



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**HONGOS ENDÓFITOS DE *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae)
PRODUCTORES DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y HERBICIDA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

GUADALUPE IBARRA MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Lista de figuras	v
Lista de cuadros	xi
Lista de abreviaturas	xv
I. Introducción	1
II. Antecedentes	4
1. Agricultura en México	4
2. Problemática en la agricultura	4
3. Control de enfermedades	5
4. Alternativas para el control de plagas y enfermedades	6
5. Hongos	6
6. Hongos endófitos	8
7. Competencia entre hongos	10
8. Control biológico	12
9. Metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos	13
III. Hipótesis	18
IV. Objetivos	19
1. Objetivo general	19
2. Objetivos particulares	19
V. Materiales y métodos	22
1. Material fúngico	22
1.1 Hongos endófitos y fitopatógenos	22
1.2 Microorganismos de prueba	22

2. Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos aislados de la planta <i>Haematoxylon brasiletto</i>	22
3. Cultivos en arroz	24
4. Obtención de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio	24
5. Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala	25
6. Determinación del potencial antifúngico	25
7. Determinación del potencial fitotóxico	27
8. Bioensayo de antagonismo directo múltiple entre hongos de <i>H. brasiletto</i> y fitopatógenos de importancia en la agricultura.	29
VI. Resultados y discusión	33
1. Determinación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de <i>H. brasiletto</i>	34
1.1.1 PBE1	35
1.1.2 PBE2	36
1.1.3 PBE3	37
1.1.4 PBE4	38
1.1.5 PBE5	39
1.1.6 PBE6	40
1.1.7 PBE7	41
1.1.8 PBE8	42
1.1.9 PBE9	43
1.1.10 PBE10	44
1.1.11 PBE11	45
1.1.12 PBE12	46
1.1.13 PBE13	47

1.1.14 PBE14	48
1.1.15 PBE15	49
1.1.16 PBE16	50
1.1.17 PBE17	51
1.1.18 PBE18	52
1.1.19 PBE19	53
1.1.20 PBF1	54
1.1.21 PBF2	55
1.1.22 PBF3	56
1.1.23 PBF4	57
1.2 Características macroscópicas del hongo endófito PBE10 durante la curva de crecimiento.	58
2. Obtención de cultivos en pequeña escala y fracciones primarias de los extractos orgánicos	59
3. Determinación del potencial antifúngico	61
4. Determinación del potencial fitotóxico	69
5. Obtención de cultivos y extractos en mediana escala	83
6. Verificación del potencial biológico de los extractos en mediana escala	84
7. Determinación de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀)	88
7.1 Potencial antifúngico	88
7.2 Actividad fitotóxica	94
8. Potencial Antagónico	102
8.1 Antagonismo entre el endófito PBE2 y los fitopatógenos de importancia económica	105

8.2 Antagonismo entre el endófito PBE8 y los fitopatógenos de importancia económica	108
8.3 Antagonismo entre el endófito PBE9 y los fitopatógenos de importancia económica	111
8.4 Antagonismo entre el endófito PBE11 y los fitopatógenos de importancia económica	113
8.5 Antagonismo entre el endófito PBE12 y los fitopatógenos de importancia económica	116
8.6 Antagonismo entre el endófito PBE14 y los fitopatógenos de importancia económica	118
8.7 Antagonismo entre el endófito PBE19 y los fitopatógenos de importancia económica	120
VII. Conclusiones	122
VII. Perspectivas	125
IX. Bibliografía	126

Lista de Figuras

	Páginas
Figura 1. Árbol filogenético de los seres vivos deducido de la secuenciación comparativa del gen del RNA ribosómico (Modificado de Madigan <i>et al.</i> , 2009).	7
Figura 2. Bioensayo de antagonismo directo múltiple en caja Petri entre los hongos endófitos de <i>H. brasiletto</i> y los microorganismos fitopatógenos de importancia económica en la agricultura.	30
Figura 3. Endófito PBE1. A) Crecimiento de 19 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol, respectivamente.	35
Figura 4. Endófito PBE2. A) Crecimiento de 18 días en medio PDA anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol, respectivamente.	36
Figura 5. Endófito PBE3. A) Crecimiento de 14 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol, respectivamente.	37
Figura 6. Endófito PBE4. A) Crecimiento de 11 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observaciones microscópicas en 40 X, teñidas con colorante rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente.	38
Figura 7. Endófito PBE5. A) Crecimiento de 19 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observaciones microscópicas en 40 X, teñida con colorante rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente.	39

- Figura 8.** Endófito PBE6. A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente. 40
- Figura 9.** Endófito PBE7. A) Crecimiento de 20 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo. 41
- Figura 10.** Endófito PBE8. A) Crecimiento de 21 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo. 42
- Figura 11.** Endófito PBE9. A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol. 43
- Figura 12.** Endófito PBE10. A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo. 44
- Figura 13.** Endófito PBE11. A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo. 45
- Figura 14.** Endófito PBE12. A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo. 46
- Figura 15.** Endófito PBE13. A) Crecimiento de 14 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con rojo congo. 47

- Figura 16.** Endófito PBE14. A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol. 48
- Figura 17.** Endófito PBE15. A) Crecimiento de 32 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo. 49
- Figura 18.** Endófito PBE16. A) Crecimiento de 13 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo. 50
- Figura 19.** Endófito PBE17. A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo. 51
- Figura 20.** Endófito PBE18. A) Crecimiento de 26 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo. 52
- Figura 21.** Endófito PBE19. A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente. 53
- Figura 22.** Fitopatógeno PBF1. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo. 54

Figura 23. Fitopatógeno PBF2. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.	55
Figura 24. Fitopatógeno PBF3. A) Crecimiento de 18 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.	56
Figura 25. Fitopatógeno PBF4. A) Crecimiento de 6 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.	57
Figura 26. Endófito PBE10 a los días 3, 6 y 9 de crecimiento.	58
Figura 27. Perfil cromatográfico de las fracciones primarias del hongo endófito PBE11 A) Fracción metanólica B) Fracción hexánica.	60
Figura 28. Efecto antifúngico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos de cultivos en mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento radial de <i>F. oxysporum</i> : A) PBE9 B) PBE11 C) PBE14 D) PBF2.	89
Figura 29. Efecto antifúngico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos de cultivos en mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento radial de <i>A. alternata</i> : A) PBE2 B) PBE9 C) PBE11 D) PBE14 E) PBF2.	90

- Figura 30.** Efecto antifúngico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos de cultivos en mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento radial de *P. capsici*: **A)** PBE2 **B)** PBE9 **C)** PBE11 **D)** PBE2. 91
- Figura 31.** Efecto antifúngico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos de cultivos en mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento radial de *P. aphanidermatum*: **A)** PBE11 **B)** PBE9 **C)** PBE14. 92
- Figura 32.** Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos del cultivo a mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico, evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento de la raíz de la semilla *S. lycopersicum*: **A)** PBE6 **B)** PBE9 **C)** PBE11 **D)** PBE14. 95
- Figura 33.** Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos del cultivo a mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico, evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento de la raíz de la semilla *A. hypochondriacus*: **A)** PBE2 **B)** PBE6 **C)** PBE9 **D)** PBE11 **E)** PBE14. 96
- Figura 34.** Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos del cultivo a mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico, evaluados a cuatro concentraciones sobre el consumo de O₂ de las semillas de *S. lycopersicum*: **A)** PBE11 **B)** PBE9 y *A. hypochondriacus*. **D)** PBE9. 97
- Figura 35.** Efecto del extracto orgánico derivado de la maceración con CH₂Cl₂-MeOH del cultivo en mediana escala de PBE9, sobre el consumo de O₂ de las plántulas de *A. hypochondriacus*. 98

Figura 36.	Efecto del extracto orgánico derivado de la maceración con CH ₂ Cl ₂ -MeOH del cultivo en mediana escala de PBE11, sobre el consumo de O ₂ de las plántulas de <i>S. lycopersicum</i> .	99
Figura 37.	Controles de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos con importancia agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de bioensayo.	104
Figura 38.	Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE2 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.	107
Figura 39.	Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE8 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.	110
Figura 40.	Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE9 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.	112
Figura 41.	Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE11 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.	115
Figura 42.	Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE12 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.	117
Figura 43.	Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE14 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.	119
Figura 44.	Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE19 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.	121

Lista de cuadros

Cuadro 1.	Grupo y clases de hongos endófitos (Rodríguez <i>et al.</i> , 2009; Sánchez-Fernández <i>et al.</i> , 2013).	9
Cuadro 2.	Mecanismos combativos de los endófitos en interacción antagonica (Boddy, 2000; Cao <i>et al.</i> , 2009).	11
Cuadro 3.	Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos.	14
Cuadro 4.	Tipo de interacciones entre microorganismos y valores numéricos asignados (modificado de Yuen <i>et al.</i> , 1999).	32
Cuadro 5.	Rendimiento de los extractos orgánicos crudos y fracciones primarias de los hongos endófitos y fitopatógenos de <i>H. brasiletto</i> .	61
Cuadro 6.	Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de <i>H. brasiletto</i> sobre el crecimiento radial de <i>F. oxysporum</i> , <i>A. alternata</i> , <i>P. capsici</i> y <i>P. aphanidermatum</i> .	63
Cuadro 7.	Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos fitopatógenos aislados de <i>H. brasiletto</i> sobre el crecimiento radial de <i>F. oxysporum</i> , <i>A. alternata</i> , <i>P. capsici</i> y <i>P. aphanidermatum</i> .	68
Cuadro 8.	Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de <i>H. brasiletto</i> sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de <i>A. hypochondriacus</i> .	71
Cuadro 9.	Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos fitopatógenos aislados de <i>H. brasiletto</i> sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de <i>A. hypochondriacus</i> .	76

Cuadro 10.	Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de <i>H. brasiletto</i> sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de <i>S. lycopersicum</i> .	77
Cuadro 11.	Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos fitopatógenos aislados de <i>H. brasiletto</i> sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de <i>S. lycopersicum</i> .	82
Cuadro 12.	Rendimiento de los cultivos en mediana escala de los endófitos y fitopatógenos de <i>H. brasiletto</i> con mayor actividad biológica.	83
Cuadro 13.	Efecto antifúngico de los extractos orgánicos de los cultivos en mediana escala de los endófitos y fitopatógenos de <i>H. brasiletto</i> con mayor actividad biológica sobre los cuatro microorganismos de prueba.	85
Cuadro 14.	Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de los cultivos en mediana escala de los endófitos y fitopatógenos de <i>H. brasiletto</i> con mayor actividad biológica sobre el crecimiento de la raíz y germinación de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>S. lycopersicum</i> .	87
Cuadro 15.	Concentraciones inhibitorias medias sobre el crecimiento radial de los hongos fitopatógenos de importancia en la agricultura <i>F. oxysporum</i> , <i>A. alternata</i> , <i>P. aphanidermatum</i> y <i>P. capsici</i> .	93
Cuadro 16.	Concentraciones Inhibitorias medias de los extractos obtenidos de los hongos endófitos con mayor potencial biológico sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> .	101

Cuadro 17.	Concentraciones Inhibitorias medias de los extractos obtenidos de los hongos endófitos con mayor potencial biológico sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de <i>S. lycopersicum</i> .	102
Cuadro 18.	Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i> contra el endófito PBE2.	106
Cuadro 19.	Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i> contra el endófito PBE8.	109
Cuadro 20.	Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i> contra el endófito PBE9.	111
Cuadro 21.	Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i> contra el endófito PBE11.	114
Cuadro 22.	Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i> contra el endófito PBE12.	116
Cuadro 23.	Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i> contra el endófito PBE14.	118

Cuadro 24. Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo *in vitro* contra el endófito PBE19. 120

Lista de abreviaturas

<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>A. hypochondriacus</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
CCF	Cromatografía en capa fina
CH₂Cl₂	Diclorometano
CH₃OH	Metanol
cm	Centímetros
cm²	Centímetros cuadrados
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
°C	Grados Celsius
EC	Extracto orgánico crudo
FH	Fracción hexánica
FM	Fracción metanólica
g	Gramos
<i>H. brasiletto</i>	<i>Haematoxylon brasiletto</i>
h	Horas
IA	Índice de antagonismo
L	Litros
µg	Microgramos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
PDA	Papa-dextrosa-agar
<i>P. aphanidermatum</i>	<i>Phytium aphanidermatum</i>
<i>P. capsici</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
REBIOSH	Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla
<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>

I. Introducción

Actualmente, incrementar la producción de frutas y hortalizas es una prioridad mundial, debido a la gran cantidad de vitaminas y minerales que aportan al consumirlas, beneficiando de esta manera la salud humana, es por esto que es crucial que las mismas lleguen en buen estado al consumidor. Los productos hortofrutícolas poseen las condiciones adecuadas para que se desarrollen microorganismos, que causan serios problemas de pudrición, destacándose a los hongos fitopatógenos. Durante muchos años, el control de las enfermedades en cultivos agrícolas se ha estado realizando, mediante el uso de fungicidas químicos sintéticos, y que se han caracterizado por su eficacia y rapidez en control de los patógenos. No obstante, se ha encontrado que diversos fitopatógenos han desarrollado resistencia frente a los mismos (Föster *et al.*, 2007).

Por otra parte, diversos estudios ponen en evidencia los efectos nocivos que tienen los químicos sintéticos contra la salud humana, y los daños que han provocado al medio ambiente. Esta situación ha provocado que se encaminen investigaciones hacia la búsqueda de alternativas naturales para controlar los fitopatógenos de cultivos (Lira–Saldivar, 2007).

La naturaleza ha sido siempre una fuente inagotable de compuestos activos que tienen aplicación en la medicina y la agricultura. Algunos productos naturales cuentan con diversas ventajas sobre los productos sintéticos, como son la baja toxicidad, la poca retención en los tejidos de los seres vivos, baja acumulación en la tierra, agua, aire y la aportación de estructuras complejas las cuales poseen una importante actividad biológica con mecanismos de acción muy específicos, que puede ser usadas en diferentes áreas (Nepote *et al.*, 2006; Amason *et al.*, 2008; Dayan *et al.*, 2009; Mann y Kaufman, 2012).

En la lista de los productos naturales, los microorganismos endófitos, son una opción actual de estudio; debido a la importancia de algunos productos de su metabolismo secundario, dentro de los que destacan algunos con uso en la

agricultura como agroquímicos alternativos o como agentes de biocontrol (Schulz *et al.*, 2002; Strobel y Daisy, 2003; Khan *et al.*, 2007; Debbab *et al.*, 2009).

Los hongos endófitos son microorganismos que pasan la totalidad o parte de su ciclo de vida colonizando inter y/o intra celularmente los tejidos sanos de las plantas huésped, sin causarle síntomas aparentes de enfermedad. Los endófitos establecen una estrecha relación con su planta hospedera, y algunos de ellos forman parte de los mecanismo de defensa, favoreciendo así su supervivencia (Zhang *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011).

En los últimos años el estudio químico y biológico de los microorganismos endófitos ha despertado un gran interés, debido no solo a la gran variedad existente si no al potencial que tienen para producir nuevos compuestos naturales. Los metabolitos secundarios producidos por microorganismos endófitos, han sido usados para el desarrollo de productos que beneficien al ser humano, y van desde productos que protegen cultivos y cosechas actuando como agentes nematocidas, insectocidas, herbicidas y antifúngicos (Aneja *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Megbeahuruike *et al.*, 2011; Mann y Kaufan, 2012; Rosa *et al.*, 2012) hasta aquellos con aplicación farmacológica como anticancerígenos, antibacterianos, antivirales, antifúngicos, antioxidantes, entre otros (Debbab *et al.*, 2009; Rhoden *et al.*, 2012).

Cabe destacar que en general, un gran número de metabolitos secundarios biosintetizados por microorganismos, poseen un tiempo de vida corto y son susceptibles a ser degradados por los microorganismos del suelo, lo cual disminuye sus efectos tóxicos, reduciendo la contaminación del ambiente, así como el riesgo a la salud humana, convirtiéndolos así, en candidatos potenciales para la búsqueda de agroquímicos alternativos más amigables con el ambiente, y menos tóxicos para los mamíferos, que los agroquímicos de origen sintético empleados indiscriminadamente en la actualidad (Dubey *et al.*, 2011; Grover y Gijzen, 2006).

En este contexto, el presente proyecto de tesis tiene la finalidad de poner en evidencia el potencial antifúngico y fitotóxico a nivel de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de hongos endófitos aislados de hojas de *Haematoxylon brasiletto*, colectadas en una zona de alta biodiversidad, la “Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla” (REBIOSH) y establecer el potencial antagonístico de hongos endófitos con mayor actividad biológica, mediante bioensayos de antagonismo directo entre endófitos y microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola. Esto, con la finalidad de contribuir al posible desarrollo de nuevos agentes herbicidas y/o antifúngicos de origen fúngico más eficaces, menos tóxicos y con menor impacto ambiental. Así, como contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las estrechas relaciones que se establecen entre las plantas hospederas y los hongos endófitos.

II. Antecedentes

1. Agricultura en México

La agricultura en México es un sector productivo importante. México cuenta con un territorio nacional de 198 millones de hectáreas, de las cuales 145 millones se dedican a la actividad agropecuaria. Cerca de 30 millones de hectáreas son tierras de cultivo y 115 millones son de agostadero (SAGARPA, 2007).

Existen cerca de 200 productos agrícolas que se cultivan en México, destacando algunos que son de importancia porque se destinan al consumo humano directo y otros porque se canalizan al mercado exterior con la consecuente generación de divisas para el país. Entre los primeros se encuentra el maíz, el frijol, el arroz, el sorgo, la caña de azúcar y las oleaginosas, en tanto que entre los productos de exportación más importantes se incluyen el café, el jitomate, el algodón y algunas frutas (FAO, 2009).

