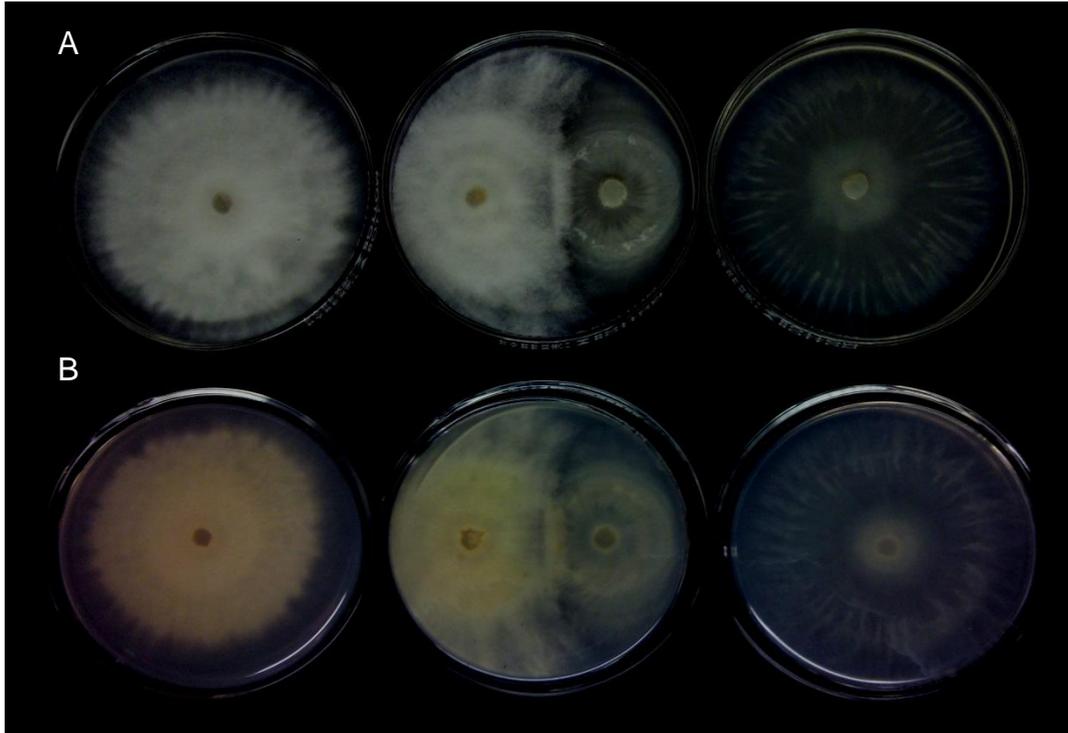


Figura 25. Antagonismo directo entre los hongos endófitos MAE4 (izquierda) y MAE3 (derecha) con tasa de crecimiento lenta, aislados de *Mimosa affinis*. Las fotografías del anverso (A) y del reverso (B) fueron tomadas a los 14 días de interacción antagónica.

En el **Cuadro 7** se presentan los porcentajes de inhibición y el índice de antagonismo de los tres hongos antagonizados entre ellos, a los 14 días de interacción antagónica. El hongo MAE4 inhibió significativamente y en más del 50.0% el crecimiento de sus competidores; mostrando una interacción tipo D (**Cuadro 6**), en donde el endófito MAE4 creció sobre el micelio de los hongos MAE3 y MAE5 obteniéndose un IA de 6 puntos. Este comportamiento puede atribuirse a la facilidad del hongo en utilizar los nutrientes del medio de cultivo y crecer rápidamente sobre la superficie, limitando el crecimiento de sus competidores y a la producción de metabolitos secundarios (no necesariamente coloridos) difusibles en el agar y con propiedades antifúngicas o bien a su comportamiento como micoparásito, al crecer sobre sus competidores (Boddy,

2000). Por su parte, el hongo MAE3 inhibió significativamente y en un 46.6% el crecimiento del hongo MAE5, presentando una interacción tipo D, debido a que crece sobre el micelio de su competidor (**Cuadro 6**), obteniéndose un IA de 3. Por el contrario, el hongo MAE5 es inhibido por los dos competidores en consecuencia su IA es de cero.

Con base en las observaciones obtenidas, el hongo MAE4, se seleccionó como el hongo endófito de *M. affinis* de tasa de crecimiento lenta, con mayor potencial antagonico. Este microorganismo inhibe significativamente a sus dos competidores, mostrando los valores más altos de IA.

Cuadro 7. Porcentajes de inhibición e índices de antagonismo de los hongos endófitos de *Mimosa affinis* con tasa de crecimiento lenta a los 14 días de interacción antagonica.

Hongo de prueba	Porcentaje de inhibición			Índice de antagonismo
	MAE3	MAE4	MAE5	
MAE3		0.0 ± 0.0	46.6 ± 1.3*	3
MAE4	60.0 ± 1.9*		55.4 ± 1.1*	6
MAE5	7.9 ± 0.2	0.0 ± 0.0		0

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

Hongos endófitos con tasa de crecimiento muy lento aislados de *Mimosa affinis*

En la **Figura 26** se ilustra la interacción entre los hongos MAE7 y MAE6 a los 10 días de incubación. Debido a que el hongo MAE7 presentó la T.C. más baja (0.45 cm²/día) se inoculó en el medio de cultivo 15 días antes que su competidor. El

hongo MAE7 es el endófito de crecimiento más lento que se aisló de la planta *M. affinis*. Cabe mencionar que el endófito MAE7 es de crecimiento limitado.

A los diez días de interacción antagónica, se observó que el endófito MAE7 produce un pigmento naranja, que difunde en el medio de cultivo y que limita el crecimiento del hongo MAE6. La producción de pigmentos que difunden en el medio de cultivo, puede atribuirse a la producción de metabolitos secundarios coloridos con actividad antifúngica. El hongo MAE7 inhibe a distancia el crecimiento de su competidor en un 25.5%, produciendo una interacción tipo E. Esta inhibición se mantuvo durante el tiempo de observación (21 días) (**Cuadro 8**).

Adicionalmente, se observó que la colonia del hongo MAE7 en el cultivo en interacción presenta mayor micelio aéreo y exudado, en comparación con su cultivo control (**Figura 26**).

