



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**HONGOS ASOCIADOS A *Salvia* sp., COMO UNA FUENTE DE  
METABOLITOS SECUNDARIOS CON POTENCIAL ANTIFÚNGICO  
Y FITOTÓXICO, ÚTILES EN LA AGRICULTURA**

***T E S I S***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**LAURA ANGÉLICA OROZCO CANO**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** DRA. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ  
**VOCAL:** DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA  
**SECRETARIO:** DRA. ELENA GUADALUPE RAMÍREZ LÓPEZ  
**1ER. SUPLENTE:** DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO  
**2DO. SUPLENTE:** DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**LABORATORIO 1-4. PRODUCTOS NATURALES**

**UNAM**

---

**ASESOR DEL TEMA: DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA**

---

**SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. BRENDA LORENA SÁNCHEZ ORTIZ**

---

**SUSTENTANTE: LAURA ANGÉLICA OROZCO CANO**

# ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. Actividad agrícola en México	3
2. Enfermedades fúngicas	3
2.1. Fusariosis del banano	4
2.2. Moho negro, provocado por <i>Alternaria alternata</i>	6
2.3. Enfermedades provocadas por <i>Phytium aphanidermatum</i>	7
2.4. Marchitez provocada por <i>Phytophthora capsici</i>	8
3. Malezas	9
4. Pesticidas	11
5. Productos naturales como fuente de compuestos bioactivos	12
6. Microorganismos endófitos	13
7. Hongos endófitos	14
8. Hipótesis mutualista: Relación hongo endófito-planta hospedera	15
9. Metabolitos secundarios de hongos endófitos	16
10. Aislamiento de hongos endófitos	20
11. Reserva de la Biosfera de Huautla	21
12. Planta hospedera <i>Salvia</i> sp.	22

<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
	1. Objetivo General	24
	2. Objetivos particulares	24
<b>V.</b>	<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>26</b>
	1. Purificación de hongos endófitos y fitopatógenos de <i>Salvia</i> sp.	26
	2. Preparación de medios de cultivo	27
	2.1. Papa-dextrosa- agar (PDA)	27
	2.2. Medio de arroz (MA)	27
	3. Determinación de las características macro y microscópicas de los hongos de <i>Salvia</i> sp.	28
	4. Cultivos en pequeña escala en medio de arroz	29
	5. Obtención de los extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala	29
	6. Determinación del potencial antifúngico y fitotóxico	30
	6.1. Actividad antifúngica	30
	6.2. Actividad fitotóxica	31
	7. Fraccionamiento primario	32
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>34</b>
	1. Obtención de cultivos puros	35
	2. Determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos puros	37
	3. Obtención de cultivos en pequeña escala de los hongos de <i>Salvia</i> sp.	60
	4. Efecto fitotóxico de extractos totales de los hongos de <i>Salvia</i> sp.	62

5. Efecto antifúngico de extractos totales de los hongos de <i>Salvia</i> sp.	66
6. Fraccionamiento primario	69
7. Efecto fitotóxico de las fracciones primarias de los extractos de los hongos de <i>Salvia</i> sp.	72
8. Efecto antifúngico de las fracciones primarias de los extractos de los hongos de <i>Salvia</i> sp.	76
VII. CONCLUSIONES	86
VIII. PERSPECTIVAS	90
IX. REFERENCIAS	91

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Metabolitos secundarios con actividad antifúngica y fitotóxica aislados de diversos hongos endófitos.	<b>17</b>
<b>Cuadro 2.</b> Claves originales y claves simplificadas asignadas a los aislamientos de hongos endófitos y fitopatógenos puros de <i>Salvia</i> sp.	<b>35</b>
<b>Cuadro 2.</b> Claves originales y claves simplificadas asignadas a los aislamientos de hongos endófitos y fitopatógenos puros de <i>Salvia</i> sp. (Continuación).	<b>36</b>
<b>Cuadro 3.</b> Rendimientos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos y fitopatógenos de <i>Salvia</i> sp. cultivados en pequeña escala en medio arroz.	<b>62</b>
<b>Cuadro 4.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (100 µg/mL) de los hongos endófitos de <i>Salvia</i> sp. sobre el crecimiento de la raíz de dos plantas prueba.	<b>63</b>
<b>Cuadro 4.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (100 µg/mL) de los hongos endófitos de <i>Salvia</i> sp. sobre el crecimiento de la raíz de dos plantas prueba. (Continuación).	<b>64</b>
<b>Cuadro 5.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (100 µg/mL) de los hongos fitopatógenos de <i>Salvia</i> sp. sobre el crecimiento de la raíz de dos plantas prueba.	<b>64</b>
<b>Cuadro 6.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (250 µg/mL) de los hongos endófitos de <i>Salvia</i> sp. sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura.	<b>67</b>
<b>Cuadro 6.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (250 µg/mL) de los hongos endófitos de <i>Salvia</i> sp. sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la a agricultura (continuación).	<b>68</b>

<b>Cuadro 7.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (250 µg/mL) de los hongos fitopatógenos de <i>Salvia</i> sp. sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en la agricultura.	<b>68</b>
<b>Cuadro 8.</b> Rendimientos de las fracciones primarias obtenidas de los extractos totales procedentes de hongos endófitos y fitopatógenos de <i>Salvia</i> sp.	<b>70</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. a)</b> Tallo del cultivo de plátano infectado por <i>Fusarium oxysporum</i> . <b>b)</b> Cultivos de plátano infectados por <i>Fusarium oxysporum</i> .	<b>4</b>
<b>Figura 2. a)</b> Cultivos de tomate saladet infectados por <i>Alternaria alternata</i> . <b>b)</b> Tallos de cultivos de tomate bola infectados por <i>Alternaria solani</i> .	<b>7</b>
<b>Figura 3. a)</b> Raíz de pepino infectada por <i>Phyitium aphanidermatum</i> . <b>b)</b> Tizón común en las hojas del cultivo de maíz, infectado por <i>Phyitium</i> .	<b>8</b>
<b>Figura 4. a)</b> Marchitez de cultivos de pimiento verde infectados por <i>P. capsici</i> . <b>b)</b> Cultivos de sandía infectados por <i>P. capsici</i> .	<b>9</b>
<b>Figura 5.</b> Hipótesis: Antagonismo balanceado entre hongo endófito y planta hospedera (Schulz, 1999).	<b>16</b>
<b>Figura 6. Endófito SspE1. A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha). <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C)</b> Tinción en fresco con azul de lactofenol a 40x. <b>D)</b> Tinciones en fresco con rojo congo a 40x.	<b>38</b>
<b>Figura 7. Endófito SspE2. A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C y D)</b> Tinciones en fresco con rojo congo a 40x.	<b>39</b>
<b>Figura 8. Endófito SspE3. A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C y D)</b> Tinciones en fresco con fucsina ácida a 40x.	<b>40</b>
<b>Figura 9. Endófito SspE4. A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C y D)</b> Tinciones en fresco con rojo congo a 40x.	<b>41</b>
<b>Figura 10. Endófito SspE5. A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C y D)</b> Tinción en fresco con fucsina ácida a 40x.	<b>42</b>

<b>Figura 11.</b> Endófito <b>SspE6.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C y D)</b> Tinciones en fresco con fucsina ácida a 40x.	<b>43</b>
<b>Figura 12.</b> Endófito <b>SspE7.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo y vegetativo en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C)</b> Tinción en fresco con rojo congo a 10x. <b>D)</b> Tinción en fresco con azul de lactofenol a 40x.	<b>44</b>
<b>Figura 13.</b> Endófito <b>SspE8.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C y D)</b> Tinciones en fresco con rojo congo a 40x.	<b>45</b>
<b>Figura 14.</b> Endófito <b>Ssp1E9.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C y D)</b> Tinciones en fresco con rojo congo a 40x.	<b>46</b>
<b>Figura 15.</b> Endófito <b>SspE10.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C)</b> Tinción en fresco con azul de lactofenol a 40x. <b>D)</b> Tinción en fresco con rojo congo a 40x.	<b>47</b>
<b>Figura 16.</b> Endófito <b>SspE11.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C y D)</b> Tinciones en fresco con fucsina ácida a 40x.	<b>48</b>
<b>Figura 17.</b> Endófito <b>SspE12.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo endófito. <b>C y D)</b> Tinciones en fresco con colorante rojo congo a 40x.	<b>40</b>
<b>Figura 18.</b> Fitopatógeno <b>SspF1.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. <b>C)</b> Tinción en fresco con azul de lactofenol a 40x. <b>D)</b> Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x.	<b>50</b>

<b>Figura 19.</b> Fitopatógeno <b>SspF2.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. <b>C)</b> Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x. <b>C)</b> Tinción en fresco con fucsina ácida a 40x.	<b>51</b>
<b>Figura 20.</b> Fitopatógeno <b>SspF3.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. <b>C)</b> Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x. <b>D)</b> Tinción en fresco con fucsina ácida a 40x.	<b>52</b>
<b>Figura 21.</b> Fitopatógeno <b>SspF4.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. <b>C)</b> Tinción en fresco con azul de lactofenol a 40x <b>D)</b> Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x.	<b>53</b>
<b>Figura 22.</b> Fitopatógeno <b>SspF5.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. <b>C)</b> Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x. <b>D)</b> Tinción en fresco con fucsina ácida a 40x.	<b>54</b>
<b>Figura 23.</b> Fitopatógeno <b>SspF6.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. <b>C y D)</b> Tinciones en fresco con colorante rojo congo a 40x.	<b>55</b>
<b>Figura 24.</b> Fitopatógeno <b>SspF7.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. <b>C y D)</b> Tinciones en fresco con colorante rojo congo a 40x.	<b>56</b>
<b>Figura 25.</b> Fitopatógeno <b>SspF8.</b> <b>A)</b> Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. <b>B)</b> Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. <b>C)</b> Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x. <b>D)</b> Tinción en fresco con colorante azul de lactofenol. a 40x.	<b>57</b>
<b>Figura 26.</b> Clasificación de los hongos endófitos y fitopatógenos de <i>Salvia</i> sp. con base en su tasa de crecimiento.	<b>58</b>

<b>Figura 27.</b> Cromatografía en capa fina comparativa de los extractos orgánicos del hongo fitopatógeno SspF4.	<b>61</b>
<b>Figura 28.</b> Cromatografía en capa fina comparativa de las fracciones primarias del hongo endófito SspE8.	<b>71</b>
<b>Figura 29.</b> Efecto fitotóxico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos endófitos de <i>Salvia</i> sp., sobre el crecimiento de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>S. lycopersicum</i> .	<b>74</b>
<b>Figura 30.</b> Efecto fitotóxico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos fitopatógenos de <i>Salvia</i> sp., sobre el crecimiento de la semilla de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>S. lycopersicum</i> .	<b>75</b>
<b>Figura 31.</b> Efecto antifúngico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos endófitos de <i>Salvia</i> sp., sobre el crecimiento radial de los hongos <i>F. oxysporum</i> y <i>A. alternata</i> .	<b>76</b>
<b>Figura 32.</b> Efecto antifúngico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos fitopatógenos de <i>Salvia</i> sp., sobre el crecimiento radial de los hongos <i>F. oxysporum</i> y <i>A. alternata</i> .	<b>79</b>
<b>Figura 33.</b> Efecto antifúngico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos endófitos de <i>Salvia</i> sp., sobre el crecimiento radial de los oomicetos <i>Phytium aphanidermatum</i> y <i>Phythophthora capsici</i> .	<b>81</b>
<b>Figura 34.</b> Efecto antifúngico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos fitopatógenos de <i>Salvia</i> sp., sobre el crecimiento radial de los oomicetos <i>Phytium aphanidermatum</i> y <i>Phythophthora capsici</i> .	<b>82</b>
<b>Figura 35.</b> Estructuras químicas de compuestos naturales y sintéticos pertenecientes a la familia de la estrobilurina.	<b>84</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	Significancia
<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>A. hypochondriacus</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
°C	Grados Centígrados
CCF	Cromatografía en capa fina
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	Hexano
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
CPD	Caldo papa dextrosa
E	Endófito
F	Fitopatógeno
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
g	gramos
h	horas
L	Litros
MA	Medio arroz
µg	Microgramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
<i>P. capsici</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
<i>P. aphanidermatum</i>	<i>Phytium aphanidermatum</i>
PDA	Papa-Dextrosa-Agar
ppm	Partes por millón
sp.	Especie
<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
vs	Contra

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la agricultura en nuestro país se enfrenta a varios problemas para abastecer a toda la población mexicana. Dentro de las causas de desabasto encontramos los recientes desastres naturales provocados por el cambio climático global que ha afectado a varias regiones agrícolas de la República Mexicana, lo que ha ocasionado pérdidas millonarias en este sector (Gerald, 2009).

Otra de las problemáticas, es el agotamiento de los recursos naturales como el agua y suelo, debido a la conversión de campos agrícolas en suelos urbanos; lo que ha hecho más difícil la labor en el campo, provocando el abandono de las tierras por parte de los campesinos (Tyler, 2007).

Por otra parte, el uso indiscriminado de plaguicidas y fertilizantes de origen sintético, ocasionan un grave deterioro y contaminación del suelo y agua. Actualmente, los plaguicidas son altamente utilizados debido a que existe una gran variedad de organismos que perjudican los campos de cultivos, como son las malezas, las plagas y los patógenos (insectos, parásitos, virus, hongos y oomicetos), capaces de provocar enfermedades en los cultivos o de competir por espacio y nutrientes, como es el caso de las malezas, y que en la mayoría de los casos provoca la pérdida de los cultivos (Tyler, 2007; Sandoval-Espinosa, 2014).

Otra de las desventajas de los plaguicidas de origen sintético es que a pesar de tener una alta selectividad pueden tener actividad biológica sobre organismos a los que no van dirigidos, y pueden alterar cadenas completas dentro de los ecosistemas, debido a que al no ser biodegradables, perduran mucho tiempo en el suelo. Además, el uso intensivo de los plaguicidas sintéticos, ha provocado que los microorganismos generen sistemas de resistencia (Tyler, 2007).

Debido a las desventajas que presentan los plaguicidas de origen sintético, muchos países han creado regulaciones más restrictivas respecto al uso de los mismos. Asimismo, algunos investigadores han intensificado la búsqueda de nuevas alternativas para el desarrollo de pesticidas.

Una prometedora solución es el uso de productos de origen natural. Los compuestos derivados del metabolismo secundario de diversos organismos ofrece una alternativa para la obtención de compuestos bioactivos estructuralmente novedosos y menos agresivos para el ambiente, debido a su capacidad de biodegradación (Tyler, 2007).

Dentro de las fuentes de origen natural se sitúan los microorganismos endófitos. Algunas investigaciones han encontrado que estos microorganismos son fuente de metabolitos secundarios con una alta actividad biológica como agentes agroquímicos, entre otros (Li & Tao, 2009; Macías et al., 2010, 2014; Sandoval-Espinosa, 2014).

En este contexto, el presente trabajo de investigación se desarrolló con la finalidad de poner en evidencia la actividad biológica, a nivel extractos orgánicos de los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos y fitopatógenos aislados de la planta hospedera *Salvia* sp., recolectada en la Reserva de la Biosfera de Sierra de Huautla (REBIOSH), con la finalidad de colaborar al posible desarrollo de agroquímicos de origen natural, y contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones existentes entre plantas hospederas y hongos endófitos.

Asimismo, el presente proyecto comprende: 1) La purificación y determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos de la planta *Salvia* sp. 2) La obtención de los cultivos en pequeña escala de los hongos puros. 3) La obtención de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio. 4) La evaluación cuantitativa del potencial antifúngico y fitotóxico de los extractos orgánicos sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura y sobre dos plantas de prueba. 5) El fraccionamiento primario de los extractos orgánicos crudos y la determinación del potencial antifúngico y fitotóxico de las fracciones primarias.

## **II. ANTECEDENTES**

### **1. Actividad agrícola en México**

La agricultura forma parte de las actividades del sector primario económico de México, y es una de las ramas de la economía mexicana más importantes desde la época prehispánica (Palomo *et al.*, 1993). La agricultura se define como el cultivo de diferentes semillas, plantas y frutos que se realiza con el objetivo de obtener alimentos que serán destinados para la alimentación del ganado y para proveer de materias primas a la industria con la finalidad de abastecer la alimentación humana (Palomo *et al.*, 1993; INEGI, 2011).

En México, se cultiva una gran variedad de productos agrícolas gracias a la diversidad de climas presentes en las diferentes regiones del país, de acuerdo al INEGI, en el año 2011 los cultivos cíclicos con mayor producción fueron: maíz, sorgo, frijol, trigo, arroz y jitomate; entre los cultivos perennes con mayor producción se encuentran: aguacate, café, cereza, naranja, plátano, caña de azúcar y limón (INEGI, 2011).

A pesar de la amplia variedad de cultivos en nuestro país, existen diversos problemas para abastecer eficientemente la alimentación humana, entre ellas, encontramos el ataque de plagas y malezas que perjudican enormemente a los cultivos agrícolas. A continuación, se describirán cuatro de las enfermedades fúngicas ocasionadas por los microorganismos de prueba utilizados en esta investigación. Asimismo, se profundiza en la problemática generada por las malezas.

### **2. Enfermedades fúngicas**

Algunos cultivos agrícolas se han visto afectados por ciertas enfermedades microbianas que pueden provocar un impacto importante en la actividad económica de un país. En seguida, se presentan y describen algunas enfermedades provocadas por los hongos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria*



*alternata*, y por lo oomicetos *Pythium aphanidematum* y *Phytophthora capsici*, utilizados en el presente proyecto de investigación.

## 2.1. Fusariosis del banano

La fusariosis del banano, mejor conocida como enfermedad de Panamá, es una enfermedad provocada por un hongo fitopatógeno que ha afectado gravemente la producción agrícola en varios países desde los años 20's (Kavanagh, 2003). La fusariosis es una enfermedad generalizada por vía vascular, cuyo agente es *Fusarium oxysporum* que puede vivir y persistir durante muchos años en el suelo. Una vez presente, la enfermedad no puede ser controlada con prácticas de cultivo tradicionales (FAO, 2014). El crecimiento y propagación de este microorganismo se ve favorecido por suelos ácidos, pobreza mineral del terreno, especialmente en potasio, malos drenajes, y la presencia de superficies pizarrosas (Kavanagh, 2003). La propagación se intensifica después de estaciones muy lluviosas. El hongo infesta las raíces, principalmente cuando estas sufren quemaduras, erosiones en las radículas o ataques de parásitos. El micelio se desarrolla rápidamente destruyendo las células parequimatosas, y alcanzando los vasos conductores, en los que progresa más rápidamente (**Figura 1**). Los síntomas de enfermedad suelen ser perceptibles en los plátanos adultos, no en los retoños (Kavanagh, 2003; Pérez, 2004).



**Figura 1.** a) Tallo del cultivo de plátano infectado por *Fusarium oxysporium*. b) Cultivos de plátano infectados por *Fusarium oxysporium*.

Esta enfermedad es de extensión rápida, ocasiona la muerte de las plantas y dificulta la implantación de nuevos cultivos en el suelo infestado, debido a esto, varias extensiones de cultivos en América Central fueron abandonadas a partir de 1926 (Kavanagh, 2003).

Actualmente, el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4 (TR4), se ha propagado masivamente causando el mismo marchitamiento, sin embargo, ahora afecta y destruye otras variedades de banano que no habían sido afectadas en décadas pasadas (Pérez, 2004). Lo que pone de manifiesto que posee mayor potencial fitotóxico, y resistencia a los agroquímicos. El TR4 ha infestado plantaciones de banano en Asia, Jordania, Mozambique, India, China, Filipinas, Indonesia, Camerún, Tanzania, Colombia, Ecuador y Brasil, entre otras (Pérez, 2004; FAO, 2014).

Sin embargo no existe tratamiento totalmente efectivo viable del suelo o de la planta para controlar o curar el marchitamiento provocado por *F. oxysporum* TR4, en el terreno de cultivo; por otro lado las esporas del hongo permanecen en latencia durante décadas; el genoma del hongo no se ha identificado completamente. La única medida preventiva disponible en la actualidad es la cuarentena, previniendo la transferencia de tierra afectada a zonas no infectadas, libres de *F. oxysporum* TR4 (FAO, 2014).

El plátano es uno de los cultivos perennes con mayor producción anual en México, es el octavo cultivo alimenticio más importante del mundo, y el cuarto más importante en los países menos desarrollados. Se produce en 135 países en territorios de zonas tropicales y subtropicales, es por ello que la FAO (Food and Agriculture Organization) poniendo importante atención en esta enfermedad, que cada vez es más persistente y de mayor propagación (FAO, 2014, INEGI, 2011).

*Fusarium oxysporum* no sólo es responsable del marchitamiento en plátano, sino también ataca el césped, cultivo de flores, algodón, café, tabaco, jengibre y soya (Kavanagh, 2003).

## 2.2. Moho negro, provocado por *Alternaria alternata*

El moho negro es una enfermedad endémica del Norte de Sinaloa, causada por el hongo *Alternaria alternata* que afecta a los frutos maduros de tomate, los síntomas varían desde pequeñas lesiones superficiales de color café claro hasta lesiones necróticas hundidas. En condiciones de alta humedad, el hongo produce una capa negra de conidios sobre el tejido infectado (**Figura 2**), por lo que la severidad de síntomas varía de acuerdo a las condiciones de humedad prevalentes durante la madurez de los frutos. La humedad provoca que los conidios del hongo germinen debido a la disponibilidad de los nutrientes solubles presentes en la superficie de los frutos (Félix *et al.*, 2002).

Esta enfermedad ocasiona importantes pérdidas económicas, ya que cuando la incidencia de *A. alternata* supera el 8%, los productores reciben descuentos en la cosecha o esta es rechazada por la industria, lo que representa pérdidas económicas significativas (Félix *et al.*, 2002).

Los productores de tomate que abastecen la industria del Norte de Sinaloa comúnmente realizan 1 o 2 aplicaciones de clorotalonil para el control del moho negro del fruto, y en muchas ocasiones estas aplicaciones resultan ineficaces debido a que se realizan cuando ya se observan los síntomas iniciales de la enfermedad (Félix *et al.*, 2002). Se ha comprobado que, la aplicación de clorotalonil durante 6 semanas antes de la cosecha, controla satisfactoriamente la enfermedad. Sin embargo, el clorotalonil es considerado sustancia peligrosa, y se ha demostrado que podría ser carcinógeno en humanos, ya que causa cáncer renal en animales (Félix *et al.*, 2002).

*Alternaria alternata* y *Alternaria solani* son dos hongos patógenos que pueden afectar tanto tomates maduros como cultivos de papas (Kavanagh, 2003).



**a**



**b**

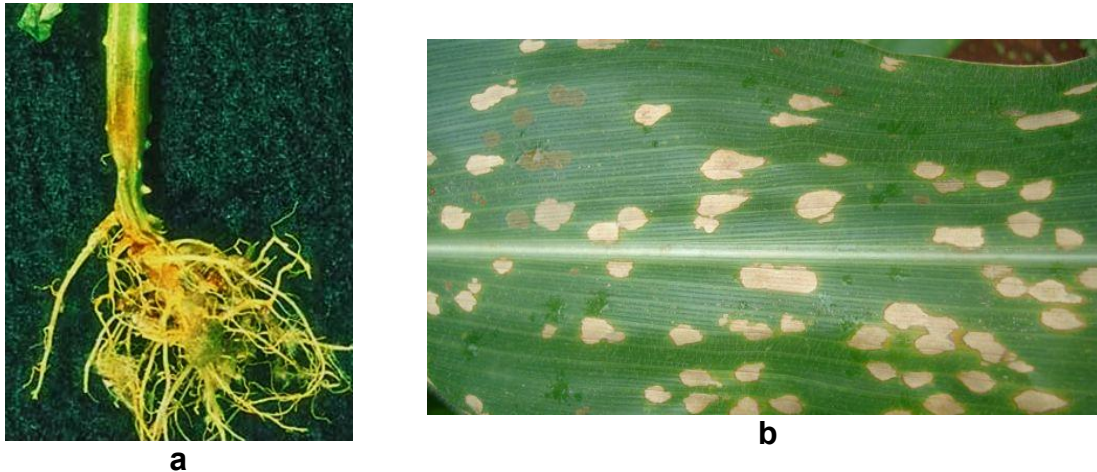
**Figura 2.** a) Cultivos de tomate saladette infectados por *Alternaria alternata*. b) Tallos de cultivos de tomate bola infectados por *Alternaria solani*.

### 2.3. Enfermedades provocadas por *Pythium aphanidermatum*

Los cultivos de maíz pueden ser afectados por distintas enfermedades, entre las que destacan las royas, manchas de hojas y tallo, y la pudrición de los mismos (FAO, 2001).

Las especies del género de *Pythium* son oomicetos fitopatógenos comunes en suelos tropicales, y generalmente, son los responsables de causar los tizones en los cultivos de maíz. Especies del género de *Pythium* y *Fusarium* también son agentes causales de la pudrición de las raíces, ya que al estar presentes en la raíz del maíz, la debilitan y comienza a pudrirse; la pudrición puede ocurrir en las raíces principales, en los tejidos de la plántula y en la corona, y como consecuencia hongos como *Diplodia maydis* y *Gibberella zeae* pueden entrar a la planta a través de las raíces dañadas y causar la pudrición del tallo (FAO, 2001).

En general, las especies de *Pythium*, incluida *Aphanidermatum*, pueden causar pudrición en las raíces y en las semillas de muchas plantas, también pueden ser agente causal de la podredumbre suave en frutos frescos que están en contacto directo con el suelo. Los pastos son las especies más susceptibles a esta enfermedad (Kavanagh, 2003) (**Figura 3**).



**Figura 3.** a) Raíz de pepino infectada por *Phythium aphanidermatum*. b) Tizón común en las hojas del cultivo de maíz, infectado por *Phythium*.

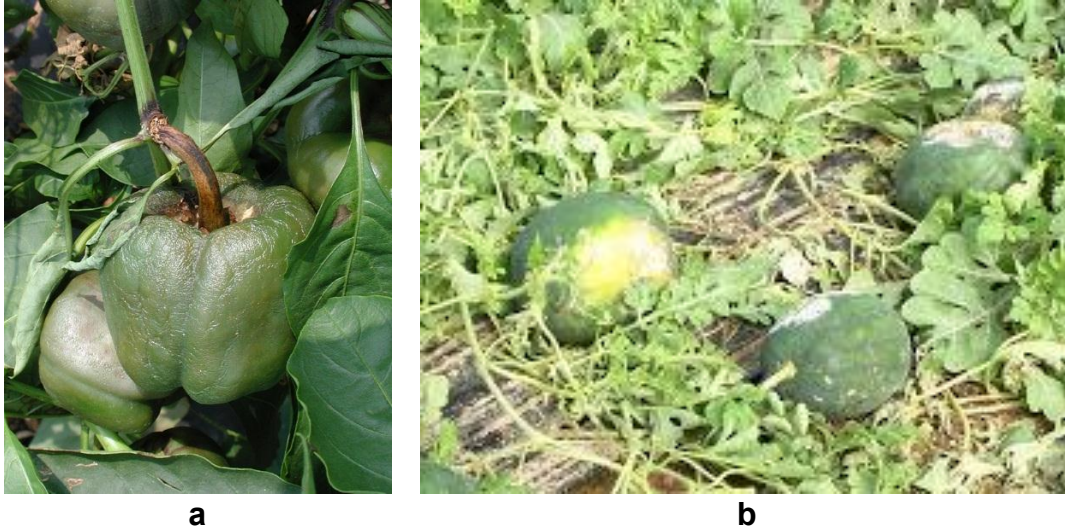
#### **2.4. Marchitez provocada por *Phytophthora capsici***

*Phytophthora capsici* es un oomiceto fitopatógeno que constituye uno de los principales problemas que afectan la productividad agrícola a nivel nacional, ha llegado a afectar entre 10 y 60% a los cultivos, y en algunos casos hasta el 100%, en zonas como el Bajío y Puebla. Se aisló por primera vez en Nuevo México en cultivos de pimiento, después en otros hospedantes como berenjena, calabacita, melón, jitomate, cacao, macadamia, fresa, pepino y sandía. El patógeno vive en el suelo y afecta principalmente las raíces y la base del tallo de la planta, aunque también puede afectar partes aéreas (Pérez *et al.*, 2003).