2. Problemática en la agricultura

Día con día la población mundial se multiplica a un ritmo acelerado, exigiendo servicios, fuentes de empleo, y alimentación. Por tal motivo, la agricultura se enfrenta a un gran reto: el satisfacer las necesidades de alimentación en calidad y cantidad, aprovechando al máximo las áreas agrícolas, debido a que con la misma superficie de terreno, se debe alimentar a un mayor número de personas. Uno de los principales problemas de este gran reto es el ataque de plagas, malezas y enfermedades, que a nivel mundial disminuyen aproximadamente el 35% de la producción agrícola (AMIFAC, 2015).

Las pérdidas que ocasionan las plagas y enfermedades en los cultivos de los países desarrollados se ubican entre 10 y 25% de la producción, lo que significa que la cuarta parte de lo que se produce nunca llega al consumidor para el que se

cultivó, convirtiéndose en uno de los principales inconvenientes para los productores (Gaceta Innovación, 2014). Las pérdidas anuales causadas por las malezas en la agricultura de los países en desarrollo han sido estimadas del orden de 125 millones de toneladas, cantidad suficiente para alimentar a 250 millones de personas. Es bien sabido que, las malezas compiten con las plantas cultivables por los nutrientes del suelo, agua y luz. Además, estas plantas indeseables sirven de hospederas de insectos y patógenos dañinos a las plantas cultivables (Labrada *et al.*, 1996).

Esta problemática, ha suscitado el temor de que el mundo no será capaz de producir alimentos suficientes para asegurar que las poblaciones futuras reciban una alimentación adecuada (FAO, 2002).

3. Control de enfermedades

En México, se calcula que existen alrededor de 900 plaguicidas, y los cultivos en los que se usa el mayor volumen de plaguicidas químicos sintéticos son: maíz, algodón, papa, chile, tomate, frijol, trigo, aguacate, café y tabaco, en cantidades que van desde 395 hasta 13,163 toneladas de plaguicidas al año (AMIFAC, 2015). Los estados con mayor uso de plaguicidas son Sinaloa, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México, Puebla y Oaxaca, con el 80% de los plaguicidas totales (Albert, 2005).

Cabe mencionar que los herbicidas más comercializados en México a partir de 1997 son Gramoxone® (paraquat), Faena® (glifosato), seguidos de los insecticidas organofosforados; paratión metílico, metamidofos, malatión, y de los fungicidas Daconil® (mancozeb) y Manzate® (clorotalonil). La aplicación de estos compuestos ha sido una de las principales fuentes de contaminación ambiental, generando varios casos de intoxicación y otros problemas de salud pública (Leyva *et al.*, 2014).

El control de plagas y enfermedades depende, en gran parte, de la aplicación de estos productos químicos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos, ha ocasionado severos problemas de contaminación ambiental y generando la aparición de organismos altamente resistentes (Ibarra *et al.*, 2006).

4. Alternativas para el control de plagas y enfermedades

La protección de los cultivos implica la búsqueda histórica de productos defensivos de las plantas frente a plagas. Este proceso implica la búsqueda de productos de origen natural (metabolitos secundarios), que eventualmente se puedan desarrollar a mediana y gran escala. Evitando así, el alto impacto medio ambiental de los plaguicidas sintéticos. Para lograr este fin los productos naturales deben ser degradables y no presentar riesgo toxicológico en humanos (González-Coloma, 2002; Lira-Saldivar, 2007; Giménez, 2007).

Los bioplaguicidas de origen botánico y fúngico, así como, los agentes de biocontrol post cosecha, representan una alternativa de bajo impacto ambiental para el control de plagas con una alta seguridad alimentaria. Las plantas y los hongos endófitos son una fuente potencial de bioplaguicidas ya que han evolucionado su metabolismo para defenderse de los herbívoros y/o hongos patógenos y por tanto su estudio químico biodirigido, para la obtención de los metabolitos de interés representa un paso adelante en el desarrollo de este tipo de productos (González-Coloma, 2002; Lira-Saldivar, 2007; Giménez, 2007).

5. Hongos

Los hongos pertenecen al dominio Eukarya (**Figura 1**) (Madigan *et al.*, 2009), son quimiorganótrofos, típicamente con requerimientos nutricionales simples y la mayoría son aerobios. Los hongos se alimentan por secreción de enzimas extracelulares que digieren materiales orgánicos complejos, tales como

polisacáridos o proteínas, en azúcares y péptidos, respectivamente. Los aminoácidos también son asimilados como fuente de carbono y energía.

Como parásitos de plantas y animales, los hongos usan la misma forma de nutrición pero toman nutrientes de las células de las plantas y animales que invaden (Madigan *et al.*, 2009).

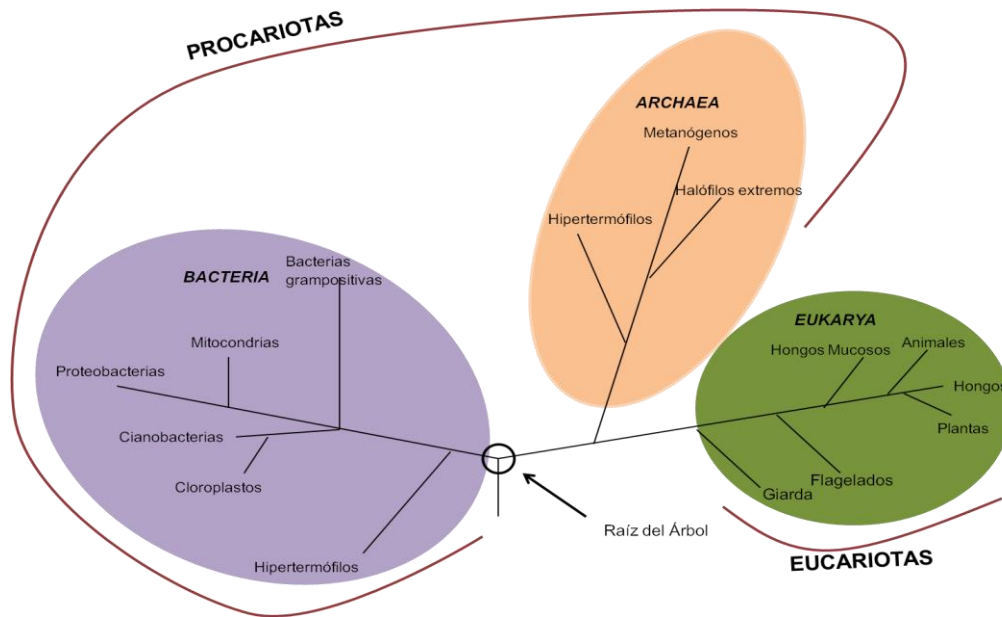


Figura 1. Árbol filogenético de los seres vivos deducido de la secuenciación comparativa del gen del RNA ribosómico (Modificado de Madigan *et al.*, 2009).

La morfología de los hongos es variada, desde organismos microscópicos unicelulares, como levaduras, y multicelulares filamentosas, como los mohos hasta formas macroscópicas como las setas. En el caso de los hongos filamentosos, las células forman estructuras microscópicas tubulares denominadas hifas que son paredes tabicadas alrededor de una membrana citoplásmica. Las hifas con frecuencia son septadas, sin embargo, en algunos casos la célula puede no tener la formación de tabiques generando hifas cenocíticas. Las hifas pueden presentar pigmentación por la presencia de melanina (dematiáceas). El conjunto de hifas, forman el micelio que puede observarse a simple vista (Bonifaz, 2012; Mier *et al.*, 2013; Villanueva-Silva, 2014). La mayoría de los hongos filamentosos

se reproducen principalmente de modo asexual mediante crecimiento y elongación de hifas, y mediante la producción de conidios (Maheshwari, 2005; Bonifaz, 2012). Algunos hongos, realizan reproducción sexual mediante la fusión de gametos unicelulares o por la fusión de hifas, produciendo como resultado esporas (Maczulak, 2011; Madigan *et al.*, 2009; Villanueva-Silva, 2014).

6. Hongos endófitos

Los hongos endófitos son microorganismos que viven dentro de los tejidos de la planta huésped sin causar daño aparente de enfermedad o que muestren cualquier signo de su existencia en la planta. Los hongos endófitos son un grupo polifilético de muy diversos hongos, en su mayoría pertenecen a los ascomicetos y el resto a los basidiomicetos (Rai *et al.*, 2014).

En general, se han reconocido dos principales grupos de hongos endófitos: los Clavicipitáceos que infectan pastos y los no Clavicipitáceos que provienen de plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas. Sin embargo, los no Clavicipitáceos se dividen en tres grupos, basados en su historia de vida (hospederos, tejido que colonizan, colonización, transmisión) y por su función ecológica (Rodríguez *et al.*, 2009; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013) (**Cuadro 1**).

Los endófitos residen en los tejidos entre las células de las plantas, formando una relación mutuamente beneficiosa con la planta huésped. Este tipo de relación puede referirse como el mutualismo o simbiosis. De esta forma, los endófitos podrían contribuir a la protección incrementando los mecanismos de defensa intrínseco del huésped y proporcionando fuentes adicionales de defensa extrínseca a la de la planta huésped (Rai *et al.*, 2014).

Los endófitos tienen la capacidad de mostrar amplia diversidad química, su metabolismo secundario incluye, alcaloides, péptidos, esteroides terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides y lignanos, fenoles, ácidos fenólicos,

compuestos alifáticos, lactonas y otros, convirtiéndolos en una importante y novedosa fuente de compuestos bioactivos (Rai *et al.*, 2014).

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

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

7. Competencia entre hongos

La competencia entre hongos es comúnmente considerada por macroecólogos como competencia por interferencia cuando un organismo inhibe al otro, por ejemplo, inhibición por producción de alelopáticos, y competencia por explotación: esta ocurre cuando un organismo usa los recursos (nutrientes) y disminuye la disponibilidad de estos para el otro organismo (Boddy, 2000).

Los mecanismos combativos incluyen antagonismo a distancia, la interferencia de hifas, micoparasitismo y el contacto directo del micelio (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Mecanismos combativos de los endófitos en interacción antagónica (Boddy, 2000; Cao *et al.*, 2009).

Mecanismos combativos			
Antagonismo a distancia	Interferencia hifal	Micoparasitismo	Contacto micelial directo
<p>Los antagonismos a distancia son atribuidos a compuestos difusibles o a compuestos volátiles. Las reacciones dependen de las especies en competencia. Esto sugiere un intercambio recíproco de señales químicas y el reconocimiento a distancia. En agar la inhibición mutua tiene que ser de 15 mm o más.</p>	<p>Esto sucede cuando una hifa hace contacto con otra o con una espora, resultando en la muerte del competidor por destrucción citoplásmica, esto es debido a una toxina no enzimática que se produce cuando las hifas están en estrecha proximidad. Sin embargo, existen algunos hongos que la producen en la ausencia y en la presencia de las hifas del competidor.</p>	<p>Los micoparásitos producen enzimas que degradan la pared celular de su competidor y de esta forma hacen agujeros en otros hongos y extraen los nutrientes para su propio crecimiento.</p>	<p>Comúnmente el micelio tiene cambios morfológicos durante la interacción. Se vuelve más abundante impidiendo la invasión, o la densidad disminuye dejando un espacio que lo hace más susceptible a una invasión. En general, los cambios no son evidentes en todo el morfo tipo de la colonia. Son observados solo en una parte del competidor (la zona de interacción).</p>

8. Control biológico

El control biológico de plagas, enfermedades y malezas, se refiere al uso de 'enemigos naturales' incluyendo insectos y microorganismos para el control de las poblaciones indeseables (Lira–Saldivar, 2007).

En este contexto, los endófitos producen una amplia gama de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) con diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas que los hacen útiles en la industria, y en la agricultura como agentes de biocontrol post cosecha donde los VOCs producidos inhiben o matan a los patógenos más comunes en la post cosecha (Gabler *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010; Zhi-Lin *et al.*, 2012), como *Botrytis cinerea* (moho gris en uvas y fresas), *Penicillium expansum* (moho azul en peras y manzanas), *Sclerotinia sclerotiorum* (moho blanco en frijol, tomate lechuga, apio) y *Monilinia fruticola* (podredumbre parda en durazno) (Camp *et al.*, 2008).

Así por ejemplo, *Oxyporus latemarginatus* produce VOCs con actividad antifúngica contra *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Lee *et al.*, 2009). *Muscodor* sp. es efectivo en la reducción del crecimiento de los fitopatógenos *Monilina frutícola*, *Physalospora pyricola*, *Phytophthora capsici*, *Thilletia caries*, *Rhizoctonia solani* y *Phytium ultimum* (Camp *et al.*, 2008; Mercier y Jiménez, 2009; Worapong y Strobel, 2009; Goates y Mercier, 2011; Zhi-Lin *et al.*, 2012).

De igual forma, para el control de enfermedades post cosecha se emplean microorganismos antagonistas que inhiben el crecimiento del micelio de varios fitopatógenos. En este sentido, los endófitos *Cylindrocarpon* sp., *S. elegans*, y *C. aboriginum* aislados de la caña, penetran las hifas de los hongos patógenos mediante la producción de enzimas líticas, que son la clave en la lisis de la pared celular de los hongos fitopatógenos: *Phytium aphanidermatum* y *Rhizoctonia*

solani causantes de *Damping off* en frijol, tomate, cebada, algodón y papa etc. (Cao *et al.*, 2009).

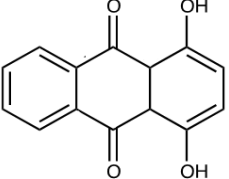
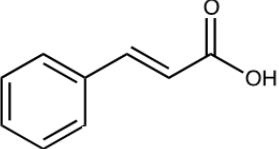
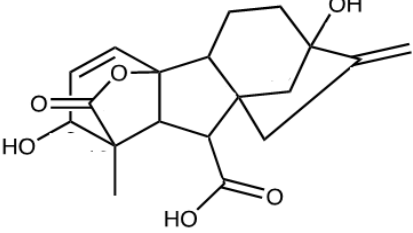
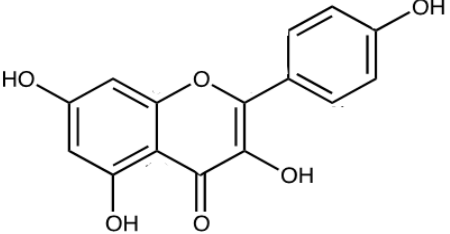
9. Metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos

Los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos, una vez aislados y caracterizados, pueden tener potencial para su uso en la agricultura, en la medicina moderna y en la industria (Sánchez-Fernández *et al.*, 2010). Se ha descrito que los hongos endófitos pueden sintetizar metabolitos similares o incluso más activos que los producidos por sus anfitriones como es el caso de *Curcuma wenyuin* (Curcumina) (Jvfen *et al.*, 2014) y *Taxus brevifolia* (Taxol) (Strobel y Daisy, 2003).

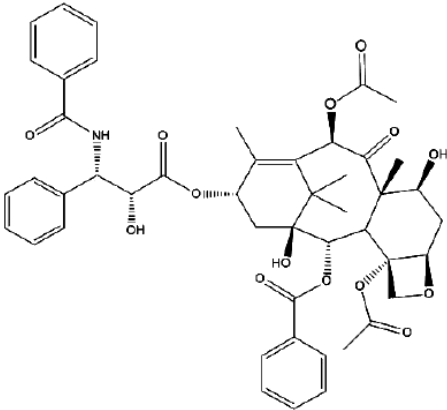
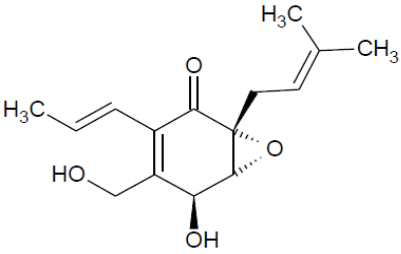
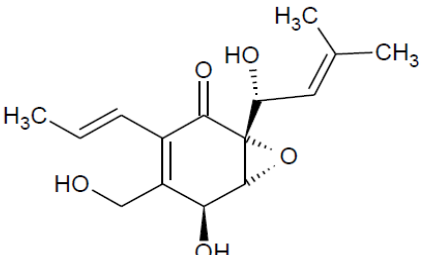
Muchos de los compuestos producidos por los endófitos presentan propiedades aleloquímicas por lo que pueden afectar a microorganismos, plantas, algas, hongos, patógenos, insectos y nematodos, entre otros. Su modo de acción involucra la afección de diversos procesos simultáneamente, a nivel celular, fitohormonal, membranal, en la obtención de nutrientes, apertura de los estomas, fotosíntesis, respiración, hasta la inhibición de los microorganismos del suelo (Reigosa, 1999; Sánchez–Fernández, 2010).

En el **Cuadro 3** se describen ejemplos de metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos, así como su actividad biológica.

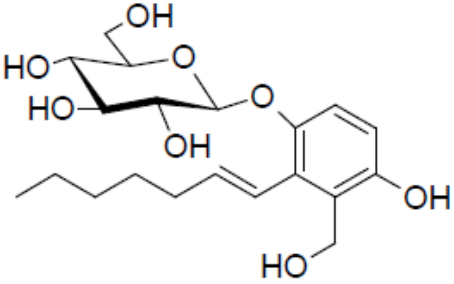
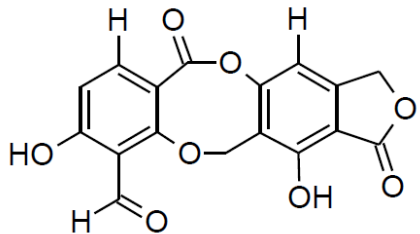
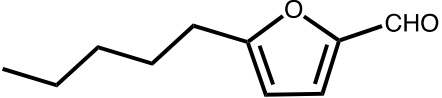
Cuadro 3. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos.