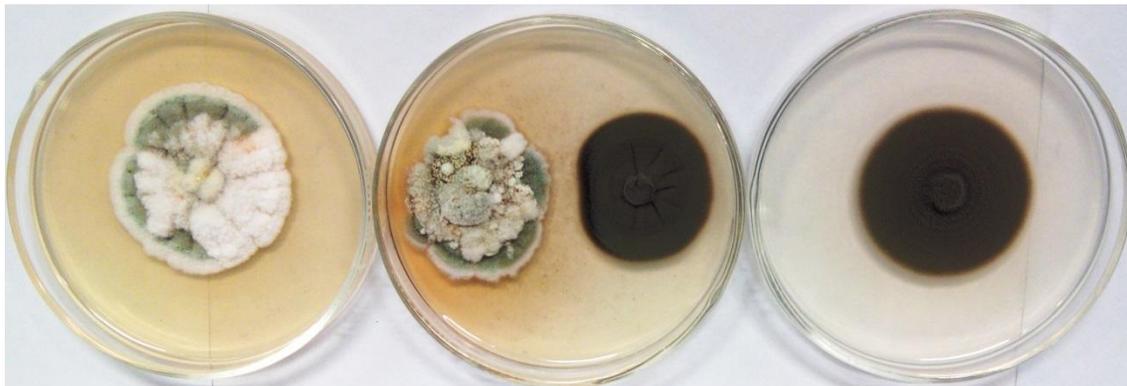


Figura 26. Antagonismo directo entre los hongos endófitos MAE7 (izquierda) y MAE6 (derecha) con tasa de crecimiento muy lento aislados de *Mimosa affinis*. La fotografía del anverso del cultivo fue tomada a los 10 días de incubación.

El endófito MAE7 inhibe significativamente el crecimiento de su competidor, sin resultar inhibido, obteniendo un IA de 4 puntos. Con base en esta información se seleccionó al hongo MAE7 como el hongo de crecimiento muy lento aislado de *M. affinis*, con mayor potencial antagónico.

Cuadro 8. Porcentajes de inhibición e índices de antagonismo de los hongos endófitos de *Mimosa affinis* con tasa de crecimiento muy lenta. Los valores fueron obtenidos a los 21 días de interacción antagónica.

Hongo de prueba	Porcentaje de inhibición		Índice de antagonismo
	MAE6	MAE7	
MAE6		0.0 ± 0.0	0
MAE7	25.5 ± 0.8*		4

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

Hongos endófitos con tasa de crecimiento muy rápido aislados de *Sapium macrocarpum*

En la **Figura 27** se muestran fotografías del antagonismo directo entre los hongos endófitos SME1 y SME2 aislados de *S. macrocarpum*. Estos hongos son de crecimiento muy rápido y ambos hongos compiten fuertemente por espacio y nutrientes del medio de cultivo. A los dos días de interacción antagónica ambos hongos hacen contacto entremezclando sus micelios. El hongo SME2 crece rodeando el micelio de su competidor, sin crecer sobre éste. Esta interacción se mantuvo durante los diez días de observación. A los tres días de incubación, ambos hongos cubrieron la superficie de los cultivos control. Cabe mencionar que el olor característico del endófito SME2 se intensificó en los cultivos en interacción antagónica, indicando que un posible mecanismo de defensa de este microorganismo, involucra la producción de metabolitos secundarios volátiles, con propiedades antifúngicas (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; Suwannarach *et al.*, 2013). La fuerte competencia entre los endófitos SME1 y SME2 se corroboró con valores bajos de % I, obtenidos para los dos hongos competidores.

Como se presenta en el **Cuadro 9**, ambos microorganismos, inhiben significativamente el crecimiento de su competidor. Los endófitos de crecimiento rápido SME1 y SME2 muestran una interacción tipo A2 (crecen entremezclando sus hifas, sin que exista reducción en el crecimiento de alguno de ellos), por tal motivo, ninguno recibe puntos de acuerdo con el **Cuadro 6** de categorías de interacción, en consecuencia su IA es cero. En este antagonismo los valores de % I y el IA no aportan suficiente información para establecer cuál endófito presenta mayor potencial antagónico, confirmando de nueva cuenta que ambos son fuertes competidores.

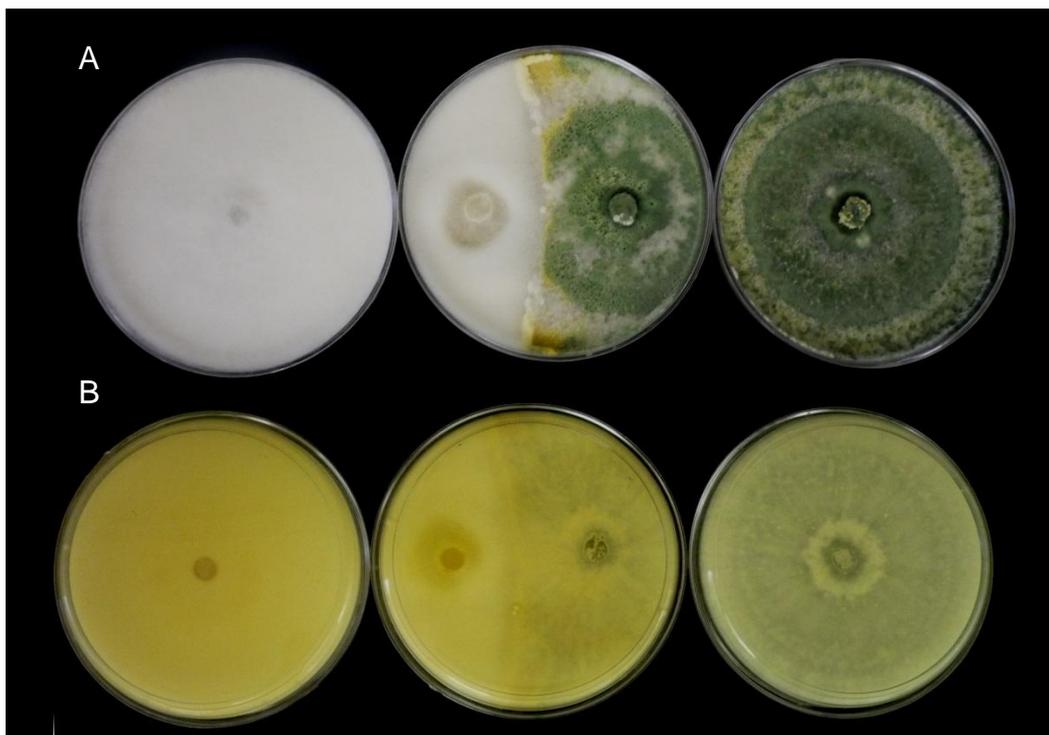


Figura 27. Antagonismo directo entre los hongos endófitos SME1 (izquierda) y SME2 (derecha) con tasa de crecimiento muy rápida, aislados de *Sapium macrocarpum*. Las fotografías del anverso (A) y del reverso (B) fueron tomadas a los 10 días de interacción antagónica.