Los síntomas iniciales son el necrosamiento y pudrición de las raíces secundarias y terciarias, que son las que se encargan de la absorción de agua. Posteriormente, se presenta la marchitez de plantas, y por último, la pudrición de los frutos. Bajo condiciones favorables de temperatura (25 a 28°C) y alta humedad del suelo, *P. capsici* es sumamente agresivo, capaz de destruir campos enteros de los hospedantes en corto tiempo (Pérez *et al.*, 2003).

El control de la enfermedad provocada por *P. capsici* ha sido muy difícil, entre las principales causas se encuentran que se cultivan semillas infectadas, existen encharcamientos en los cultivos, no se hace rotación de los cultivos; y el control

químico utilizado hasta ahora no ha sido eficiente debido a que el fitopatógeno tiene respuesta variable a los plaguicidas empleados, y ha desarrollado resistencia a los mismos (Pérez *et al.*, 2003).



**Figura 4.** a) Marchitez de cultivos de pimiento verde infectados por *P. capsici*. b) Cultivos de sandía infectados por *P. capsici*.

### 3. Malezas

Las malas hierbas, también llamadas malezas, se han definido como “especies que no forman parte del cultivo” o “especies que no han sido sembradas intencionalmente en cierta zona”. Sin embargo, una planta sólo se convierte en mala hierba cuando interfiere en actividades humanas como procesos agrícolas u hortícolas, ya que en otros momentos, y en otros lugares, ciertas plantas se ven de manera completamente diferente ya que pueden poseer propiedades medicinales como la manzanilla o pueden formar parte de la alimentación de ciertas culturas como el jitomate y el amaranto (Lampkin, 2001).

Estas plantas (malezas) que interfieren con actividades agrícolas, pueden causar daños directos o indirectos al cultivo. Directamente, compiten con los cultivos por el espacio, luz, agua y nutrientes provocando la reducción de la producción; pueden comportarse como parásitas del cultivo como las hechiceras que afectan al sorgo y al maíz en África, India y algunas partes de Estados Unidos; o pueden

ser venenosas, como los senecios en los pastos (Lampkin, 2001). Indirectamente, las malas hierbas pueden actuar como hospederas de plagas, y enfermedades que pueden afectar el cultivo, durante su crecimiento, y después de la cosecha. En el momento de la recolección la presencia de las malas hierbas puede causar problemas con la maquinaria agrícola, pueden dificultar las labores de recolecta, afectando el valor económico del cultivo (Lampkin, 2001).

Las malas hierbas pueden clasificarse como gramíneas o del tipo hoja ancha, pudiendo ser anuales, bianuales o perennes, y tienen distintos periodos de germinación. Muchas malas hierbas se han visto favorecidas al mejorar la nutrición de los cultivos, y presentan mayor resistencia a herbicidas, como por ejemplo, el uso generalizado de la atrazina y la simazina en cultivos de maíz, ha provocado que varias gramíneas silvestres, generalmente, especies del género *Panicum*, y especies de hoja ancha del género *Amaranthus*, se hayan convertido en malas hierbas problemáticas (Lampkin, 2001).

Las malas hierbas poseen la habilidad de colonizar rápidamente el terreno, debido a sus mecanismos de reproducción y dispersión, así como la autopolinización y producción de semillas en grandes cantidades y con gran capacidad de dispersión. El esparcimiento de abonos orgánicos, estiércol líquido o lodos, que no han sido aireados o compostados adecuadamente, también son importantes fuentes de fructificación de malas hierbas (Lampkin, 2001).

Aunque algunas semillas de malezas permanecen viables en el suelo durante muchos años, la mayoría germina el mismo año en que se producen. El mecanismo que permite a las semillas sobrevivir durante largos periodos hasta que encuentran las condiciones adecuadas para la germinación es conocido como "latencia". Para que la germinación se lleve a cabo, la semilla requiere presencia de oxígeno, humedad y temperaturas adecuadas, así como fuentes de nutrientes (Lampkin, 2001).

#### **4. Pesticidas**

Los pesticidas son productos químicos destinados a combatir ataques de plagas de diferentes organismos que pueden afectar cultivos agrícolas y hortícolas. Una de las clasificaciones más conocidas los secciona en tres grupos: insecticidas, herbicidas y fungicidas. Sin embargo, también existen pesticidas dirigidos a otras plagas como: oomicidas, rodenticidas, moluscicidas y acaricidas, entre otros (Cremllyn, 1991; Lampkin, 2001).

Los plaguicidas también se encuentran divididos en dos principales tipos: pesticidas no sistémicos y pesticidas sistémicos. Los pesticidas no sistémicos son aquellos que no penetran a los tejidos de la planta y consecuentemente, no son transportados dentro del sistema vascular de la misma. Los primeros insecticidas, fungicidas y herbicidas, fueron de este tipo, sin embargo; estos pesticidas presentan algunas desventajas como la susceptibilidad a los efectos del clima (viento, lluvia, luz solar). Los pesticidas sistémicos son aquellos en los que el químico entra en contacto directo con los tejidos internos de la planta hospedera. Una de las desventajas de estos plaguicidas es que pueden causar daños a la planta (Cremllyn, 1991).

Los plaguicidas tienen una elevada actividad biológica que a pesar de ser selectiva tiende a tener algunas consecuencias sobre organismos a los que no van dirigidos. También pueden alterar una amplia gama de ecosistemas, comenzando con el suelo y sus microorganismos, y llegando hasta los animales superiores (Lampkin, 2001).

El uso intensivo de plaguicidas sintéticos en los últimos años ha provocado el desarrollo de resistencia de los microorganismos a los agroquímicos. Debido a que estos productos químicos no son biodegradables, y permanecen por largo tiempo en el suelo han provocado una mayor contaminación ambiental. Los plaguicidas sintéticos, también han ocasionado problemas de salud a los trabajadores que se encuentran en contacto directo con los mismos.



Tomando en consideración las desventajas que presentan los plaguicidas sintéticos, así como a las regulaciones cada vez más restrictivas en varios países para el uso de estos productos, se ha intensificado la búsqueda de alternativas para el desarrollo de nuevos pesticidas, entre las que destacan el uso de productos de origen natural (Lira-Saldívar, 2007; Gond *et al.*, 2010).

## **5. Productos naturales como fuente de compuestos bioactivos**

Los compuestos activos provenientes de los productos naturales son derivados del metabolismo secundario de distintos organismos, y pueden poseer una alta actividad biológica sobre otros organismos, lo que representa una gran alternativa para la obtención de compuestos bioactivos menos agresivos para el medio ambiente, colaborando así, con el desarrollo de actividades económicas sostenibles (González-Coloma *et al.*, 2007; Dayan, 2009; Yu *et al.*, 2010).

Una de las fuentes de origen natural de plaguicidas potenciales, son los microorganismos asociados a plantas, denominados microorganismos endófitos. Estos organismos, en ambientes naturales, se encuentran presentes en casi todas las plantas, incluyendo helechos, coníferas y angiospermas; de la misma manera se encuentran asociados a especies de algas y musgos (Luiz, 2012).

Los microorganismos endófitos son fuente potencial de metabolitos secundarios biológicamente activos, y se ha encontrado que algunos de ellos tienen aplicaciones como antibióticos, antiparasitarios, inmunosupresores, agentes anticancerígenos y agroquímicos, entre otros (Li & Tao, 2009).

## **6. Microorganismos endófitos**

Se conocen como microorganismos endófitos a aquellos organismos que viven durante parte o durante todo su ciclo de vida dentro de los tejidos de las plantas; pueden desarrollarse intra e intercelularmente en los tejidos e incluso en las raíces de las mismas, sin ocasionar síntomas visibles de enfermedad (Gamboa-Gaytán, 2006; Schulz, 1999; Zhao, 2010; Recco-Pimentel, 2011).

Dentro de los microorganismos que pueden habitar en el interior de las plantas se encuentran hongos, oomicetos, levaduras y bacterias; por lo tanto, una planta no debe ser considerada como un solo individuo, sino como un ecosistema, debido al gran número de comunidades e interacciones que pueden existir en su interior (Gamboa-Gaytán, 2006).

La interacción mutualista entre los microorganismos endófitos y su planta hospedera resulta benéfica para ambas partes, ya que algunos endófitos puede proveer protección a la planta por medio de la producción de compuestos bioactivos que colaboran con la supervivencia de la hospedera, brindándole protección ante agentes externos. Mientras que la planta hospedera brinda un hábitat al endófito (Recco-Pimentel, 2011).

Los organismos endófitos se han adaptado a su hábitat dentro de la planta hospedera; sin embargo, viven en constante competitividad en su microambiente en el cuál compiten por nutrientes y espacio contra otros microorganismos endófitos y patógenos. Este estrés biótico los estimula a producir metabolitos secundarios estructuralmente diversos y con amplia actividad biológica. (Recco-Pimentel, 2011; Macías- Rubalcava, 2014).

Una vez aislados los compuestos sintetizados por los microorganismos endófitos, pueden ser utilizados en la industria, agricultura y medicina, debido a su alto potencial biológico (Recco-Pimentel, 2011).

## 7. Hongos endófitos

Los hongos endófitos a diferencia de otros microorganismos endófitos, tienen la capacidad de esporular cuando la planta llega a la senescencia con fines de propagación (Rodríguez *et al.*, 2008). Los hongos endófitos pueden ser biotróficos, mutualistas, comensales benignos, descomponedores o patógenos latentes. Taxonómicamente, la mayoría de los hongos endófitos pertenecen al phylum *Ascomycota* asociados a anamórfos, mientras que algunas especies pertenecen al phylum *Basidiomycota* y *Zigomicota*. (Luiz, 2012).

Schulz y colaboradores (1999) demostraron experimentalmente que los hongos endófitos no causan ningún síntoma de enfermedad, ni inhiben el crecimiento de su planta hospedera, en comparación con los hongos fitopatógenos que producen daños en los tejidos vegetales, y disminuyen el crecimiento de las plántulas inoculadas.

Cerca de 300,000 especies de plantas han sido estudiadas con el fin de evidenciar la presencia de microorganismos endófitos, y se estima que existen alrededor de un millón de diferentes especies de hongos endófitos, pero pocas especies han sido descritas debido a que no todos los hongos endófitos crecen en medios artificiales, por lo que este cálculo puede subestimar la diversidad microbiana endófito real (Gamboa-Gaytán, 2006; Yu *et al.*, 2010).

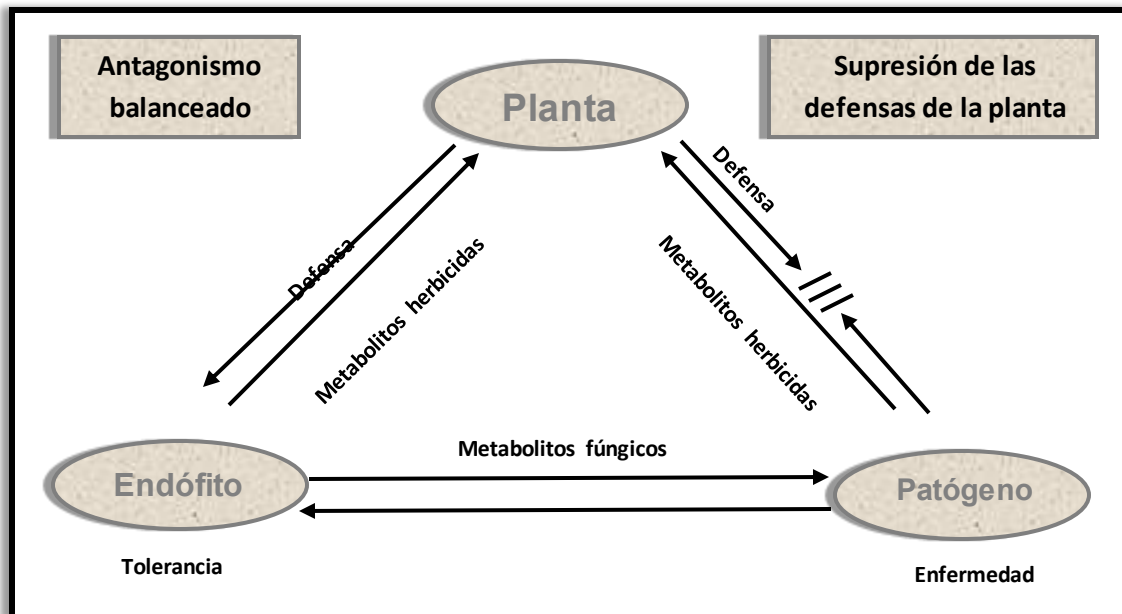
Algunas de las especies de hongos endófitos descritas hasta el momento pertenecen a los géneros de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Ectostroma*, *Fusarium*, *Metarhizium*, *Monochaetia*, *Mucor*, *Ozonium*, *Papulaspora*, *Periconia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Pithomyces*, *Taxomyces*, *Tubercularia*, *Acremonium*, *Blastomyces*, *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Zhao, 2010).

Los hongos endófitos se han considerado un grupo modelo para estudios ecológicos, y de biodiversidad debido a su fácil muestreo y cultivo en el laboratorio, en comparación de otros microorganismos endófitos, y debido a la gran cantidad de especies e individuos (Gamboa-Gaytán, 2006).

## **8. Hipótesis mutualista: Relación hongo endófito-planta hospedera**

Una relación mutualista es aquella que permite que la capacidad de sobrevivencia, y reproducción de los organismos involucrados en la misma, sea mayor cuando están asociados que cuando están viviendo como un solo individuo (Gamboa-Gaytán, 2006).

La relación hongo endófito-planta hospedera se propone como mutualista, ya que la planta hospedera puede proporcionar un hábitat y nutrimentos a los hongos endófitos, y algunos de estos a su vez, pueden producir compuestos bioactivos, mejor conocidos como metabolitos secundarios, que pueden ayudar a la planta hospedera a resistir factores de estrés externos bióticos y abióticos (Zhao, 2010; Yu *et al.*, 2010). Sin embargo, el estado fisiológico de la planta determina si la relación será de carácter mutualista o parasítico (Gamboa-Gaytán, 2006), debido a que los hongos endófitos excretan metabolitos no específicos con actividad herbicida que pueden causar necrosis, inhibición de crecimiento, y muerte de la hospedera. De la misma manera, la planta excreta metabolitos que pueden causar daño al endófito, no obstante, al no existir daño en ninguna de las partes se piensa que la planta y el hongo endófito viven en un antagonismo balanceado (**Figura 5**) (Schulz, 1999), en el cual si las defensas de la planta decrecen, el antagonismo balanceado puede convertirse en parasitismo por parte del hongo endófito.



**Figura 5.** Hipótesis: Antagonismo balanceado entre hongo endófito y planta hospedera (Schulz, 1999).

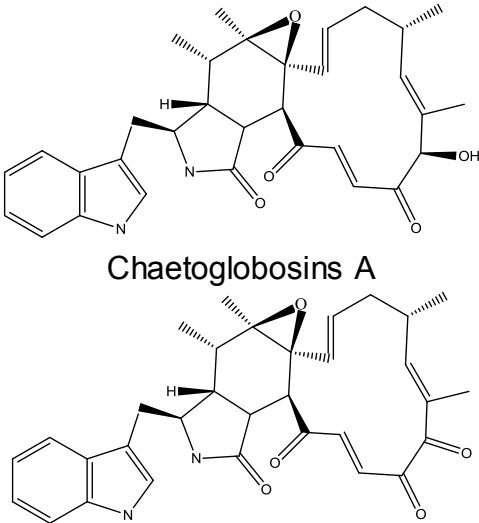
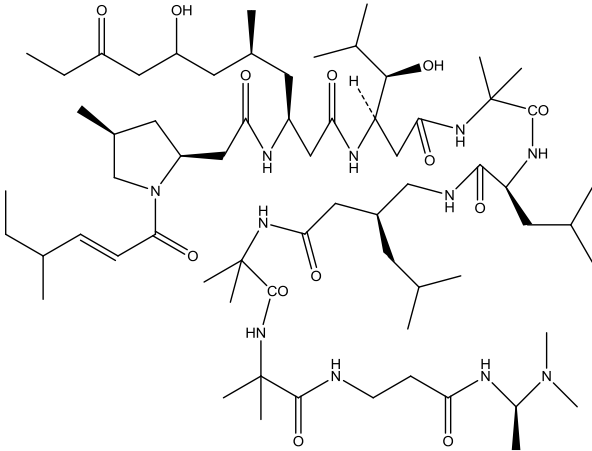
## 9. Metabolitos secundarios de hongos endófitos

Anteriormente, se pensaba que los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos eran productos de desechos del metabolismo primario, sin embargo, estudios recientes demuestran que estos metabolitos secundarios juegan un rol ecológico importante, ya que pueden proveer a la planta hospedera de sustancias que la protejan contra la herbivoría, y también la ayuden a superar factores de estrés causados por factores externos bióticos y abióticos (Schulz *et al.*, 1999).

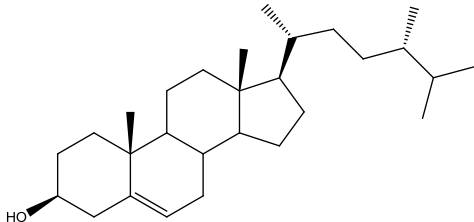
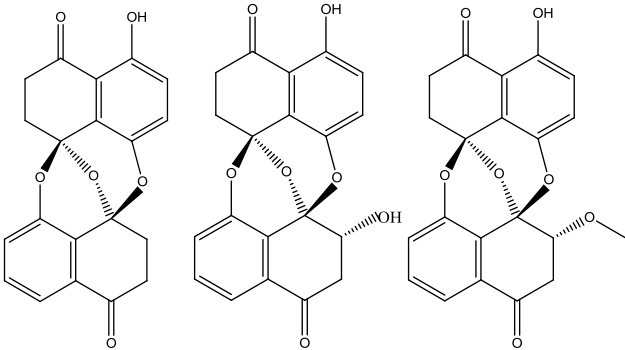
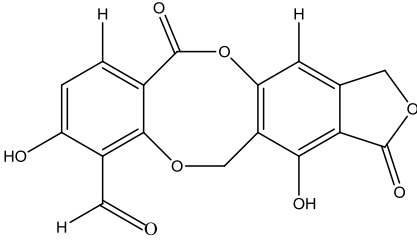
A partir del aislamiento del paclitaxel (taxol), obtenido del hongo endófito *Taxomyces andreanae* en 1993, muchos científicos enfocaron sus estudios a los hongos endófitos, como posibles fuentes de origen natural productores de compuestos con actividad biológica (Zhao, 2010). Desde entonces, se han elucidado diversas estructuras químicas de metabolitos secundarios, que se

encuentran dentro de los siguientes grupos: esteroides, terpenoides, alcaloides, quinonas, fenoles, péptidos, flavonoides, lactonas, xantinas, isocoumarinas, furofuranonas y palmarumicinas (Schulz *et al.*,1999; Zhao *et al.*, 2010; Yu *et al.*,2010). En el Cuadro 1, se muestran algunos metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos.

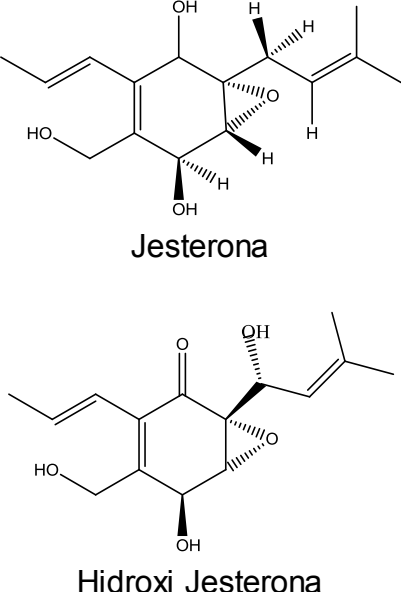
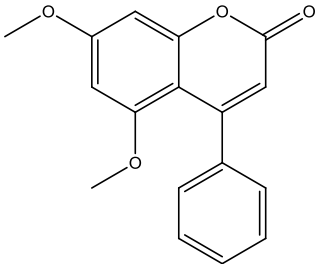
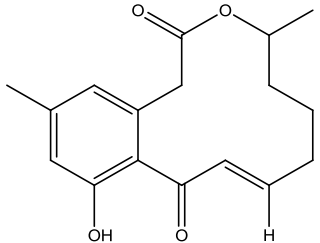
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad antifúngica y fitotóxica aislados de diversos hongos endófitos.

Planta hospedera/ hongo endófito	Metabolito secundario	Actividad biológica
<p><i>Ginkgo biloba</i> / <i>C. globosum</i></p>	 <p>Chaetoglobosins A</p> <p>Chaetoglobosins C</p>	<p>Antioomiceto vs <i>Mucor miehei</i></p> <p>Yu <i>et al.</i>, 2010</p>
<p><i>Taxus baccata</i> / <i>Acremonium</i> sp.</p>	 <p>Leuesnostatin A</p>	<p>Antioomiceto vs <i>Pythium ultimum</i></p> <p>Yu <i>et al.</i>, 2010</p>

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad antifúngica y fitotóxica aislados de diversos hongos endófitos (Continuación).

Planta hospedera / hongo endófito	Metabolito secundario	Actividad biológica
<p><i>Juniperus cedre</i> / <i>Nodulisporium</i> sp.</p>	 <p>3β-hidroxi-ergosta-5-ene</p>	<p>Antiomiceto vs <i>Phytophthora capsici</i></p> <p>Yu et al., 2010</p>
<p><i>C. acuminata</i> / <i>Edenia gomezpompae</i></p>	 <p>Preusomerina EG<sub>1</sub>, EG<sub>2</sub> y EG<sub>3</sub>.</p>	<p>Antifúngica vs</p> <p><i>P. capsici</i>, <i>P. parasitica</i>, <i>F. oxysporum</i> <i>Alternaria solani</i>.</p> <p>Macías et al., 2008</p>
<p><i>Desmotes incomparabilis</i> / <i>Cordyceps dipterigena</i> F0307</p>	 <p>Cordicepsidona A</p>	<p>Antifúngico vs <i>Pythium ultimum</i> <i>Gibberella fujikuroi</i></p> <p>Varughese et al., 2012</p>

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad antifúngica y fitotóxica aislados de diversos hongos endófitos (Continuación).

Planta hospedera/ hongo endófito	Metabolito secundario	Actividad biológica
<p><i>Fragraea bodenii</i> / <i>Pastalotiopsis</i> <i>jesteri</i></p>	 <p>Jesterona</p> <p>Hidroxi Jesterona</p>	<p>Antioomiceto vs <i>Phythium</i> <i>ultimum</i></p> <p><i>Phytophthora</i> <i>citrophthora</i></p> <p><i>Phytophthora</i> <i>cinnamomi</i></p> <p>Li <i>et al.</i>, 2005</p>
<p><i>Zingiber officinale</i> / <i>Streptomyces</i> <i>aureofaciens</i> CMUAc 130</p>	 <p>5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina</p>	<p>Antifúngico vs <i>F. oxysporum</i></p> <p><i>Colletotrichum</i> <i>musae</i></p> <p>Taechowisan <i>et al.</i>, 2005</p>
<p><i>Malus domestica</i> / <i>Nectria gallegena</i></p>	 <p><math>\alpha,\beta</math>- dehidrocurvularina</p>	<p>Inhibe germinación y crecimiento de las semillas de mijo.</p> <p>Gutierrez <i>et al.</i>, 2005</p>



## 10. Aislamiento de hongos endófitos

Para el aislamiento de hongos endófitos, primero es necesario seleccionar las plantas que se desean estudiar. Algunos de los criterios de selección son los siguientes: a) Plantas desarrolladas en zonas de alta biodiversidad, como zonas forestales tropicales, ya que pueden ser candidatas de poseer una gran diversidad de hongos endófitos; b) Plantas que no presenten síntomas de enfermedad que se encuentren cercadas por plantas infectadas, ya que las defensas pueden estar relacionadas con la producción de metabolitos secundarios de hongos endófitos; c) Plantas utilizadas por comunidades para fines medicinales debido a su actividad biológica (Yu *et al.*, 2010).

El aislamiento tradicional consiste en esterilizar superficialmente el material vegetal que se desea examinar y cultivarlo en cajas de Petri conteniendo medios artificiales de agar con diferentes nutrientes y antibióticos, e incubarlos bajo condiciones controladas hasta que los hongos endófitos emerjan de las hojas de las plantas hospederas y colonicen el medio (Gamboa-Gaytán, 2006).

La Reserva de la Biosfera de Huautla (REBIOSH) fue seleccionada como zona de estudio para realizar el muestreo de plantas hospederas, debido a su alta biodiversidad (Arias, 2002). Algunas de las plantas seleccionadas para realizar ensayos biológicos con el objetivo de evidenciar la presencia de hongos endófitos fueron: *Mimosa affinis*, *Sapium macrocarpum*, *Haematoxylon brasiletto*, *Salvia* sp., entre otras. El presente proyecto de investigación se inició a partir de aislamientos realizados de la planta hospedera *Salvia* sp.

## 11. Reserva de la Biosfera de Huautla

La Reserva de la Biosfera de Huautla (REBIOSH) forma parte de la Selva Baja Caducifolia (SBC). Actualmente, la vegetación que se encuentra en la Selva Baja Caducifolia es la vegetación tropical en mayor peligro de extinción, a pesar de esto, la fracción que abarca la REBIOSH es la única sección de la SBC considerada como área natural protegida, con una extensión territorial de 59,000 hectáreas, localizada en la cuenca del río Balsas (Arias, 2002).

La Reserva de la Biosfera de Huautla (REBIOSH) es considerada una zona de alta biodiversidad, incluyendo flora y fauna. Con respecto a la flora, hasta la fecha se han documentado un total de 967 especies de plantas vasculares, incluidas en 469 géneros y 130 familias. Las familias más abundantes en cuanto a número de especies son Fabaceae, Poaceae y Asteraceae. Existen varias especies que dominan el paisaje, siendo las más comunes *Conzattia multiflora*, *Lysiloma acapulcense*, *L. divaricata* (Fabaceae) y varias especies de los géneros *Bursera* (Burseraceae) y *Ceiba* (Bombacaceae). En la distribución de la flora un factor determinante es la temperatura, la cual oscila entre los 20°C y los 29°C, a lo largo del año (Arias, 2002).

Otro de los aspectos importantes por lo que se seleccionó la REBIOSH como zona de estudio, aparte de ser una zona de alta biodiversidad, es que la vegetación de la SBC en ámbito nacional es el tipo de vegetación que provee mayor número de plantas utilizadas con fines medicinales, en esta zona, existen alrededor de 500 especies de plantas consideradas medicinales (Arias, 2002).