Hongo endófito y planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Gibberella fujikuroi</i></p> <p>Endófito de</p> <p><i>Curcuma wenyujin</i></p> <p>(Jvfen <i>et al.</i>, 2014)</p>	 <p>1,4 dihidroxi antroquinona</p>	<p>Antibacteriano, anticancerígeno</p>
	 <p>Ácido cinámico</p>	<p>Antioxidante y antibacteriano</p>
	 <p>Ácido giberelico</p>	<p>Auxiliar en la regulación de los procesos fisiológicos de la planta</p>
	 <p>Kaempferol</p>	<p>Antifúngico, anticancerígeno</p>

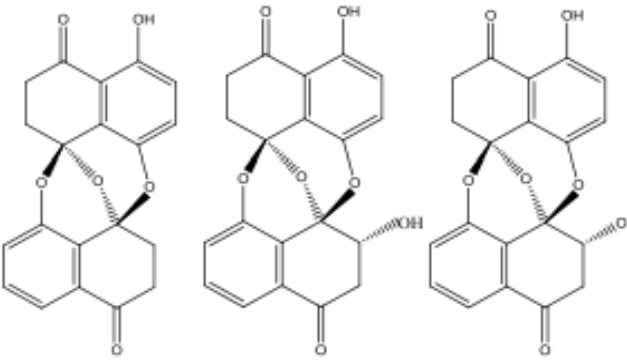
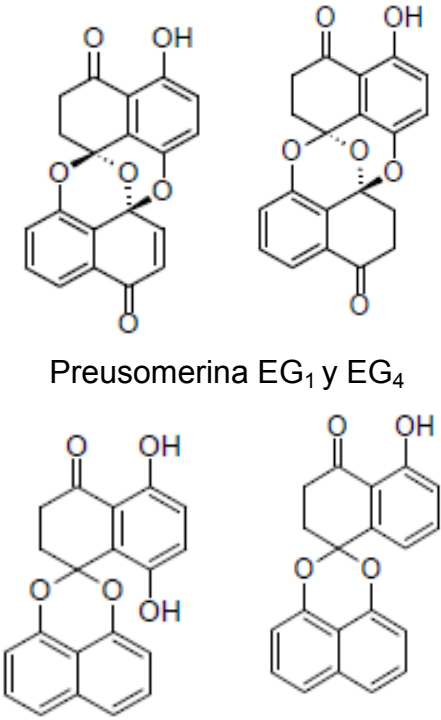
Cuadro 3. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

Hongo endófito y planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Taxomyces andreanae</i> Endófito de <i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae) (Stierle y Strobel, 1995)</p>	 <p style="text-align: center;">Taxol</p>	<p style="text-align: center;">Anticáncerigeno</p>
<p><i>Pestalotiopsis Jesteri</i> (Amphisphaeriaceae) Endófito de <i>Fragraeae bodenii</i> (Gentianaceae) (Li y Strobel, 2001)</p>	 <p style="text-align: center;">Jesterona</p>  <p style="text-align: center;">Hidroxi-jesterona</p>	<p style="text-align: center;">Antioomiceto</p>

Cuadro 3. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

Hongo endófito y planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Pestalotiopsis microspora</i> Endófito de <i>Torreya taxifolia</i> (Strobel <i>et al.</i>, 2004; Tan y Zou, 2001)</p>	 <p>Pestalósida</p>	<p>Antifúngico y fitotóxico</p>
<p><i>Cordyceps Dipterigen</i> F0307 Endófito de <i>Desmotes incomparabilis</i> (Varughese <i>et al.</i>, 2013)</p>	 <p>Cordicepsidona A</p>	<p>Antifúngico</p>
<p><i>Oxyporus latemarginatus</i> EF069 Endófito de <i>Capsicum annum</i> L. (pimienta roja) (Lee <i>et al.</i>, 2009)</p>	 <p>5-pentil-2-furaldehído</p>	<p>Antifúngico</p>

Cuadro 3. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

Hongo endófito y planta hospedera	Metabolitos secundarios / estructura química	Actividad biológica
<p><i>Edenia gomezpompae</i> Endófito de <i>Callicarpa acuminata</i> (Macias-Rubalcava, 2008; 2014)</p>	 <p>Preusomerina EG₁ , EG₂ y EG₃</p>	Antifúngico
	 <p>Preusomerina EG₁ y EG₄</p> <p>Palmarumicinas CP₁₇ y CP₂</p>	Herbicida

III. Hipótesis

Los hongos endófitos producen metabolitos secundarios que evitan o disminuyen la herbivoría, la susceptibilidad a patógenos y a la tensión ambiental de su hospedera. Por lo tanto, al aislar y purificar hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* y cultivarlos en condiciones óptimas, se permitirá la obtención de metabolitos secundarios bioactivos que podrían presentar actividad antifúngica y/o fitotóxica.

IV. Objetivos

1. Objetivos generales

Establecer las características macro y microscópicas de 19 hongos endófitos y 4 fitopatógenos aislados a partir de hojas de *Haematoxylon brasiletto*, colectada en una zona de alta biodiversidad, y establecer el potencial antifúngico y fitotóxico a nivel de extractos orgánicos y fracciones primarias del medio de cultivo y micelio, evaluando su actividad biológica sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura y sobre el crecimiento de especies vegetales, con la finalidad de evidenciar la presencia de metabolitos secundarios con potencial antifúngico y/o herbicida, que puedan contribuir al desarrollo de nuevos agroquímicos de origen natural, que sean eficaces y puedan tener menor impacto ambiental o bien proponer algún microorganismo endófito como agente de control biológico.

2. Objetivos particulares

- ∅ Realizar el análisis detallado de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *H. brasiletto*, y establecer en lo posible el género de cada microorganismo.
- ∅ Determinar la tasa de crecimiento de los hongos puros en estudio empleando cultivos en medio papa-dextrosa-agar (PDA).
- ∅ Cultivar en pequeña escala los hongos endófitos y fitopatógenos empleando medio arroz y obtener los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio mediante un proceso de maceración exhaustivo con diclorometano y acetato de etilo.

- ⊗ Realizar el fraccionamiento primario de los extractos orgánicos obtenidos de los cultivos en pequeña escala, mediante un proceso de reparto exhaustivo entre hexano y metanol.
- ⊗ Determinar cuantitativamente de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos y de las fracciones metanólicas y hexánicas derivadas de los cultivos en pequeña escala, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Phythium aphanidermatum*, empleando el método de dilución en agar.
- ⊗ Evaluar el potencial fitotóxico de las fracciones metanólicas y hexánicas de los extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala, sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las plántulas *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*.
- ⊗ Cultivar en mediana escala los hongos endófitos y fitopatógenos con mayor actividad antifúngica y/o herbicida, empleando arroz como medio de crecimiento.
- ⊗ Obtener los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los cultivos en mediana escala, mediante un proceso de maceración exhaustivo con hexano y diclorometano. Verificar la actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos orgánicos resultantes.
- ⊗ Determinar las concentraciones inhibitorias medias de los extractos de diclorometano derivados de los cultivos en mediana escala, sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de prueba.

- ⊗ Establecer las concentraciones inhibitorias medias de los extractos de diclorometano derivados de los cultivos en mediana escala, sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba.

- ⊗ Establecer el potencial antagónico de los hongos endófitos productores de metabolitos secundarios con la mayor actividad antifúngica, mediante bioensayos de antagonismo directo múltiple entre hongos de *H. brasiletto* y fitopatógenos de importancia en la agricultura: *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. ultimum*, con el fin proponer especies fúngicas útiles como agentes de control biológico.

V. Materiales y métodos

1. Material fúngico

1.1 Hongos endófitos y fitopatógenos

Se emplearon un total de 19 aislamientos de hongos endófitos, aislados a partir de hojas sanas de *H. brasiletto* y 4 aislamientos de hongos fitopatógenos obtenidos a partir de hojas que mostraban síntomas de enfermedad. Las hojas fueron colectadas en Septiembre del 2010 en una zona de alta biodiversidad, la Reserva de la biosfera de Huautla (REBIOSH) ubicada en el municipio de Quilamula, Estado de Morelos, México.

1.2 Microorganismos de prueba

Se emplearon cinco fitopatógenos de importancia económica en la agricultura, los hongos *A. alternata* y *F. oxysporum* (Eumycota); y los oomicetos *P. capsici*, *P. ultimum* y *P. aphanidermatum* (Oomycota). Las cepas fueron donadas por la Dra. Olga Gómez y la M. en C. Bertha Tlalpal Bolaños del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

2. Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos aislados de la planta *H. brasiletto*

Las características macro y microscópicas de cada hongo endófito y fitopatógeno en estudio se establecieron a partir de cultivos en PDA preparados con 200 gramos de papas frescas previamente peladas y cortadas en cubos pequeños se hirvieron durante 20 min. La decocción resultante se filtró a través de gasa, y se agregaron 20 g de dextrosa, 15 g de agar y agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL. El medio de cultivo se homogenizó totalmente y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Ulloa y Hanlin, 1978, Sandoval-Espinosa,

2014). A continuación, se vertieron 20 mL de PDA en cajas de Petri de 10 cm. Las cajas se sembraron por triplicado con un inóculo de 5 mm de diámetro, hecho con un sacabocado estéril, del micelio de cada uno de los hongos en estudio. Los inóculos se colocaron en el centro de las cajas, y se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodo 12:12 h luz fluorescente-obscuridad.

Las características macroscópicas, se observaron periódicamente, hasta que los microorganismos crecieron al límite de las cajas de Petri, empleando un microscopio estereoscópico marca Motic, registrándose las características del micelio: color en la parte superior (anverso) y posterior (reverso), textura, consistencia y tipo de crecimiento, así como, la presencia de estructuras de reproducción. También se verificó la producción de exudado y la difusión en el medio de cultivo de pigmentos coloridos (posibles metabolitos secundarios); (Armendáriz-Guillén, 2013; Sandoval-Espinosa, 2014).

Para establecer la tasa de crecimiento de los hongos puros, fue necesario registrar diariamente el crecimiento radial o irregular de las tres réplicas de cada endófito y fitopatógeno, hasta llegar al límite de la caja Petri. Esta información fue analizada por medio de escaneo de imágenes con ayuda del escáner CI 202 (Área Meter) permitiendo obtener el crecimiento en cm^2 por día. Las curvas de crecimiento se construyeron graficando el área en cm^2 vs tiempo en días, donde la pendiente indica la tasa de crecimiento. Por último, se obtuvieron fotografías de los hongos endófitos y fitopatógenos a diferentes tiempos de crecimiento.

Las características microscópicas se establecieron a partir de tinciones frescas realizadas a partir de microcultivos en PDA, los cuales permitieron el crecimiento del micelio sobre un portaobjetos. Las preparaciones se tiñeron con rojo congo y azul de lactofenol. Las estructuras fueron apreciadas con ayuda de un microscopio óptico a 40x, marca Motic, (modelo BA410), registrándose el tipo de micelio (septado o cenocítico), estructuras reproductivas (esporangióforos, conidióforos, basidióforos, ascas) y/o esporas observadas (Sánchez-Fernández, 2010;

Armendáriz-Guillén, 2013; Sandoval-Espinosa, 2014). Finalmente, se obtuvieron diversas fotografías de las estructuras observadas, empleando una cámara digital, Moticam 2000 de 2.0 (Digital microscopy).

3. Cultivos en medio arroz

Los cultivos en pequeña escala se realizaron utilizando matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 50 gramos de arroz y 87 mL de agua destilada. El arroz se remojó durante una hora en agua destilada. Posteriormente, se filtró a través de gasa y se agregaron 87 mL de agua destilada. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. A continuación, los matraces se inocularon con 5 cortes circulares del micelio de cada hongo endófito y Fitopatógeno, previamente incubado por 10 días en PDA, hechos con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro, y se incubaron en condiciones estáticas durante 30 días a temperatura ambiente con fotoperíodos 12:12 h luz fluorescente-obscuridad (Aly *et al.*, 2008; Sandoval-Espinosa, 2014).

Los cultivos en mediana escala se realizaron utilizando matraces Fernbach de 3000 mL conteniendo 300 gramos de arroz y 300 mL de agua destilada. El medio arroz, se preparó siguiendo la metodología indicada para los cultivos en pequeña escala. Los matraces se inocularon con 10 cortes circulares del micelio de cada hongo endófito y fitopatógeno, previamente incubado por 10 días en PDA, hechos con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro, y se cultivaron durante 30 días a temperatura ambiente con fotoperíodos 12:12 h luz fluorescente-obscuridad.

4. Obtención de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio

Transcurrido el periodo de incubación, los cultivos a pequeña escala se sometieron a un proceso de maceración exhaustiva, realizando una extracción por día con diclorometano (CH₂Cl₂), y posteriormente, este procedimiento se repitió con acetato de etilo (AcOEt). Los extractos obtenidos se filtraron con papel filtro y

sulfato de sodio anhidro para retirar el agua presente. Finalmente, los extractos orgánicos se concentraron al vacío mediante el uso de un rotaevaporador (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Sandoval-Espinosa, 2014)

Los extractos orgánicos derivados de los cultivos en mediana escala se obtuvieron utilizando la técnica indicada anteriormente, modificando únicamente los disolventes de extracción. El proceso de maceración exhaustiva, se llevó a cabo por cinco días, realizando una extracción por día con hexano, y posteriormente, cinco veces más con CH₂Cl₂-MeOH en una proporción 9:1.

5. Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala

El fraccionamiento primario de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña escala, se llevó a cabo mediante un proceso de reparto empleando hexano y metanol. Los extractos orgánicos se disolvieron en 10 mL de metanol y el proceso de partición se realizó 4 veces consecutivas con 10 mL de hexano. Las fracciones resultantes se unieron, y se concentraron al vacío mediante el uso de un rotavapor. Este procedimiento permitió obtener una fracción de naturaleza polar (metanólica) y una no polar (hexánica) para cada extracto fúngico. Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF).

6. Determinación del potencial antifúngico

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico de extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala, así como de las fracciones primarias obtenidas, se realizó mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, dos hongos: *F. oxysporum*, y *A. alternata* (Eumycota), y dos oomicetos: *P. capsici* y *P. aphanidermatum* (Oomycota), utilizando el método de dilución en agar.

Los bioensayos se realizaron en cajas Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar las muestras se pesaron 20 mg de cada extracto y se disolvieron en metanol (100-300 μ L). A continuación, se adicionaron 40 mL de agua destilada estéril y 40 mL de PDA (2%) para obtener una concentración final de 250 μ g/L. En cada caja Petri se colocaron 5 mL de la disolución y se dejaron solidificar (\sim 40 $^{\circ}$ C). En seguida, se colocó en el centro de cada caja un inóculo de 5 mm de diámetro, del micelio del microorganismo de prueba, previamente incubado por 8 días en PDA. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las cajas Petri se incubaron de 2 a 4 días, dependiendo del microorganismo de prueba a 28 $^{\circ}$ C con fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad 12:12 h (2 días para los oomicetos y 4 para los hongos verdaderos). Paralelamente, se realizaron controles negativos PDA-agua (1%) y PDA-metanol (1%) (300 μ L), y como control positivo se utilizaron el fungicida comercial Prozicar® 50 P.H (Carbendazim: metilbencimidazol-2-il carbamato) a una concentración de 250 μ g/mL para hongos verdaderos y el Ridomil Gold 4E® (Metalaxil-m) para oomicetos a la misma concentración (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; Sandoval-Espinosa, 2014; Meléndez-González, 2015).

Para establecer las concentraciones inhibitoria medias (CI_{50}) de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en mediana escala, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, se diseñó una curva de concentración vs respuesta (efecto antifúngico) de cada uno de los extractos a partir del porcentaje de inhibición provocado a 250 μ g/mL. Se emplearon cuatro concentraciones por extracto activo. Las concentraciones evaluadas fueron en el rango de 25-1000 μ g/mL. Asimismo, se utilizaron Prozicar® y Ridomil Gold 4E® como controles positivos, en un rango de concentración de 5-250 μ g/mL, para ambos casos. Como controles negativos se emplearon los indicados anteriormente.

Al finalizar el período de incubación se realizaron dos mediciones perpendiculares del diámetro de los micelios de cada uno de los hongos 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 HDS (utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0) (Armendáriz-Guillén, 2013; Macías-Rubalcava *et al.*, 2014; Sandoval-Espinosa, 2014; Mélenlez-González, 2015).

7. Determinación del potencial fitotóxico

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña y mediana escala, así como de las fracciones primarias obtenidas, se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación, la longitud de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las plántulas de *A. hypochondriacus* (Amaranthaceae) [Amaranto] y *S. lycopersicum*, (Solanaceae) [jitomate], utilizando el método de dilución en agar (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; 2014). Las semillas de *A. hypochondriacus* se compraron en el mercado de Tulyehualco México, D.F. y las de *S. lycopersicum* se adquirieron en “semillas Berentsen”, Celaya, Guanajuato, México. Estas especies son plantas modelo ampliamente utilizadas para establecer de manera preliminar el efecto fitotóxico de extractos orgánicos, fracciones y compuestos puros, son especies que presentan alta viabilidad y rápida germinación (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; 2014; Sandoval-Espinosa; 2014).

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar las muestras se pesaron 4 mg de extracto orgánico y se disolvieron en metanol (100-300 μ L). Posteriormente, se agregaron 20 mL de agua destilada y 20 mL de agar al 2%, obteniéndose una concentración final de 100 μ g/mL. A continuación, 5 mL de las disoluciones se vertieron en las cajas de Petri y se dejaron solidificar por completo (~ 40 °C). En seguida, se colocaron 30 semillas por caja, de cada una de las especies de prueba. Paralelamente, se evaluaron los controles positivos y negativos. Como control negativo se usó agar-agua al 1% y agar-metanol al 1%-

metanol (100-300 μL) y como controles positivo se utilizaron los herbicidas comerciales RIVAL® (glifosato: sal monoamónica de *N*-(fosfonometil) glicina) 100,125,350, 750 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado bajo un diseño completamente al azar.