Cuadro 9. Porcentajes de inhibición e índices de antagonismo de los hongos endófitos de *Sapium macrocarpum*, con tasa de crecimiento muy rápida a los 10 días de interacción antagónica.

Hongo de prueba	Porcentaje de inhibición		Índice de antagonismo
	SME1	SME2	
SME1		12.7 ± 2.7*	0
SME2	11.1 ± 2.7*		0
Se presenta el promedio de cuatro repeticiones.			

Se ha reportado en la literatura que diversos géneros de hongos endófitos producen metabolitos secundarios volátiles. Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) que producen los hongos endófitos *in vitro* pueden inhibir el crecimiento de otros endófitos, y algunos otros microorganismos como hongos y oomicetos fitopatógenos. En la actualidad, el género *Muscodor* ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista de sus VOCs. Este género, comprende 14 especies, todas ellas producen un importante número de compuestos volátiles, principalmente alcoholes, ácidos, cetonas, ésteres, compuestos aromáticos simples, terpenos y derivados de naftaleno. La mezcla de VOCs puede inhibir *in vitro*, el crecimiento de hongos, plantas y bacterias, y también, actúan de manera sinérgica, matando a una amplia variedad de hongos y bacterias patógenas humanas, por lo que poseen un promisorio potencial para la medicina, agricultura e industria (Strobel *et al.*, 2001; Daisy *et al.*, 2002; Strobel, 2006a, b; Kudalkar *et al.*, 2012; González *et al.*, 2009; Suwannarach *et al.*, 2010, Suwannarach *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010)

Macías-Rubalcava y colaboradores (2010), observaron que los VOCs producidos por el hongo endófito *Muscodor yucatanensis*, aislado de *Bursera simaruba* resultan tóxicos para algunos hongos endófitos aislados de *Callicarpa acuminata*, una planta colectada en la misma región que *B. simaruba*, y contra los

microorganismos fitopatógenos *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia* sp. y *Alternaria solani*. Asimismo, la mezcla de compuestos volátiles inhibe significativamente la germinación y el crecimiento de la raíz de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum* y *Echinochloa crus-galli* (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010).

Cabe destacar que diversos aislamientos de *Muscodor albus* son empleados como agentes de control biológico, en particular en cultivos post cosecha (Strobel, 2006)

Hongos endófitos con tasa de crecimiento lento aislados de *Sapium macrocarpum*

En la **Figura 28** se presenta a manera de ejemplo el antagonismo entre los hongos endófitos SME4 y SME10, SME9 y SME5, y entre los hongos SME9 y SME4, a los 14 días de interacción antagónica. Como se observa en la **Figura 28 A y B** el hongo SME4 crece rodeando completamente a su competidor SME10, y en la zona de interacción se aprecia mayor densidad de hifas y la producción de un pigmento rojo intenso que difunde en el medio de cultivo. En la **Figura 28 C y D**, se muestra la interacción antagónica entre los hongos SME9 y SME5, observándose que el hongo SME9 desarrolla una interacción similar a la del hongo SME4. Sin embargo, el hongo competidor SME5 produce en respuesta una pigmentación amarilla en sus hifas en la zona de interacción. En ambos antagonismos, los hongos de prueba SME4 y SME9 desarrollan interacciones de tipo C produciendo un pigmento rojo intenso al crecer en contacto con el hongo competidor (**Cuadro 6**).

En el **Cuadro 10** se presentan los % I y el IA, a los 14 días de interacción antagónica, de los siete hongos endófitos con tasa de crecimiento lenta aislados de *S. macrocarpum* antagonizados entre ellos. Como se observa, el hongo SME4 inhibe significativamente en un 20.8% el crecimiento del hongo SME10, mostrando una interacción tipo C, que aporta dos puntos al cálculo de su IA. En contraste, el

hongo de prueba SME9 no inhibe el crecimiento del hongo SME5 (**Figura 28 C**). Sin embargo, el hongo SME9 obtiene dos puntos por el tipo de interacción antes descrita.

Por otro lado, en la interacción antagónica entre los hongos SME9 y SME4 que se muestra en la **Figura 28 E y F**, se observa que ambos hongos crecen y se entremezclan las hifas de su micelio en la zona de interacción, sin que exista reducción en el crecimiento de ninguno de ellos, y sin la producción de pigmentos coloridos difusibles en el medio de cultivo, al crecer en contacto. Estos hongos desarrollan una interacción tipo A2, con un valor de cero puntos (**Cuadro 6**).

Como se observa en el **Cuadro 10**, en general, los hongos de este grupo muestran una fuerte competencia por nutrientes y espacio, mostrando interacciones tipo A2 que no contribuyen con ningún punto al cálculo de IA. El hongo endófito SME6 inhibió significativamente a dos de sus competidores, los hongos SME7 y SME11. Solo en tres de sus antagonismos desarrolló interacciones tipo A2 (cero puntos) y en el resto de los antagonismos desarrolló interacciones tipo C (dos puntos), por lo que obtuvo un IA de 6 puntos. El hongo SME9 presentó un comportamiento en interacción antagónica, similar al del endófito SME6. En contraste, los hongos SME7 y SME11 no inhibieron el crecimiento de sus hongos competidores.

En algunas interacciones antagónicas observadas, los hongos endófitos SME4, SME6, SME7 y SME9, producen pigmento de color rojo que difunde en el medio de cultivo. Es factible que estos hongos compitan fuertemente por espacio y nutrientes y que además produzcan metabolitos secundarios coloridos con propiedades antifúngicas, cuando crecen en contacto con otras especies diferentes.

Con base en las observaciones obtenidas, los hongos SME6 y SME9, se seleccionaron como los endófitos de *S. macrocarpum* de tasa de crecimiento lenta, con mayor potencial antagónico. Estos microorganismos inhiben significativamente a dos de sus competidores, mostrando los valores más altos de IA.