## **12. Planta hospedera *Salvia* sp.**

El nombre genérico <<*Salvia*>> proviene del latín *salvare*, que significa salvar, debido a las propiedades medicinales atribuidas a las plantas de este género. Las plantas del género *Salvia* pertenecen a la familia de Labiadas. También, puede ser llamada Selima, Sáuvia y Sage (Muñoz-López, 2002).

Las plantas del género *Salvia* son plantas leñosas, originarias de los países del Mediterráneo oriental. El clima óptimo de crecimiento es templado y templado-cálido. Es una planta muy resistente, ya que históricamente no ha presentado enfermedades importantes. Resiste sequías y heladas; se adapta a gran variedad de suelos, ácidos y básicos, con una escala amplia de pH (5 a 9); soporta alta concentración de cal, arcilla e incluso yeso (Muñoz-López, 2002). Es posible que estas características sean conferidas por la presencia de hongos endófitos productores de moléculas bioactivas.

Se ha estudiado la composición química de las hojas, la cual está integrada por ácido ursólico, flavonoides, glucósidos, ácidos rosmarínico, cafeínico y clorogénico, diterpenos y carnosol. Las flores contienen ácido diterpénico y su éter monometílico, así como taninos catéquicos. El aceite esencial de la planta contiene tuyona (cetona terpénica) 40-50%, y diferentes terpenos como el pineno, cineol, borneol, y alcanfor (Muñoz-López, 2002).

Las hojas de *Salvia*, son utilizadas con fines medicinales debido a que presentan propiedades tónicas, coleréticas, antisudorales, antiespasmódicas, hipoglucemiantes, astringentes, antisépticas, cicatrizantes, estrógenas y antioxidantes. En forma de infusión, se utiliza para combatir sudores nocturnos, asma, catarros, como agente tónico, también como conservador de alimentos en la industria cárnica y como condimentos de carnes, sopas y salsas (Muñoz-López, 2002).

### **III. HIPÓTESIS**

La hipótesis del presente proyecto de investigación considera que debido a que los hongos endófitos y fitopatógenos son fuente prometedora de compuestos con actividad biológica, al aislar y purificar a algunos de ellos, asociados a la planta *Salvia* sp. podrían producir en cultivos *in vitro* en medios de crecimiento óptimos, metabolitos secundarios que muestren actividad fitotóxica y antifúngica.

## **IV. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General**

Determinar la actividad biológica de los extractos orgánicos derivados de cultivos en pequeña escala de hongos endófitos y fitopatógenos aislados de la planta hospedera *Salvia* sp., mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento de diferentes microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba, con el fin de colaborar al posible desarrollo de agroquímicos de origen natural. Asimismo, contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones que se establecen entre plantas hospederas y hongos endófitos

### **2. Objetivos particulares**

1. Purificar y conservar el mayor número de hongos endófitos y fitopatógenos de la planta hospedera *Salvia* sp.
2. Caracterizar macro y microscópicamente a los hongos endófitos y fitopatógenos puros.
3. Realizar cultivos en pequeña escala de los hongos puros, empleando medio arroz y condiciones de incubación estáticas.
4. Obtener los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, mediante un proceso de maceración exhaustivo.
5. Establecer la similitud de los extractos orgánicos obtenidos mediante un análisis cromatográfico en capa fina.

6. Determinar cuantitativamente el potencial antifúngico de los extractos orgánicos obtenidos, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Pythium aphanidermatum* y *Phytophthora capsici*, empleando el método de dilución en agar.
7. Establecer cuantitativamente el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos obtenidos, sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*, utilizando el método de dilución en agar.
8. Realizar el fraccionamiento primario de los extractos fúngicos derivados de los cultivos en pequeña escala, mediante un proceso de reparto.
9. Determinar cuantitativamente el potencial antifúngico y fitotóxico de las fracciones primarias obtenidas.
10. Evidenciar a los hongos endófitos y fitopatógenos productores de metabolitos secundarios con actividad biológica para el desarrollo de posibles agentes herbicidas y fungicidas de origen natural útiles en la agricultura moderna.

## V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 1. Purificación de hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp.

El proceso de purificación de los hongos asociados a la planta *Salvia* sp. se inició a partir de 28 aislamientos de microorganismos endófitos de hojas sanas de la planta hospedera y de 10 aislamientos obtenidos a partir de hojas que mostraban síntomas de enfermedad, para el aislamiento de los hongos fitopatógenos. En ambos casos las hojas fueron colectadas en septiembre de 2010 en la 'Reserva de la Biosfera de Huautla (REBIOSH)' ubicada en el municipio de Quilamula, Estado de Morelos, México; una zona considerada de alta biodiversidad (Arias *et al.*, 2002).

Las resiembras necesarias para la obtención de hongos endófitos y fitopatógenos puros se realizaron en cajas de Petri con papa-dextrosa-agar (PDA). Incubando las cajas a temperatura ambiente, con fotoperiodo de luz artificial-oscuridad 12:12 h. Con el fin de evitar la presencia de bacterias endófitas y/o contaminantes también se utilizaron cajas con PDA-antibiótico. Los antibióticos utilizados fueron: cloranfenicol 1 g/L, nitrofurantoína 1 g/L o ampicilina 1 g/L.

La pureza de los hongos se corroboró realizando una resiembra del centro y de la orilla del micelio de cada uno de los microorganismos en estudio, empleando un cultivo de 8 a 10 días de crecimiento en medio PDA. Ambos inóculos se sembraron el mismo día y fueron tomados con un sacabocado de 5 mm de diámetro, se incubaron bajo las mismas condiciones, a temperatura ambiente con fotoperiodo de luz artificial-oscuridad 12:12 h. Los cambios macroscópicos, se observaron diariamente. Si ambos inóculos presentaban características macroscópicas y microscópicas iguales, se consideraron como hongos puros.

Finalmente, los hongos endófitos y fitopatógenos puros se conservaron mediante resiembras por triplicado en tubos con tapón de rosca de 5 mL conteniendo PDA inclinado, medio arroz y agua-agar. El medio de cultivo empleado para la conservación se eligió con base en las características de crecimiento de los distintos microorganismos en estudio.

## **2. Preparación de medios de cultivo**

### **2.1 Papa-dextrosa -agar (PDA)**

200 g de papas frescas previamente peladas y cortadas en cubos se hirvieron durante 20 minutos con agua destilada. La decocción resultante se filtró a través de gasa, se agregaron 20 g de dextrosa y 15 g de agar. Finalmente, se aforó a un volumen final de 1000 mL con agua destilada, se homogenizó y esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (Mier *et al.*, 2013; Armendáriz-Guillén, 2013, Sandoval-Espinosa, 2014). Posteriormente, se vertió en las cajas de Petri utilizadas para el proceso de purificación o en tubos de vidrio destinados para la conservación de hongos puros.

### **2.2 Medio de arroz (MA)**

30 g de arroz se lavaron perfectamente y se dejó remojar con agua corriente durante 1 h. Posteriormente, se retiró el agua de remojo y se colocó en un frasco de vidrio de 250 mL y se agregaron 80 mL de agua destilada. Finalmente, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (Aly *et al.*, 2008; Armendáriz-Guillén, 2013; Sandoval-Espinosa, 2014).



Para la conservación en tubos se utilizaron 3 g de arroz y 8 mL de agua, empleando el método anteriormente descrito.

### **3. Determinación de las características macro y microscópicas de los hongos de *Salvia* sp.**

Las características macroscópicas se obtuvieron paralelamente a las tasas de crecimiento, para ello, se sembró un inóculo de micelio de 5 mm de diámetro de cada hongo puro en el centro de una caja Petri con medio PDA, por triplicado. Se registraron diariamente las características macroscópicas de los hongos puros estableciéndose mediante inspección visual con ayuda de un microscopio estereoscópico y registrándose el aspecto del micelio aéreo (textura, consistencia, superficie, color) y el aspecto del micelio profundo (color, homogeneidad, formación de anillos concéntricos y/o modificación en el medio cultivo) (Ramírez *et al.*, 2008) así como, la presencia de exudado y/o pigmentos difusibles en el medio de cultivo. Las observaciones se realizaron periódicamente, hasta que los microorganismos crecieron al límite de las cajas de Petri.

Para la determinación de la tasa de crecimiento se registró el área radial o irregular de cada hongo, cada 2 días, hasta llegar al límite de la caja. Esta información se analizó por medio del escaneo de imágenes con ayuda del programa ImageJ y la información se procesó en Office Microsoft Excel. Se obtuvo el valor de cada área en cm<sup>2</sup>, las cuales se graficaron vs el tiempo correspondiente en días, donde la pendiente indica la tasa de crecimiento (cm<sup>2</sup>/días) (Armendáriz-Guillén, 2013, Sandoval-Espinosa, 2014; Villanueva-Silva, 2014).

La caracterización microscópica de los hongos en estudio, se realizó mediante la observación detallada de tinciones realizadas a partir de microcultivos, los cuales permiten conservar la integridad de las hifas y de las estructuras de reproducción, para una mejor descripción (Mier *et al.*, 2013).

En todos los casos, se observó el micelio desarrollado sobre el portaobjetos empleando una tinción en fresco utilizando rojo congo, azul de lactofenol y/o fucsina ácida. El registro de las características microscópicas: tipo de hifa (septada o cenocítica, hialina o dematiácea, presencia de vacuolas y otras estructuras), cuerpos reproductivos y tipos esporas (basidiosporas, ascosporas, esporangiosporas, conidiosporas) (Sánchez-Fernández, 2010; Armendáriz-Guillén, 2013) se llevó a cabo con ayuda de un microscopio óptico con aumento de 40x, marca Motic, (modelo BA410). Finalmente, se capturaron las imágenes con una cámara digital, Moticom 2000 de 2.0 (Digital microscopy).

#### **4. Cultivos en pequeña escala en medio de arroz**

Los cultivos en pequeña escala de los hongos endófitos y fitopatógenos puros se realizaron en frascos de vidrio de 250 mL. El inóculo consistió en cinco cortes del micelio de cada hongo, realizados con un sacabocados estéril de 5 mm de diámetro del micelio de un cultivo del microorganismo, previamente incubado por un período de 8-10 días en PDA. Los frascos se incubaron en condiciones estáticas durante 30 días a temperatura ambiente con fotoperiodo luz artificial-oscuridad 12:12 h (Armendáriz-Guillén, 2013, Sandoval-Espinosa, 2014).

#### **5. Obtención de los extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala**

Los extractos orgánicos derivados de los cultivos en medio de arroz se obtuvieron mediante un proceso de maceración exhaustivo empleando diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y acetato de etilo ( $\text{AcOEt}$ ) como disolventes de extracción. Al término de la maceración, los extractos resultantes se filtraron

y se concentraron al vacío con rotaevaporador. (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; 2014).

Cada uno de los extractos obtenidos a partir del micelio y del medio de cultivo obtenidos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y con AcOEt, se analizaron por cromatografía en capa fina, para determinar su similitud cromatográfica y se determinaron sus rendimientos.

## **6. Determinación del potencial antifúngico y fitotóxico**

### **6.1. Actividad antifúngica**

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico de los extractos orgánicos crudos y de las fracciones primarias, obtenidos a partir de los cultivos en pequeña escala en medio arroz, se realizó mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radial de dos hongos fitopatógenos con importancia económica: *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* (Eumycota) y dos fungoides: *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum* (Oomycota). Todas las cepas fueron donadas por la Dra. Olga Gómez, del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Edo. de México.

Para llevar a cabo los bioensayos se pesaron 20 mg de cada extracto orgánico o fracción obtenida y se disolvieron en metanol (100-300 µL). A continuación, se adicionaron 40 mL de agua destilada estéril y 40 mL de PDA al 2%, para obtener una concentración final de 250 ppm. En cajas Petri de 5 cm se colocaron 5 mL de la disolución y se dejaron solidificar (~40 °C). Posteriormente, se sembró un inóculo de 5 mm de diámetro de micelio de cada uno de los hongos fitopatógenos de prueba en el centro de una caja. El bioensayo se realizó por cuadruplicado, bajo un diseño completamente al azar.

Las cajas de Petri inoculadas, se incubaron de 1 a 3 días dependiendo de la tasa de crecimiento del microorganismo de prueba (un día: *Pythium aphanidermatum*, 2 días: *Phytophthora capsici*, 3 días: *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*), a 28 °C con un fotoperiodo luz artificial-oscuridad 12:12. Paralelamente, se realizaron controles negativos PDA-agua (1%) y PDA-agua (1%)- metanol (~100-300 µL). Como controles positivos se utilizó el fungicida comercial Prozycar® 50P.H (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato) y el Ridomil Gold 4E® (metalaxil-m) para los oomicetos, ambos a una concentración de 250 ppm. (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008, 2010; Armendáriz-Guillén, 2013; Sandoval-Espinosa, 2014).

Para calcular los porcentajes de inhibición, al finalizar el periodo de incubación se realizaron dos mediciones perpendiculares del diámetro de micelio de cada uno de los fitopatógenos y sus respectivas repeticiones. Los promedios se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ( $\alpha=0.05$ ) y una prueba de contrastes de Tukey HSD (utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0) (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008, 2010; Armendáriz-Guillén, 2013; Sandoval-Espinosa, 2014).

## **6.2. Actividad fitotóxica**

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y de las fracciones primarias, obtenidos a partir de los cultivos en pequeña escala, se llevó a cabo mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y la longitud de la raíz de dos plantas de prueba; *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) [amaranto] y *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) [jitomate]. Las semillas de amaranto fueron adquiridas en el Mercado de Tulyehualco, México, D.F. y las semillas de Jitomate se compraron en “Semillas Berentsen”, Celaya, Guanajuato, México.

Para llevar a cabo los bioensayos, se pesaron 4 mg de cada extracto orgánico o fracción primaria y se disolvieron en metanol (100-300  $\mu$ L). Posteriormente, se agregaron 20 mL de agua destilada y 20 mL de agar al 2%, obteniéndose una concentración final de 100 ppm. A continuación, se vertieron 5 mL de la disolución en cajas Petri, y se dejaron solidificar (~40 °C). En seguida, se colocaron 10 semillas por caja, de cada una de las especies modelo.

Las cajas Petri con las semillas se incubaron en la oscuridad a 28 °C, durante 24 h para el caso de *A. hypochondriacus* y 72 h para las semillas de *S. lycopersicum*. La actividad fitotóxica se determinó contando el número de semillas germinadas y midiendo la longitud de la raíz, transcurrido el periodo de incubación. Paralelamente, se evaluaron controles positivos y negativos. Como control negativo se usó agar-agua al 1% y agar-agua al 1%-metanol (~100-300  $\mu$ L). Como control positivo se usó el herbicida comercial RIVAL® (Glifosato: sal monoamónica de *N*-(fosfonometil) glicina) a 100 y 300 ppm. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado bajo un diseño completamente al azar. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ( $\alpha=0.05$ ) y una prueba de contrastes de Tukey HSD, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (Macías-Rubalcaba *et al.*, 2010; 2014; Armendáriz-Guillén, 2013; Sandoval-Espinosa, 2014).

## **7. Fraccionamiento primario**

Los extractos orgánicos crudos derivados de los cultivos en pequeña escala de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *Salvia* sp. se fraccionaron empleando cromatografía de reparto.

Para llevar a cabo el fraccionamiento primario de los extractos orgánicos crudos, se disolvieron en 10 mL de metanol y se colocaron en un embudo de separación. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de hexano y se realizaron diez particiones consecutivas. A continuación, se concentraron al vacío las fracciones hexánica y metanólica resultantes, con ayuda de un rotaevaporador y se determinó su rendimiento.

Las fracciones primarias obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina. Por último, se evaluó la actividad antifúngica y fitotóxica de acuerdo con la metodología indicada en los incisos 6.1 y 6.2.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de determinar la actividad biológica de los extractos orgánicos obtenidos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos y fitopatógenos puros aislados de la planta hospedera *Salvia* sp., así como evidenciar la naturaleza (polaridad) de los compuestos con actividad antifúngica y fitotóxica, realizando el fraccionamiento primario de los extractos crudos, mediante cromatografía de reparto o partición y determinando la actividad biológica presente en cada fracción; con el fin de contribuir al desarrollo de nuevos agentes de control de plagas y enfermedades en cultivos de importancia agrícola, basados en metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos y fitopatógenos.

Los resultados obtenidos se dividen en cinco partes. La primera, comprende la purificación y determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp. La segunda, corresponde a la obtención de los cultivos en pequeña escala de los hongos puros, en condiciones estáticas, empleando medio de cultivo de arroz. La tercera, pertenece a la obtención de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio. La cuarta etapa, abarca la evaluación cuantitativa del potencial antifúngico y fitotóxico de los extractos orgánicos sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura y sobre dos plantas de prueba. Finalmente, la quinta etapa corresponde al fraccionamiento primario de los extractos orgánicos crudos y a la determinación del potencial antifúngico y fitotóxico de cada fracción primaria.

## 1. Obtención de cultivos puros

A partir de 28 aislamientos de hojas sanas y de 10 aislamientos provenientes de hojas que presentaron síntomas de enfermedad, de la planta hospedera *Salvia* sp., se obtuvieron 12 hongos endófitos y 8 hongos fitopatógenos puros, respectivamente. La colecta de las hojas de la planta hospedera se llevó a cabo en la 'Reserva de la Biosfera de Huautla (REBIOSH)' ubicada en el municipio de Quilamula, Estado de Morelos, México; una zona considerada de alta biodiversidad (Arias, 2002).

A cada uno de los aislamientos se les asignó una clave constituida de la siguiente manera: La primera letra corresponde al género de la planta hospedera (S: *Salvia*), la segunda y tercera letra pertenecen a la especie, que en este caso no está definida (sp), los siguientes caracteres representan las resiembras necesarias para lograr obtener al hongo endófito o fitopatógeno puro (**Cuadro 2**). Con la finalidad de simplificar las claves se asignaron claves cortas indicando en el tercer carácter si el microorganismo puro corresponde a un hongo endófito (E) o a un hongo fitopatógeno (F). El último carácter indica el orden consecutivo en que se obtuvieron puros.

**Cuadro 2.** Claves originales y claves simplificadas asignadas a los aislamientos de hongos endófitos y fitopatógenos puros de *Salvia* sp.

Aislamientos	
Clave original	Clave simplificada
Ssp2eI3aI2	SspE1
Ssp1LI2bII	SspE2
Ssp4eII2cI1	SspE3
Ssp2eI3aII	SspE4
Ssp3cI2a	SspE5
Ssp4gI2	SspE6



**Cuadro 2.** Claves originales y claves simplificadas asignadas a los aislamientos de hongos endófitos y fitopatógenos puros de *Salvia* sp. (Continuación).

<b>Aislamientos</b>	
<b>Clave original</b>	<b>Clave simplificada</b>
Ssp4cl2	SspE7
Ssp6bl1a	SspE8
Ssp1a2	SspE9
Ssp6bl3b	SspE10
Ssp1LI2bl	SspE11
Ssp4bl	SspE12
Sspe3lllb	SspF1
Sspx1lb	SspF2
Sspd2ll	SspF3
Sspg3lla	SspF4
Sspd2la	SspF5
Sspe31	SspF6
Sspg31	SspF7
Sspx1Vb2	SspF8

Cabe destacar que durante cada una de las resiembras realizadas para la purificación de los microorganismos asociados a *Salvia* sp., se observó el potencial antagonico de los hongos presentes en un mismo aislamiento, así como su capacidad de resistencia a las condiciones de cultivo *in vitro* y crecimiento ante competidores. Los veinte hongos presentados en el **Cuadro 2**, presentan un importante potencial antagonico frente a otros hongos, así como, frente a bacterias endófitas y contaminantes ambientales.

Con base en las observaciones anteriores se establecieron las características macro y microscópicas de cada hongo puro y se evaluó su potencial alelopático o actividad biológica a nivel extracto.

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

Las características macroscópicas de los hongos puros se determinaron mediante la observación de los cultivos en medio papa dextrosa agar (PDA) con ayuda de un microscopio estereoscópico al inicio de la etapa estacionaria de crecimiento. Estableciéndose las características del micelio aéreo: textura, consistencia, superficie, color de micelio y presencia de exudado y/o pigmentos difundidos en el medio, y las características del micelio profundo: color, homogeneidad, formación de anillos concéntricos y/o modificación en el medio (Ramírez *et al.*, 2008).

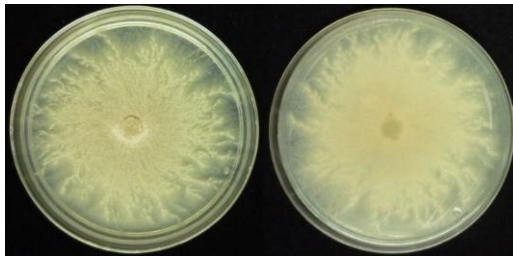
La tasa de crecimiento para cada hongo endófito y fitopatógeno puro se estableció mediante la construcción de curvas de crecimiento, graficando el área en  $\text{cm}^2$  vs tiempo en días, en donde, la pendiente indica la tasa de crecimiento ( $\text{cm}^2/\text{día}$ ).

Las características microscópicas se establecieron a partir de la observación de tinciones en fresco aplicadas al micelio desarrollado en un microcultivo. Las tinciones se realizaron con los colorantes azul de lactofenol, rojo congo y/o fusina ácida. Posteriormente, se observaron con un microscopio óptico las siguientes características: tipo de hifa (septada o cenocítica, hialina o dematiácea, con presencia de vacuolas y otras estructuras), cuerpos reproductivos (esporangios, conidióforos, etc.) y tipos de esporas. A continuación, se describen las características más importantes para cada uno de los hongos en estudio.

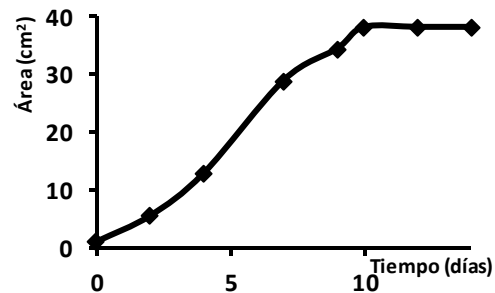
## Hongos endófitos

### SspE1

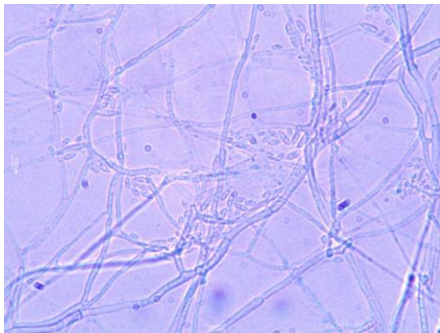
La **Figura 6A** muestra el micelio aéreo (anverso) y micelio profundo (reverso) de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE1**, con 9 días de incubación. La textura del micelio aéreo inicialmente se observa vellosa, con el transcurso del tiempo tiene una apariencia mucilaginosa. La consistencia del micelio es blanda y la superficie es plana. El color del micelio joven es blanco y con el transcurso de los días se torna rosáceo o morado. El micelio profundo exhibe los mismos cambios en color. Los bordes son irregulares y tiene una tasa de crecimiento de  $4.19 \pm 0.30 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 6B**).



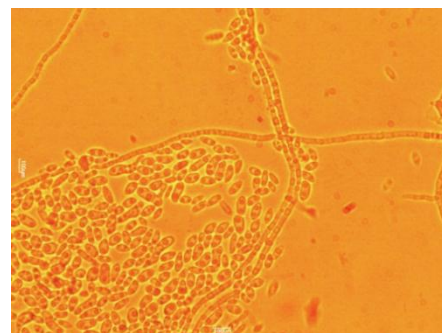
**A**



**B**



**C**



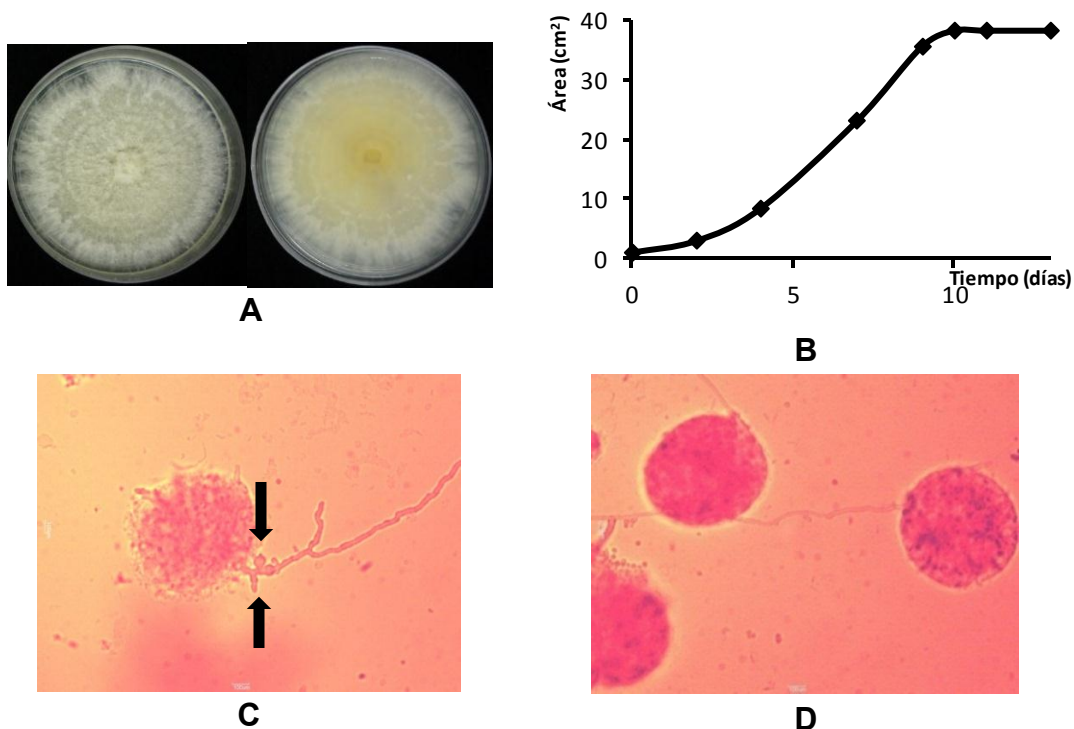
**D**

**Figura 6.** Endófito **SspE1**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha). **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C)** Tinción en fresco con azul de lactofenol a 40x. **D)** Tinciones en fresco con rojo congo a 40x.

Microscópicamente el hongo endófito **SspE1** presenta hifas hialinas y septadas (Figura 6C). Se observan esporas hialinas de forma lenticular, en su mayoría binucleadas (Figura 6D). Bajo estas condiciones de cultivo no se observan cuerpos reproductivos.

## **SspE2**

La **Figura 7A** muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE2**, con 15 días de incubación. La textura del micelio aéreo se observa vellosa, presenta consistencia blanda, superficie convexa y color blanco. Se observa la formación de anillos concéntricos tanto en el micelio aéreo y como en el micelio profundo, en el cual se observó una pigmentación amarilla a partir del octavo día de incubación. El crecimiento es radial con bordes plumosos. La tasa de crecimiento es de  $4.68 \pm 0.32 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 7B**).