Las cajas de Petri se incubaron en la oscuridad a 27 °C y la actividad fitotóxica se registró contando el número de semillas germinadas y midiendo la longitud de la raíz después de 24 h para el caso de *A. hypochondriacus*, y 72 h para *S. lycopersicum*. Finalmente, se evaluó el efecto sobre la respiración durante el proceso de germinación de las plántulas de *A. hypochondriacus*, y *S. lycopersicum*, mediante el registro del consumo de oxígeno utilizando un electrodo de Clark tipo O₂ conectado a un oxímetro YSI ® modelo 5300 a 27 °C. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las plántulas de cada una de las cajas de Petri se transfirieron a una celda de vidrio, y se adicionaron 5 mL de agua desionizada. El consumo de oxígeno se registró cada 5 segundos durante 3 minutos (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; 2014). El análisis mediante regresión lineal simple de cada una de las curvas permitió determinar cuantitativamente el oxígeno consumido por las plántulas de cada una de las semillas de prueba (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; 2014).

Para establecer las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en median escala, sobre la respiración, la germinación y el crecimiento de la raíz de las dos semillas blanco, se diseñó una curva de concentración vs respuesta (efecto fitotóxico) de cada uno de los extractos a partir el porcentaje de inhibición provocado a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se emplearon cuatro concentraciones por extracto activo. Las concentraciones evaluadas fueron en el rango de 25-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se utilizó RIVAL® como control positivo a las concentraciones de 125, 350, 750 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y hexazinona (3-ciclohexil-6-(dimetilamino)-1-metil-1,3,5 triazina-2,4-(1H,3H)-diona) a 25, 50, 100, 200 mg/L. Como controles negativos se emplearon agar-agua al 1% y agar-metanol (100-300 μL) al 1%.

Los resultados de germinación, crecimiento de raíz y consumo de oxígeno, se analizaron mediante ANOVA de una vía, modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; 2014; Zar, 2010; Espinosa-Sandoval, 2014).

8. Bioensayo de antagonismo directo múltiple entre hongos de *H. brasiletto* y fitopatógenos de importancia en la agricultura

Los bioensayos de antagonismo directo múltiple se realizaron utilizando los hongos endófitos y fitopatógenos de *H. brasiletto* que presentaron mayor potencial antifúngico y/o fitotóxico frente a los microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba.

Los microorganismos competidores se inocularon de acuerdo a sus tasas de crecimiento, empleando cajas Petri de vidrio estériles de 15 cm de diámetro, conteniendo 50 mL de PDA. Cada microorganismo de prueba se sembró utilizando inóculos de 5 mm de diámetro, de los micelios de los hongos previamente incubados en PDA por aproximadamente 10 días. Los inóculos se colocaron equidistantes distribuyéndolos de forma lineal como se muestra en la **Figura 2**. Los hongos endófitos al presentar una tasa de crecimiento menor que los fitopatógenos de prueba, se inocularon entre 5 y 8 días antes que sus competidores fitopatógenos. Los hongos competidores *F. oxysporum*, *A. alternata*, y los oomicetos *P. capsici* y *P. ultimum* se inocularon cuando el endófito de prueba mostraba un diámetro de aproximadamente 3 cm. De manera paralela se realizaron controles de crecimiento incubando los fitopatógenos en el orden mostrado en la **Figura 2** sin la presencia del endófito.

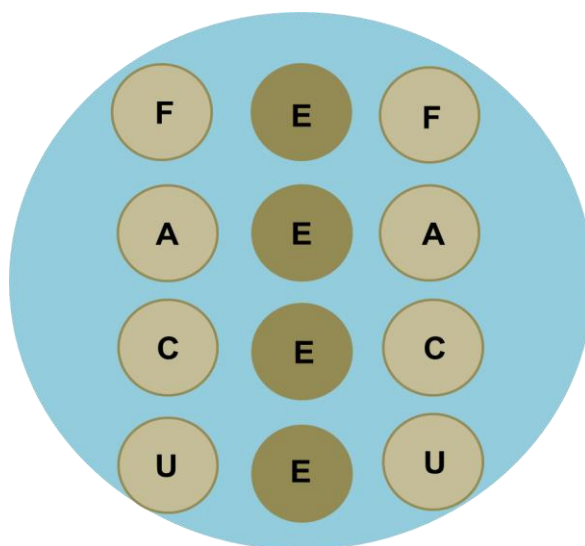


Figura 2. Bioensayo de antagonismo directo múltiple en caja Petri entre los hongos endófitos de *H. brasiletto* y los microorganismos fitopatógenos de importancia económica en la agricultura. **E:** endófito. **F:** *F. oxysporum*, **A:** *A. alternata* **C:** *P. capsici* y **U:** *P. ultimum*.

Las cajas de Petri se incubaron a temperatura ambiente con fotoperíodo de luz fluorescente-obscuridad 12:12 h. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Todo el procedimiento experimental se efectuó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar vertical.

Los resultados de crecimiento e interacción macroscópica entre los microorganismos, se registraron e interpretaron a partir de las primeras interacciones micelio-micelio entre el hongo endófito con algún o algunos de los fitopatógenos de importancia agrícola, o bien al observar a distancia la disminución del crecimiento del micelio de alguno de los fitopatógenos de prueba, estableciéndose como día uno de observación, y en general, se concluyó al día 12 de interacción antagónica. A lo largo del bioensayo se tomaron fotografías para evidenciar el antagonismo.

Los resultados de crecimiento se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento de los diferentes competidores, comparando el crecimiento de los microorganismos con respecto a los controles de crecimiento mediante mediciones del diámetro de los micelios de cada uno de los hongos fitopatógenos, y sus respectivas repeticiones.

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis t-Student pareada de dos colas ($\alpha=0.05$) utilizando el programa GraphPad versión 5.0 (Zar, 2010).

El tipo de interacción entre los hongos endófitos de *H. brasiletto* y sus competidores fitopatógenos se realizó de acuerdo con los valores numéricos señalados en el **Cuadro 4**. Una vez asignado un valor se calculó el índice de antagonismo (**IA**) de cada hongo endófito de prueba de la siguiente manera:

$$\mathbf{IA} = A (n \times 0) + A_1 (n \times 0) + B (n \times 1) + B_1 (n \times 2) + C (n \times 2) + C_1 (n \times 2) + D (n \times 3) + E (n \times 4)$$

Donde A, A₁, B, B₁, C, D o E corresponden a la categoría mostrada y *n* es el número de veces que el hongo presentó la categoría de antagonismo correspondiente (A, A₁, B, B₁, C, C₁, D o E) (modificado de Yuen *et al.*, 1999).

Cuadro 4. Tipo de interacciones entre microorganismos y valores numéricos asignados (modificado de Yuen *et al.*, 1999).

Categorías	Tipos de interacción		Puntos
A		El crecimiento de la especie A es inhibido por B.	0
A₁		A y B entremezclan las hifas de su micelio sin que exista reducción en el crecimiento en ninguna de las dos especies.	0
B		La especie A crece en contacto con B y el crecimiento de ambas cesa.	1
B₁		Ambas especies crecen en contacto y cesa el crecimiento de B.	2
C		La especie A forma un halo oscuro al estar en contacto con la especie B.	2
C₁		La especie A forma una barrera miceliar al estar en contacto con la especie B.	2
D		La especie A crece sobre B disminuyendo su crecimiento.	3
E		A inhibe a distancia el crecimiento de la especie B	4

VI. Resultados y discusión

La presente investigación se desarrolló con el propósito de establecer la actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos orgánicos y fracciones primarias derivados del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos asociados a *H. brasiletto* (Fabaceae) una planta colectada en una zona de alta biodiversidad. Así como, establecer el potencial antagónico de los hongos en estudio. Este trabajo pretende contribuir al conocimiento de las complejas relaciones entre las plantas hospederas y los hongos endófitos, y a su vez evidenciar la importancia de los metabolitos secundarios biosintetizados por estos últimos.

Los resultados obtenidos se dividen en siete partes:

La primera comprende la determinación de las características macro y microscópicas de los hongos aislados de *H. brasiletto*. La segunda abarca la obtención de cultivos en pequeña escala de los hongos endófitos y fitopatógenos puros empleando condiciones de incubación estáticas y como medio de cultivo medio arroz; así como la obtención de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio. La tercera se enfoca a la evaluación de la actividad antifúngica sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en la agricultura. La cuarta sección se refiere a la evaluación cuantitativa de los extractos orgánicos y sus fracciones primarias obtenidas, sobre la germinación, crecimiento de la raíz y la respiración en dos semillas de prueba. La quinta, comprende la obtención de 6 cultivos en mediana escala de los hongos cuyos extractos orgánicos obtenidos del cultivo en pequeña escala, presentaron mayor actividad antifúngica y fitotóxica. La sexta etapa, incluye la evaluación biológica de los 6 extractos preseleccionados, cultivados en mediana escala que mostraron mayor potencial antifúngico y fitotóxico empleando cuatro concentraciones de prueba, para determinar la concentración inhibitoria media (CI_{50}) sobre el crecimiento de los cuatro hongos fitopatógenos de importancia económica y de las dos plantas de prueba. Finalmente, la última parte consiste en los estudios de

antagonismo directo entre los hongos endófitos y fitopatógenos de *H. brasiletto* que presentaron mayor potencial antifúngico y/o fitotóxico frente a los microorganismos fitopatógenos de importancia económica en la agricultura.

1. Determinación de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos puros aislados de *H. brasiletto*

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

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

A continuación se describen las características macro y microscópicas más importantes, para cada uno de los hongos puros. Asimismo, se muestran las tasas de crecimiento, las cuales se clasificaron arbitrariamente en 4 categorías: crecimiento lento ($< 1.61 \text{ cm}^2/\text{día}$), moderado ($1.61-2.51 \text{ cm}^2/\text{día}$), rápido ($2.51-3.41 \text{ cm}^2/\text{día}$) y muy rápido ($3.41-5.69 \text{ cm}^2/\text{día}$).

1.1 Hongos endófitos

1.1.1 PBE1

En la **Figura 3 A** se muestra un cultivo de 19 días en PDA del endófito **PBE1**. Se observa la formación de micelio plano inmerso de textura butirecea y algodonoso en el centro, de consistencia suave y bordes filamentosos. En el envés presenta coloración durazno, y no presenta exudado. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $1.84 \text{ cm}^2/\text{día}$.

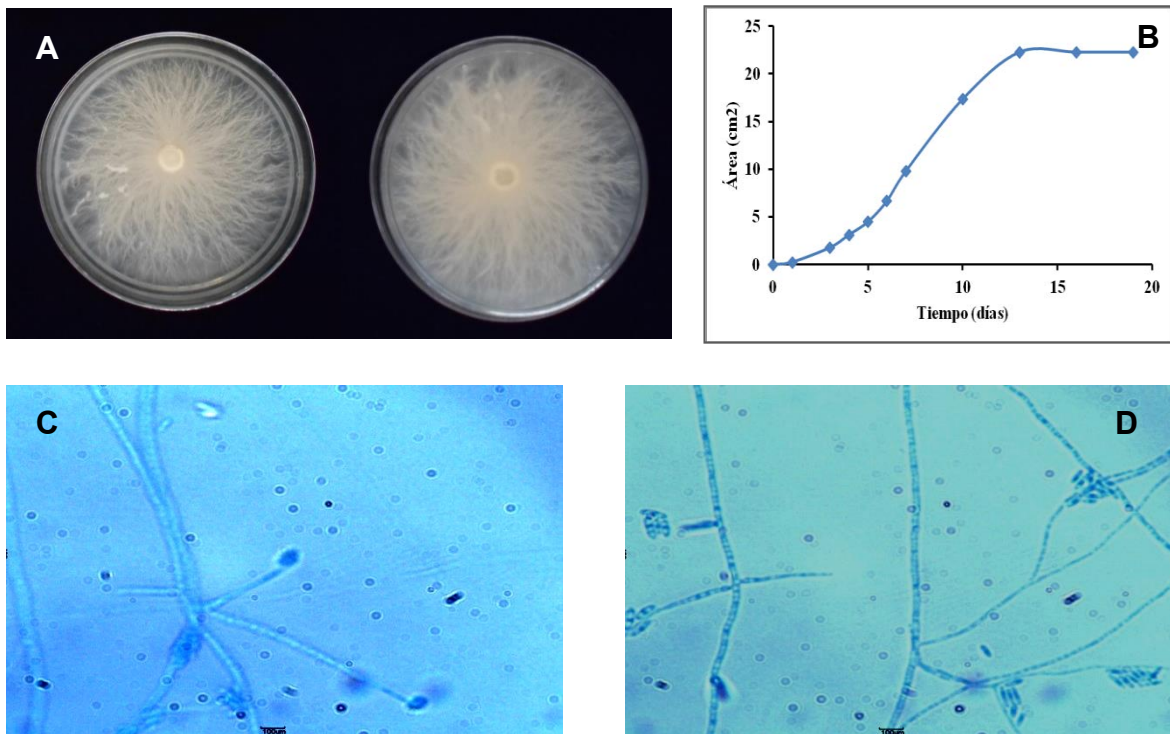


Figura 3. Endófito PBE1. A) Crecimiento de 19 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.

Las **Figuras 3 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito PBE1 en una preparación teñida con azul de lactofenol observada a 40 X. Se aprecian fragmosporas sésiles (Fig. C) e hifas septadas (Fig. D). Las características microscópicas permitieron inferir que este hongo posiblemente pertenece al género *Verticillium* (Dugan, 2006).

1.1.2 PBE2

En la **Figura 4 A** se muestra un cultivo de 18 días en PDA del endófito **PBE2**. Este endófito presenta micelio plano inmerso color púrpura de textura butirecea, en el centro es de color blanco y textura algodonosa, presenta borde liso y consistencia suave. En el envés el micelio presenta coloración púrpura, y no presenta exudado. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $1.63 \text{ cm}^2/\text{ día}$.

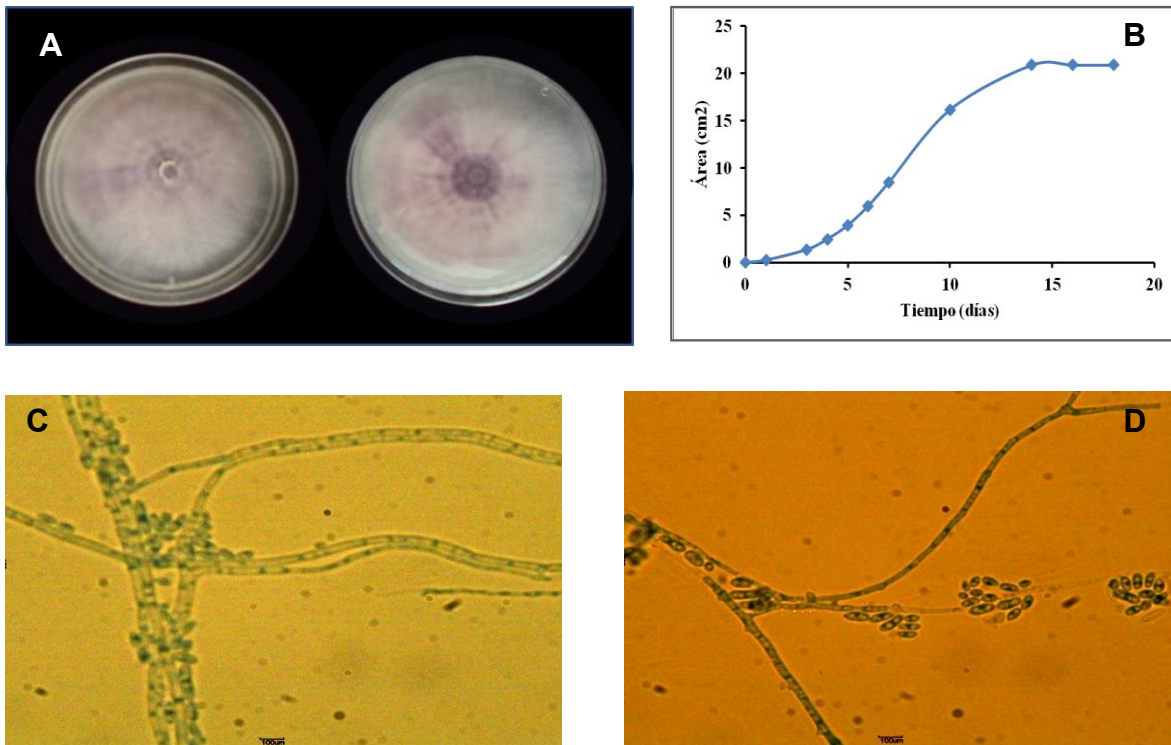


Figura 4. Endófito PBE2. A) Crecimiento de 18 días en medio PDA anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.

En las **Figuras 4 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE2** en una preparación teñida con azul de lactofenol observada a 40 X. Se aprecian hifas septadas hialinas y esporas aisladas. Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción, sin embargo, las características macroscópicas permitieron inferir que este hongo pertenece al género *Fusarium* (Dugan, 2006).

1.1.3 PBE3

En la **Figura 5 A** se muestra un cultivo de 14 días en PDA del endófito **PBE3**. Este microorganismo forma micelio aéreo convexo color blanco-púrpura de textura vellosa y algodonosa, bordes dentados y de consistencia suave, no presenta exudado. El envés del micelio es de coloración púrpura. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $1.82 \text{ cm}^2/\text{día}$.