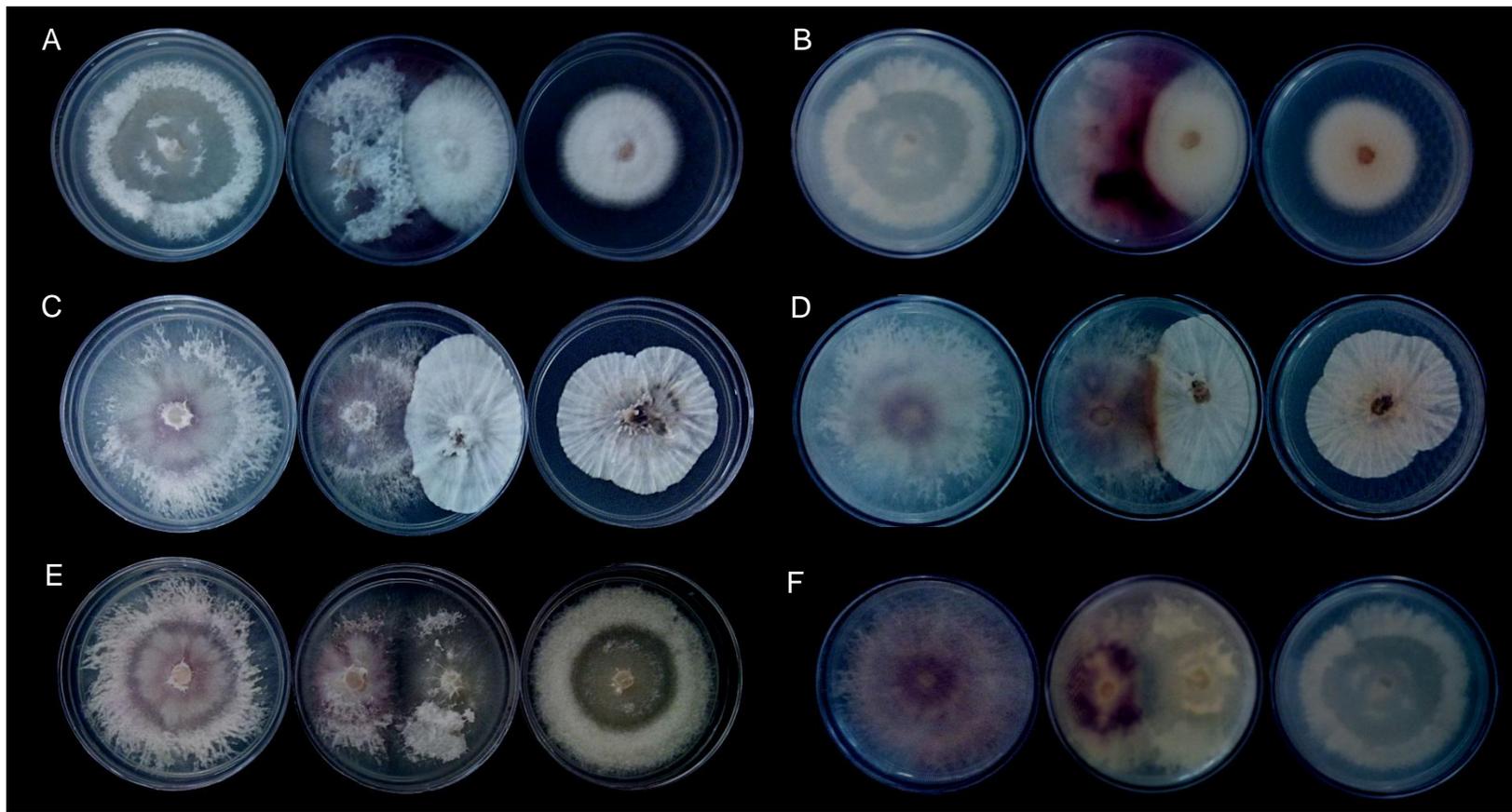


Figura 28. Antagonismo directo entre los hongos endófitos con tasa de crecimiento lenta aislados de *Sapium macrocarpum*. (A) anverso del antagonismo entre SME4 (izquierda) y SME10 (derecha). (B) reverso del antagonismo entre SME4 y SME10. (C) anverso del antagonismo entre SME9 (izquierda) y SME5 (derecha). (D) reverso del antagonismo entre SME9 y SME5. (E) anverso del antagonismo entre SME9 (izquierda) y SME4 (derecha). (F) reverso del antagonismo entre SME9 y SME4. Las fotografías del anverso y reverso fueron tomadas a los 14 días de interacción.

Cuadro 10. Porcentajes de inhibición e índice de antagonismo de los hongos endófitos de *Sapium macrocarpum*, con tasa de crecimiento lento a los 14 días de interacción antagónica.

Hongo de prueba	Porcentajes de inhibición							Índice de antagonismo
	SME4	SME5	SME6	SME7	SME9	SME10	SME11	
SME4		6.2 ± 2.9	0.0 ± 2.6	19.3 ± 3.0*	0.0 ± 0.0	20.8 ± 3.9*	33.9 ± 1.2*	4
SME5	3.9 ± 0.2		0.0 ± 0.0	42.5 ± 2.6*	0.0 ± 3.8	0.0 ± 0.0	21.1 ± 3.1*	5
SME6	5.6 ± 0.0	5.3 ± 0.0		35.2 ± 0.0*	0.0 ± 0.0	5.3 ± 0.1	100.0 ± 0.0*	6
SME7	0.0 ± 6.9	0.0 ± 5.1	0.0 ± 0.5		0.0 ± 3.0	0.0 ± 2.6	5.3 ± 0.0	4
SME9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.3	0.0 ± 0.0	31.6 ± 5.3*		4.5 ± 0.0	75.0 ± 2.6*	6
SME10	0.0 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 3.0	34.2 ± 3.0*	0.0 ± 0.0		14.0 ± 3.0*	3
SME11	0.0 ± 3.9	0.0 ± 2.2	0.0 ± 2.6	0.0 ± 3.4	0.0 ± 3.2	0.0 ± 0.0		3

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

Hongos endófitos con tasa de crecimiento muy lento aislados de *Sapium macrocarpum*

En la **Figura 29** se muestran fotografías de los antagonismos directos entre los hongos endófitos de *S. macrocarpum* SME12, SME13 y SM14. Estos endófitos pertenecen a los hongos de crecimiento muy lento, por lo que los bioensayos se observaron durante 21 días. En el **Cuadro 11** se presentan los valores de %I y de IA de los tres hongos antagonizados entre ellos.