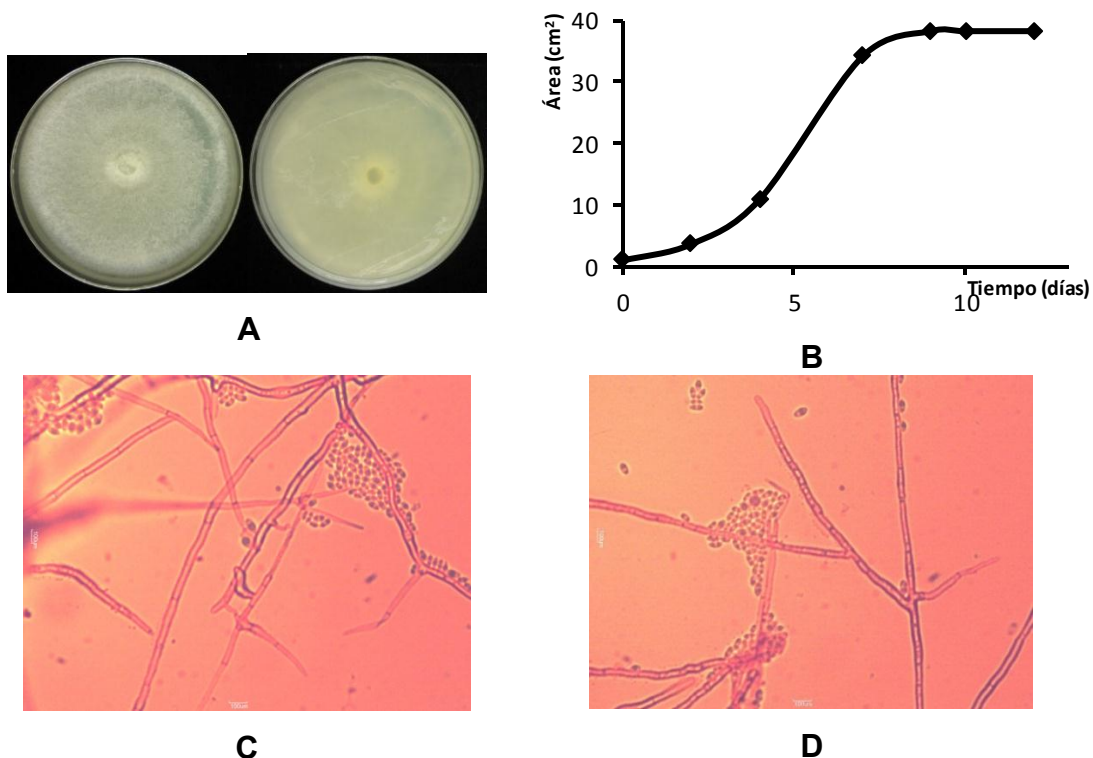


**Figura 7.** Endófito **SspE2**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C y D)** Tinciones en fresco con rojo congo a 40x.

En la Figura 7C se observa la presencia de hifas hialinas y septadas, en esta misma imagen se señalan algunos hifopodios, estructuras que pueden tener la función de adherirse a la superficie del hospedante (Ulloa, 2006). En la Figura 7D se presentan esporangios miriosporos, en uno de los cuales se observa la liberación de esporas esféricas hialinas (Ulloa, 2006).

### SspE3

En la **Figura 8A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE3**, con 10 días de incubación. La textura del micelio aéreo se observa aterciopelada, presenta consistencia blanda, superficie convexa, color blanco y borde entero. El micelio profundo se observa con una coloración homogénea, ligeramente amarilla. La tasa de crecimiento es de  $6.22 \pm 0.41$  cm<sup>2</sup>/día (**Figura 8B**).

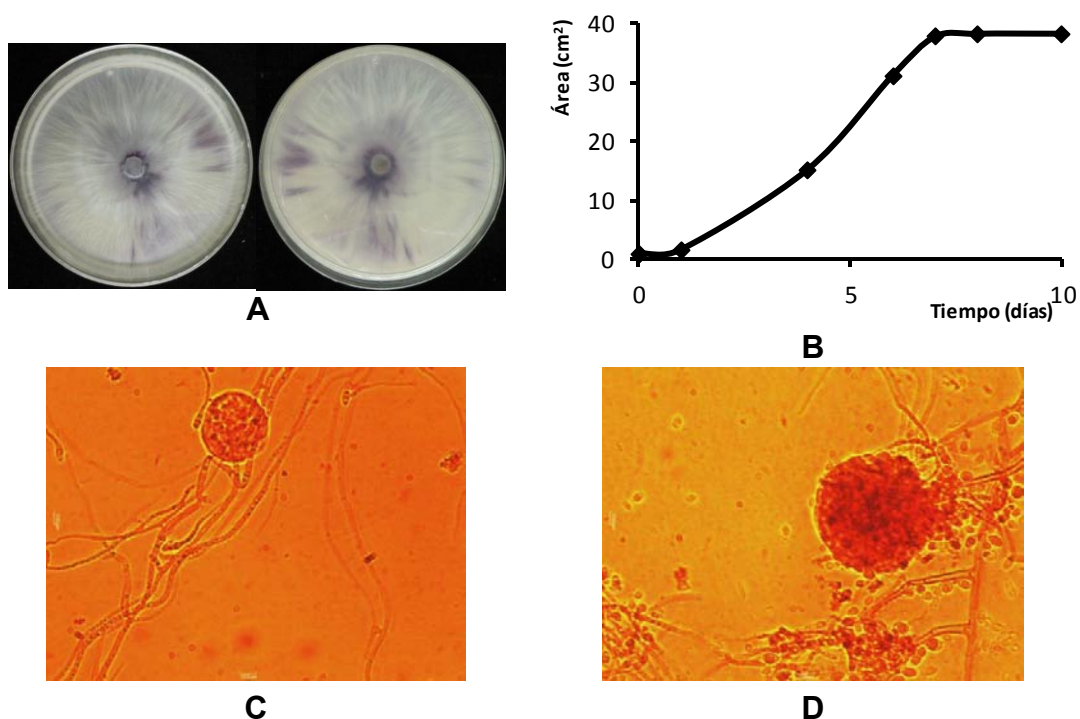


**Figura 8.** Endófito **SspE3**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C y D)** Tinciones en fresco con fucsina ácida a 40x.

Microscópicamente el hongo endófito **SspE3** presenta hifas hialinas y septadas. Se observan esporas hialinas de forma lenticular, la mayoría binucleadas (**Figuras 8A y 8B**) Bajo estas condiciones de cultivo no se observan estructuras de reproducción.

### **SspE4**

En la **Figura 9A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE4**, con 12 días de incubación. La textura del micelio aéreo presenta apariencia mucilaginosa, consistencia blanda y superficie plana. El color del micelio inicialmente es blanco con hifas al azar rosáceas, las cuales transcurrido el tiempo, se tornan de color morado. El micelio profundo sufre estos mismos cambios en el color de las hifas. El crecimiento es radial con bordes fimbriados (Ulloa, 2006). La tasa de crecimiento es de  $6.08 \pm 0.12 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 9B**).

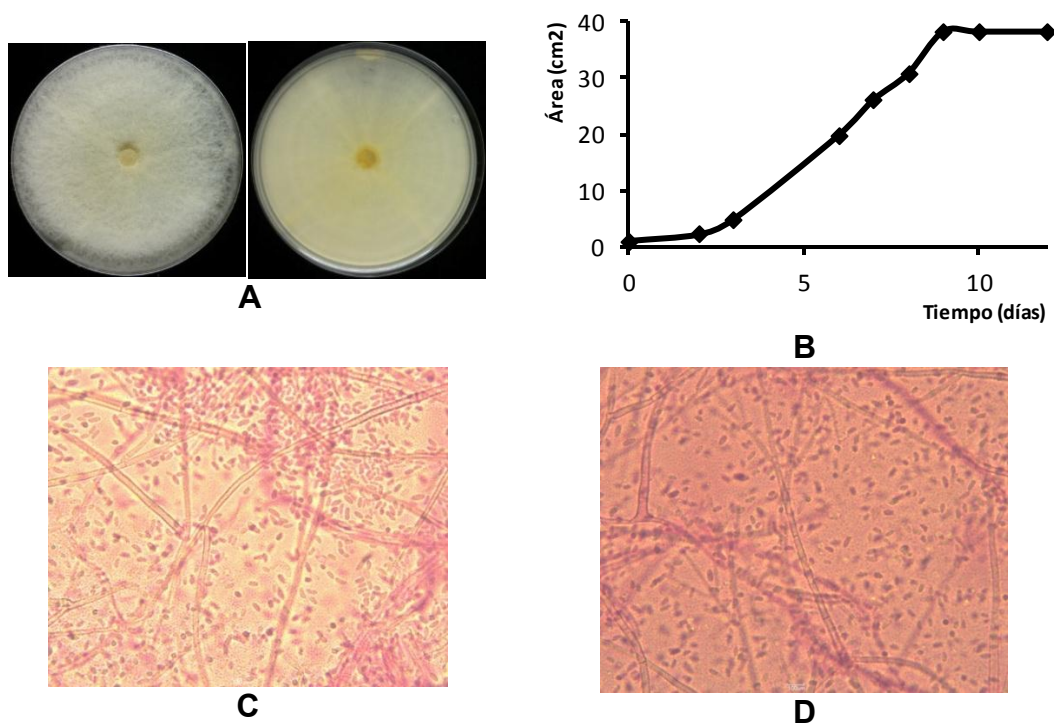


**Figura 9.** Endófito **SspE4**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C y D)** Tinciones en fresco con rojo congo a 40x.

En la **Figura 9C** se observa la presencia de hifas hialinas septadas, en la misma imagen, se observan pequeñas vacuolas presentes dentro de los septos de las hifas. La **Figura 9D** muestra la liberación de las endosporas contenidas en un esporangio, las cuales son hialinas, uninucleadas y de forma ovoide (Ulloa, 2006).

### SspE5

En la **Figura 10A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE5**, con 13 días de incubación. La textura del micelio aéreo se observa aterciopelada, de consistencia blanda, superficie convexa y color blanco. Transcurrido el tiempo se observa una coloración amarilla en el centro del micelio aéreo y en el micelio profundo. El micelio profundo exhibe formación de anillos concéntricos. El crecimiento es radial con bordes enteros. La tasa de crecimiento es de  $5.13 \pm 0.20 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 10B**).

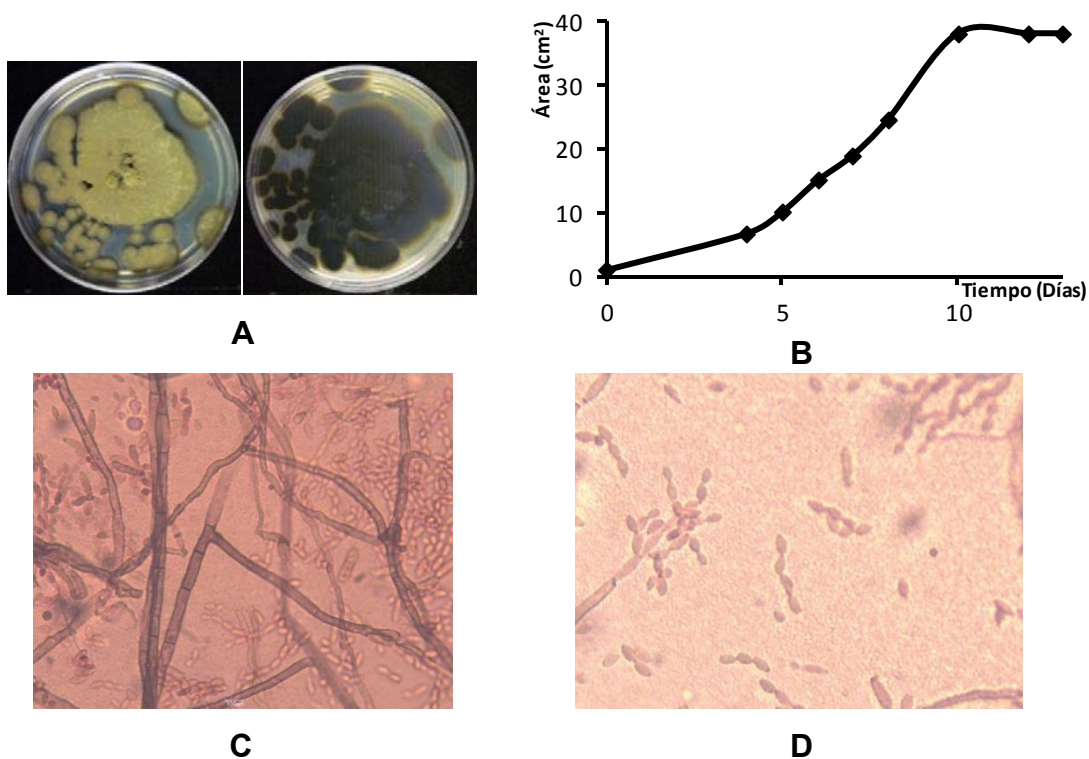


**Figura 10.** Endófito **SspE5**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C** y **D)** Tinción en fresco con fucsina ácida a 40x.

En las **Figuras 10C** y **10D** se observa la presencia de hifas hialinas septadas. El hongo endófito **SspE5** presenta esporas hialinas de forma lenticular. Bajo estas condiciones de cultivo no se observan estructuras de reproducción

### **SspE6**

En la **Figura 11A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE6**, con 10 días de incubación. La textura del micelio aéreo presenta apariencia pulverulenta, de consistencia dura, superficie plana y color verde. Durante la fase estacionaria, presenta exudado hialino en la superficie del micelio y esporulación abundante. El color del micelio profundo es negro con bordes verdes. La tasa de crecimiento es de  $5.20 \pm 0.25 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 11B**).



**Figura 11.** Endófito **SspE6**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C** y **D)** Tinciones en fresco con fucsina ácida a 40x.

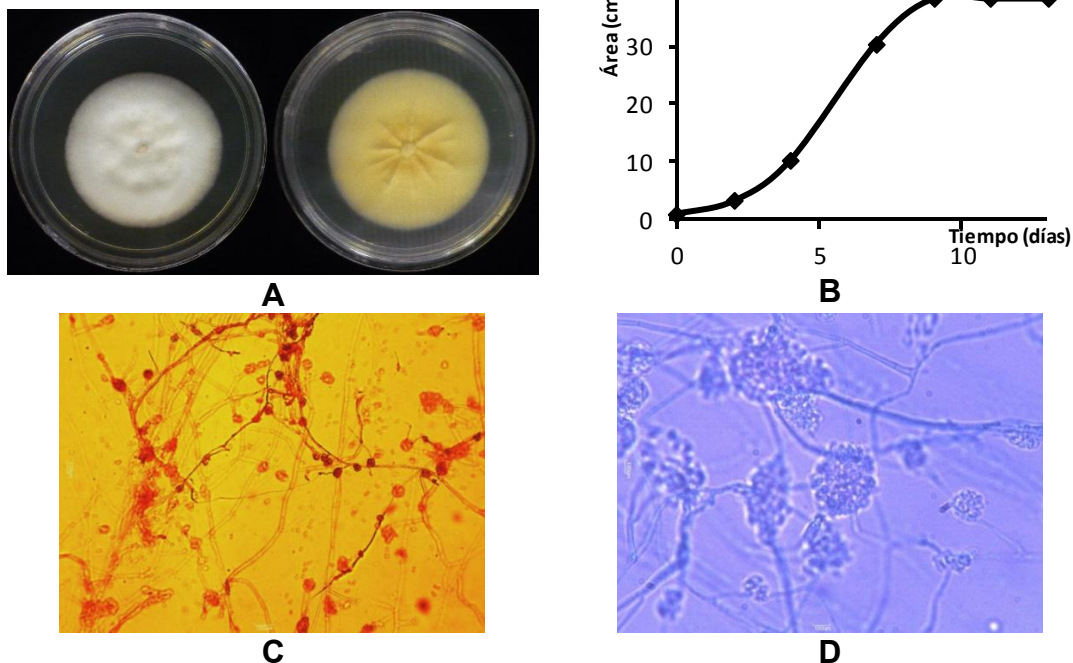


El hongo endófito **SspE6** presenta hifas septadas oscuras (**Figura 11C**). Los cuerpos reproductivos presentes son conidióforos con ramificaciones en el ápice en forma de racimo. En el medio se observan conidios de forma lenticular agrupados en cadena simple o ramificada (**Figura 11D**).

Con base en las características macro y microscópicas del hongo endófito **SspE6** presumiblemente se trata de *Cladosporium* sp. (García, 2005).

### **SspE7**

En la **Figura 12A** se muestra el micelio aéreo y el micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE7**, con 10 días de incubación. La textura del micelio aéreo aparentemente es algodonosa, la consistencia es dura, tiene superficie umbonada y color blanco. El micelio profundo presenta pigmentación amarilla a partir del noveno día, y ocasiona la ruptura del medio de cultivo. El crecimiento es radial con bordes fimbriados (Ulloa, 2006). La tasa de  $5.26 \pm 0.30 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 12B**).

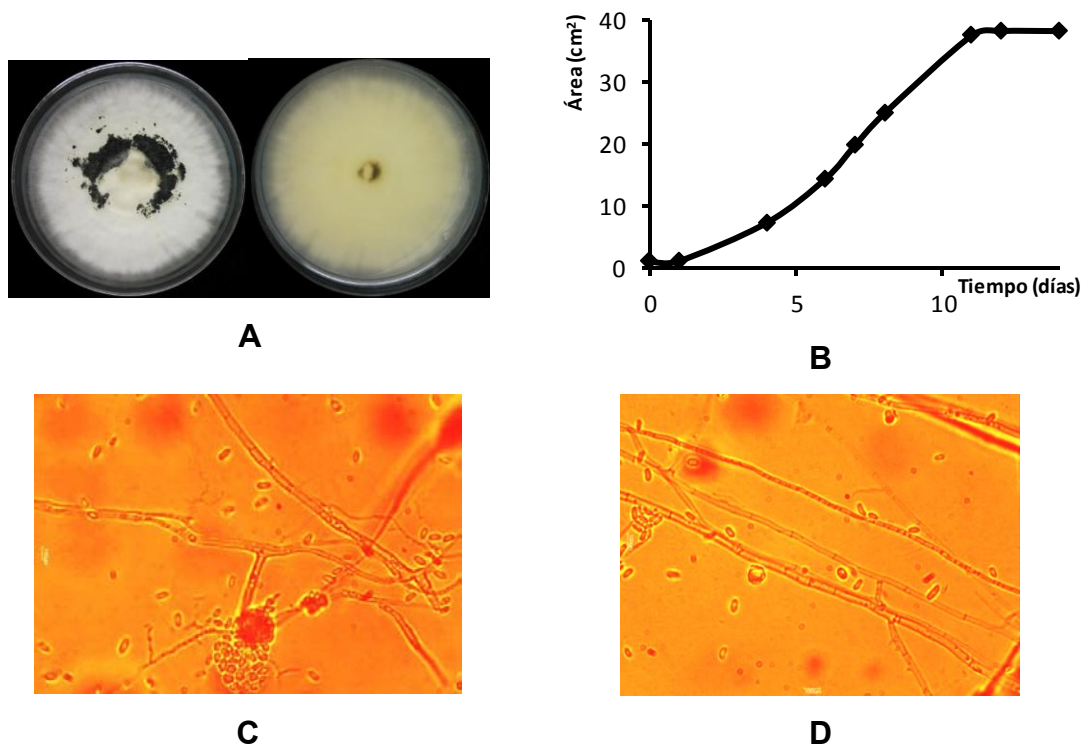


**Figura 12.** Endófito **SspE7**. **A)** Fotografías del micelio aéreo y vegetativo en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C)** Tinción en fresco con rojo congo a 10x. **D)** Tinción en fresco con azul de lactofenol a 40x.

En la **Figura 12C** se observan hifas primarias septadas e hifas secundarias que presentan menor grosor, lo que impide visualizar la presencia de septos. Se observa la presencia de conidióforos y no se observan conidios libres en el medio. Tanto las hifas como los conidios presentan apariencia hialina.

### SspE8

La **Figura 13A** muestra el micelio aéreo y el micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE8**, con 12 días de incubación. La textura del micelio aéreo muestra apariencia algodonosa, presenta consistencia blanda, superficie umbonada y color blanco. Con el transcurso del tiempo el micelio se pigmenta de color negro. El micelio profundo tiene una pigmentación amarilla en los primeros días, posteriormente el centro se torna color negro. Se observa un crecimiento radial con bordes fimbriados (Ulloa, 2006). La tasa de crecimiento es de  $3.80 \pm 0.22$  cm<sup>2</sup>/día (**Figura 13B**).

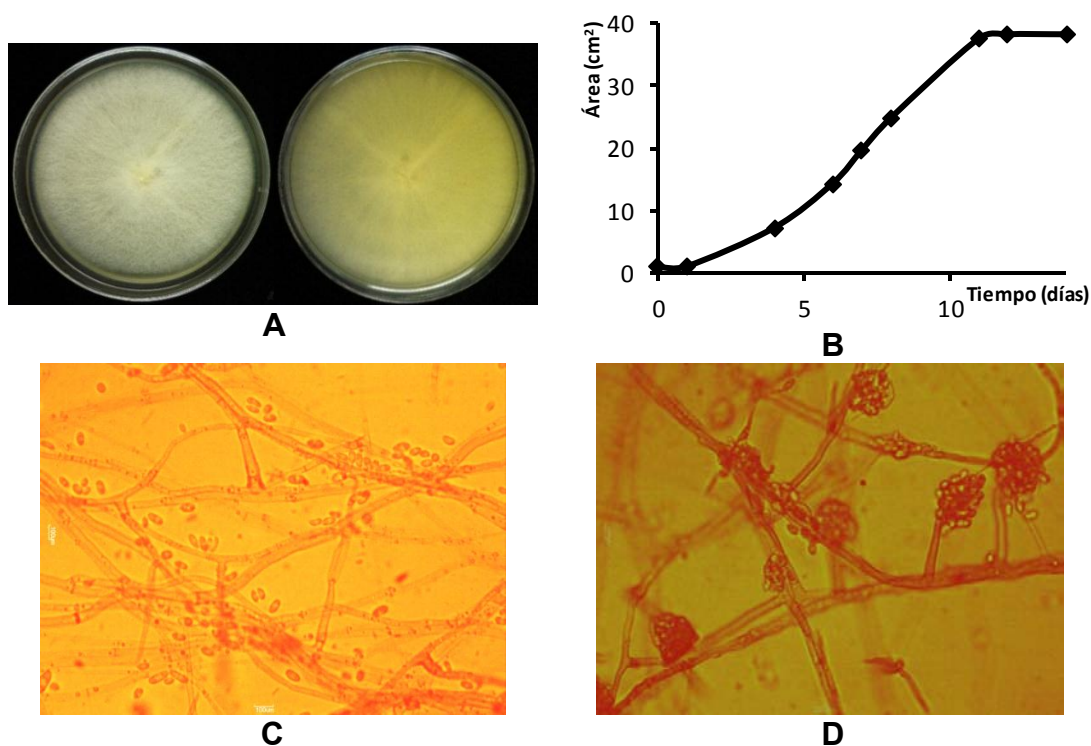


**Figura 13.** Endófito **SspE8**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C** y **D)** Tinciones en fresco con rojo congo a 40x.

Microscópicamente el hongo endófito **SspE8** presenta hifas hialinas septadas. En las **Figuras 13C y D** se observan esporas hialinas binucleadas de forma bacilar. Bajo estas condiciones de cultivo no se observan estructuras de reproducción.

### **SspE9**

En la **Figura 14A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE9**, con 9 días de incubación. La textura del micelio aéreo presenta apariencia vellosa, consistencia blanda, superficie plana y color blanco, los bordes son enteros con crecimiento radial. El micelio profundo presenta pigmentación amarilla con el transcurso de los días. La tasa de crecimiento es de  $3.75 \pm 0.11$  cm<sup>2</sup>/día (**Figura 14B**).

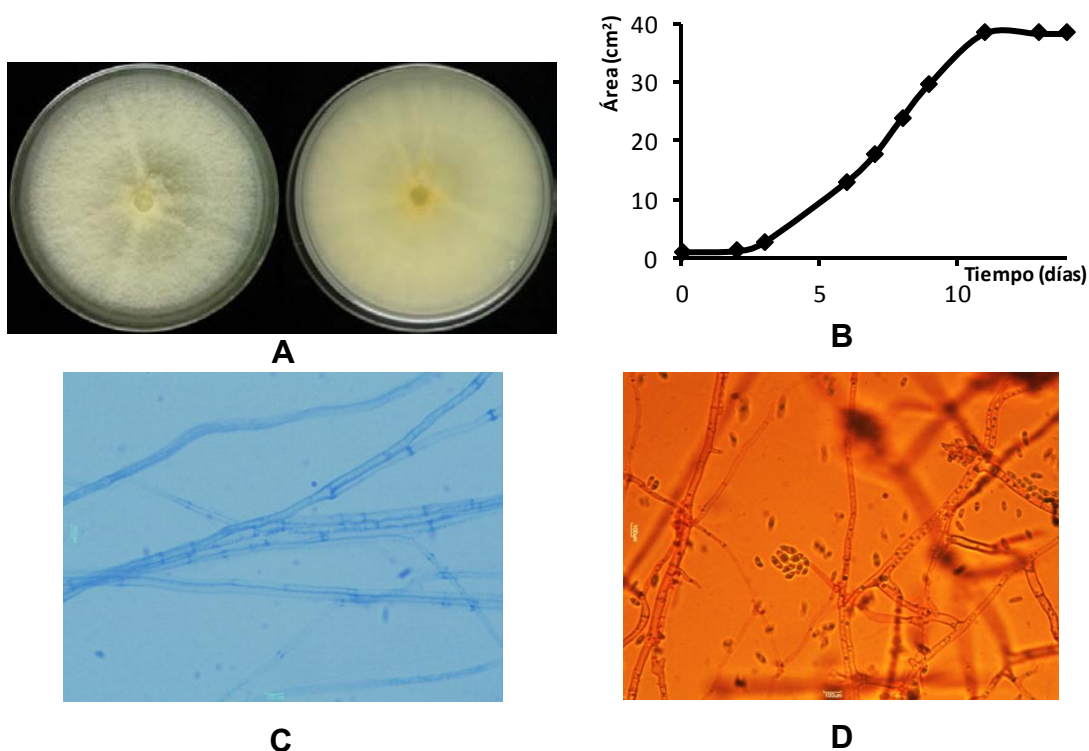


**Figura 14.** Endófito **Ssp1E9**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C y D)** Tinciones en fresco con rojo congo a 40x.

En la **Figura 14C** se observa que el hongo endófito **SspE9** presenta hifas hialinas septadas y conidios hialinos binucleados, de forma lenticular. En la **Figura 14D** se observan esporas aglomeradas sobre las fiáldes de los conidióforos. Bajo estas condiciones de cultivo no se observan estructuras íntegras de reproducción.

### **SspE10**

La **Figura 15A** muestra el micelio aéreo y el micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE10**, con 13 días de incubación. El micelio aéreo presenta textura aterciopelada, consistencia blanda, superficie convexa y color blanco. Con el transcurso de los días el centro del micelio aéreo y del micelio profundo, presentan pigmentación amarilla. La tasa de crecimiento es de  $4.21 \pm 0.18 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 15B**).