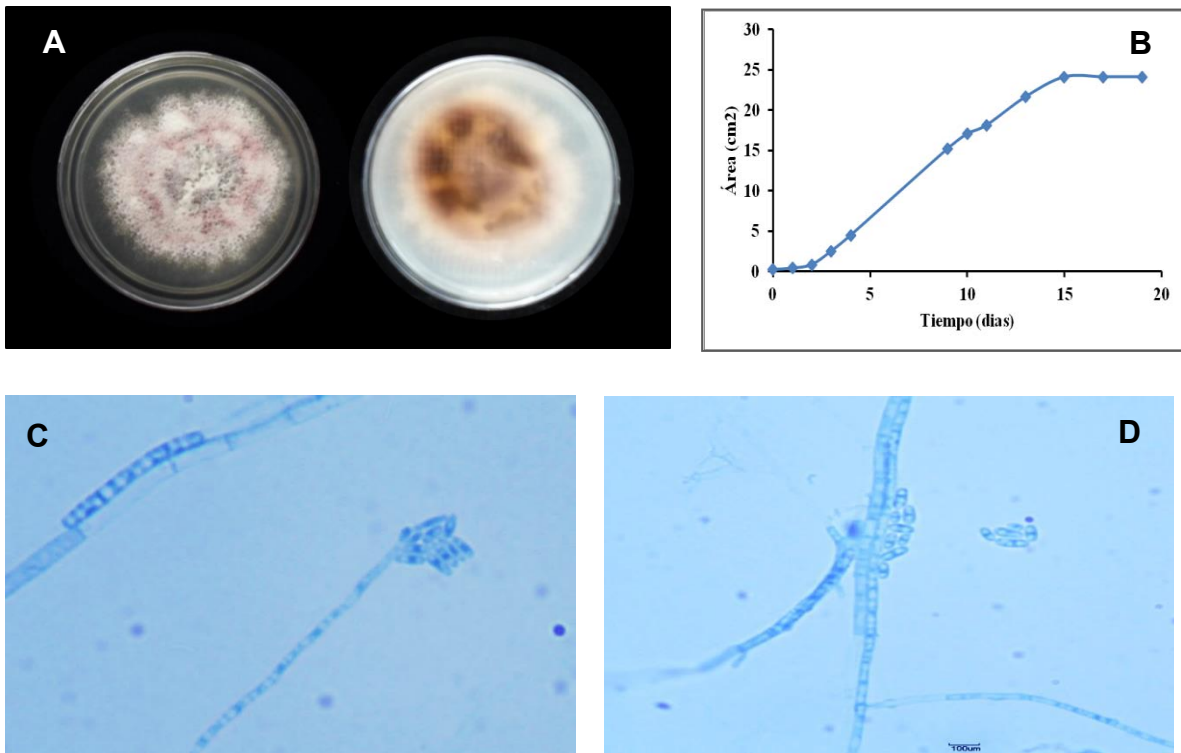


Figura 5. Endófito PBE3. A) Crecimiento de 14 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.

En las **Figuras 5 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito PBE3 en una preparación teñida con azul de lactofenol observada a 40 X. Se aprecian cabezuelas mucosas y didimosporas (Fig. C), e hifas septadas (Fig. D). Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción, sin embargo, las características macroscópicas permitieron inferir que este hongo pertenece al género *Fusarium* (Dugan, 2006).

1.1.4 PBE4

En la **Figura 6 A** se muestra un cultivo de 11 días en PDA del endófito **PBE4**. Este microorganismo forma micelio aéreo plano de color blanco, bordes lisos, de textura vellosa, lanosa y de consistencia suave. No se observa exudado, ni pigmentación del envés de su micelio. Su crecimiento es radial con una tasa de crecimiento de $2.74 \text{ cm}^2/\text{día}$.

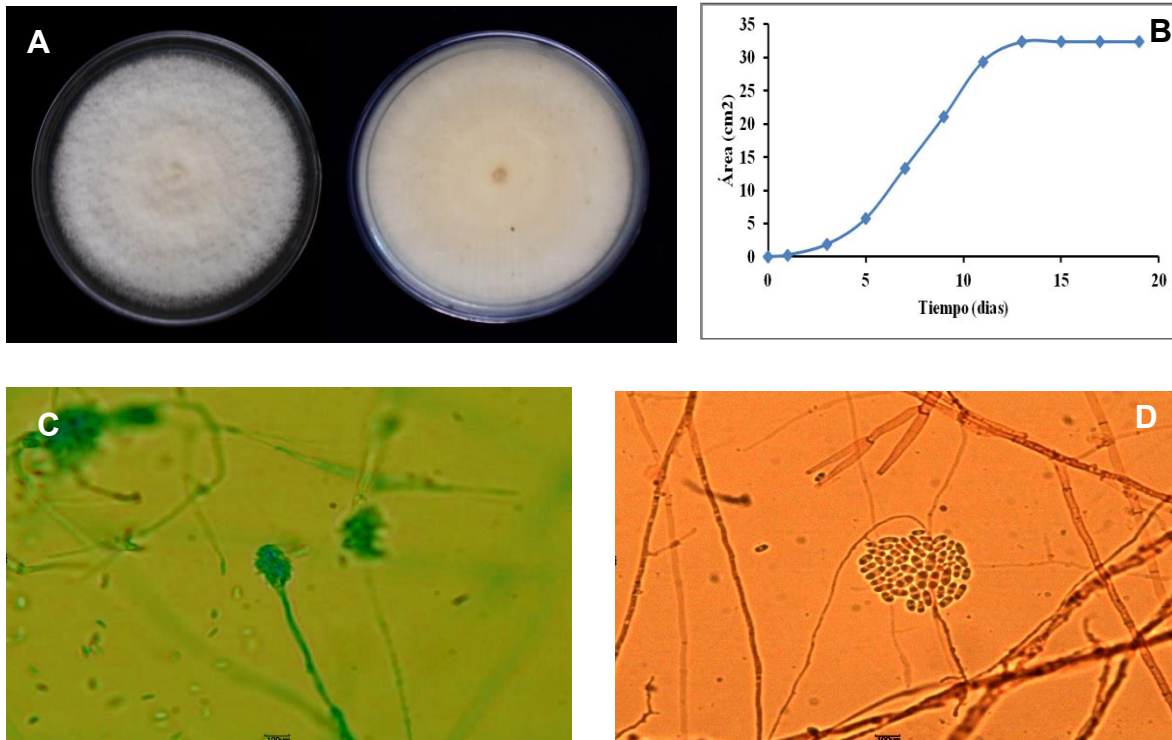


Figura 6. Endófito PBE4. A) Crecimiento de 11 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observaciones microscópicas en 40 X, teñidas con colorante azul de lactofenol y rojo congo, respectivamente.

En las **Figuras 6 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE4** en preparaciones teñidas con rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente observadas a 40 X. Se aprecian conidióforos ramificados (Fig. C y D), hifas septadas y amerosporas dinucleadas (Fig. D). Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.1.5 PBE5

En la **Figura 7 A** se muestra un cultivo de 19 días en PDA del endófito **PBE5**. Este microorganismo forma micelio aéreo vellosito de color blanco bordes dentados y de consistencia suave. No se observa exudado ni pigmentación del envés de la caja. Su crecimiento es irregular con una tasa de crecimiento de $1.19 \text{ cm}^2/\text{día}$.

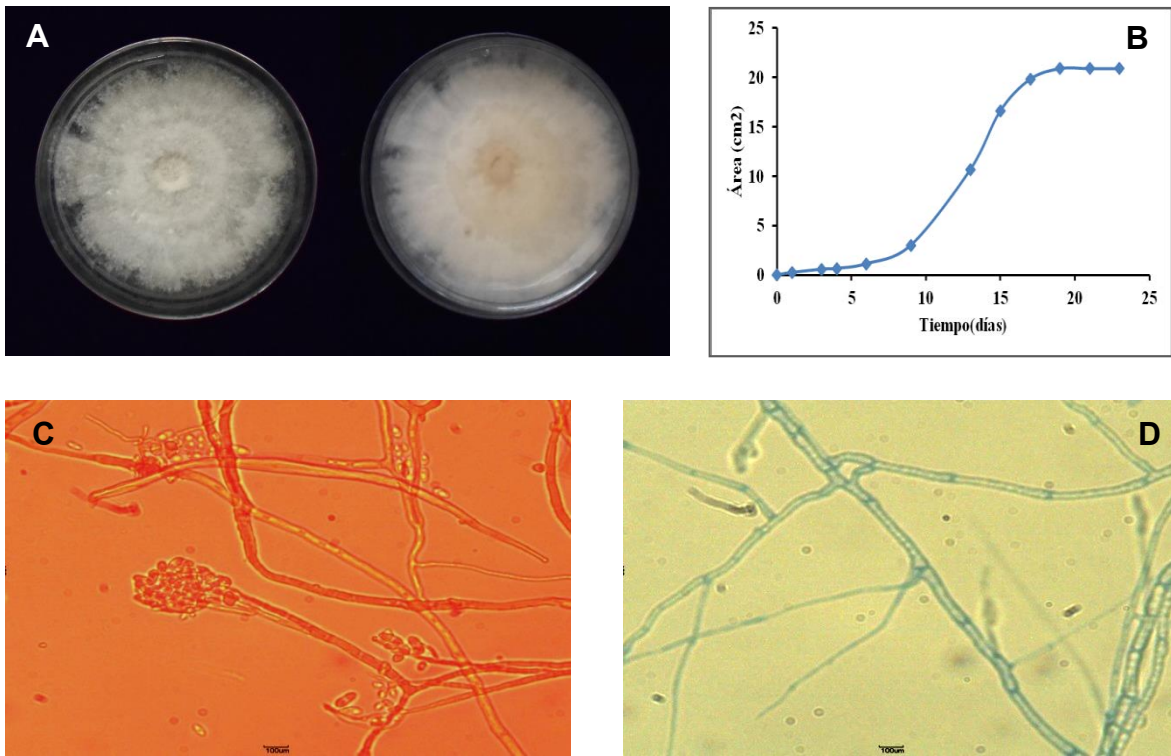


Figura 7. Endófito PBE5. A) Crecimiento de 19 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observaciones microscópicas en 40 X, teñida con colorante rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente.

En las **Figuras 7 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE5** en preparaciones teñidas con rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente, observadas a 40 X. Se aprecian hifas septadas y de diferente grosor, las hifas delgadas provienen de las más gruesas (Fig. C y D). También se observan conidióforos ramificados con amerosporas dinucleadas dispersas (Fig. C). Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.1.6 PBE6

En la **Figura 8 A** se muestra un cultivo de 10 días en PDA del endófito **PBE6**. Se observa la formación de micelio aéreo polvoso de color verde con blanco con bordes ligeramente lobulados y de consistencia dura. No se observa exudado ni pigmentación del envés de la caja. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $0.71 \text{ cm}^2/\text{día}$.

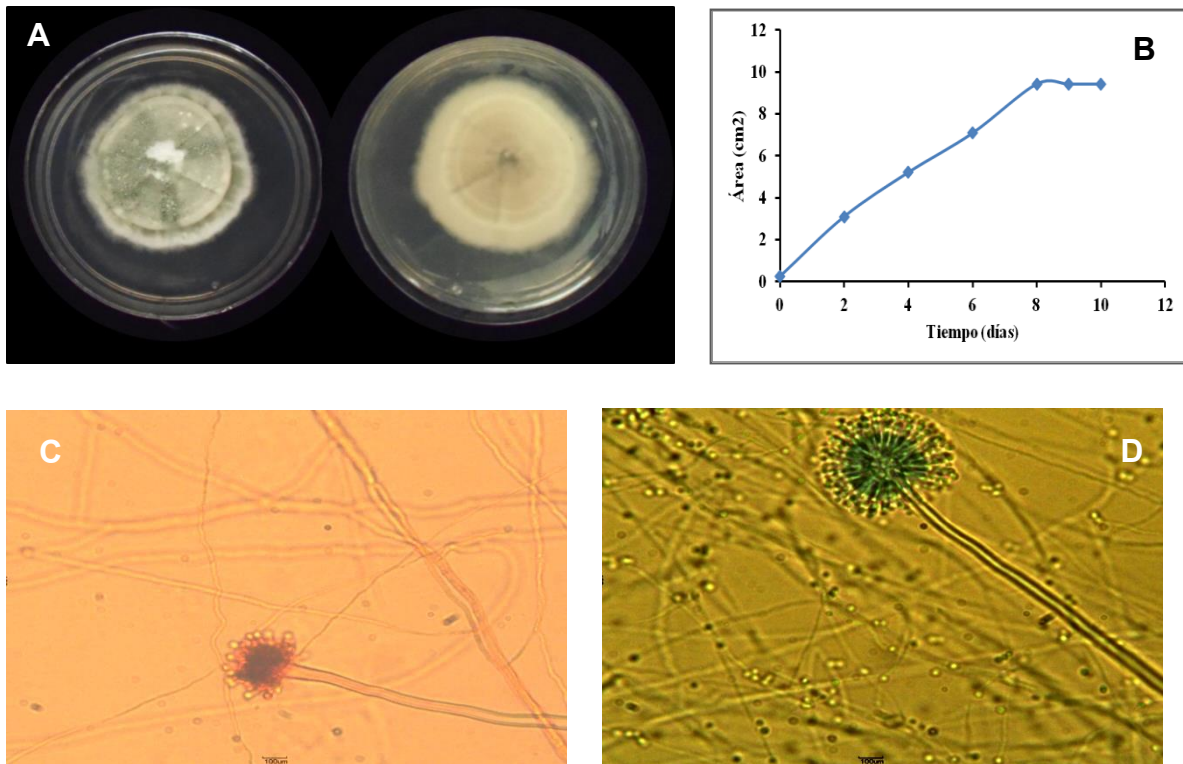


Figura 8. Endófito PBE6. A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol y rojo congo, respectivamente.

En las **Figuras 8 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE6** en preparaciones teñidas con azul de lactofenol y rojo congo, respectivamente, observadas a 40 X. Se aprecian hifas septadas (Fig. C), conidióforos de cabeza y vesículas globosas con fialides (Fig. D). Estas estructuras posiblemente corresponden al género *Aspergillus* (Dugan, 2006).

1.1.7 PBE7

En la **Figura 9 A** se muestra un cultivo de 20 días en PDA del endófito **PBE7**. Este hongo presenta micelio vellosillo lanoso de color blanco, bordes dentados y de consistencia suave. Presenta exudado hialino y pigmentación ligeramente amarilla observable en el envés de la caja. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $1.75 \text{ cm}^2/\text{día}$.

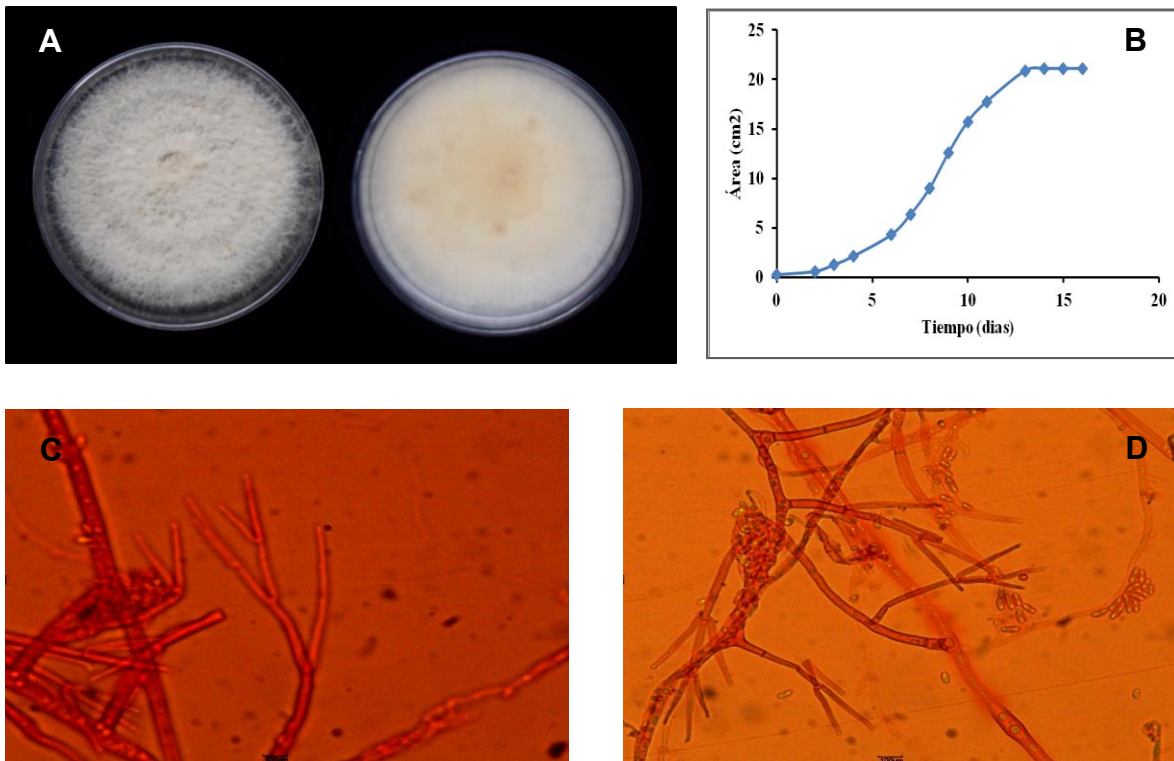


Figura 9. Endófito PBE7. A) Crecimiento de 20 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 9 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito PBE7 en una preparación teñida con rojo congo observada a 40 X. Se aprecian hifas septadas, conidióforos ramificados (Fig. C) y amerosporas dinucleadas dispersas (Fig. D). Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.1.8 PBE8

En la **Figura 10 A** se muestra un cultivo de 21 días en PDA del endófito **PBE8**. Este microorganismo desarrolla micelio aéreo vellosos, umbonado, de color blanco con tonalidades moradas en el centro y con los bordes de color verde, su textura es polvosa y su consistencia dura. Se observa exudado café claro y el envés del micelio es de coloración púrpura anillada. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $1.04 \text{ cm}^2/\text{día}$.