En la **Figura 29 A y C** el hongo endófito SME13 antagonizó fuertemente a sus dos competidores SME12 y SME14. Este endófito crece rápidamente rodeando el micelio de sus competidores, y en la zona de interacción antagónica se observa que entremezclan las hifas de su micelio, presentando en cada caso una interacción tipo D (**Cuadro 5**), con lo que el índice de antagonismo para este hongo es de 6 puntos. Con respecto al % I, el hongo SME13, inhibe significativamente en más del 60% el crecimiento de los competidores SME12 y SME14 (**Cuadro 11**).

Adicionalmente, se observaron cambios morfológicos en el micelio de los tres hongos en los cultivos en interacción antagónica. En la interacción entre los hongos SME12 y SME13 (**Figura 29 A y B**) y entre SME13 y SME14 (**Figura 29 C y D**) el hongo SME13 modificó las características de su micelio, observándose que en la primera interacción el micelio aéreo es poco abundante y en la segunda interacción el micelio se torna anaranjado. Además, hay un aumento en la producción de exudado amarillo en toda la colonia, en especial en la zona de interacción antagónica (**Figura 29 A y C**).

Por otra parte, en la **Figura 29 E y F** se observa que en interacción antagónica los hongos SME12 y SME14 compiten fuertemente, cesando su crecimiento en la zona de interacción, sin entremezclar sus micelios. Ambos hongos se inhiben a distancia generando una interacción tipo E (4 puntos), mostrando porcentajes de inhibición menores al 20% (**Cuadro 11**). Cabe la posibilidad de que los dos

endófitos al estar en interacción antagónica produzcan metabolitos secundarios con potencial antifúngico (no necesariamente coloridos), que difundan en el medio de cultivo impidiendo el crecimiento de su competidor (Yuen *et al.*,1999). Sin embargo, no se descarta la posible producción de VOCs que estén actuando conjuntamente en la interacción antagónica entre éstos hongos.

Como se indicó anteriormente, el hongo endófito SME13 es el que inhibe significativamente a sus dos competidores y es el microorganismo que obtuvo el valor más alto de IA calculado (**Cuadro 11**) al no ser inhibido por ninguno de sus competidores. Con base en las consideraciones anteriores, se infiere que el hongo SME13 tiene mayor capacidad para utilizar los nutrientes del medio de cultivo, en comparación con sus competidores SME12 y SME14, y que el exudado que produce puede desempeñar un papel químico en la inhibición observada (Boddy , 2000). El endófito SME13, se seleccionó como el hongo con mayor potencial antagónico con tasa de crecimiento muy lenta aislado de *S. macrocarpum*.

Cuadro 11. Porcentajes de inhibición e índices de antagonismo de los hongos de *Sapium macrocarpum* con tasa de crecimiento muy lenta. Los valores fueron obtenidos a los 21 días de interacción antagónica.

Hongo de prueba	Porcentaje de inhibición			Índice de antagonismo
	SME12	SME13	SME14	
SME12		0.0 ± 0.0	17.0 ± 2.9*	4
SME13	63.8 ± 2.3*		65.5 ± 3.9*	6
SME14	19.7 ± 2.6*	0.0 ± 0.0		4
*Valores estadísticamente significativos, t-student ($P < 0.05$), se presenta el promedio de cuatro repeticiones realizadas.				