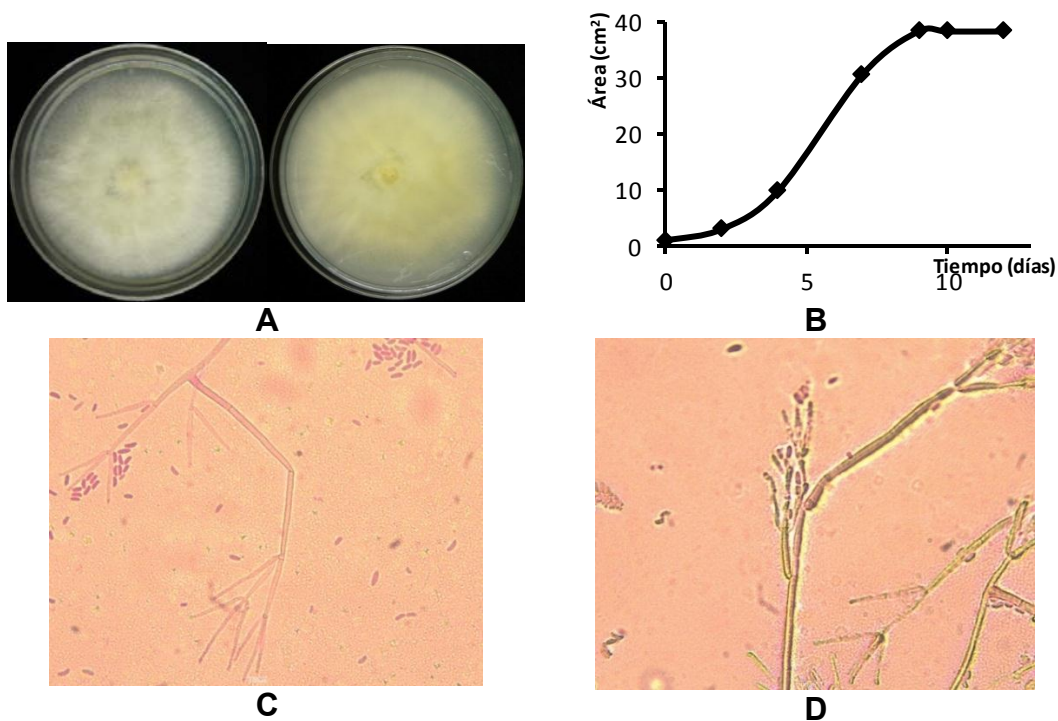


**Figura 15.** Endófito **SspE10**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C)** Tinción en fresco con azul de lactofenol a 40x. **D)** Tinción en fresco con rojo congo a 40x.

El hongo endófito **SspE10** presenta hifas hialinas septadas (**Figura 15C**). En el interior de los septos se observan vacuolas de diversos tamaños (**Figura 15D**). Las esporas presentes son hialinas de forma ovoide. Bajo estas condiciones de cultivo no se observan estructuras de reproducción.

### **SspE11**

En la **Figura 16A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE11**, con 9 días de incubación. El micelio aéreo presenta textura aterciopelada, consistencia blanda, superficie umbonada y color blanco, con pigmentaciones amarillas. El crecimiento es radial con bordes fimbriados. El micelio profundo presenta una pigmentación ligeramente amarilla, con el transcurso de los días. La tasa de crecimiento es de  $5.33 \pm 0.22 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 16B**).

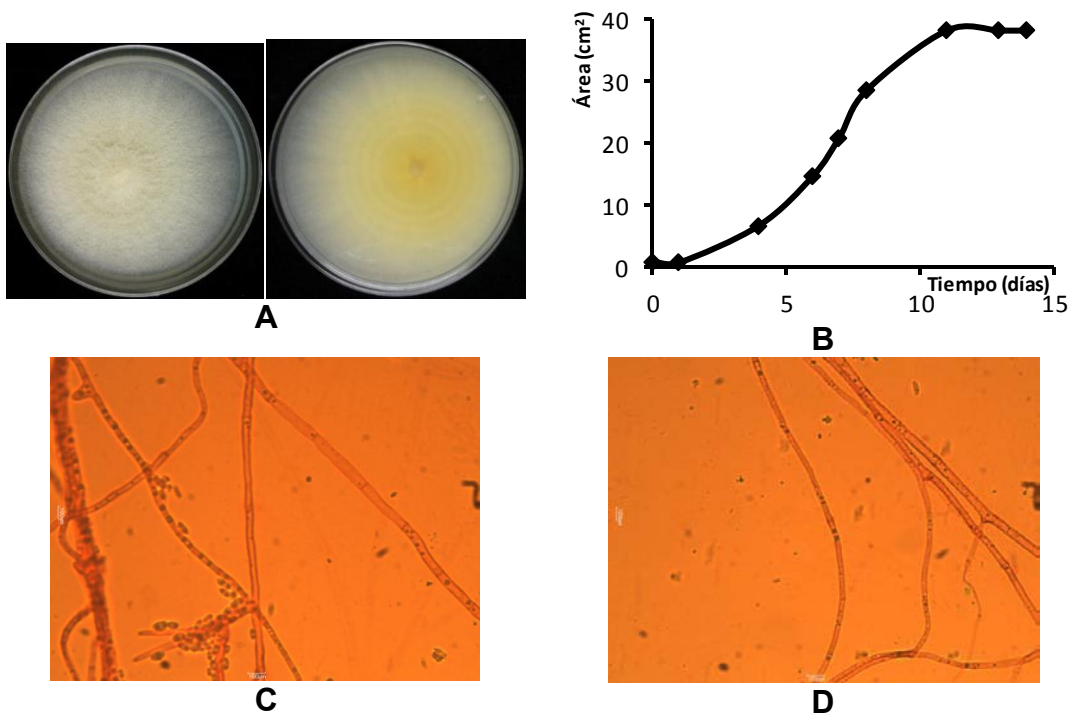


**Figura 16.** Endófito **SspE11**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C** y **D)** Tinciones en fresco con fucsina ácida a 40x.

Microscópicamente el hongo endófito **SspE11** presenta hifas hialinas septadas (**Figura 16C**). Los cuerpos reproductivos presentes en este hongo endófito son los conidióforos, ya que se encontraron restos de ellos, así mismo se observan fiálides divaricadas y conidios de forma bacilar (**Figura 16D**) (Ulloa, 2006).

### **SspE12**

En la **Figura 17A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo endófito **SspE12**, con 12 días de incubación. La textura del micelio aéreo presenta apariencia aterciopelada, consistencia blanda y superficie convexa. Inicialmente el color del micelio aéreo y profundo es blanco, con el transcurso de los días se observa una pigmentación amarilla en ambos. Presenta un crecimiento radial con bordes regulares y formación de anillos concéntricos. La tasa de crecimiento del hongo endófito es de  $3.96 \pm 0.18 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 17B**).



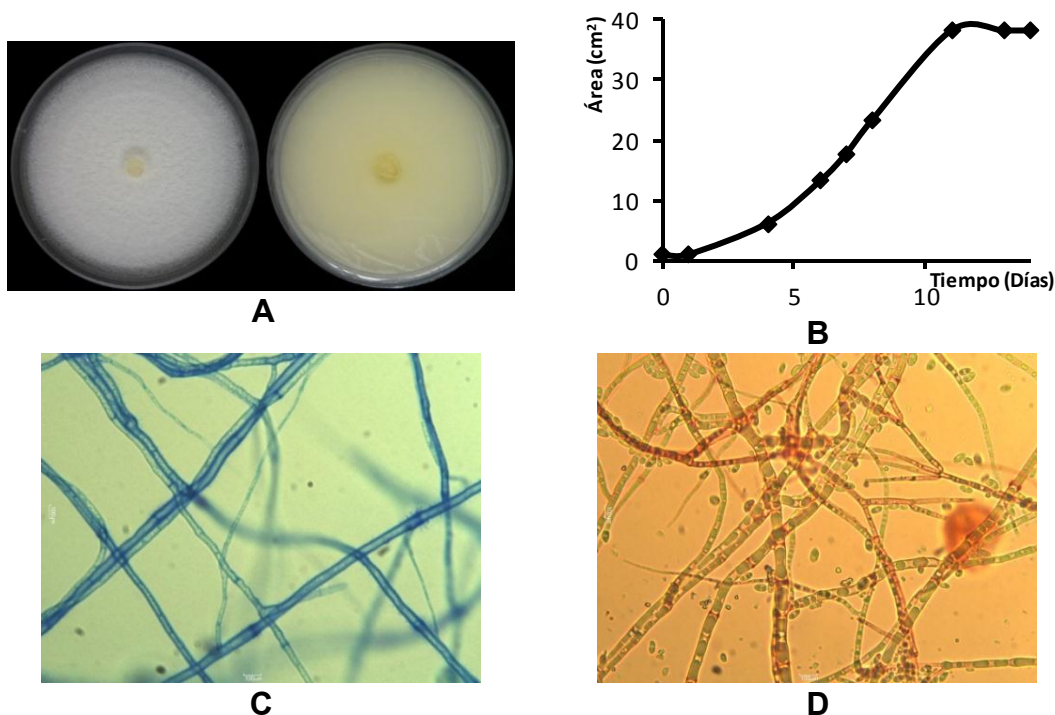
**Figura 17.** Endófito **SspE12**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo endófito. **C** y **D)** Tinciones en fresco con colorante rojo congo a 40x.

El hongo endófito **SspE12** presenta hifas hialinas septadas y esporas hialinas binucleadas. Se observan vacuolas de diversos tamaños dentro de los septos de las hifas. Bajo estas condiciones de cultivo no se logran observar estructuras de reproducción.

## Hongos fitopatógenos

### SspF1

En la **Figura 18A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo fitopatógeno **SspF1**, con 12 días de incubación. La textura del micelio aéreo presenta apariencia aterciopelada, consistencia blanda, y superficie plana. El color del micelio es blanco y el crecimiento es radial con bordes enteros. El micelio profundo presenta una pigmentación color beige uniforme. La tasa de crecimiento es de  $4.64 \pm 0.11$  cm<sup>2</sup>/día (**Figura 18B**).

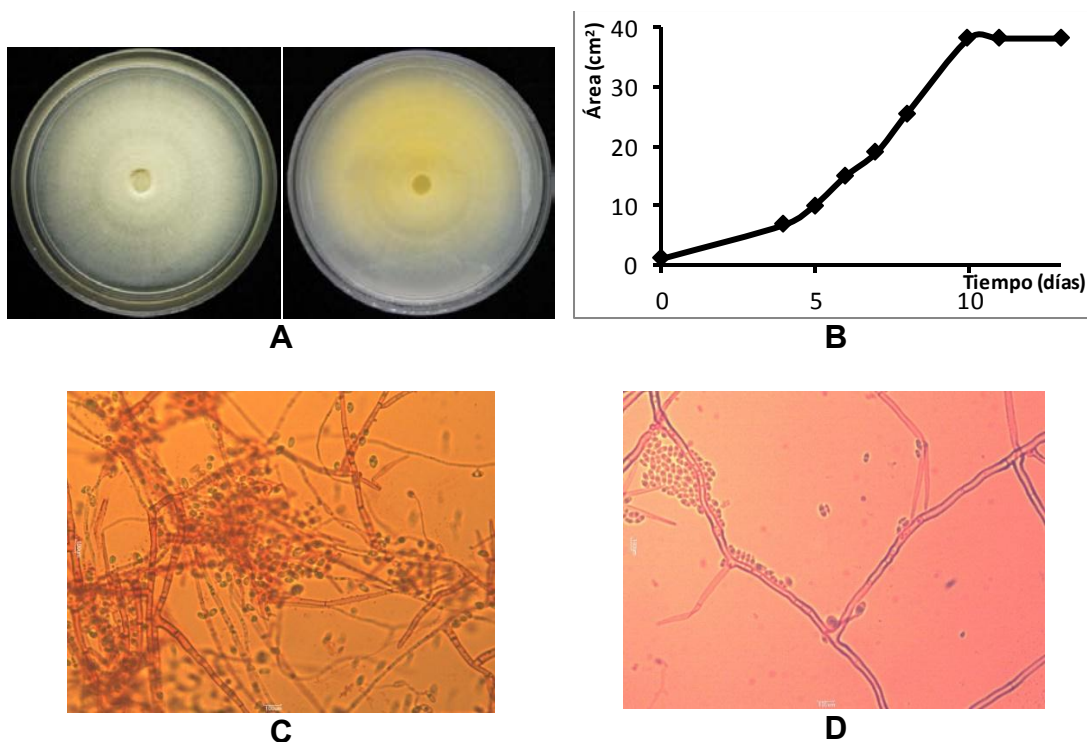


**Figura 18.** Fitopatógeno **SspF1**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. **C)** Tinción en fresco con azul de lactofenol a 40x. **D)** Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x.

El hongo fitopatógeno **SspF1** presenta hifas hialinas septadas, las ramificaciones o hifas secundarias muestran un menor grosor que las primarias (**Figura 18C**). Se observan esporas hialinas libres en el medio. En la **Figura 18D** se observan vacuolas de gran tamaño dentro de los septos de las hifas. Bajo estas condiciones de cultivo no se logran observar estructuras de reproducción.

### **SspF2**

En la **Figura 19A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo fitopatógeno **SspF2**, con 19 días de incubación. La textura del micelio aéreo es aterciopelada, consistencia blanda, superficie plana y color blanco. El micelio profundo presenta una pigmentación amarilla no uniforme. La tasa de crecimiento es de  $5.27 \pm 0.26$   $\text{cm}^2/\text{día}$  (**Figura 19B**).



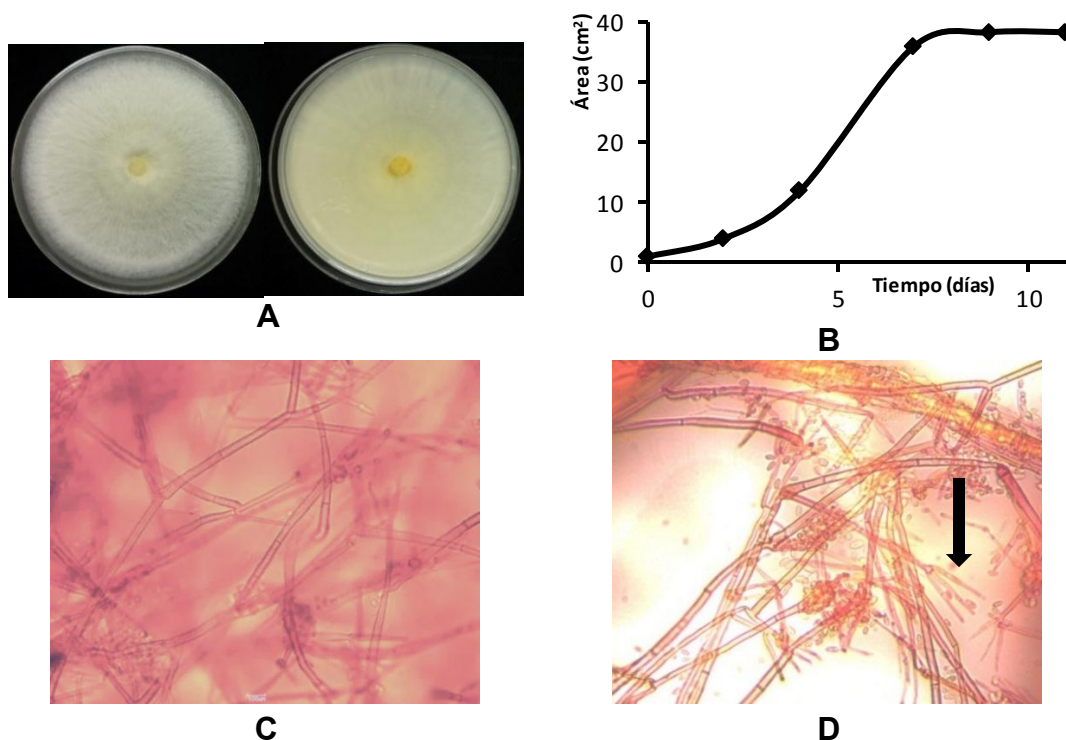
**Figura 19.** Fitopatógeno **SspF2**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. **C)** Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x. **D)** Tinción en fresco con fuscina ácida a 40x.



Microscópicamente el hongo fitopatógeno **SspF2** presenta hifas hialinas septadas, se observan pequeñas vacuolas en el interior de los septos de las hifas. A la izquierda de la **Figura 19C** se observa grupo de hifas fasciculadas (Ulloa, 2006). Bajo estas condiciones de cultivo no se observan estructuras de reproducción.

### **SspF3**

La **Figura 20A** muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo fitopatógeno **SspF3**, con 10 días de incubación. La textura del micelio aéreo es de apariencia plumosa, consistencia blanda, superficie convexa y color blanco. El micelio profundo se observa ligeramente amarillo. El crecimiento es radial con bordes enteros. La tasa de crecimiento es de  $6.50 \pm 0.10 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 20B**).

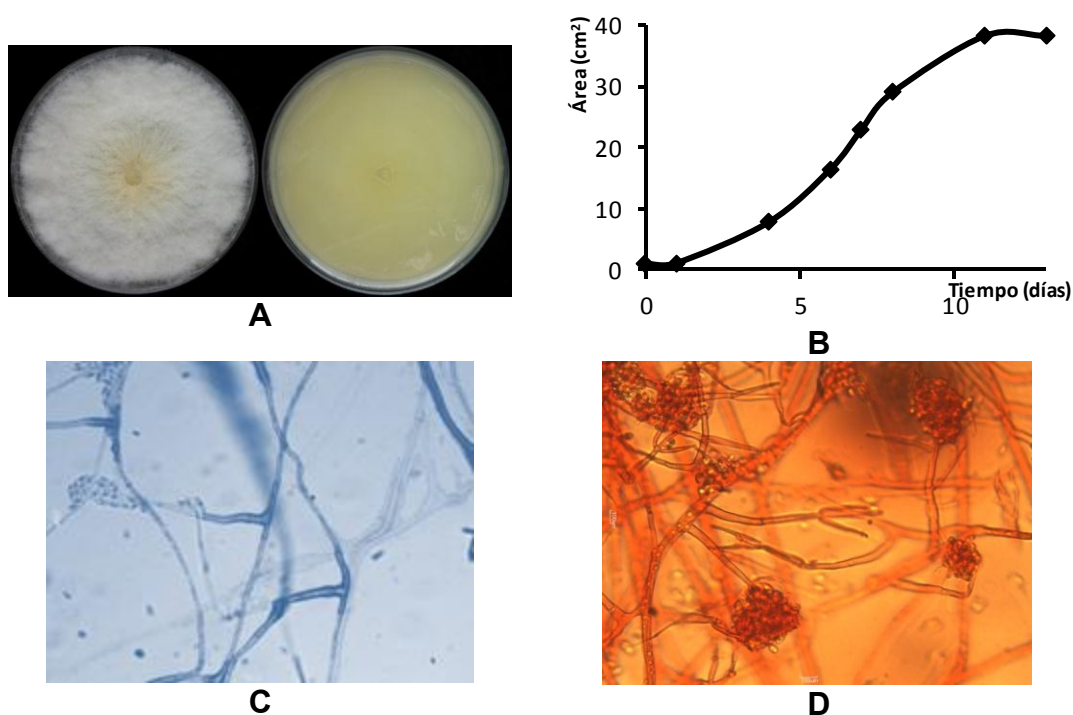


**Figura 20.** Fitopatógeno **SspF3**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. **C)** Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x. **D)** Tinción en fresco con fuscina ácida a 40x.

El hongo fitopatógeno **SspF3** presenta hifas hialinas septadas, en la **Figura 20D** se observan ramas bifurcadas de los conidióforos. Los conidios presentes en el medio son hialinos de forma lenticular (Ulloa, 2006). Bajo estas condiciones de cultivo no se observan estructuras íntegras de reproducción.

### **SspF4**

La **Figura 21A** muestra el micelio aéreo y el micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo fitopatógeno **SspF4**, con 12 días de incubación. El micelio aéreo presenta apariencia algodonosa, consistencia blanda, superficie convexa y color blanco, con pigmentación ligeramente amarilla al centro. El micelio profundo presenta una pigmentación amarilla homogénea. El crecimiento es radial con una tasa de crecimiento de  $4.44 \pm 0.19 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 21B**).

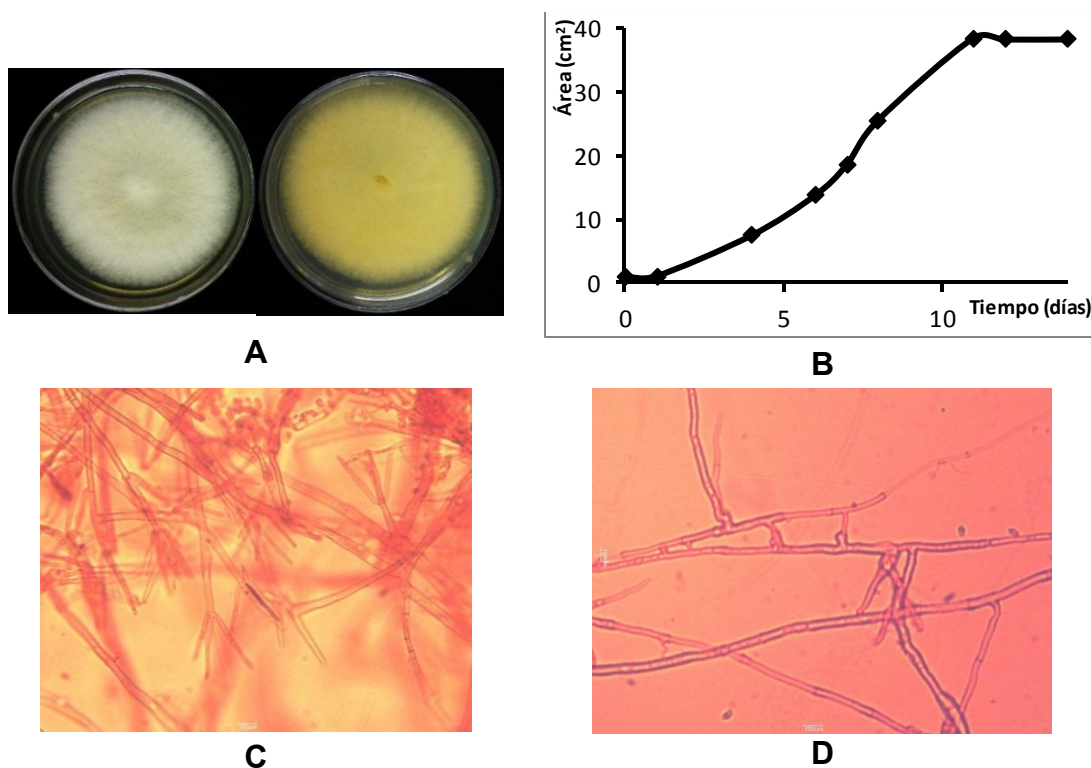


**Figura 21.** Fitopatógeno **SspF4**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. **C)** Tinción en fresco con azul de lactofenol a 40x **D)** Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x.

El hongo fitopatógeno **SspF4** presenta hifas hialinas septadas (Figura 21C). Los conidios presentes en el medio son uninucleados de forma oblonga. En la **Figura 21D** se observan restos de conidióforos como fiálides bifurcadas, y también se pueden observar algunos conidióforos íntegros.

### SspF5

En la **Figura 22A** se muestra el micelio aéreo y el micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo fitopatógeno **SspF5**, con 11 días de incubación. La textura del micelio es de apariencia algodonosa, consistencia blanda, superficie convexa y el color de micelio es blanco. El crecimiento es radial con bordes fimbriados. El micelio profundo se torna amarillo a partir del sexto día de incubación. La tasa de crecimiento es de  $7.01 \pm 0.28 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 22B**).

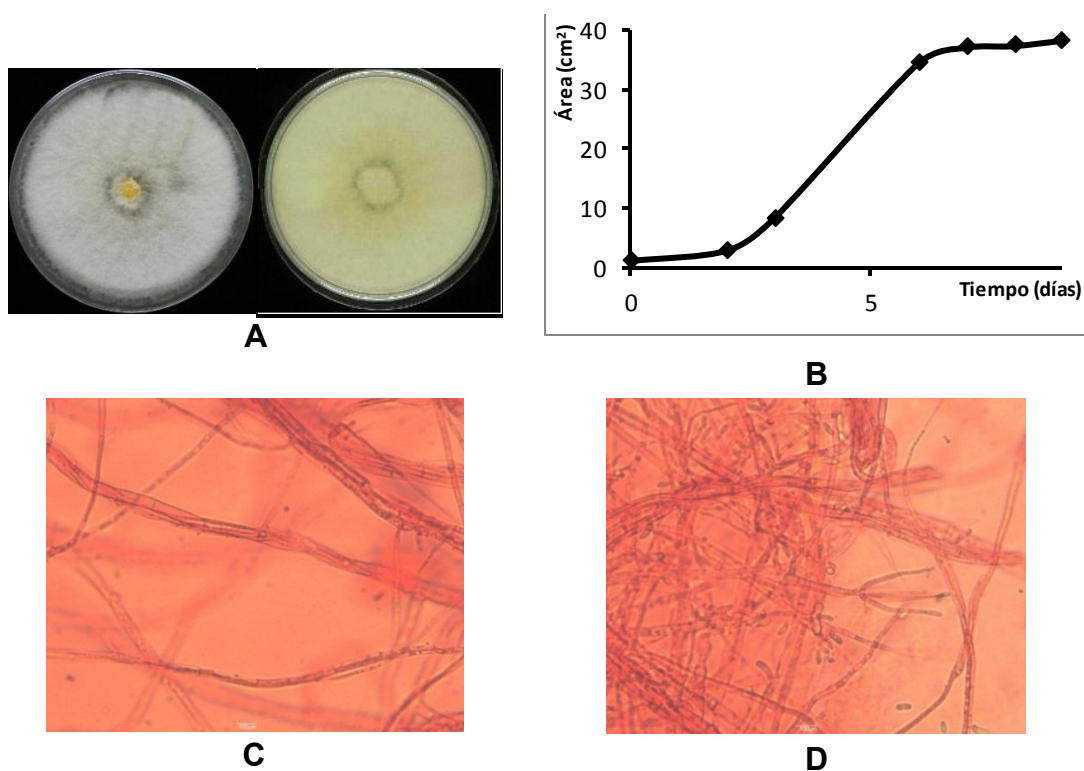


**Figura 22.** Fitopatógeno **SspF5**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. **C)** Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x. **D)** Tinción en fresco con fucsina ácida a 40x.

El hongo fitopatógono **SspF5** presenta hifas hialinas septadas. En la Figura 22C se observan fiálides bifurcadas de conidióforos. Los conidios presentes en el medio son hialinos de forma oblonga (**Figura 22D**). Bajo estas condiciones de cultivo no se observan estructuras íntegras de reproducción.

### **SspF6**

En la **Figura 23A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en medio PDA del hongo fitopatógono **SspF6**, con 13 días de incubación. La textura del micelio aéreo es de apariencia aterciopelada, consistencia blanda y superficie convexa. El color del micelio aéreo es blanco y el del micelio profundo se torna color beige con el transcurso del tiempo. El crecimiento es radial con bordes algodonosos. La tasa de crecimiento es de  $7.35 \pm 0.23 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 23B**).