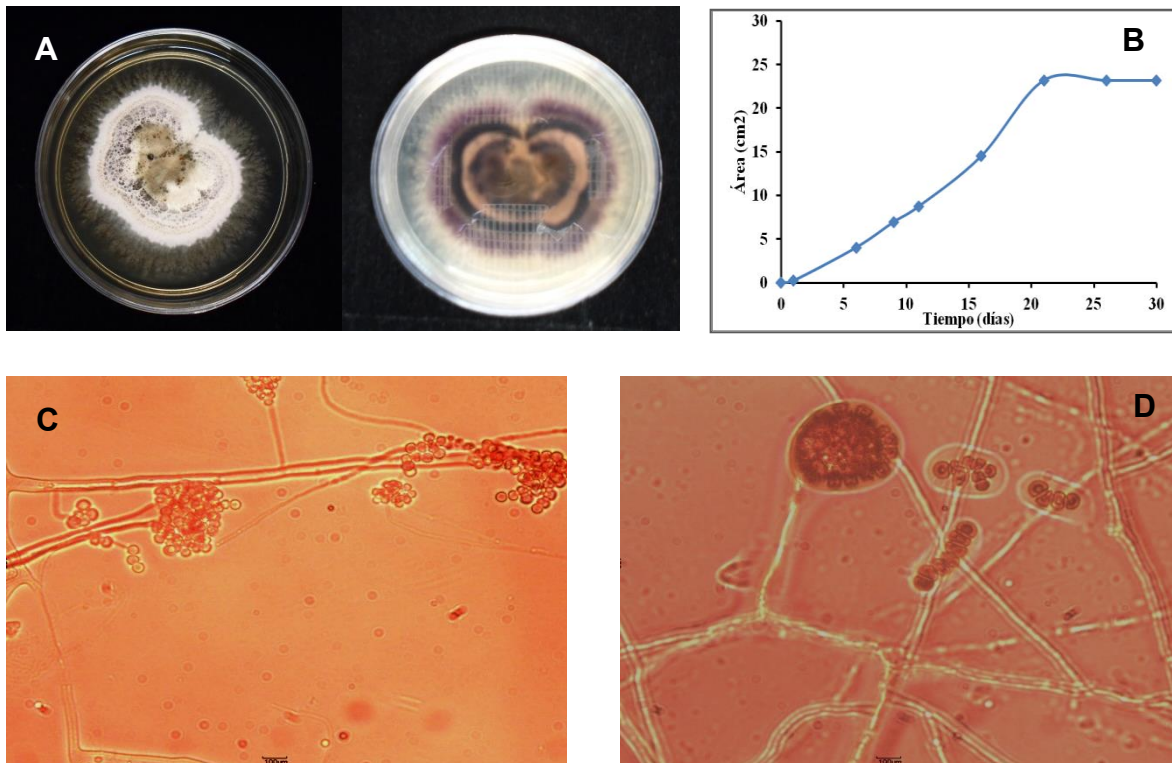


Figura 10. Endófito PBE8. A) Crecimiento de 21 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 10 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito PBE8 en una preparación teñida con rojo congo observada a 40 X. Se observan hifas septadas (Fig. C) y esporangioforos (Fig. C y D). Estas estructuras pertenecen posiblemente al género *Aspergillus* (Dugan, 2006).

1.1.9 PBE9

En la **Figura 11 A** se muestra un cultivo de 10 días en PDA del endófito **PBE9**. Este microorganismo desarrolla micelio plano inmerso de textura butirecea y color púrpura, en los bordes presenta micelio de color blanco y textura vellosa. No se observa exudado, en el envés el micelio se observa también de coloración púrpura. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de 2.5 cm²/día.

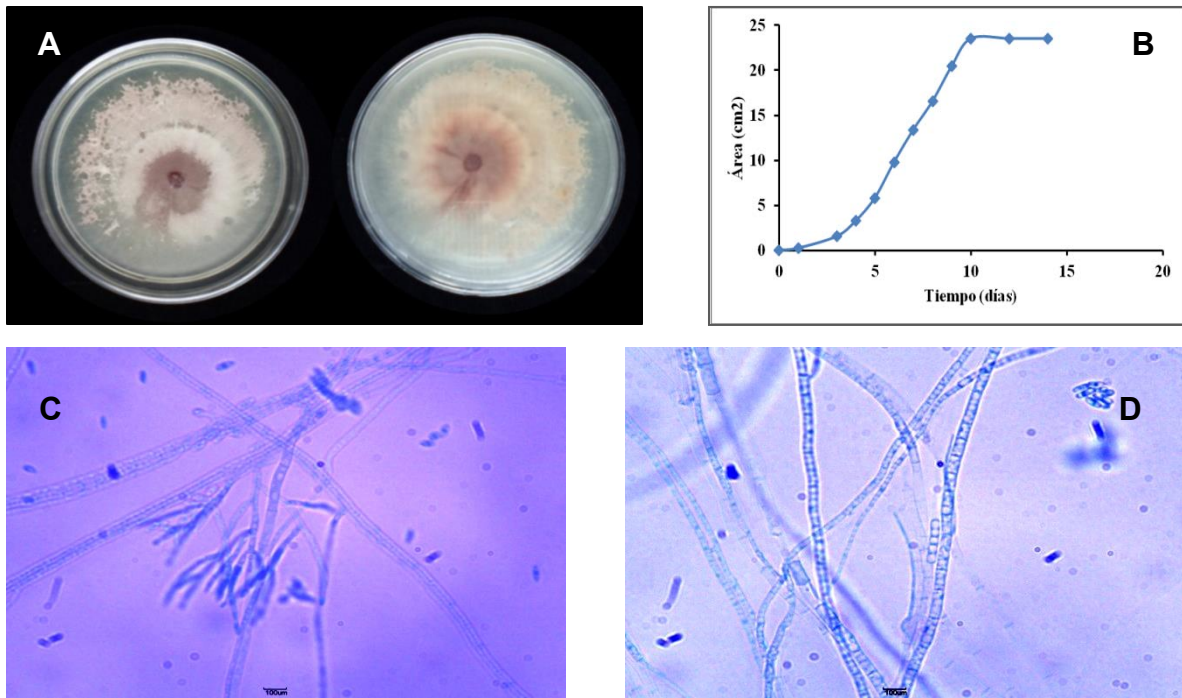


Figura 11. Endófito PBE9. A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.

En las **Figuras 11 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE9** en una preparación teñida con azul de lactofenol observada a 40 X. Se observan conidióforos ramificados (Fig. C), hifas septadas y amesporas dispersas (Fig. D). Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción, sin embargo, las características macroscópicas permitieron inferir que este hongo pertenece posiblemente al género *Fusarium* (Dugan, 2006).

1.1.10 PBE10

En la **Figura 12 A** se muestra un cultivo de 22 días en PDA del endófito **PBE10**. Este microorganismo desarrolla micelio plano, aéreo de color blanco de textura plumosa, bordes lobulados y de consistencia dura. No se observa exudado, en el envés del micelio se observa coloración café en el centro. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $1.12 \text{ cm}^2/\text{día}$

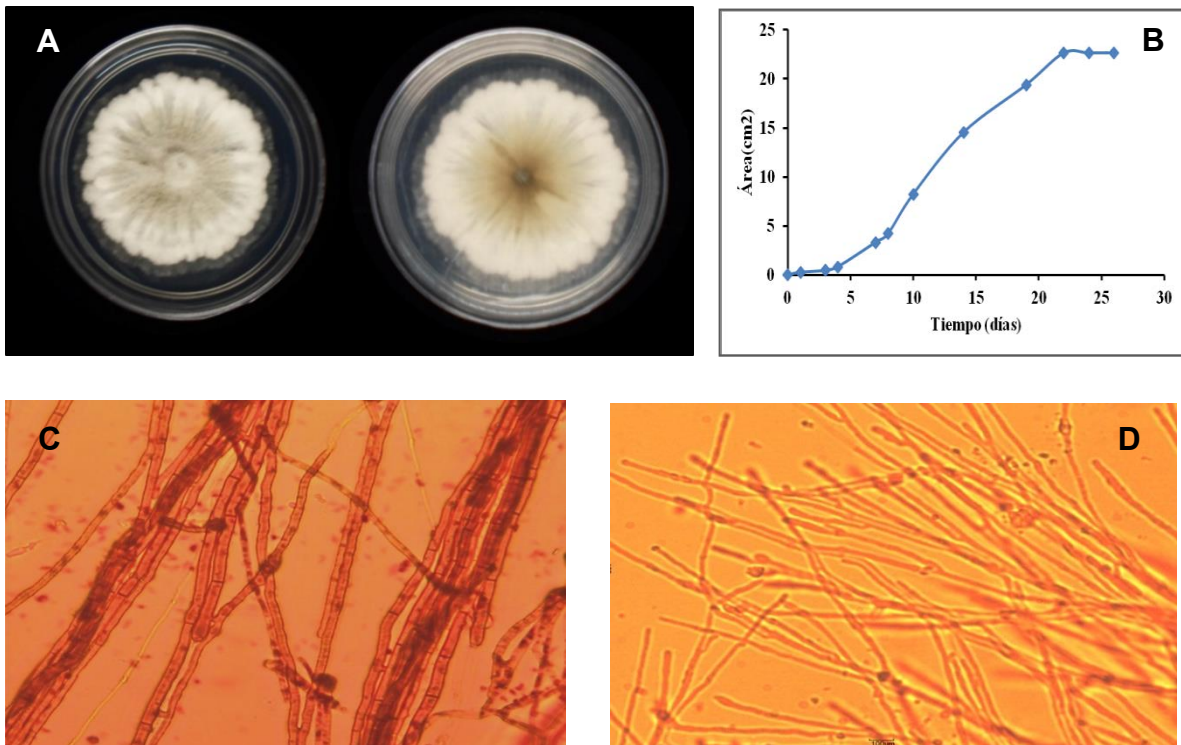


Figura 12. Endófito PBE10. A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 12 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE10** en una preparación teñida con rojo congo observada a 40 X. Se observan conidióforos ramificados e hifas septadas. Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción. Sin embargo, las características macroscópicas permitieron inferir que este hongo pertenece posiblemente al género *Xylaria* (Dugan, 2006).

1.1.11 PBE11

En la **Figura 13 A** se muestra un cultivo de 22 días en PDA del endófito **PBE11**. Este hongo presenta micelio plano aéreo de textura algodonosa y de color blanco, con bordes lisos y consistencia dura. Presenta exudado hialino y no se observa pigmentación en el envés de su micelio. Su crecimiento es radial con una tasa de crecimiento de $1.75 \text{ cm}^2/\text{día}$

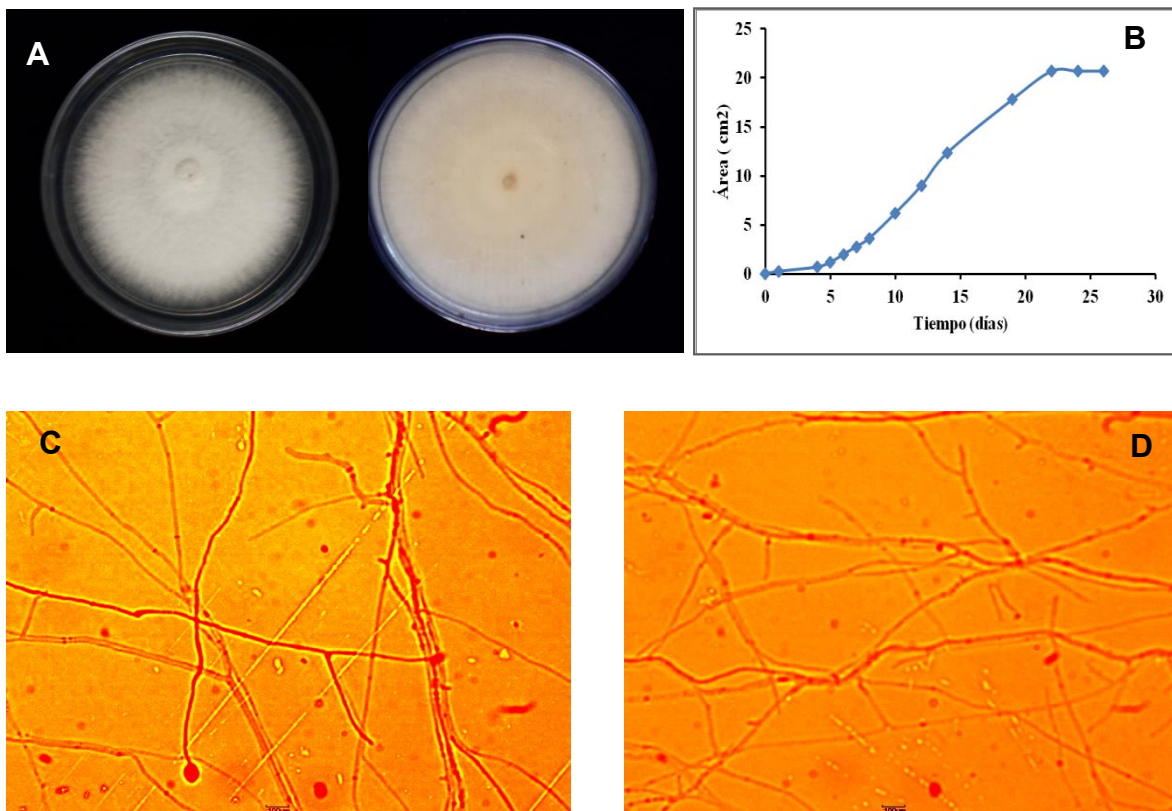


Figura 13. Endófito PBE11. A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 13 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE11** en una preparación teñida con rojo congo observada a 40 X. Se observan conidióforos simples e hifas septadas. Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.1.12 PBE12

En la **Figura 14 A** se muestra un cultivo de 10 días en PDA del endófito **PBE12**. Este hongo presenta micelio aéreo plano, de color blanco, textura vellosa y de consistencia suave. No presenta exudado ni tampoco pigmentación en el envés del micelio. Su crecimiento es radial anillado con una tasa de crecimiento de 2.97 cm²/día.

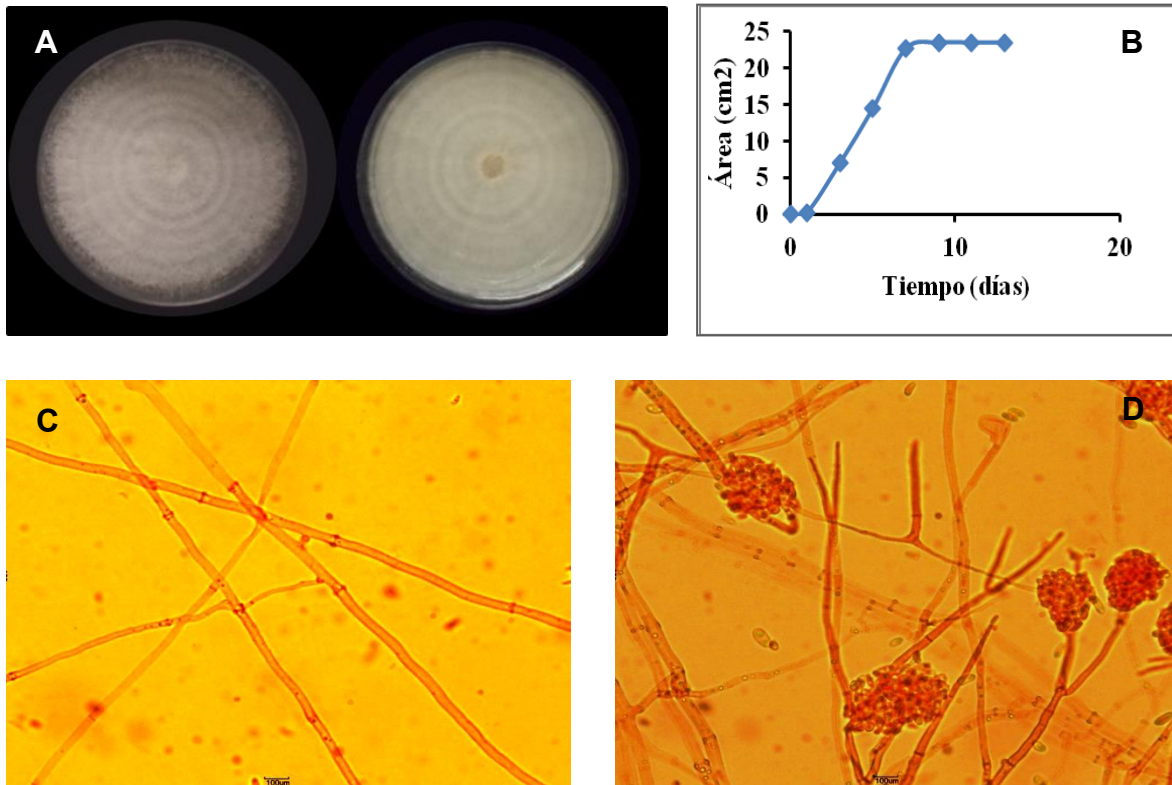


Figura 14. Endófito PBE12 A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 14 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE12** en una preparación teñida con rojo congo observadas a 40 X. Se aprecian hifas septadas (Fig. C), amerosporas y también se observan esporangióforos (Fig. D). Las características macroscópicas permitieron inferir que este hongo pertenece posiblemente al género *Acremonium* (Dugan, 2006).