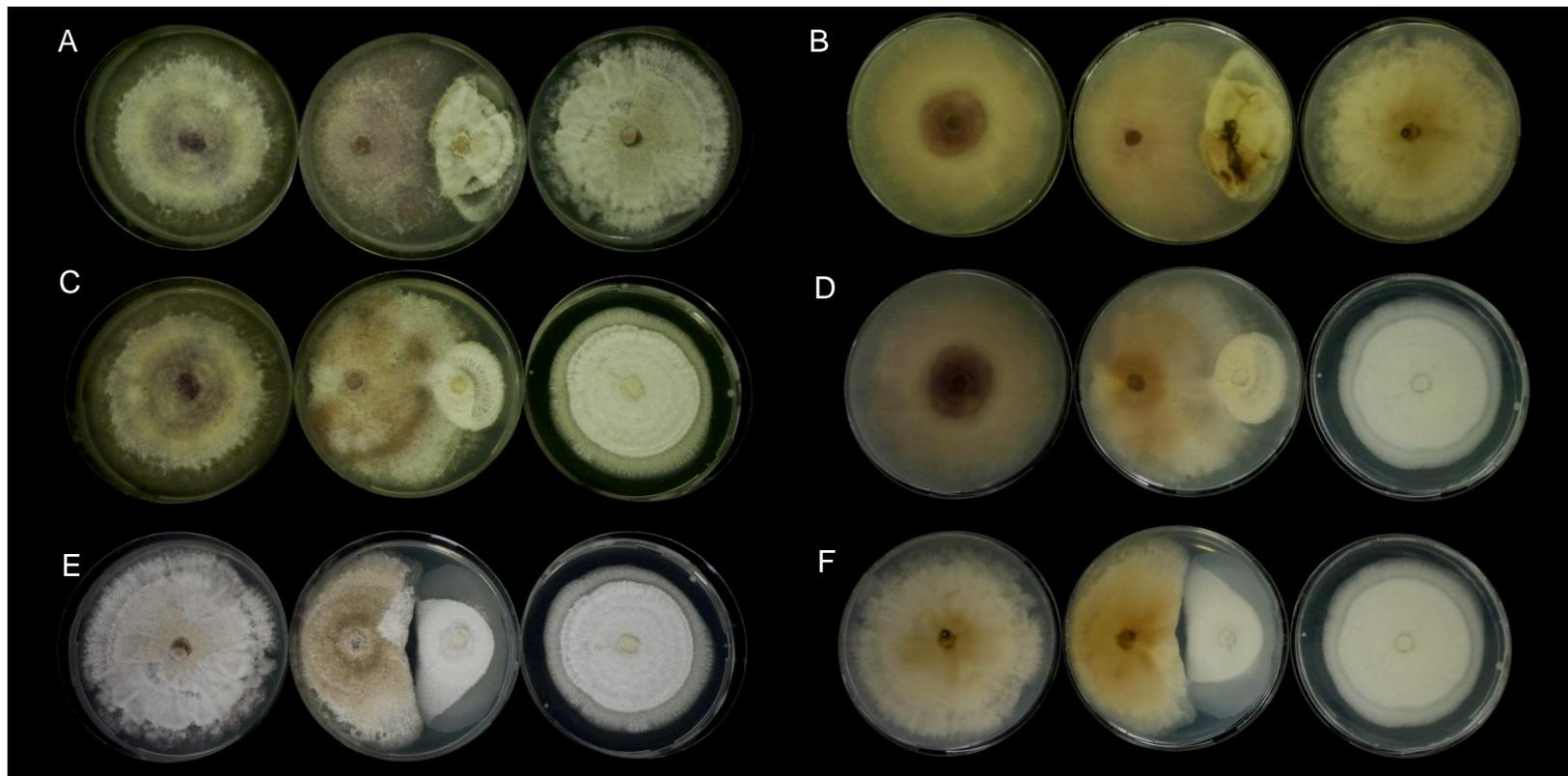


Figura 29. Antagonismo directo entre los hongos endófitos con tasa de crecimiento muy lenta aislados de *Sapium macrocarpum*. (A) anverso del antagonismo entre SME13 (izquierda) y SME12 (derecha). (B) reverso del antagonismo entre SME13 y SME12. (C) anverso del antagonismo entre SME13 (izquierda) y SME14 (derecha).(D) reverso del antagonismo entre SME13 y SME14 (E) anverso del antagonismo entre SME12 (izquierda) y SME14 (derecha). (F) reverso del antagonismo entre SME12 y SME14. Las fotografías del anverso y reverso fueron tomadas a los 21 días de interacción antagónica.

VII. Conclusiones

El análisis detallado de las características macroscópicas y microscópicas de los 7 y 14 hongos endófitos puros aislados de las hospederas *M. affinis* y *S. macrocarpum* respectivamente, permitió determinar la pureza, la tasa de crecimiento y en algunos casos el género de los aislamientos.

Con base en su tasa de crecimiento, se encontró un endófito de crecimiento muy rápido, uno de crecimiento rápido, tres de crecimiento lento y dos de crecimiento muy lento, aislados de *M. affinis*, y dos endófitos de crecimiento muy rápido, uno de crecimiento rápido, ocho de crecimiento lento y tres de crecimiento muy lento aislados de *S. macrocarpum*.

Se identificaron un total de cinco hongos endófitos pertenecientes al género *Fusarium*, de los cuales el endófito MAE3 corresponde a *Fusarium* sp. Los hongos endófitos SME4 y SME6 corresponden a la especie *F. solani*. Los endófitos SME9 y SME13 pertenecen a las especies *F. commune* y *F. avenaceum*, respectivamente. Además, se identificó al hongo endófito MAE7 aislado de *M. affinis* como una especie perteneciente al género *Aspergillus*, y al hongo endófito SME5 aislado de *S. macrocarpum* como una especie con características morfológicas similares a las del género *Xylaria*.

En ambas plantas hospederas, se observaron ocho hongos endófitos que producen estructuras de reproducción asexuales (conidios) bajo las condiciones de cultivo. Sin embargo, en estos aislamientos no se pudo inferir el género de los hongos. Adicionalmente, cinco de los hongos endófitos aislados de *S. macrocarpum* y uno de los aislados de *M. affinis* no desarrollaron estructuras de reproducción bajo las condiciones de crecimiento.

Los bioensayos de antagonismo directo realizados entre los hongos endófitos con tasa de crecimiento similar, permitieron evidenciar el potencial antagónico de los hongos endófitos puros de *M. affinis* y *S. macrocarpum*.

Los hongos endófitos SME6 y SME9 de crecimiento lento, y el SME13 de crecimiento muy lento, aislados de *S. macrocarpum*, así como, el endófito MAE4 de crecimiento lento, aislado de *M. affinis*, son los microorganismos con el mayor índice de antagonismo.

Los hongos SME6 y SME9 aislados de *S. macrocarpum* producen un pigmento rojo en interacción antagónica con otros hongos endófitos de su misma tasa de crecimiento, que inhibe significativamente el crecimiento de su competidor. De la misma forma, el hongo MAE7 produce un pigmento naranja difusible en el medio de cultivo que inhibe significativamente a distancia a su competidor.

Los porcentajes de inhibición y el tipo de interacción antagónica entre los hongos SME1 y SME2 de crecimiento muy rápido aislados de *S. macrocarpum* no permiten realizar una selección adecuada, ya que ambos microorganismos presentan importante potencial antagónico.

Los bioensayos de antagonismo directo *in vitro* entre hongos endófitos, permiten evidenciar las posibles interacciones que pueden existir *in vivo* entre los hongos endófitos de la misma planta hospedera.

En las interacciones antagónicas *in vitro*, está involucrada la capacidad con la que los hongos endófitos aprovechan los recursos nutritivos así como su tasa de crecimiento.

La interacción entre las hifas de los competidores puede provocar tanto cambios morfológicos en el micelio como en la formación de barreras miceliales, mayor producción de micelio, engrosamiento de las hifas, entre otras, involucrando mecanismos físicos de competencia.

La producción de metabolitos secundarios que difunden en el medio de cultivo o que volatilicen cercanamente a la zona de interacción antagónica, pueden provocar la inhibición del crecientito del competidor, y son producidos como mecanismos químicos de competencia.

Los mecanismos físicos y químicos de competencia, pueden ocurrir simultáneamente e influir fuertemente en la capacidad de inhibición del crecimiento de los hongos competidores.

Los hongos endófitos SME1, SME2, SME6, SME9 y SME13 aislados de *S. macrocarpum*, así como, MAE4 y MAE7 aislados de *M. affinis*, constituyen candidatos potenciales para su estudio como microorganismos útiles en el control biológico de enfermedades de las plantas y como fuente de metabolitos secundarios con posible actividad antifúngica.

Los resultados obtenidos en los bioensayos de antagonismo directo realizados en la presente investigación ponen en evidencian la capacidad que presentan los hongos endófitos de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum* para limitar el crecimiento de otros hongos *in vitro* y, a su vez, permiten contribuir al conocimiento de su posible papel ecológico en la protección de sus hospederas.