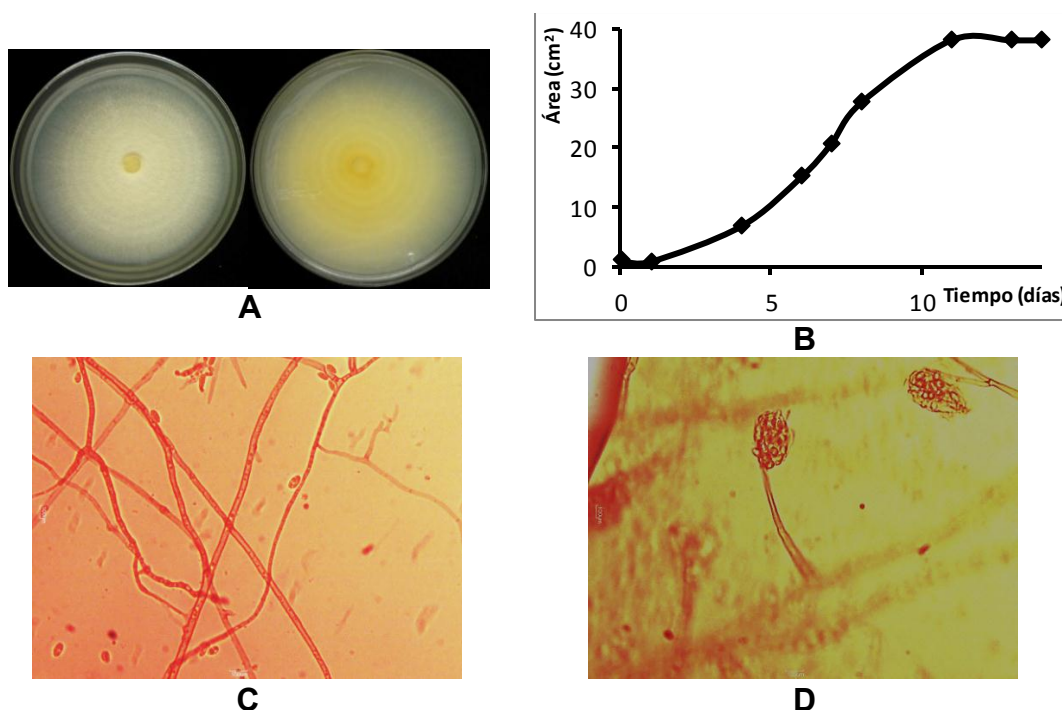


**Figura 23.** Fitopatógono **SspF6**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo fitopatógono. **C** y **D)** Tinciones en fresco con colorante rojo congo a 40x.

El hongo fitopatógeno **SspF6** presenta hifas hialinas septadas y fiálides bifurcadas de conidióforos (**Figura 23C**). Se presentan pequeñas vacuolas en el interior de los septos de las hifas. Los conidios libres en el medio son hialinos binucleados de forma bacilar (Ulloa, 2006). Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras íntegras de reproducción.

### **SspF7**

En la **Figura 24A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en PDA del hongo fitopatógeno **SspF7**, con 13 días de incubación. El micelio aéreo presenta textura aterciopelada, consistencia blanda, superficie plana. El color del micelio aéreo es blanco, se observa la formación de anillos concéntricos. En el micelio profundo se observa una pigmentación amarilla con la formación de anillos concéntricos. El crecimiento es radial, con bordes farináceos (Ulloa, 2006). La tasa de crecimiento es de  $3.91 \pm 0.09 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 24B**).

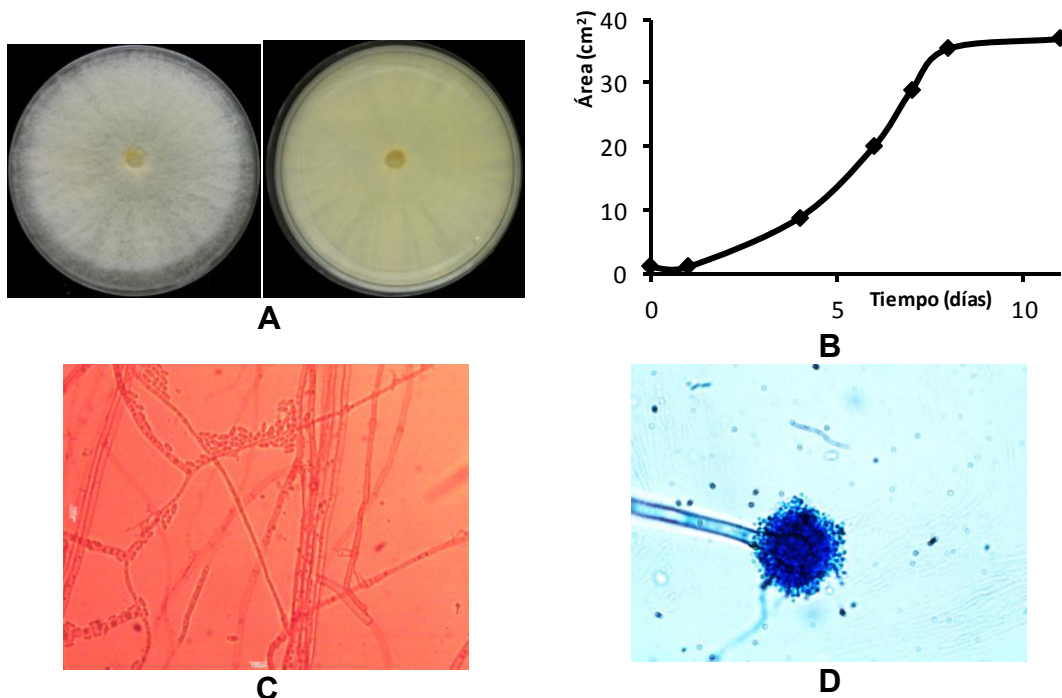


**Figura 24.** Fitopatógeno **SspF7**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo fitopatógeno. **C** y **D)** Tinciones en fresco con colorante rojo congo a 40x.

Microscópicamente el hongo fitopatógono **SspF7** presenta hifas hialinas septadas. Los conidios presentes en el medio son hialinos de forma oblonga (**Figura 24C**). En la **Figura 24D** se observan algunos conidios aglomerados sobre fiálides de conidióforos. Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras íntegras de reproducción.

### **SspF8**

En la **Figura 25A** se muestra el micelio aéreo y el reverso del micelio profundo de un cultivo en medio PDA del hongo fitopatógono **SspF8**, con 13 días de incubación. La textura del micelio aéreo presenta apariencia vellosa, consistencia blanda, superficie convexa y color blanco. Con el transcurso del tiempo el micelio aéreo y el micelio profundo se tornan de color amarillo. El crecimiento es radial con bordes vellosos. La tasa de crecimiento es de  $6.74 \pm 0.19 \text{ cm}^2/\text{día}$  (**Figura 25B**).

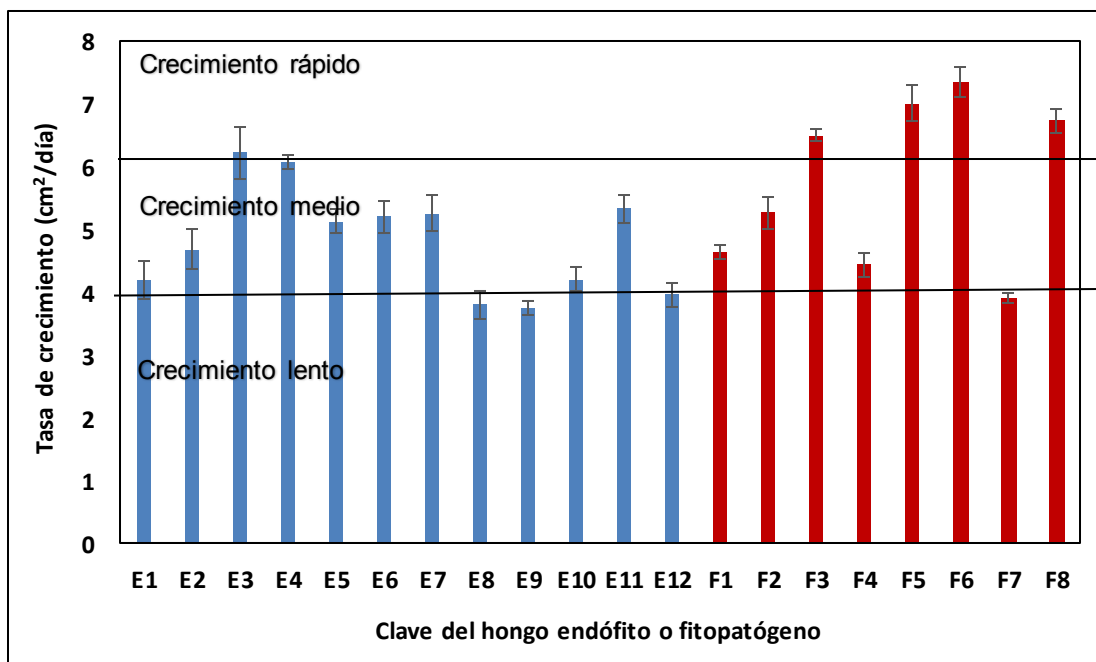


**Figura 25.** Fitopatógono **SspF8**. **A)** Fotografías del micelio aéreo (izquierda) y micelio profundo (derecha) en PDA. **B)** Curva de crecimiento del hongo fitopatógono. **C)** Tinción en fresco con colorante rojo congo a 40x. **D)** Tinción en fresco con colorante azul de lactofenol. a 40x.

El hongo fitopatógono **SspF8** presenta hifas hialinas septadas, se observan vacuolas en algunos septos. Los conidios presentes en el medio son de apariencia hialina y son binucleados. (**Figura 25C**). En la **Figura 20D** se presenta una cabezuela conidial biseriada, en la cual se observan varias estructuras: columela, vesícula de la cabeza, y conidios (Ulloa, 2006).

Las características microscópicas observadas muestran que el hongo fitopatógono **SspF8** podría pertenecer al género *Aspergillus* (Ulloa, 2006).

Por último, en la **Figura 26** se comparan los valores de las tasas de crecimiento de los 12 hongos endófitos y de los 8 hongos fitopatógenos con el objetivo de establecer arbitrariamente una clasificación. Los hongos puros procedentes de *Salvia* sp. se clasificaron en tres grupos con base en su tasa de crecimiento: crecimiento lento (<4.0 cm<sup>2</sup>/día), crecimiento medio (4.1- 6.0 cm<sup>2</sup>/día) y de crecimiento rápido (>6.1-cm<sup>2</sup>/día).



**Figura 26.** Clasificación de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp. con base en su tasa de crecimiento.

Macroscópicamente los hongos endófitos y fitopatógenos puros, procedentes de aislamientos de *Salvia* sp., crecen con las mismas características y con la misma tasa de crecimiento establecida anteriormente, siempre y cuando se siembren en el mismo medio de cultivo y bajo las condiciones del presente estudio. Establecidas las tasas de crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógenos pueden utilizarse para la determinación del potencial antagónico frente otros microorganismos. (Sánchez-Fernandez, 2010; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008) Sin embargo en este proyecto se estableció el potencial alelopático o actividad biológica directamente a nivel de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, así como a nivel de fracciones orgánicas primarias.

Finalmente se establece que el promedio de las tasas de crecimiento de los hongos endófitos es de 4.81 cm<sup>2</sup>/día, clasificándolos en la categoría de crecimiento medio. Y el promedio de las tasas de crecimiento de los hongos fitopatógenos es de 5.70 cm<sup>2</sup>/día, por tanto, los hongos fitopatógenos procedentes de *Salvia* sp. presentan un crecimiento más rápido que los hongos endófitos de la misma hospedera.

Los hongos endófitos y fitopatógenos que exhiben mayor tasa de crecimiento son: SspF6, SspF5, SspF8, SspF3 y SspE3, por lo que se clasificaran en la categoría de crecimiento rápido.

Microscópicamente todos los hongos endófitos y fitopatógenos exhiben características similares: esporas uni o binucleadas en su mayoría de forma lenticular, los cuerpos fructíferos encontrados son conidiosporos y esporangios. Todos los hongos en estudio presentan hifas septadas, característica que los clasifican como hongos superiores (Ulloa, 2006).



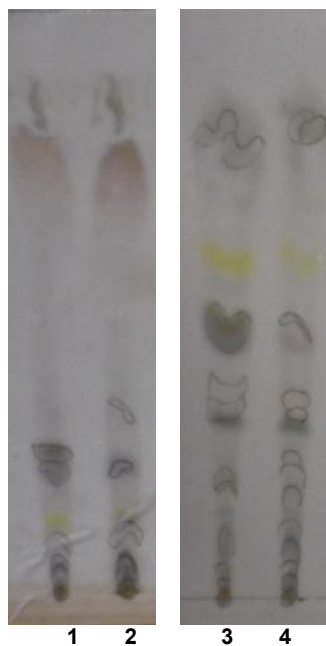
### 3. Obtención de cultivos en pequeña escala de los hongos de *Salvia* sp.

Una vez que se determinaron las características macro y microscópicas, así como la pureza de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp., se obtuvieron los cultivos en pequeña escala.

Los cultivos de estos microorganismos se llevaron a cabo en condiciones estáticas utilizando arroz como medio de cultivo. Este medio de crecimiento proporciona altos rendimientos en la producción de los metabolitos secundarios biosintetizados por hongos, en comparación con otros medios de cultivo como PDA o caldo papa dextrosa (CPD) (Aly, *et al.*, 2008; Armendáriz-Guillén, 2013; Sandoval-Espinosa, 2014), y en consecuencia permite obtener extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio en cantidades apropiadas, para llevar a cabo los bioensayos necesarios para determinar la actividad biológica de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos.

Los cultivos fueron incubados durante un periodo de 30 días a temperatura ambiente, con un fotoperiodo luz fluorescente-obscuridad 12:12 h. Finalizado el periodo de incubación, se procedió a la obtención de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, mediante un proceso de maceración exhaustivo empleando como disolventes de extracción diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y acetato de etilo (AcOEt) (Armendáriz-Guillén, 2013; Sandoval-Espinosa, 2014).

Posteriormente, se analizaron los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos obtenidos para cada uno de los hongos cultivados, empleando cromatografía en capa fina (CCF). En todos los casos los perfiles cromatográficos de ambos extractos y sus características físicas son muy similares, por lo que se reunieron antes de determinar su actividad biológica (fitotóxica y antifúngica). A manera de ejemplo, en la **Figura 27** se muestra el análisis por CCF del extracto orgánico del hongo fitopatógeno SspF4.



**Figura 27.** Cromatografía en capa fina comparativa de los extractos orgánicos del hongo fitopatógeno SspF4. 1) Extracto obtenido con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . 2) Extracto obtenido con AcOEt. Sistema de elución para 1 y 2:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  100%. 3) Extracto obtenido con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . 4) Extracto obtenido con AcOEt. Sistema de elución para 3 y 4:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  98:2.

En el **Cuadro 3** se muestran los rendimientos totales de extracción para los 12 hongos endófitos y los 8 hongos fitopatógenos cultivados en pequeña escala. Los mayores rendimientos se obtuvieron a partir de los hongos fitopatógenos SspF3, SspF5, y SspF6, estos microorganismos se encuentran clasificados en el grupo de los hongos de crecimiento rápido (**Figura 26**). Este resultado probablemente es debido a la relación entre el tamaño de micelio y el metabolismo secundario existente; ya que es de esperarse una mayor producción de compuestos procedentes del metabolismo secundario con una mayor área de micelio.

**Cuadro 3.** Rendimientos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp. cultivados en pequeña escala en medio arroz.

<b>Clave hongo</b>	<b>Rendimiento total (mg extracto/30g arroz)</b>
<b>Endófitos</b>	
SspE1	1,344.1
SspE2	701.8
SspE3	1,002.1
SspE4	555.6
SspE5	821.8
SspE6	1,074.6
SspE7	365.3
SspE8	409.9
SspE9	312.1
SspE10	828.9
SspE11	749.7
SspE12	1,056.5
<b>Fitopatógenos</b>	
SspF1	525.4
SspF2	624.1
SspF3	1,751.7
SspF4	486.9
SspF5	3,046.8
SspF6	1,823.5
SspF7	387.2
SspF8	815.2

#### **4. Efecto fitotóxico de extractos totales de los hongos de *Salvia* sp.**

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los cultivos en pequeña escala se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y el

crecimiento de la raíz de dos especies de plantas prueba; *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*, mediante el método dilución en agar.

En los **Cuadros 4 y 5** se muestran los porcentajes de inhibición provocados por los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los hongos de *Salvia* sp. sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba utilizadas. En general, los extractos orgánicos obtenidos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos (**Cuadro 4**) y fitopatógenos (**Cuadro 5**) muestran mayor efecto fitotóxico sobre el crecimiento de la raíz de *S. lycopersicum* que sobre *A. hypochondriacus*, al igual que el herbicida comercial Glifosato®, empleado como control positivo.

Los extractos orgánicos obtenidos de los hongos SspE1, SspE3, SspE4, SspF1, SspF2, SspF3 y SspF7 muestran mayor actividad fitotóxica sobre *S. lycopersicum*, que el herbicida comercial Glifosato®, a la misma concentración de prueba (100 µg/mL).

**Cuadro 4.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (100 µg/mL) de los hongos endófitos de *Salvia* sp. sobre el crecimiento de la raíz de dos plantas prueba.

Clave endófito	%Inhibición del crecimiento de la raíz	
	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
SspE1	73.5 ± 2.4*	78.0 ± 1.3*
SspE2	35.3 ± 1.8*	52.7 ± 5.0*
SspE3	76.9 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*
SspE4	87.8 ± 1.8*	100.0 ± 0.0*
SspE5	56.2 ± 4.3*	41.0 ± 4.3
SspE6	45.5 ± 4.1*	47.0 ± 3.8
SspE7	20.2 ± 4.4	28.4 ± 2.9
SspE8	19.6 ± 3.2	35.3 ± 3.0

**Cuadro 4.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (100 µg/mL) de los hongos endófitos de *Salvia* sp. sobre el crecimiento de la raíz de dos plantas prueba. (Continuación).

Clave endófito	%Inhibición del crecimiento de la raíz	
	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
SspE9	-21.3 ± 3.2	33.1 ± 4.5
SspE10	57.1 ± 4.5*	40.8 ± 4.3
SspE11	39.7 ± 4.6*	44.9 ± 3.5*
SspE12	30.9 ± 3.0	42.7 ± 4.5
<b>Control</b>		
Glifosato 100 µg/mL	32.4 ± 1.1	60.0 ± 2.5*
Glifosato 250 µg/mL	42.2 ± 3.9*	65.1 ± 3.2*

\* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05). Los porcentajes representan el promedio de cuatro repeticiones.

**Cuadro 5.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (100 µg/mL) de los hongos fitopatógenos de *Salvia* sp. sobre el crecimiento de la raíz de dos plantas prueba.

Clave fitopatógeno	%Inhibición del crecimiento de la raíz	
	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
SspF1	<b>69.1 ± 3.2*</b>	<b>76.4 ± 2.0*</b>
SspF2	<b>50.1 ± 3.7*</b>	<b>71.0 ± 4.2*</b>
SspF3	<b>48.2 ± 3.9*</b>	<b>79.0 ± 1.70*</b>
SspF4	37.1 ± 2.2*	55.8 ± 4.2*
SspF5	31.2 ± 2.1	52.2 ± 3.6*
SspF6	27.5 ± 3.8	27.5 ± 3.8
SspF7	<b>61.3 ± 3.1*</b>	<b>60.0 ± 4.0*</b>
SspF8	39.5 ± 4.1*	50.2 ± 4.9*
<b>Control</b>		
Glifosato 100 µg/mL	32.4 ± 1.1	60.0 ± 2.5*
Glifosato 250µg/mL	42.2 ± 3.9*	65.1 ± 3.2*

\* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05). Los porcentajes representan el promedio de cuatro repeticiones.

Los mayores porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba, son provocados por los metabolitos presentes en los extractos orgánicos derivados de los cultivos de los hongos endófitos. Estos resultados concuerdan con la investigación de Schulz y colaboradores (1999), en la cual se comprueba que los metabolitos secundarios de hongos endófitos presentan mayor actividad herbicida que los metabolitos procedentes de los hongos fitopatógenos y que de los hongos obtenidos del suelo.

El efecto inhibitorio provocado por los extractos de los hongos endófitos SspE1, SspE3 y SspE4 es mayor al 70% sobre ambas plantas prueba. Mostrando una actividad inhibitoria superior a la mostrada por el herbicida comercial Glifosato®, a 100 y 250 µg/mL.

En el caso de los extractos obtenidos del medio de cultivo y micelio de los hongos fitopatógenos de *Salvia* sp., en general, también se obtuvieron efectos inhibitorios significativos mayores al herbicida comercial para ambas plantas prueba (**Cuadro 5**). Los extractos procedentes de los hongos fitopatógenos con mayor actividad fitotóxica fueron el SspF1 y el SspF7 con un porcentaje de inhibición mayor al 60% sobre ambas plantas.

Con respecto al proceso de germinación de las semillas de prueba, los extractos de los hongos endófitos SspE1, SspE3 y SspE4 son los únicos que presentaron un efecto inhibitorio significativo del 25%, 87.5% y 37.5%, respectivamente, sobre la germinación de *A. hypochondriacus*. La germinación de las semillas de *S. lycopersicum*, se ve afectada en un 35%, 90% y 75%, respectivamente.

## 5. Efecto antifúngico de extractos totales de los hongos de *Salvia* sp.

El potencial antifúngico de los extractos orgánicos obtenidos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp., se estableció cuantitativamente mediante el estudio del efecto de los mismos sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura: los fungales u hongos verdaderos *F. oxysporum*, *A. alternata*, los fungoides u oomicetos *Pythium aphanidermatum* y *Phytophthora capsici*.

Cabe mencionar que en el caso de los hongos verdaderos se empleó el fungicida comercial Carbendacim®, y para los oomicetos el antiomiceto Metalaxil® (DEAQ, 2011). En la agricultura moderna es muy común que estos agroquímicos se empleen sin distinción, provocando que la plaga no sea contrarrestada. Los resultados presentados en los **Cuadros 6 y 7** y en las **Figuras 31-34** muestran claramente que el Metalaxil® no tiene actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento de los hongos verdaderos, y que el Carbendacim® no es efectivo sobre el crecimiento de los oomicetos. Por lo que no deben de ser usados indiscriminadamente para combatir hongos y oomicetos, ya que su actividad es selectiva.

En los **Cuadro 6 y 7** se muestran los porcentajes de inhibición producidos por los extractos orgánicos de los hongos endófitos y fitopatógenos, sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba. Con excepción de los extractos de los endófitos SspE1, SspE3, SspE8 y SspE12 que muestran un porcentaje de inhibición estadísticamente significativo sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *A. alternata*, exhibiendo una actividad antifúngica superior al control positivo, el fungicida comercial Carbendacim®, evaluado a la misma concentración de prueba (250 µg/mL), ninguno de los extractos orgánicos derivados de los cultivos de

los hongos endófitos tienen actividad antifúngica significativa sobre este fitopatógeno con importancia económica en la agricultura.

Dentro del grupo de los fitopatógenos de *Salvia* sp., el extracto del hongo SspF5 muestra un potencial selectivo sobre el crecimiento de los oomicetos en estudio (*Pythium aphanidermatum* y *Phytophthora capsici*) mostrando porcentajes de inhibición estadísticamente significativos, mayores al 40%. Por otra parte, el extracto del hongo SspF6 también muestra importante actividad sobre los oomicetos, afectando en mayor grado el crecimiento de *Pythium aphanidermatum*. El porcentaje de inhibición provocado por el extracto del hongo SspF6 sobre *A. alternata*, supera en más del 20% a la inhibición mostrada por el fungicida comercial evaluado a la misma concentración.

**Cuadro 6.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (250 µg/mL) de los hongos endófitos de *Salvia* sp. sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura.

Endófito	%Inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos de importancia económica			
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
SspE1	-3.94 ± 0.0	<b>29.6 ± 1.19*</b>	-3.86 ± 1.15	17.4 ± 2.04
SspE2	5.5 ± 1.8	6.51 ± 1.19	-2.3 ± 1.1	0.52 ± 0
SspE3	27.97 ± 1.5	<b>29.9 ± 1.23*</b>	14.85 ± 4.05	14.5 ± 2.88
SspE4	9.35 ± 1.62	2.68 ± 1.19	3.29 ± 1.95	6.39 ± 1.42
SspE5	14.0 ± 2.1	4.02 ± 1.15	4.86 ± 1.86	0.52 ± 0.0
SspE6	8.12 ± 1.5	1.15 ± 0.0	-4.07 ± 1.12	0.52 ± 0.0
SspE7	5.51 ± 1.78	8.62 ± 1.06	1.7 ± 1.0	0.52 ± 0.0
SspE8	9.68 ± 1.99	<b>36.8 ± 1.26*</b>	23.78 ± 1.86	8.81 ± 2.39



**Cuadro 6.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (250 µg/mL) de los hongos endófitos de *Salvia* sp. sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura (continuación).

Endófito	%Inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos de importancia económica			
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
SspE9	-0.2 ± 0.0	5.16 ± 1.12	1.7 ± 1.49	0.0 ± 0.0
SspE10	5.71 ± 1.84	6.51 ± 1.19	-5.12 ± 0	0.52 ± 0.0
SspE11	0.74 ± 0.0	7.06 ± 1.23	-5.12 ± 0	0.52 ± 0.0
SspE12	3.99 ± 0.98	<b>46.4 ± 1.7*</b>	12.26 ± 1.51	7.41 ± 1.16
<b>Controles</b>				
Metalaxil® 250 µg/mL	3.82 ± 1.68	15.90 ± 4.48	100.0 ± 0.0*	71.32 ± 0.50*
Carbendacim® 250 µg/mL	100 ± 0.0*	20.52 ± 2.45	17.5 ± 0.15	15.00 ± 2.80

\* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05). Los porcentajes representan el promedio de cuatro repeticiones.

**Cuadro 7.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (250 µg/mL) de los hongos fitopatógenos de *Salvia* sp. sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en la agricultura.

Fitopatógeno	%Inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos de importancia económica			
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
SspF1	4.88 ± 1.16	7.63 ± 1.97	1.39 ± 0.94	3.98 ± 1.23
SspF2	2.4 ± 1.3	3.61 ± 0.0	4.20 ± 1.00	2.47 ± 1.7
SspF3	5.39 ± 3.92	4.22 ± 0.0	1.22 ± 0.82	1.65 ± 1.16
SspF4	-6.72 ± 1.95	3.61 ± 0.0	1.56 ± 0.9	5.35 ± 1.52
SspF5	3.5 ± 1.34	7.63 ± 1.97	<b>53.5 ± 3.69*</b>	<b>41.8 ± 1.7*</b>
SspF6	-3.4 ± 1.8	<b>41.5 ± 1.82*</b>	<b>42.6 ± 3.58*</b>	27.6 ± 1.76
SspF7	6.52 ± 1.05	23.5 ± 1.70	0.9 ± 0.0	9.14 ± 1.8
SspF8	5.65 ± 1.95	9.24 ± 1.97	1.17 ± 0.76	1.65 ± 1.16
<b>Controles</b>				
Metalaxil® 250 µg/mL	3.82 ± 1.68	15.90 ± 4.48	100.0 ± 0.0*	71.32 ± 0.50*
Carbendacim® 250 µg/mL	100 ± 0.0*	20.52 ± 2.45	17.5 ± 0.15	15.00 ± 2.80

\* Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05). Los porcentajes representan el promedio de cuatro repeticiones.

Con base en los resultados obtenidos en la determinación del potencial fitotóxico y antifúngico de los hongos de *Salvia* sp., los hongos endófitos SspE1, SspE3 y SspE4, y los hongos fitopatógenos SspF1 y SspF7 corresponden a los microorganismos con mayor potencial fitotóxico, debido a que el efecto de inhibición sobre el de crecimiento de la raíz de las dos plantas prueba fue superior al 60%. Los hongos endófitos SspE8, SspE12 constituyen posibles candidatos productores de metabolitos secundarios con actividad antifúngica específica contra *A. alternata*, con una actividad inhibitoria superior al 35%. El fitopatógeno SspF5, es candidato potencial para la obtención de metabolitos secundarios con actividad selectiva sobre oomicetos. Asimismo, el hongo fitopatógeno SspF6 es posible candidato de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria sobre *A. alternata* y *Phyitium aphanidermatum*, sin mostrar selectividad sobre alguno de los dos grupos.