1.1.13 PBE13

En la **Figura 15 A** se muestra un cultivo de 14 días en PDA del endófito **PBE13**. Este microorganismo desarrolla micelio plano aéreo blanco, presenta consistencia blanda; en la parte posterior es de color blanco amarillento; produce exudado hialino. Su crecimiento es radial lobular con una tasa de crecimiento de 1.60 cm²/día.

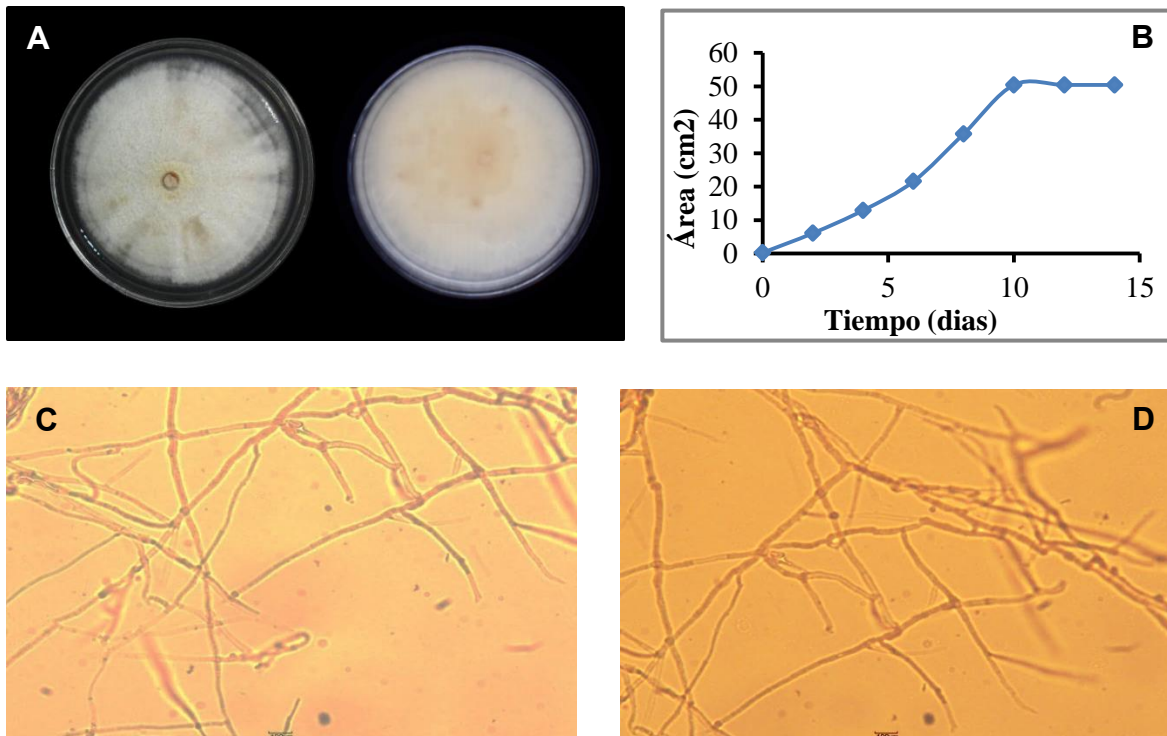


Figura 15. Endófito PBE13. A) Crecimiento de 14 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 15 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE13** en una preparación teñida con rojo congo observadas a 40 X. Se aprecian hifas septadas, sin embargo, bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.1.14 PBE14

En la **Figura 16 A** se muestra un cultivo de 22 días en PDA del hongo endófito **PBE14**. Este endófito presenta micelio plano aéreo, de consistencia dura, textura algodonosa y de color blanco. Presenta exudado hialino y no se observa pigmentación en el envés de su micelio. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $1.70 \text{ cm}^2/\text{día}$.

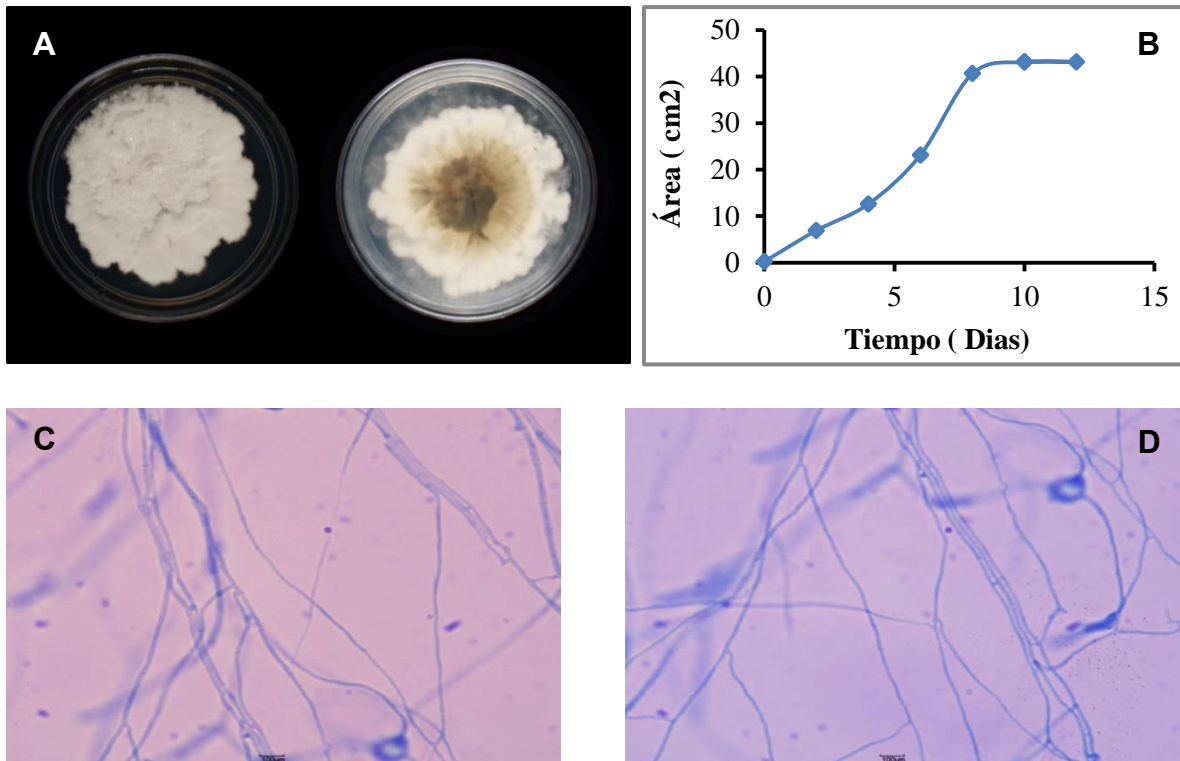


Figura 16. Endófito PBE14 A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.

En las **Figuras 16 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE14** en una preparación teñida con azul de lactofenol observadas a 40 X. Se aprecian hifas septadas. Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.1.15 PBE15

En la **Figura 17 A** se muestra un cultivo de 32 días en PDA del endófito **PBE15**. Este microorganismo desarrolla micelio plano, aéreo blanco, consistencia dura. Se observa producción de exudado hialino, en el envés el micelio se observa coloración amarilla. Su crecimiento es radial con una tasa de crecimiento de 1.14 cm²/día.

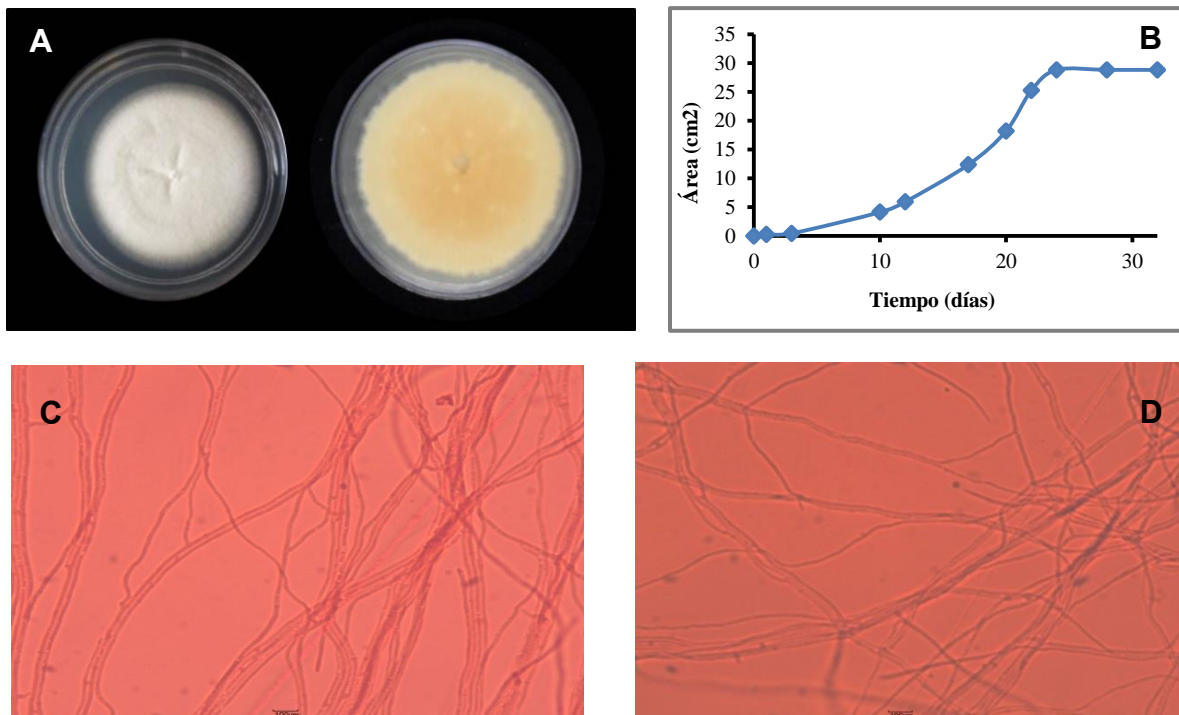


Figura 17. Endófito PBE15. A) Crecimiento de 32 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 17 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE15** en una preparación teñida con rojo congo observadas a 40 X. Se aprecian hifas septadas delgadas. Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.1.16 PBE16

En la **Figura 18 A** se muestra un cultivo de 13 días en PDA del endófito **PBE16**. Se observa la formación de micelio aéreo de color blanco, plano, textura vellosa y consistencia dura. No presenta producción de exudado. Al envejecer, en el envés su micelio presenta una coloración rosa pálido. Su crecimiento es radial con una tasa de crecimiento de $1.65 \text{ cm}^2/\text{día}$.

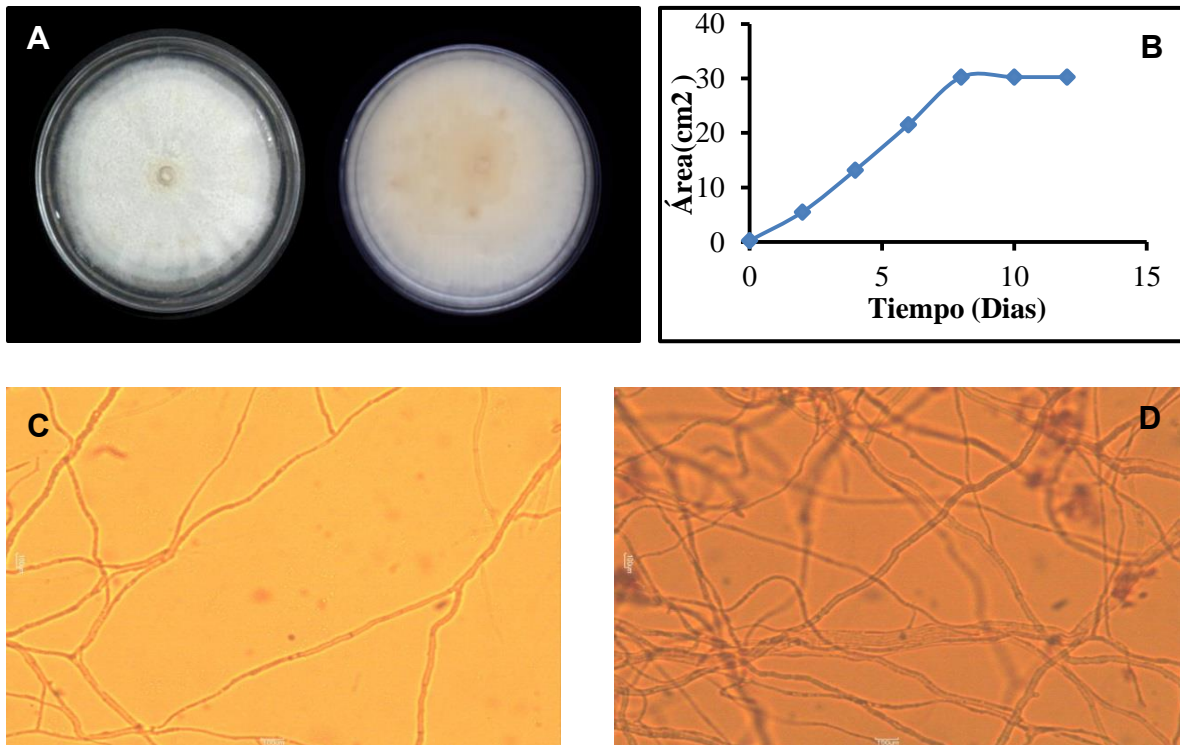


Figura 18. Endófito PBE16. A) Crecimiento de 13 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 18 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE16** en una preparación teñida con rojo congo observadas a 40 X. Bajo estas condiciones no se lograron observar estructuras de reproducción, sin embargo, se aprecian hifas septadas.

1.1.17 PBE17

En la **Figura 19 A** se muestra un cultivo de 22 días en PDA del endófito **PBE17**. Este microorganismo forma micelio plano aéreo, blanco y de consistencia dura; en un inicio es de color blanco y con el paso del tiempo comienza a tornarse color negro. Produce exudado hialino y al envejecer se observa difusión de pigmento color rosa pálido en el medio de cultivo. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $1.70 \text{ cm}^2/\text{día}$.

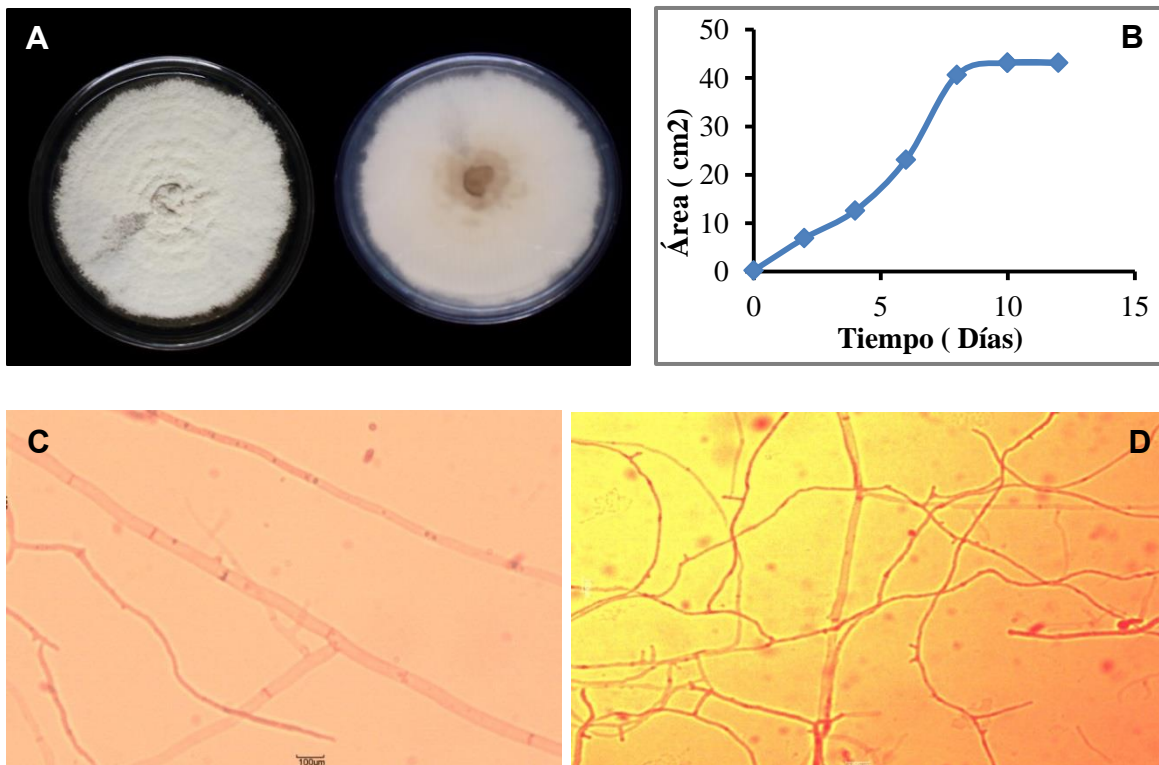


Figura 19. Endófito PBE17. A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 19 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE17** en una preparación teñida con rojo congo observadas a 40 X. Bajo estas condiciones no se lograron observar estructuras de reproducción. Únicamente, se aprecian hifas septadas.

1.1.18 PBE18

En la **Figura 20 A** se muestra un cultivo de 26 días en PDA del endófito **PBE18**. Este microorganismo desarrolla micelio plano aéreo de color blanco y consistencia dura. No se observa exudado, en el envés el micelio es de color amarillo pálido. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $1.50 \text{ cm}^2/\text{día}$.