VIII. Perspectivas

1. Realizar la clasificación taxonómica de los hongos endófitos SME1, SME2, SME6, SME9 y SME13 aislados de *S. macrocarpum*, y MAE4 y MAE7 aislados de *M. affinis*, que presentaron el mayor potencial antagónico, mediante métodos moleculares.
2. Realizar bioensayos de antagonismo directo entre los hongos endófitos con tasa de crecimiento diferente y seleccionar aquellos con los mayores índices de antagonismo.
3. Realizar bioensayos de antagonismo directo entre los hongos endófitos con mayores índices de antagonismo y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum*.
4. Realizar los cultivos en pequeña escala de los hongos endófitos con potencial antagónico seleccionados, utilizando 1L de caldo-papa-dextrosa (CPD) incubando bajo condiciones estáticas y de agitación.
5. Obtener los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio, por medio de particiones sucesivas del medio de cultivo, y mediante maceración exhaustiva del micelio, empleando diclorometano y acetato de etilo como disolventes de extracción.
6. Realizar el análisis cromatográfico en capa fina de los extractos orgánicos obtenidos a partir del medio de cultivo y micelio para establecer su similitud.

-
7. Evaluar cuantitativamente el potencial antifúngico de los extractos orgánicos sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura.
 8. Realizar el cultivo en mediana escala (10 L de medio CPD) de al menos dos de los hongos con mayor potencial antifúngico sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba y obtener los extractos orgánicos del micelio y del medio de cultivo.
 9. Comparar los perfiles químicos de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala mediante el análisis cromatográfico en capa fina.
 10. Corroborar la actividad antifúngica de cada uno de los extractos obtenidos en mediana escala empleando el método de dilución en agar y los mismos hongos fitopatógenos de prueba.
 11. Realizar el estudio químico biodirigido de los extractos orgánicos con mayor actividad antifúngica y/o con el mejor rendimiento. Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios responsables de la actividad antifúngica, empleando diversos procedimientos cromatográficos.
 12. Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados, mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas y de difracción de rayos X.
 13. 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, G. N. (2004). **Plant Pathology**. 5th Ed. Elsevier. p 4-52.
- Armendáriz-Guillén, B. (2013). **Hongos Endófitos Productores de Metabolitos Secundarios con Potencial Fitotóxico y Antifúngico**. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química UNAM.
- Arnold, A. E., L. C. Mejía, D. Kylo, E. I., Rojas, Z. Maynard, N. Robbins & E. A. Herre. (2003). **Fungal Endophytes Limit Pathogen Damage in a Tropical Tree**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (26): 15649–54.
- Arx, J. A. von. (1981). **The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture**. 2a Ed. J. Cramer. Vaduz. p 12 - 14, 15, 178,189, 262, 264, 304, 305,
- **Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana**. Consultada por última vez el 21 de noviembre 2014 .

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- Boddy, L. (2000). **Interspecific Combative Interactions between Wood-Decaying Basidiomycetes**. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology ecology* 31: 185–94.
- Bolognesi, C. & F.D. Merlo. (2011). **Pesticides : Human Health Effects**. Elsevier B.V: 438–53.
- Bonifaz, J. A. (2012). **Micología Médica Básica**. 4a Ed. Mc Graw Hill. p.1- 40
- Dorado, Ó., D. M. Arias, B. Maldonado, & E. Leyva. (2006). **Estrategia Integral de Conservación de La Reserva de La Biosfera Sierra de Huautla**. En *Manejo, Conservación y Restauración de Recursos Naturales En México: Perspectivas Desde La Investigación Científica*, Ed. Siglo XXI, p 368.
- FAO. (2009). **La FAO en México más de 60 años de cooperación 1945 - 2009**. p 152 -161.

-
- Fournier, J., F. Flessa, D. Peršoh, & M. Stadler. (2010). **Three New Xylaria Species from Southwestern Europe**. *Mycological Progress* 10(1): 33–52.
 - Gamboa, M. A., S. Laureano, & P. Bayman. (2002). **Measuring Diversity of Endophytic Fungi in Leaf Fragments: Does Size Matter?**. *Mycopathologia* 156: 41–45.
 - Gunatilaka A. A. L. (2006). **Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence**. *Journal of natural products* 69(3): 509–26.
 - Jayaprakashvel, M, & N. Mathivanan. (2011). **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management** En Ed. Dinesh K. Maheshwari
 - Kudalkar P., G. Strobel, S. Riyaz-UI-Hassan, B. Geary & J. Sears. (2012). **Muscodor sutura, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities**. *Mycoscience* 53: 319–325.
 - Judelson, H. S. (2007). **Genomics of the Plant Pathogenic Oomycete Phytophthora: Insights into Biology and Evolution**. *Advances in genetics* 57: 97–141.
 - Latijnhouwers, M., P. J. G. M. de Wit, & F. Govers. (2003). **Oomycetes and Fungi: Similar Weaponry to Attack Plants**. *Trends in Microbiology* 11(10): 462–69.
 - Leslie, J. F. & B. A. Summerell. (2006). **The Fusarium Laboratory Manual**. 5-14
 - Macías-Rubalcava, M. L., B. E. Hernández-Bautista, M. Jiménez-Estrada, M. C. González, A. E. Glenn, R. T. Hanlin, S. Hernández-Ortega, A. Saucedo-García, J. M. Muria-González & A. L. Anaya. (2008). **Naphthoquinone Spiroketal with Allelochemical Activity from the Newly Discovered Endophytic Fungus Edenia Gomezpompae**. *Phytochemistry* 69(5): 1185–96.

-
- Macías-Rubalcava, M. L., B. E. Hernández-Bautista, F. Oropeza, G. Duarte, M. C. González, A. E. Glenn, R. T. Hanlin & A. L. Anaya. (2010). **Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodor yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera Simaruba*.** *Journal of chemical ecology* 36(10): 1122–31.
 - Macías-Rubalcava, M. L., M. E. Ruiz-Velasco Sobrino, C. Meléndez-González & S. Hernández-Ortega. (2014a). **Naphthoquinone Spiroketal and Organic Extracts from the Endophytic Fungus *Edenia Gomezpompae* as Potential Herbicides.** *Journal of agricultural and food chemistry* 62(16): 3553–62. (b)
 - Macías-Rubalcava, M. L., M. E. Ruiz-Velasco Sobrino, C. Meléndez-González, B. King-Díaz & B. Lotina-Hennsen. (2014b). **Selected phytotoxins and organic extracts from endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as light reaction of photosynthesis inhibitors.** *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* 138: 17-26.
 - A. Maczulak. (2011). **Encyclopedia of Microbiology.** Facts on File. p 327-334.
 - Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap, & D. P. Clarck. (2009). **BROCK. Biología de Los Microorganismos.** 12 Ed: Pearson Educación.
 - Maheshwari, R. (2005). **Fungi Experimental Methods in Biology /Ramesh Maheshwari.** Ed. J W Bennett. Taylor & Francis. p 3-17, 223-233.
 - Mier, T, F. Rivera-Becerril, M. A. Ayala-Zermeño, C. Toriello, S. Aguilar-Ogarrío & M. Ulloa. (2013). **Métodos Experimentales Para El Estudio de Hongos Microscópicos.** México.p 1- 9.
 - Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario. (2013). SAGARPA. Consultado por última vez el 25 de noviembre 2014:

<http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/introduccion/Documents/Programa%20Sectorial%20de%20Desarrollo%20Agropecuario,%20Pesquero%20%20y%20Alimentario%202013-2018.pdf>

-
- Rodriguez, R. J., J. F. White, A. E. Arnold, & R. S. Redman. (2009). **Fungal Endophytes: Diversity and Functional Roles**. *The New phytologist* 182(2): 314–30.
 - Ruiz-Terán, F., A. Medrano-Martínez, & A. Navarro-Ocaña. (2008). **Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Plant Extracts Used in Traditional Medicine in Mexico**. *African Journal of Biotechnology* 7(12): 1886–93.
 - Saldaña-Fernández, M. C., D. I. Munévar, A. Ortiz-Sanchez, E. E. Moreno & A. N. Aragón-Cadenas. (2007). **Una Visita a La Reserva de La Biósfera Sierra de Huautla (Morelos, México)**. *Revista estudios sociales, Universidad de Guadalajara*: 189–219.
 - Sánchez-Fernández, R. E., B. L. Sánchez-Ortiz, Y. K. M. Sandoval-Espinosa, A. Ulloa-Benítez, B. Armendáriz-Guillén, C. M. García Méndez & M. L. Macías-Rubalcava. (2013). **Hongos Endófitos: Fuente Potencial de Metabolitos Secundarios Bioactivos con Utilidad un Agricultura y Medicina**. *TIP* 16(2): 132–46.
 - Sandoval-Espinoza Y. K. M. (2014). **Asilamientos y Purificación de hongos endófitos con Potencial Antifúngico y Fitotóxico de *Lysiloma acapulcense*** (Tesis de licenciatura). Facultad de Química UNAM.
 - Schulz, B., C. Boyle, S. Draeger, A. K. Römmert & K. Krohn. (2002). **Endophytic Fungi: A Source of Novel Biologically Active Secondary Metabolites**. *The British Mycological Society* 106: 996–1004.
 - Schulz, B. & C. Boyle. (2005). **The Endophytic Continuum**. *Mycological Research* 109(6): 661–86.
 - Sculz, B., A. K. Römmert, U. Dammann, A. Hans-Jürgen & S. Dieter. (1999). **The Endophyte-Host Interaction: A Balanced Antagonism?**. *Mycological Research* 103(10): 1275–83.
 - Smith, T. M., & R. L. Smith. (2007). *Ecología*. 6a. Edición. Madrid. p 272, 273.
-

-
- Stierle, A. & G. Strobel. (1995). **The Search for a Taxol-Producing Microorganism Among the Endophytic Fungi of the Pacific Yew, *Taxus Brevifolia***. *Journal of natural products* 58(9): 1315–24.
 - Strange, R. N. & P. R. Scott. (2005). **Plant Disease: A Threat to Global Food Security**. *Annual review of phytopathology* 43: 83–116.
 - Strobel, G., & B. Daisy. (2003). **Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 491–502.
 - Strobel, G. (2002). **Microbial Gifts from Rain forests**. *Canadian Journal of plant pathology* 20: 14–20.
 - Strobel, G. (2006). **Harnessing Endophytes for Industrial Microbiology**. *Current opinion in microbiology* 9(3): 240–44.
 - Strobel, G. (2003). **Endophytes as Sources of Bioactive Products**. *Microbes and Infection* 5(6): 535–44.
 - Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo, & J. Harper. (2004). **Natural Products from Endophytic Microorganisms**. *Journal of natural products* 67(2): 257–68.
 - Suryanarayanan T. S., N. Thirunavukkarasu, M. B. Govindarajulu, F. Sasse, R. Jansen & T. S. Murali. (2009). **Fungal Endophytes and Bioprospecting**. *Fungal Biology Reviews* 23(1-2): 9–19.
 - Suwannarach N., J. Kumla, B. Bussaban, K. D. Hyde, K. Matsui & S. Lumyong. (2013). **Molecular and Morphological Evidence Support Four New Species in the Genus *Muscodor* from Northern Thailand**. *Annals of Microbiology* 63(4): 1341–51.
 - Tan, R. X. & W. X. Zou. (2001). **Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites**. *Natural product reports* 18(4): 448–59.
 - Wang, E. T., M. A. Rogel, A. Garcia-de los Santos, J. Martínez-Romero, M. A. Cevallos & E. Martínez-Romero. (1999). ***Rhizobium Etli* Bv. *Momosae*, a**
-

Novel Biovar Isolated from *Mimosa Affinis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 1479–91.

- Wang, J., Y. Huang, M. Fang, Y. Zhang, Z. Zheng, Y. Zhao & W. Su. (2002). **Brefeldin A, a Cytotoxin Produced by *Paecilomyces Sp.* and *Aspergillus Clavatus* Isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*.** *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology ecology* 34: 51–57.
- Watanabe, T. (2010). **Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi : Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species.** 3rd Edition. Ed. Taylor & Francis. Boca Raton: CRC Press.
- Yu, H., L. Zhang, L. Li, C. Zheng, L. Guo, W. Li, P. Sun & L. Qin. (2010). **Recent Developments and Future Prospects of Antimicrobial Metabolites Produced by Endophytes.** *Microbiological research* 165(6): 437–49.
- Yuen, T. K., K. D. Hyde, & I.J. Hodgkiss. (1999). **Interspecific Interactions among Tropical and Subtropical Freshwater Fungi.** *Microbial Ecology* 37(4): 257–62.
- Zou, W. X., J. C. Meng, H. Lu, G. X. Chen, G. X. Shi, T. Y. Zhang & R. X. Tan. (2000). **Metabolites of *Colletotrichum Gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mongolica*.** *Journal of natural products* 63: 1529–30.