Cabe destacar que la mayoría de los extractos fúngicos presentan dos fases, una oleosa y la otra sólida. Con la finalidad de disminuir la complejidad metabólica de los extractos de los hongos de *Salvia* sp. y considerando que la fase oleosa es la más abundante, se procedió a realizar su fraccionamiento primario empleando un proceso de reparto y se determinó de nuevo su actividad biológica, con el propósito de mejorar la actividad biológica demostrada por los extractos totales, en particular del potencial antifúngico.

## **6. Fraccionamiento primario**

Los extractos orgánicos obtenidos por medio de maceración exhaustiva a partir de los cultivos en pequeña escala de los hongos aislados de *Salvia* sp., se fraccionaron mediante un proceso de reparto entre hexano (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>) y metanol (CH<sub>3</sub>OH). En el **Cuadro 8**, se muestran los rendimientos obtenidos.

Todas las fracciones hexánicas presentan un mayor rendimiento con respecto a las fracciones metanólicas.

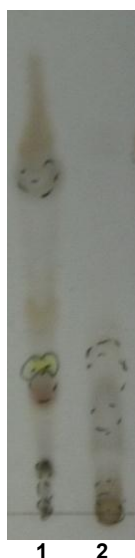
**Cuadro 8.** Rendimientos de las fracciones primarias obtenidas de los extractos totales procedentes de hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp.

Clave	Fracción hexánica (mg extracto/ 30g arroz)	% Fracción hexánica	Fracción metanólica (mg extracto/ 30g arroz)	% Fracción metanólica	Extracto total (mg extracto/ 30g arroz)
<b>Endófito</b>					
SspE1	1,208.40	90.2	<b>130.4</b>	9.8	1,338.80
SspE2	572.7	90.3	61.7	9.7	634.40
SspE3	659.2	77.5	<b>191.8</b>	22.5	851.00
SspE4	399.2	72.6	<b>151</b>	27.4	550.20
SspE5	474.7	65.3	<b>252</b>	34.7	726.70
SspE6	774	84.4	<b>142.7</b>	15.6	916.70
SspE7	225.6	81.4	51.6	18.6	277.20
SspE8	233.5	74.4	80.2	25.6	313.70
SspE9	191	84.9	34.0	15.1	225.00
SspE10	607.8	88.16	81.6	11.84	689.40
SspE11	553	92.8	43	7.2	596.00
SspE12	811.7	90.9	81.4	9.1	893.10
<b>Fitopatógeno</b>					
SspF1	436.2	90.7	44.8	9.3	481.00
SspF2	522	84.9	92.4	15.1	614.40
SspF3	1,192.40	74.4	<b>411.5</b>	25.6	1,603.90
SspF4	307.3	80.7	73.4	19.3	380.70
SspF5	1,806.8	82.8	<b>375.3</b>	17.2	2,182.10
SspF6	1,572.9	93.8	<b>103.4</b>	6.2	1,676.30
SspF7	202	76.6	61.6	23.4	263.60
SspF8	670.2	95.2	33.7	4.8	703.90

Los mayores rendimientos para las fracciones metanólicas se obtuvieron a partir de los extractos procedentes de los hongos: SspE1, SspE3, SspE4, SspE5, SspE6 SspF3, SspF5 y SspF6, con un rendimiento superior a 100 mg de extracto por cada 30 g arroz (6-34%). Como es de esperarse, con

excepción del endófito SspE4, estos son algunos de los hongos que mostraron los mayores rendimientos de extracto orgánico total (**Cuadro 3**).

Por otra parte, se compararon los perfiles cromatográficos de las fracciones primarias obtenidas mediante CCF. A manera de ejemplo, en la **Figura 28** se muestra el perfil cromatográfico de las fracciones primarias del extracto orgánico obtenido del hongo endófito SspE8, observándose que los perfiles químicos son diferentes, indicando la distinta naturaleza en composición química de la fracción hexánica y metanólica, por lo que se espera que la actividad biológica de cada fracción sea distinta.



**Figura 28.** Cromatografía en capa fina comparativa de las fracciones primarias del hongo endófito SspE8. 1) Fracción primaria obtenida con  $C_6H_{12}$ . 2) Fracción primaria obtenida con  $CH_3OH$ . Sistema de elución:  $CH_2Cl_2-CH_3OH$ ; 98:2.

A pesar de que, en general, las fracciones hexánicas de los hongos en estudio mostraron una alta similitud en el análisis cromatográfico por CCF con la fracción hexánica derivada del extracto control del medio arroz, se decidió evaluar su actividad biológica considerando la posibilidad de la presencia de algún metabolito secundario bioactivo de naturaleza poco polar producido por los hongos, que se encuentre enmascarado debido a la abundancia de los compuestos extraídos del medio arroz.

Una vez que se obtuvieron las fracciones primarias se determinó cuantitativamente su potencial fitotóxico y antifúngico, empleando las plantas y microorganismos de prueba, antes mencionados.

## **7. Efecto fitotóxico de las fracciones primarias de los extractos de los hongos de *Salvia* sp.**

En las **Figuras 29** y **30** se muestran los porcentajes de inhibición provocados por los extractos totales y las fracciones primarias obtenidas a partir de los cultivos de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp., respectivamente, sobre el crecimiento de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*.

En la mayoría de los casos se muestra que la fracción primaria metanólica presenta mayor actividad biológica que el extracto total y que la fracción primaria hexánica. Con excepción de los extractos de los endófitos SspE5 y SspE6 sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondryacus*, y del extracto del fitopatógeno SspF1 sobre el crecimiento de *S. lycopersicum*, y del extracto del endófito SspE3 sobre ambas semillas de prueba, que mostraron mayor efecto inhibitorio en presencia del extracto total. Debido a un probable efecto de sinergismo entre metabolitos secundarios polares y los poco polares (Cavallé-Oller, 2011).

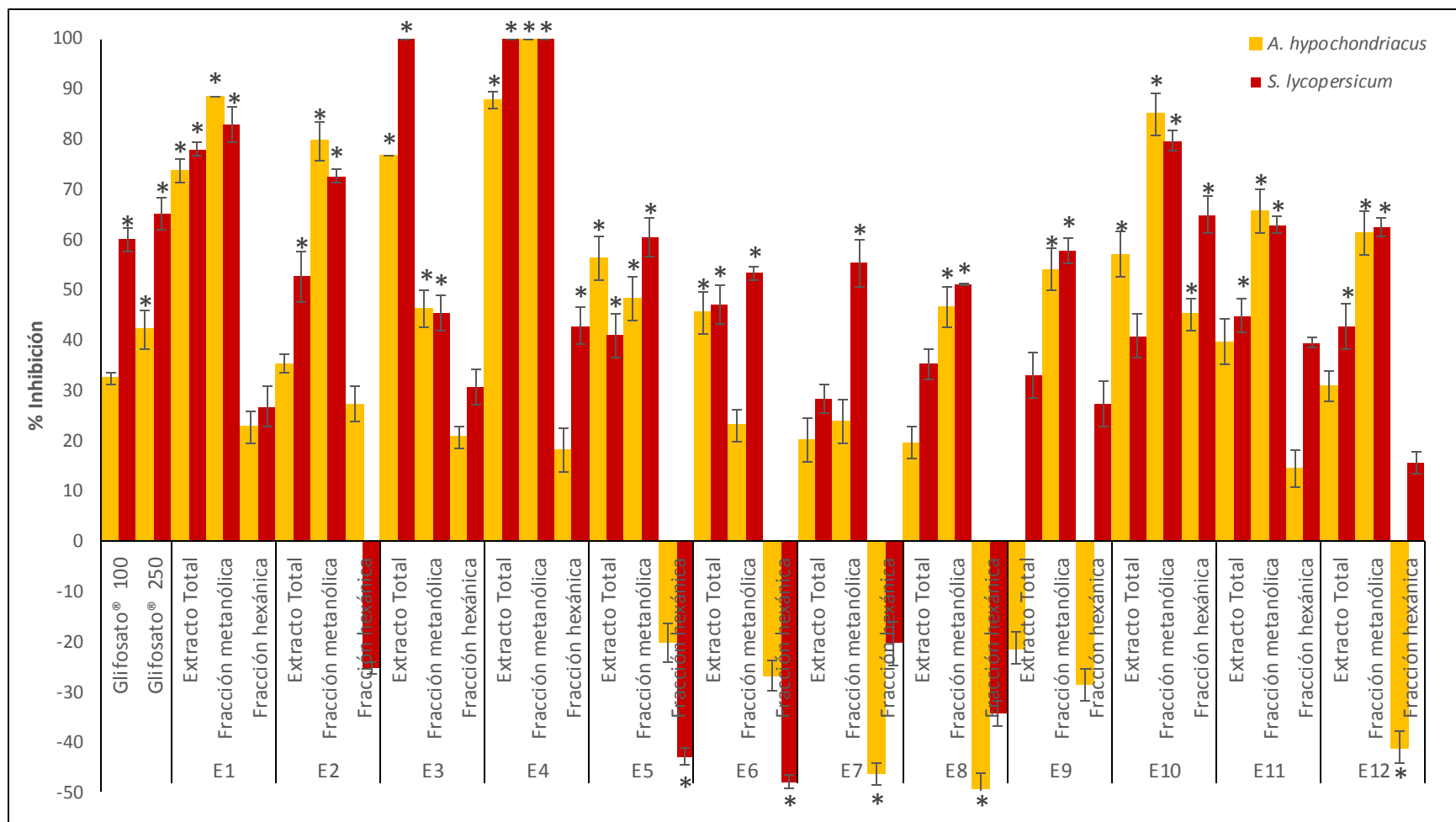
Con respecto a las fracciones hexánicas, con excepción de las procedentes del cultivo de los hongos SspE10 y SspF3, en las que la actividad fitotóxica es mayor a la actividad demostrada por el extracto total sobre el crecimiento de la raíz de *S. lycopersicum* y *A. hypocondriacus*, respectivamente. El efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las plantas de prueba provocado es cercano al 50%, sin embargo, su actividad fitotóxica no supera a la demostrada por la fracción metanólica. En estos dos casos, se pone en

evidencia la existencia de metabolitos secundarios poco polares con actividad biológica. Por otra parte, los metabolitos secundarios presentes en el extracto total de hongos SspE10 y SspF3, también muestran un posible efecto de antagonismo, ya que al fraccionarlos tanto los compuestos polares como los pocos polares presentan mayor actividad biológica (Cavallé-Oller, 2011).

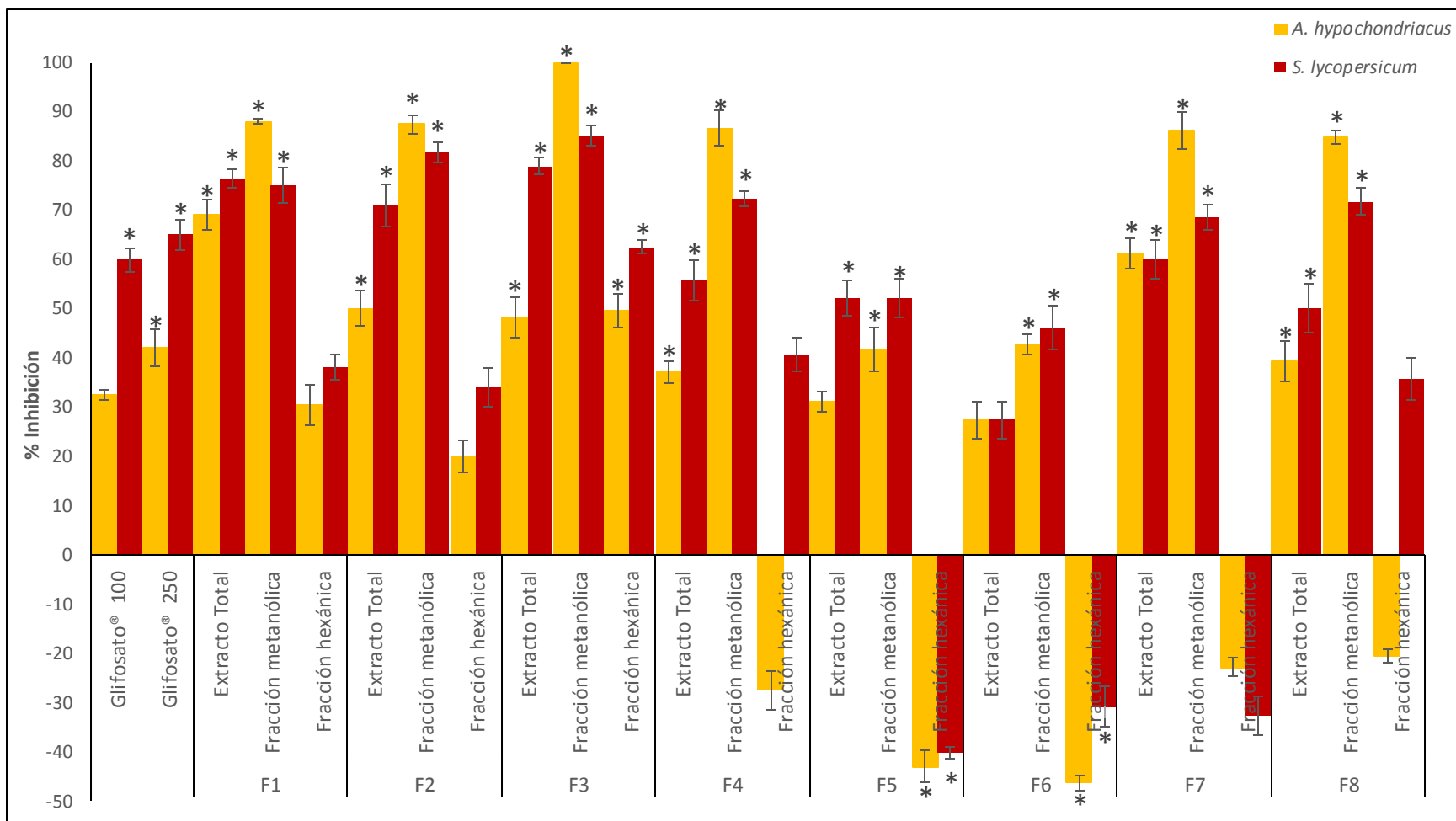
Por otra parte, doce de las veinte fracciones hexánicas evaluadas muestran un efecto estimulante sobre el crecimiento de la raíz de alguna o de ambas plantas pruebas. Esto puede ser la consecuencia de que el disolvente de extracción arrastró componentes nutritivos poco polares del arroz como son los ácidos grasos, que puedan beneficiar el crecimiento de la planta prueba.

En general las fracciones metanólicas evaluadas, poseen mayor actividad que el herbicida comercial Glifosato®, utilizado como control positivo, a la concentración de prueba de 100 µg/mL. Las fracciones metanólicas que presentan una actividad inhibitoria superior al 80% sobre ambas plantas de pruebas son las derivadas de los hongos SspE1, SspE4, SspF2 y SspF3, mostrando además mayor actividad de fitotóxica que el herbicida control a la misma concentración.

Con base en la actividad fitotóxica demostrada por los extractos totales de los hongos de *Salvia* sp., se proponen como candidatos productores de metabolitos secundarios con potencial herbicida a los hongos endófitos SspE1, SspE4, SspE10 y a los fitopatógenos SspF1, SspF3 y SspF7, ya que sus extractos totales muestran los mayores porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de las dos plantas de prueba, el cual incrementa en la fracción metanólica.



**Figura 29.** Efecto fitotóxico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos endófitos de *Salvia* sp., sobre el crecimiento de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*. (\*) Valores estadísticamente significativos, ANOVA ( $p < 0.05$ ). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.



**Figura 30.** Efecto fitotóxico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos fitopatógenos de *Salvia* sp., sobre el crecimiento de la semilla de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*. (\*) Valores estadísticamente significativos, ANOVA ( $p < 0.05$ ). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.



## 8. Efecto antifúngico de las fracciones primarias de los extractos de los hongos de *Salvia* sp.

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico de las fracciones primarias, se llevó a cabo evaluando su efecto sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba. En las **Figuras 31** y **32** se muestra el efecto antifúngico de los extractos totales y de las fracciones primarias obtenidas de los cultivos de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp., respectivamente, sobre el crecimiento radial hongos verdaderos *F. oxysporum* y *A. alternata*.

Con excepción de los extractos totales de los hongos SspE3, SspE7, SspF6 y SspF7 que muestran mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de ambos hongos de prueba y de los extractos de los hongos SspE5, SspE8 y SspF3 sobre el crecimiento de *F. oxysporum*, de nueva cuenta, en la mayoría de los casos la fracción primaria metanólica presenta mayor actividad biológica que el extracto total y que la fracción primaria hexánica.

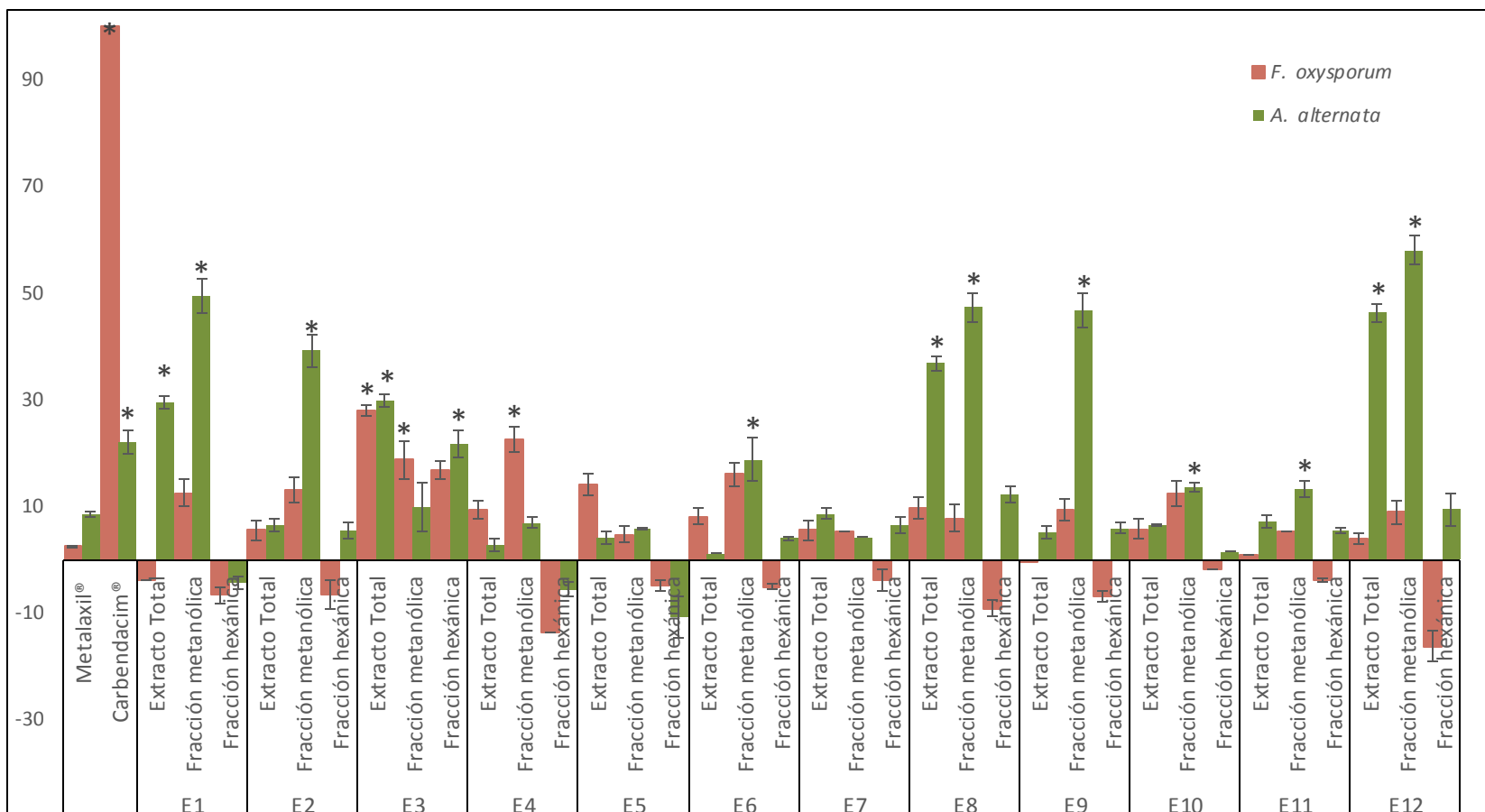
En general, se observa que *F. oxysporum* es la especie más resistente a los tratamientos. *A. alternata*, es inhibida significativamente y en mayor grado por la presencia de los extractos totales de los hongos SspE8, SspE12 y SspF6 y por las fracciones metanólicas de los hongos SspE1 y SspE12.

La fracción metanólica del endófito SspE4 y el extracto total del SspE3 presentan un efecto de inhibición significativa superior al 20%, sobre *F. oxysporum*. Sin embargo, no se encontraron extractos totales o las fracciones primarias que superen la inhibición demostrada por el fungicida comercial control a la misma concentración de prueba.

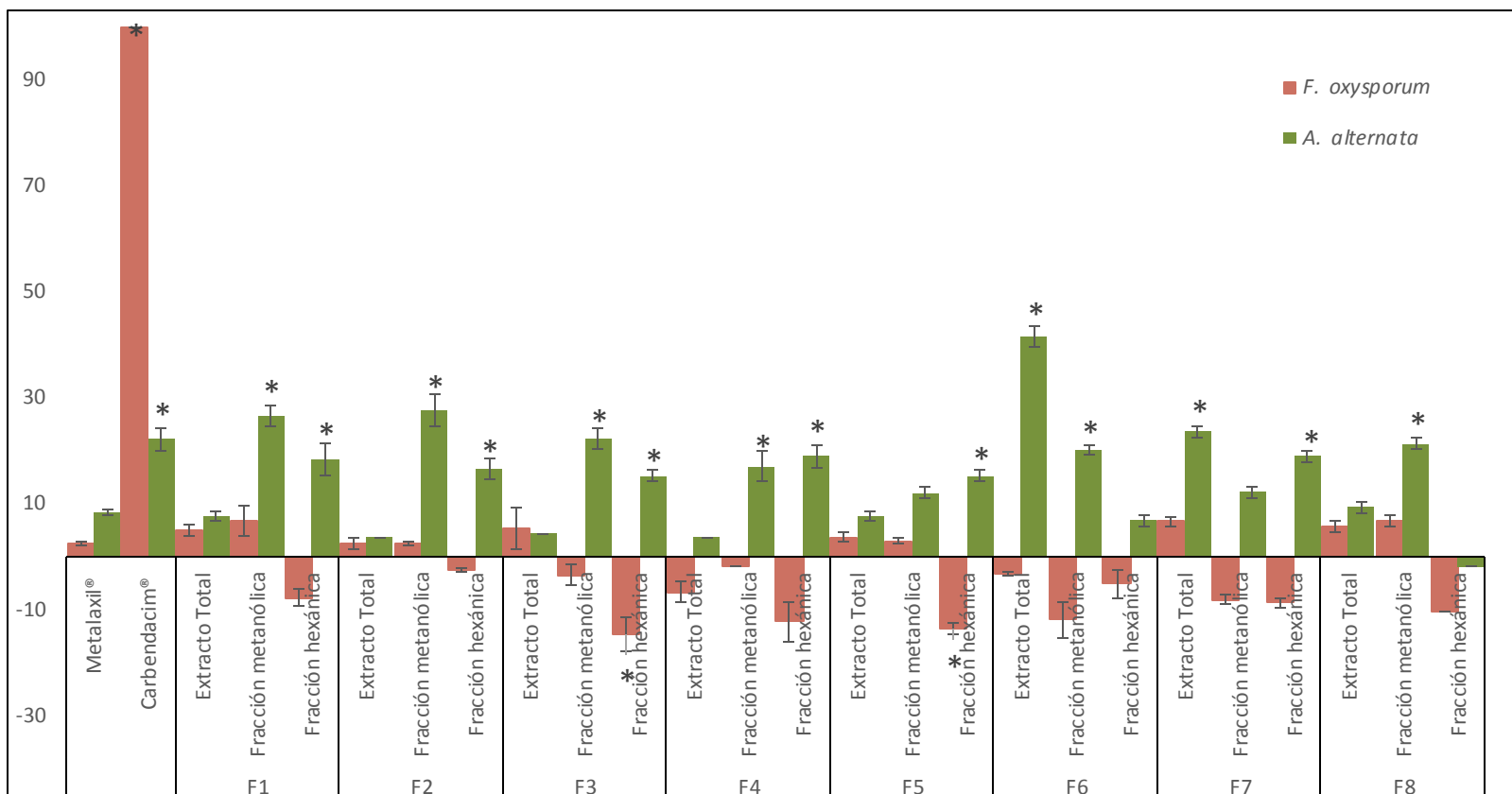
Con respecto a las fracciones hexánicas, con excepción de la derivada del cultivo del hongo SspE3, todas ellas provocan un efecto estimulante sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*. Las fracciones de los hongos SspE1,

SspE4 y SspE5 son las únicas que provocan efecto estimulante sobre de crecimiento de *A. alternata*.

Los extractos orgánicos totales y las fracciones metanólicas de los hongos SspE1, SspE8, SspE12 y SspF6 constituyen una fuente prometedora para la obtención de metabolitos secundarios con potencial antifúngico específico sobre *A. alternata*, así como las fracciones metanólicas de SspE2 (39.2%) y SspE9 (46.75%) ya que provocan un mayor porcentaje de inhibición que el fungicida comercial Carbendacim®, empleado como control positivo a la misma concentración de prueba (250 µg/mL).



**Figura 31.** Efecto antifúngico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos endófitos de *Salvia* sp., sobre el crecimiento radial de los hongos *F. oxysporum* y *A. alternata*. (\*) Valores estadísticamente significativos, ANOVA ( $p < 0.05$ ). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

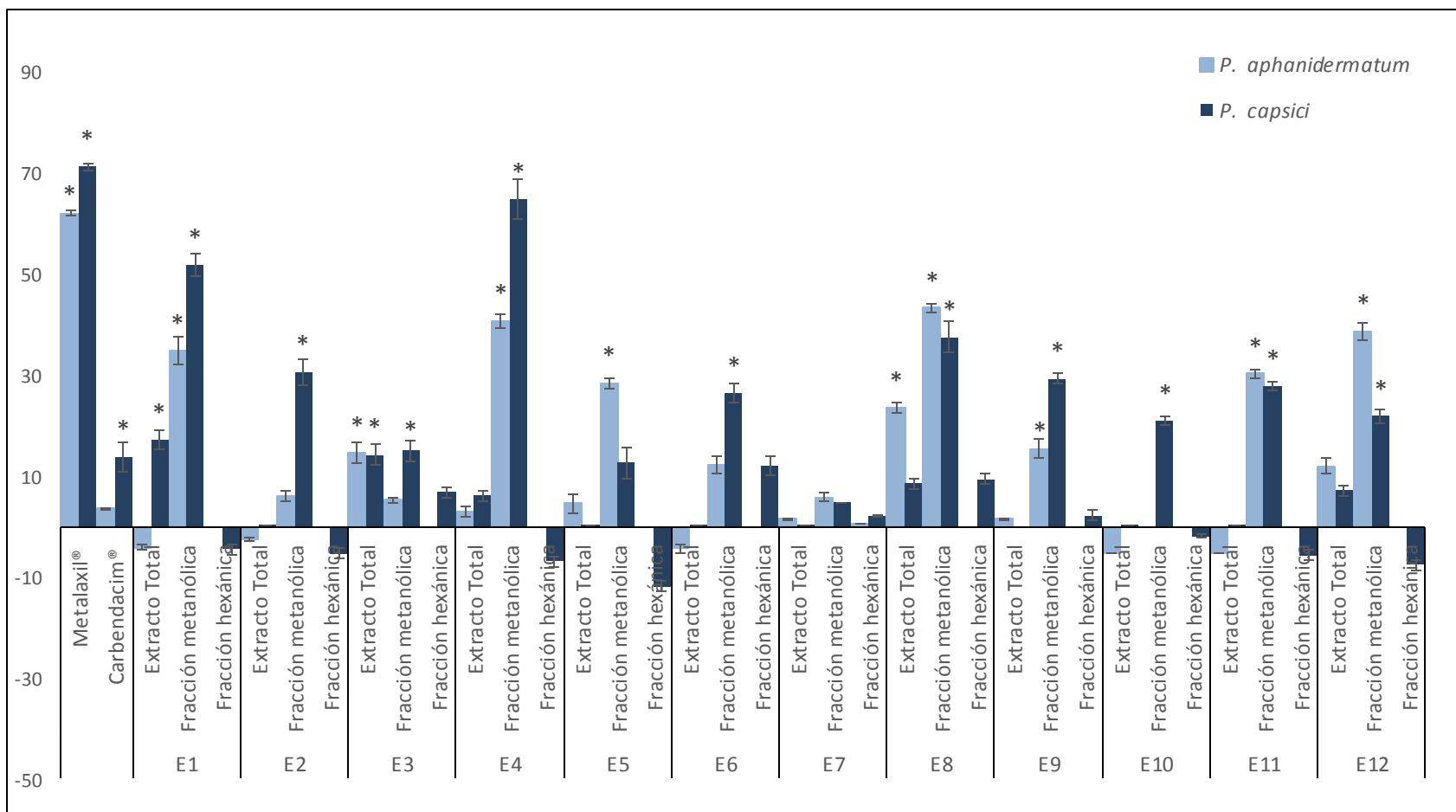


**Figura 32.** Efecto antifúngico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos fitopatógenos de *Salvia* sp., sobre el crecimiento radial de los hongos *F. oxysporum* y *A. alternata*. (\*) Valores estadísticamente significativos, ANOVA ( $p < 0.05$ ). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

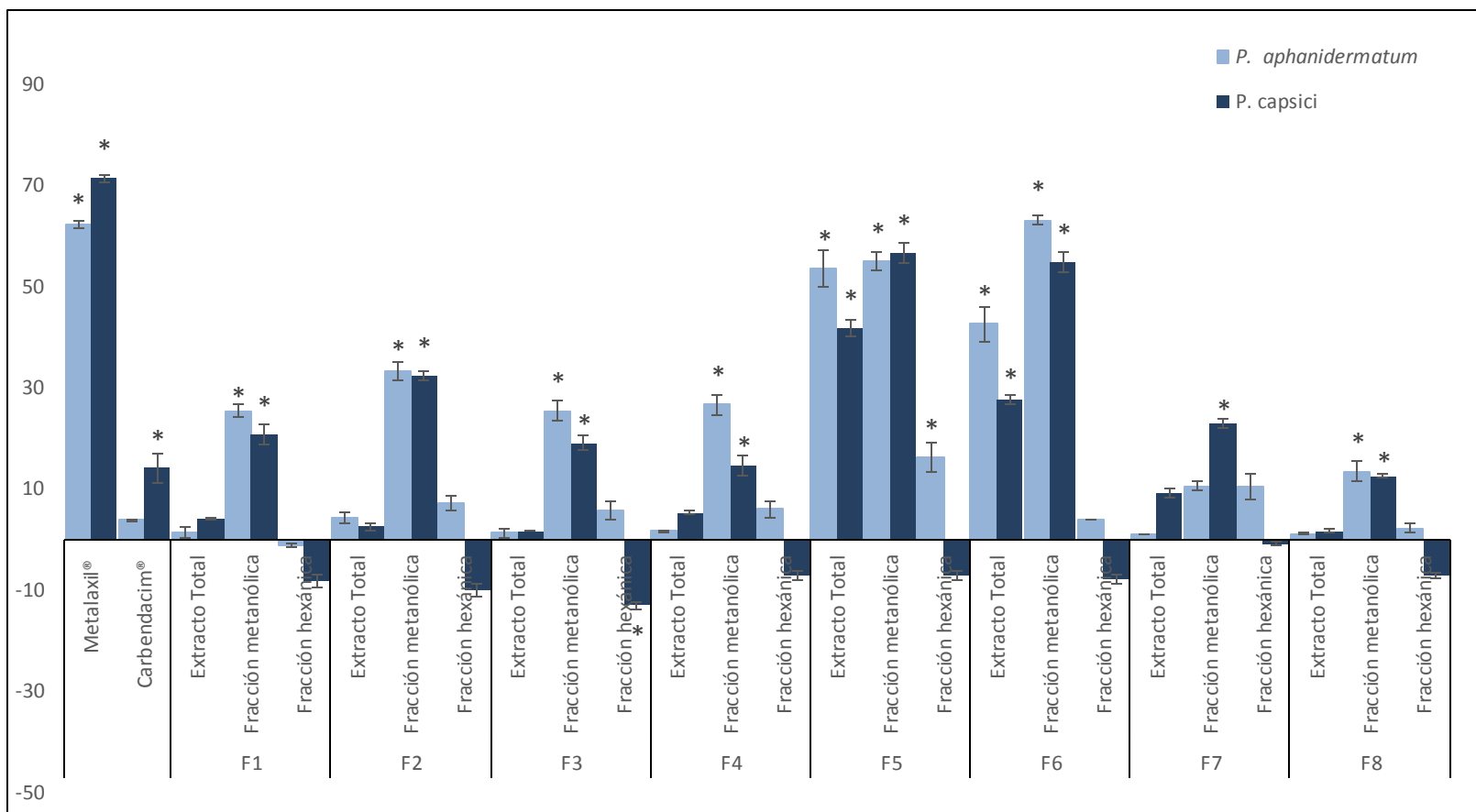
En las **Figura 33** y **34** se muestra el efecto inhibitorio de los extractos totales y de las fracciones primarias obtenidas de los cultivos de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp., respectivamente, sobre el crecimiento radial de los oomicetos *Phytium aphanidermatum* y *Phythophtora capsici*.

Los metabolitos secundarios presentes en las fracciones metanólicas de los hongos SspE4, SspE8, SspE12, SspF5 y SspF6 presentan una actividad inhibitoria significativa superior al 40% sobre el crecimiento del oomiceto *Phytium aphanidermatum*. Sin embargo, ninguno de los extractos totales o fracciones primarias supera la actividad inhibitoria provocada por el antioomiceto comercial Metaixil® usado como control positivo, a la concentración de 250 µg/mL. Por otra parte, la fracción metanólica de los hongos SspE1, SspE4, SspF5 y SspF6 inhiben significativamente y en más del 50% el crecimiento de *Phythophtora capsici*.

Las fracciones primarias metanólicas obtenidas de los hongos fitopatógenos SspF5 y SspF6 muestran una alta selectividad sobre el crecimiento de dos de los oomicetos de prueba, inhibiendo su crecimiento en más del 50%, en contraste, la inhibición sobre el crecimiento de los hongos verdaderos fungales es menor al 20%. Constituyendo candidatos útiles para el desarrollo de agroquímicos específicos sobre oomicetos fitopatógenos.



**Figura 33.** Efecto antifúngico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos endófitos de *Salvia* sp., sobre el crecimiento radial de los oomycetos *Phytophthora aphanidermatum* y *Phytophthora capsici*. (\*) Valores estadísticamente significativos, ANOVA ( $p < 0.05$ ). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.



**Figura 34.** Efecto antifúngico de los extractos totales y fracciones primarias de los hongos fitopatógenos de *Salvia* sp., sobre el crecimiento radial de los oomicetos *Phytophthora aphanidermatum* y *Phytophthora capsici*. (\*) Valores estadísticamente significativos, ANOVA ( $p < 0.05$ ). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

El presente proyecto de investigación se centró en la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica y antifúngica, a nivel extracto, a partir de hongos endófitos y fitopatógenos de la planta hospedera *Salvia* sp. Los resultados obtenidos permiten poner en evidencia los aislamientos fúngicos de *Salvia* sp con alto potencial para el aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios bioactivos.

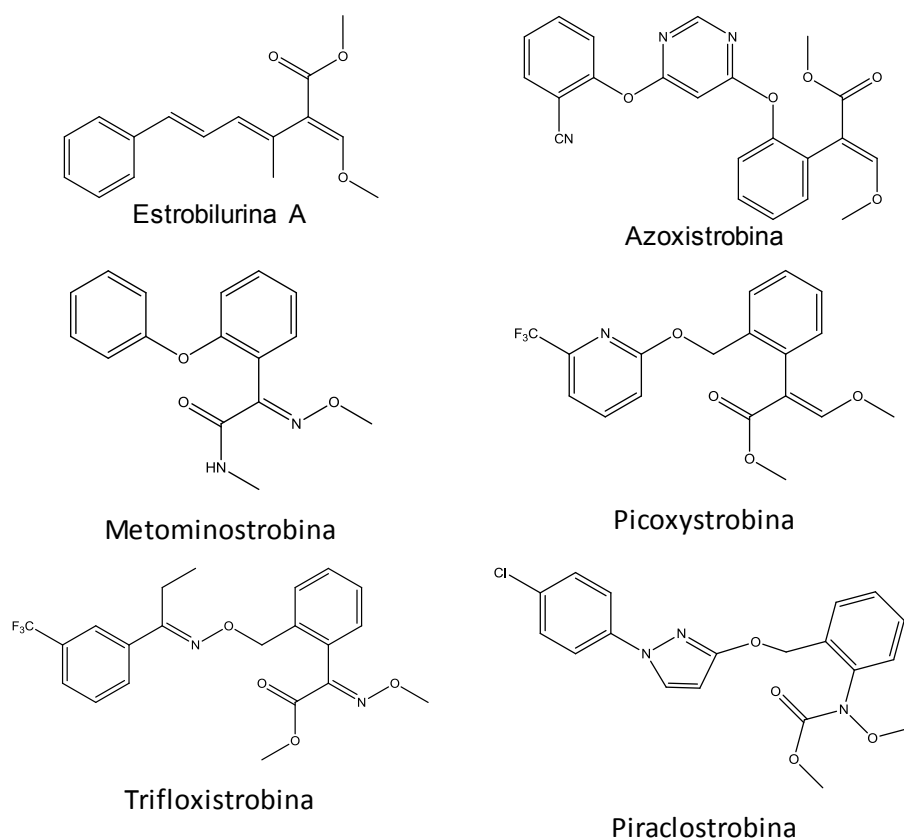
En este contexto, es importante citar a la familia de las estrobilurinas, que son un ejemplo de productos naturales aplicados como fungicidas comerciales agrícolas. Las estrobilurinas fueron aisladas del hongo de la madera podrida *Strobilurus tenacellus* (Dave *et al.*, 2001; Diedhiou *et al.*, 2004). Estos fungicidas fueron comercializados por primera vez en 1996, para el control sobre las enfermedades que afectaban a los cereales; sin embargo, con el transcurso de los años, los descubrimientos fueron en aumento, y actualmente se pueden encontrar más estrobilurinas de origen natural y sintético como fungicidas comerciales (**Figura 35**) (Dave *et al.*, 2001).

Las estrobilurinas pertenecen al grupo de los inhibidores de quinonas; son fungicidas de amplio espectro que actúan inhibiendo la respiración mitocondrial del hongo. Estas moléculas se enlazan al centro Q<sub>o</sub> en el citocromo B y bloquean la transferencia de electrones entre el citocromo B y el citocromo C<sub>1</sub>. Esto interrumpe el ciclo de energía dentro del hongo, provocando la inhibición de la producción de ATP (Dave *et al.*, 2001).

Una de las principales razones del éxito comercial de la azoxistrobina es su potencial de control sobre cuatro clases de hongos fitopatógenos: ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos y oomicetos. Por lo tanto, tiene un amplio espectro antifúngico lo que evita la necesidad de usar mezclas de uno o más fungicidas (Dave *et al.*, 2001).



De la misma forma, también sirvieron como base para la elaboración de productos sintéticos como la trifloxistrobina elaborada por Novartis®, la metominostrobrina de Shionogi y la picoxistrobina por Syngenta. La azoxistrobina y la picoxistrobina conservan el grupo metil-β-metoxiacrilato de los fungicidas naturales, mientras que los otros contienen grupos modificados por medio de síntesis orgánica (Dave *et al.*, 2001; Balba, 2007).



**Figura 35.** Estructuras químicas de compuestos naturales y sintéticos pertenecientes a la familia de la estrobilurina.

Con base en estos antecedentes, es altamente probable que los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos obtenidos de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp., permitirán obtener compuestos con actividad antioomiceto, antifúngica y/o fitotóxica, útiles en la agricultura o como herramientas para el diseño de plaguicidas alternativos de origen natural, como es el caso de la estrobilurina y sus derivados sintéticos.

## VII. CONCLUSIONES

A partir de 28 aislamientos de hojas sanas y de 10 aislamientos de hojas que presentaron síntomas de enfermedad de la planta hospedera *Salvia* sp., se obtuvieron un total de 12 hongos endófitos y 8 hongos fitopatógenos puros.

El análisis detallado de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos puros, permitió corroborar la pureza de los microorganismos y determinar su tasa de crecimiento. Asimismo, permitió inferir el posible género de los hongos endófitos SspE1 y SspE4, los cuales presentan características similares a los hongos del género *Fusarium*, así como del endófito SspE6 que muestra características propias del género *Cladosporium*. Mientras que en el grupo de los hongos fitopatógenos el hongo SspF8 presenta características del género de *Aspergillus*. Finalmente, se presume la presencia de oomicetos endófitos en la planta hospedera *Salvia* sp., debido a que el hongo SspE2 exhibe características macroscópicas y microscópicas pertenecientes a este grupo.

Con base en su tasa de crecimiento, se encontraron cinco endófitos de crecimiento lento, siete de crecimiento medio y ninguno de crecimiento rápido. En contraste, solo un hongo fitopatógeno presenta crecimiento lento, tres son de crecimiento medio y cuatro de crecimiento rápido.

Durante el proceso de extracción orgánica de los metabolitos secundarios producidos por los hongos puros de *Salvia* sp., los rendimientos más altos, se obtuvieron a partir de los cultivos de los hongos endófitos y fitopatógenos que poseen las tasas de crecimiento más altas y que corresponden a los fitopatógenos SspF3, SspF5 y SspF6.

Los extractos totales obtenidos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos SspE1, SspE3 y SspE4 presentan porcentajes de inhibición significativos sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *Amaranthus*

*hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*, superiores al 70%. Los extractos orgánicos totales obtenidos del cultivo de los hongos fitopatógenos SspF1 y SspF7 presentan porcentajes de inhibición significativos superiores al 60%, sobre ambas plantas de prueba. En los casos de los endófitos antes mencionados y del fitopatógeno SspF1, la actividad inhibitoria mostrada es superior a la provocada por el herbicida comercial Glifosato® a la misma concentración de prueba que fue de 250 µg/mL.

Los extractos orgánicos totales de los hongos SspE1, SspE3, SspE8 y SspE12 presentan el mayor potencial antifúngico, mostrando porcentajes de inhibición estadísticamente significativos sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *A. alternata*, exhibiendo una actividad antifúngica superior al control positivo, del fungicida comercial Carbendacim® a la misma concentración de prueba que fue de 250 µg/mL. El extracto total del hongo SspF5 muestra un potencial selectivo sobre los oomicetos *P. aphanidermatum* y *P. capsici*. Asimismo, el extracto orgánico del hongo SspF6, mostró una importante inhibición sobre el crecimiento de los dos oomicetos de prueba, y sobre el hongo *A. alternata*. Ningún extracto total inhibió significativamente el crecimiento de *F. oxysporum*.

Se determinó cuantitativamente la actividad fitotóxica y antifúngica de las fracciones primarias. En general, las fracciones metanólicas presentan una mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los organismos de prueba, que el extracto total y que la fracción hexánica. En algunos casos, las fracciones hexánicas estimulan el crecimiento de los microorganismos en estudio.

La evaluación biológica de los extractos totales permitió observar algunos casos de sinergismo entre los compuestos polares y los no polares. Sin embargo, también se encontraron casos de antagonismo entre los

compuestos de diferente polaridad, efecto que provoca que las fracciones presenten mayor o menor actividad biológica que el extracto total.

Se proponen como candidatos productores de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico, útiles en la agricultura a los hongos endófitos SspE1, SspE4, SspE10 y a los fitopatógenos SspF1, SspF3 y SspF7, debido a que sus extractos totales muestran los mayores porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum* y debido a que su efecto fitotóxico incrementa al realizar el fraccionamiento primario.

Los extractos totales de los hongos SspE1, SspE8, SspE12 y SspF6, así como las fracciones metanólicas de los endófitos SspE2 y SspE9 constituyen una fuente prometedora para la obtención de metabolitos secundarios con potencial antifúngico específico sobre *A. alternata*.

Los metabolitos secundarios presentes en la fracción metanólica de los hongos endófitos SspE3 y SspE4 constituyen posibles candidatos útiles para la obtención de compuestos con actividad antifúngica sobre *F. oxysporum*.

Los hongos SspE1, SspE4, SspE8, SspE12, SspF5 y SspF6 son candidatos productores de metabolitos secundarios con actividad antioomiceto. El hongo fitopatógeno SspF5 produce metabolitos secundarios con actividad selectiva sobre el crecimiento de los oomicetos *P. aphanidermatum* y *P. capsici*.

El presente proyecto de investigación contribuye al conocimiento de las interacciones existentes entre planta hospedera y microorganismos endófitos, evidenciando la presencia de una gran diversidad de microorganismos y confirmando la presencia de metabolitos secundarios bioactivos producidos por hongos endófitos y fitopatógenos.

La actividad biológica encontrada en algunos de los extractos y fracciones orgánicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *Salvia* sp. son de gran interés para la posible producción de agroquímicos de origen natural destinados para la actividad agrícola moderna.

## VIII. PERSPECTIVAS

- Cultivar en mediana escala a los hongos endófitos y fitopatógenos de *Salvia* sp. que presentaron el mayor potencial fitotóxico y antifúngico. Obtener los extractos y fracciones orgánicas para verificar su potencial biológico.
- Realizar el fraccionamiento químico biodirigido de los extractos fúngicos con mayor actividad biológica, derivados de los cultivos en mediana escala. Aislar y caracterizar a los metabolitos secundarios responsables de la actividad herbicida y/o antifúngica.
- Establecer el potencial biológico de los extractos orgánicos y metabolitos secundarios puros, ampliando la gamma de organismos de prueba. En el caso de la actividad herbicida, se realizará con diversas semillas mono y dicotiledonas. La actividad antifúngica o antioomiceto, se llevará a cabo empleando más especies de hongos y oomicetos, respectivamente.
- Determinar preliminarmente la toxicidad de los extractos totales, fracciones orgánicas, y compuestos puros con el fin de establecer posibles efectos tóxicos en el hombre y los animales.

## IX. REFERENCIAS

- Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Wray, V. Müller, W. E. G., Kozytska, S., Hentschel, U., Proksch, P., (2008). **Bioactive metabolites from the endophic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*.** *Phytochemistry*, 69 (8): 1716-1725.
- Arias, D., O. Dorado y B. Maldonado. (2002). **Biodiversidad e importancia de la selva baja caducifolia: la Reserva de la Biosfera de Huautla.** *CONABIO. Biodiversitas* 45:7-12.
- Armendáriz-Guillén, B. (2013). **Hongos endófitos productores de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico y antifúngico.** Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM.
- Bacon C. W., Hinton D. M., Porter J. K., Glenn A. E., Kuldau G. (2004). **Fusaric acid, a *Fusarium verticillioides* metabolite, antagonistic to the endophytic biocontrol bacterium *Bacillus mojavensis*.** *Canadian Journal of Botany*, 82: 878-885.
- Cavallé Oller, N., (2011). **Exposición simultánea a varios agentes químicos: criterios generales de evaluación del riesgo.** Instituto Nacional de seguridad e higiene en el trabajo.
- Cremlyn R. J., (1991). **Agrochemicals: Preparation and mode of action.** John Wiley & Sons Ltd. England.
- Dave W. Bartlett, Jonh M. Clough, Chris R. A., Godfrey, Jeremy R. Godwin, Alison A. Hall, Steve P. Heaney and Steve J. (2001).



**Understanding the strobilurin fungicides.** Journal Royal Society of chemistry.

- Dayan, F.E., Cantrell, C.L., & Duke, S. O. (2009). **Natural products in crop protection.** Bioorganic & medicinal chemistry, 17 (12): 4022-4034.
- Diedhiou M. , Oerke E. C., Dehne . W. (2004). **Effects of the strobilurin fungicides azoxystrobin and kresoximmetyl on arbuscular mycorrhiza.** *Journal of plants diseases and protection.* 111 (6), 545-556.
- DEAQ, **Diccionario de especialidades agroquímicas.** ( 2011). P.180.
- FAO (2001). **El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción.** p.37.
- FAO (2014). **Luchando contra las amenazas de la Banana.** P.52.
- Félix-Gastélum, R. y Gálvez-Figueroa, C.A. (2002). **Control del moho negro, *Alternaria alternata* en el fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum*) considerando unidades calor y variables ambientales para la aplicación de azoxystrobin en Sinaloa, México.** Revista Mexicana de Fitopatología 20: 72-76.
- Gamboa Gaytán Miguel (2006), **Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas,** Universidad Nacional de Colombia.
- García V. R., Zavaleta M., Rojas M., Leyva M., Fuentes D. (2005). **Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn. Causante de la Roya blanca del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev).** Revista mexicana de Fitopatología. 23-1.

- Gerald C. Nelson, Mark W. Rosegrant, Jawoo Koo, Richard Robertson, Timothy Sulser, Tingju Zhu, Claudia Ringler, Siwa Msangi, Amanda Palazzo, Miroslav Batka, Marilia Magalhaes, Rowena Valmonte-Santos, Mandy Ewing y David Lee. (2009). **Cambio climático: El impacto en la agricultura y los costos de adaptación.** Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias (IFPRI).
- Gond, S. K., Verma, V. C., Mishra, A., Kumar, A., & Kharwar, R. N. (2010). **Role of fungal endophytes in plant protection.** Management of fungal plant pathogens.
- González Coloma A., Reina M., Fraga B. M., Díaz C.E., Cabrera R. (2007). **Biocompuestos con actividad antimicrobial. Bioplaguicidas naturales para la protección de cultivos.** CIQA. 2.
- Gutiérrez M., Theoduloz C., Rodríguez J., Lolas M., Schmeda-Hirschmann G. (2005). **Bioactive metabolites from the fungus *Nectria galligena*, the main apple canker agent in Chile.** Food chem. 53.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2011). **El sector alimentario en México 2011.**
- Kavanagh Kevin (2003). **Fungi: Biology and Applications.** John Wiley & Sons, Ltd. Ireland.
- Lampkin Nicolas (2001). **Agricultura ecológica.** Mundi prensa. España.
- Li J., Strobel G. A. (2001). **Jesterone and hydroxyl-jesterone antioomycete Cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*.** Phytochem 57.

- Li, Y. C., & Tao, W. Y. (2009). **Paclitaxel-producing fungal endophyte stimulates the accumulation of taxoids in suspension cultures of *Taxus cuspidate***. *Scientia Horticulturae*, 121 (1): 97-102.
- Lira- Saldívar, R.H. (2007). **Bioplaguicidas y control biológico**. Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), 1, 231.
- Luiz H. R., Vieira M., Cota B., Johann S., Alves T., Zani C. (2012). **Endophytic fungi of tropical forests: a promising source of bioactive prototype molecules for the treatment of neglected diseases**. 113-131.
- 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., Hernández Bautista B. E., Oropeza F., Duarte, G., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., Anaya A. L. (2010). **Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba***. *Journal of chemical ecology*, 36 (10): 1122-31.
- Macías-Rubalcava, M. L. E. Ruiz-Velasco Sobrino, C. Meléndez-González, S. Hernández-Ortega (2014). **Naphthoquinone Spiroketal and organic extracts from the endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as potencial herbicides**. *Journal of agricultural and food chemistry* 62 (16): 3553-62.

- 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.**
- Muñoz López F. (2002). **Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado.** Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Palomo Martínez Guadalupe, Arriaga Becerra Raul. (1993). **Atlas de ubicación de productos agropecuarios utilizables en la planificación y desarrollo de la acuicultura en México.** Secretaria de pesca.
- Pérez Moreno Luis, Durán Ortiz Josefina, Ramírez Malagón Rafael, Sánchez Pale Ricardo, Olalde Portugal Victor. (2004). **Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de Phytophthora capsici.** Revista Mexicana de Fitopatología. 21 (1): 19-25.
- Ramírez R. M., Millán L. B., Velázquez M. O., Vierna García L., Mejía Chávez A., Tsuzuki R. G., Hernández Gómez L., Muggenburg I., Camacho Cruz A., Hernández U.(2008). **Manual de prácticas de microbiología general.** Facultad de Química UNAM.
- Recco Pimentel M., Molina G., Dionísio A., Maróstica M., Pastore M. (2011). **The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process.** *Biotechnology Research International.*
- Rodríguez-Almarza, M., (2007). **Determinación de la composición química y propiedades físicas y químicas del pulido de arroz (*Oryza sativa* L.).** Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias agrarias. Universidad de Chile.

- Rodríguez R. J., White J. F., Arnold A. E., Redman R. S. (2008), **Fungal endophytes: diversity and functional roles**, *New Phytologist* 1-13.
- Sánchez-Fernández, R. E., (2010). **Potencial alelopático de extractos del micelio y medio de cultivo de un hongo endófito aislado de *Lonchocarpus castilloi* (Fabaceae)**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Sandoval-Espinosa, Y. (2014). **Aislamiento y purificación de hongos endófitos con potencial antifúngico y fitotóxico de *Lysiloma acapulcense***. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Schulz Barbara, Römmert A., Dammann U., Aust H., Strack D. (1999). **The endophyte-host interaction: a balanced antagonism**.
- Taechowisan T., Lu C., Shen Y., Lumyong S. (2005). **Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 and their antifungal activity**. *Microbiol.* 151.
- Tyler, B. M. (2007). ***Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete**. *Molecular plant pathology*, 8 (1), 1-8.
- Ulloa M., Hanlin R. T. (2006). **Diccionario ilustrado de micología**. The American Phytopathological Society.
- Varughese, T., Rios N., Higginbotham S., Arnold A. E., Phyllis D.C., Kursar T. A., Gerwick W. (2012). **Antifungal depsidone metabolites from *Cordyceps dipterigena*, an Endophytic fungus antagonistic to the Phytopathogen *Gibberella fujikuroi***. Elsevier, *Tetrahedron letters*.

- Villanueva-Silva, R. (2014). **Potencial antagónico de hongos endófitos de *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarcum***. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM.
- Yu Hongsheng, Zhang Lei, Lin Li, Zheng Chengjian, Guo Lei, Li Wenchao, Sun Peixin, Qin Luping (2010). **Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes**. Microbiological Research 165, 437-449.
- Zhao J., Zhou L., Wang J., Shan T., Zhong L., Liu X., Gao X. (2010), **Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants**.