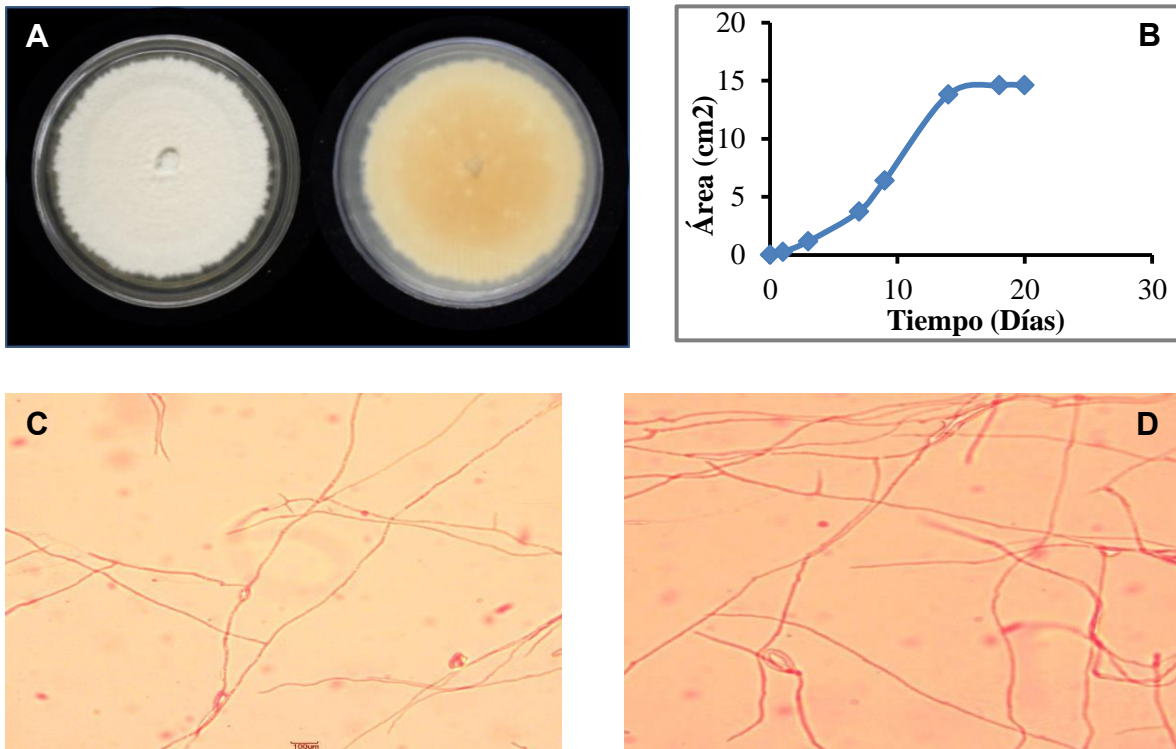


Figura 20. Endófito PBE18. A) Crecimiento de 26 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 20 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito **PBE18** en una preparación teñida con rojo congo observadas a 40 X. Se aprecian hifas delgadas septadas. Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.1.19 PBE19

En la **Figura 21 A** se muestra un cultivo de 10 días en PDA del endófito **PBE19**. Este microorganismo desarrolla micelio aéreo polvoso, plano, color café y de consistencia blanda. Presenta producción de exudado color marrón. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $3.01 \text{ cm}^2/\text{día}$.

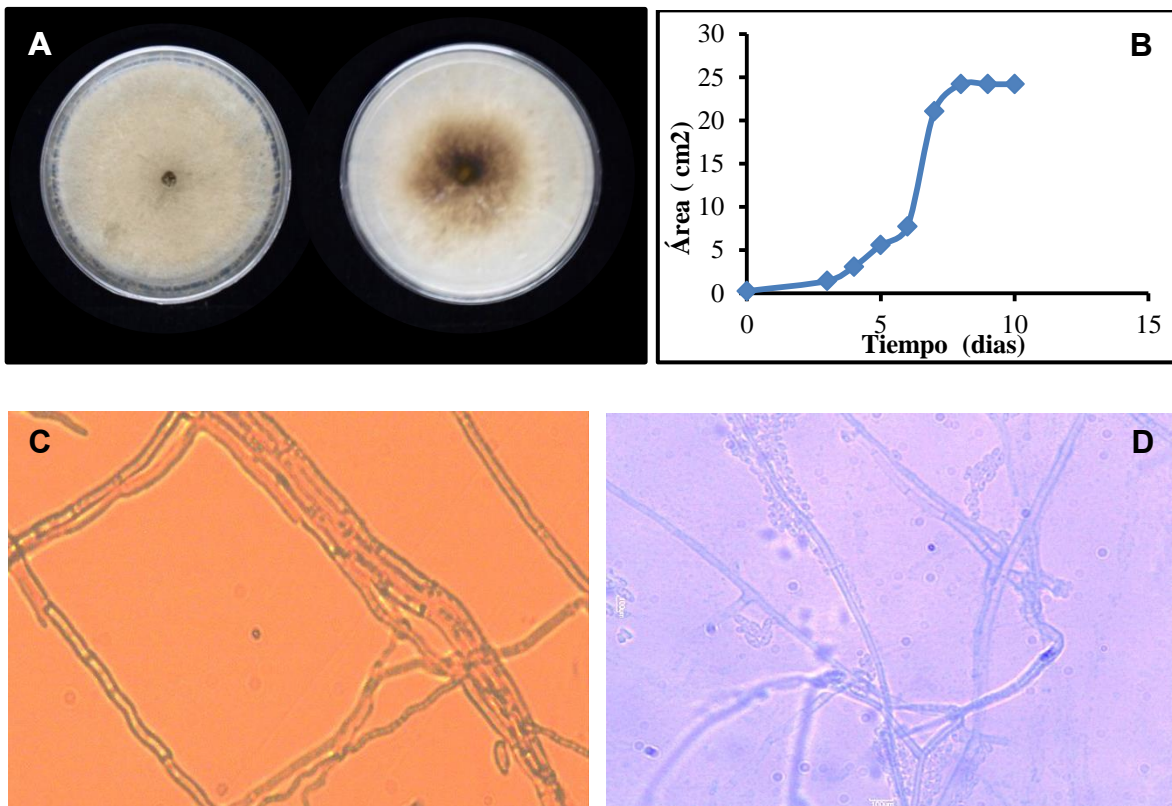


Figura 21. Endófito PBE19. A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo y azul de lactofenol, respectivamente.

En las **Figuras 21 C** y **D** se presentan las estructuras del endófito PBE19 en una preparación teñida con rojo congo y otra teñida con azul de lactofenol, observadas a 40 X. Se aprecian hifas septadas (Fig. C) y amerosporas dinucleadas dispersas (Fig. D). Bajo estas condiciones de cultivo, no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.1.20 PBF1

En la **Figura 22 A** se muestra un cultivo de 15 días en PDA del hongo fitopatógeno **PBF1**. Se observa la formación de micelio aéreo de color blanco, aspecto veloso, borde dentado y de consistencia dura. Presenta producción de exudado color amarillo. En el envés su micelio presenta una coloración amarillo intenso que con el paso de los días se difunde completamente en el medio de cultivo. Su crecimiento es irregular con una tasa de crecimiento de $1.19 \text{ cm}^2/\text{día}$.

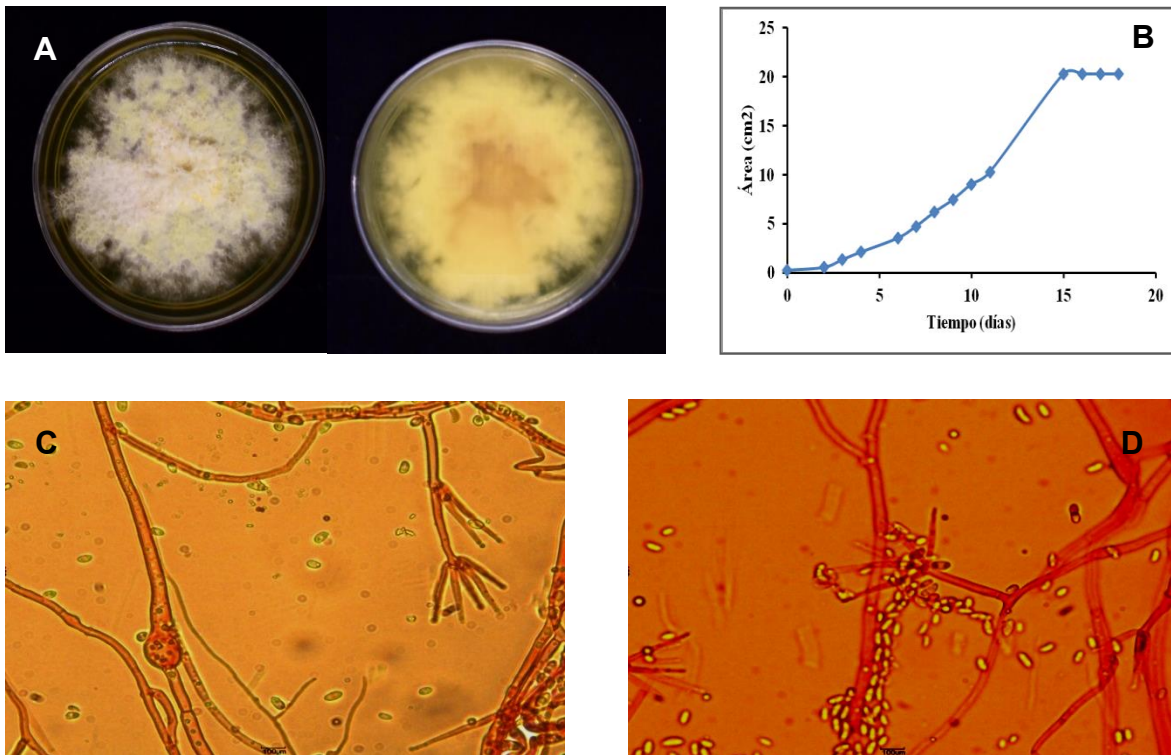


Figura 22. Fitopatógeno PBF1. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 22 C** y **D** se presentan las estructuras del fitopatógeno PBF1 en una preparación teñida con rojo congo observada a 40 X. Se aprecian hifas septadas, conidióforos ramificados (Fig. C) y amerosporas dinucleadas dispersas (Fig. D). Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.1.21 PBF2

En la **Figura 23 A** se muestra un cultivo de 15 días en PDA del fitopatógeno **PBF2**. Este microorganismo forma micelio aéreo, lanoso con bordes dentados y de consistencia suave; en un inicio es de color blanco y durazno en el centro, con el paso del tiempo comienza a tornarse color café. Produce exudado hialino y no se observa difusión de pigmentos en el medio de cultivo. Su crecimiento es irregular con una tasa de crecimiento de $2.12 \text{ cm}^2/\text{día}$.

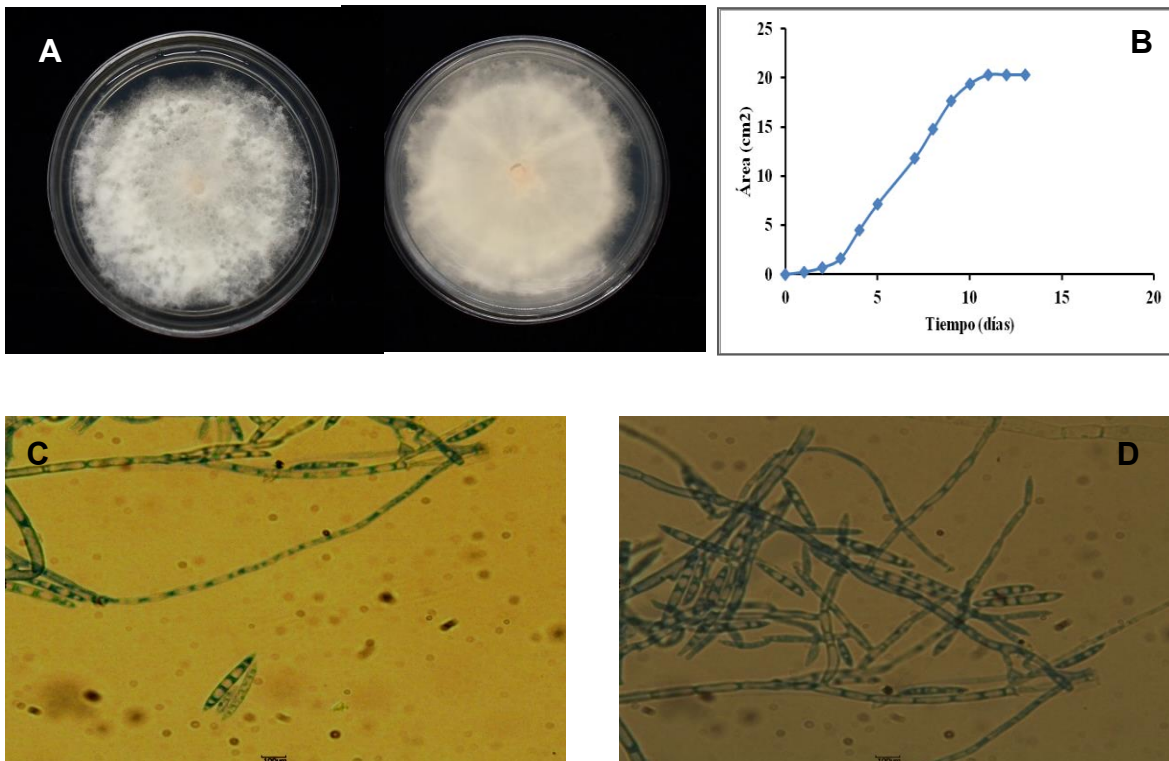


Figura 23. Fitopatógeno PBF2. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.

En las **Figuras 23 C** y **D** se presentan las estructuras del fitopatógeno **PBF2** en una preparación teñida con azul de lactofenol observada a 40 X. Se aprecian hifas septadas (Fig. C) y macroconidios dispersos, curvados, pluriseptados y con una célula apical (Fig. C y D). Estas estructuras posiblemente corresponden al género *Fusarium* (Dugan, 2006).

1.1.22 PBF3

En la **Figura 24 A** se muestra un cultivo de 18 días en PDA del fitopatógeno **PBF3**. Se observa la formación de micelio aéreo blanco de textura vellosa, lanosa y de consistencia suave. Presenta producción de exudado color amarillo. En el envés se presenta una pigmentación amarillo intenso que con el paso de los días se difunde completamente en el medio de cultivo. Su crecimiento es radial irregular con una tasa de crecimiento de $1.17 \text{ cm}^2/\text{día}$.

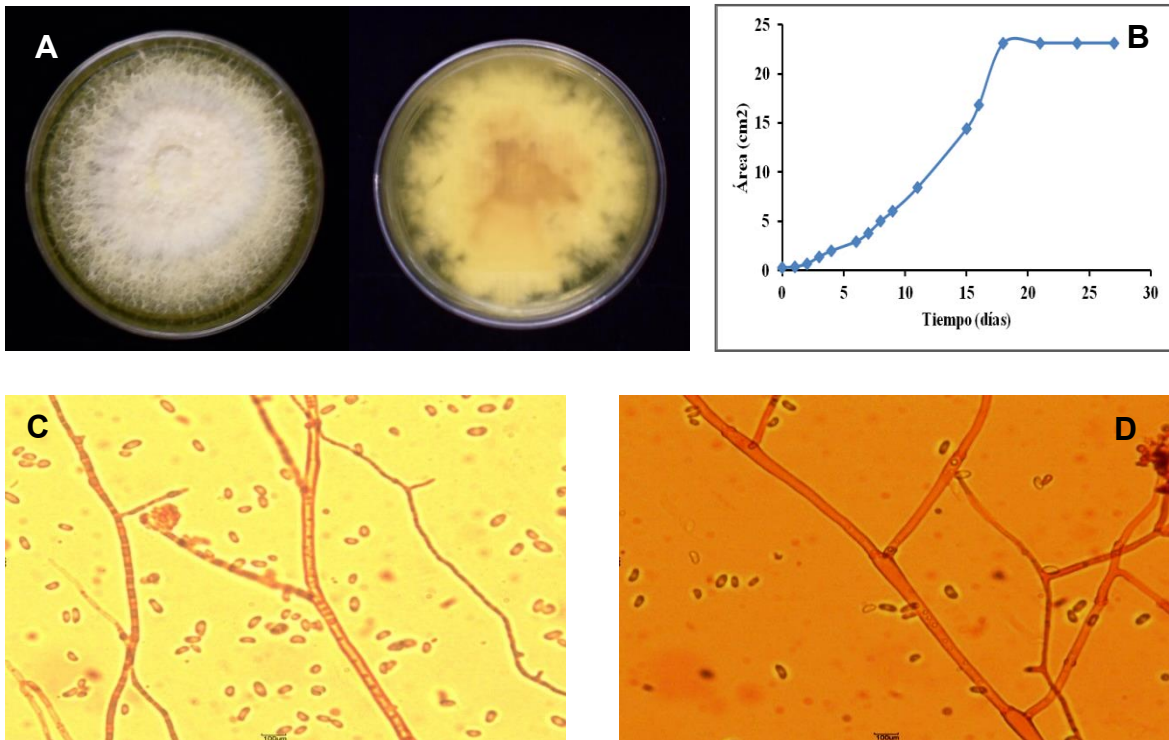


Figura 24. Fitopatógeno PBF3. A) Crecimiento de 18 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 24 C** y **D** se presentan las estructuras del fitopatógeno **PBF3** en una preparación teñida con rojo congo observadas a 40 X. Se observan conidióforos con amesporas sésiles (Fig. C) y también se aprecian hifas septadas (Fig. D). Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.1.23 PBF4

En la **Figura 25 A** se muestra un cultivo de 6 días en PDA del hongo fitopatógeno **PBF4**. Se observa la formación de micelio escaso aéreo blanco de textura vellosa y de consistencia suave. Al envejecer su micelio se torna color verde, no presenta producción de exudado y no se observa pigmentación en el envés de su micelio. Su crecimiento es radial con una tasa de crecimiento de $5.69 \text{ cm}^2/\text{día}$.

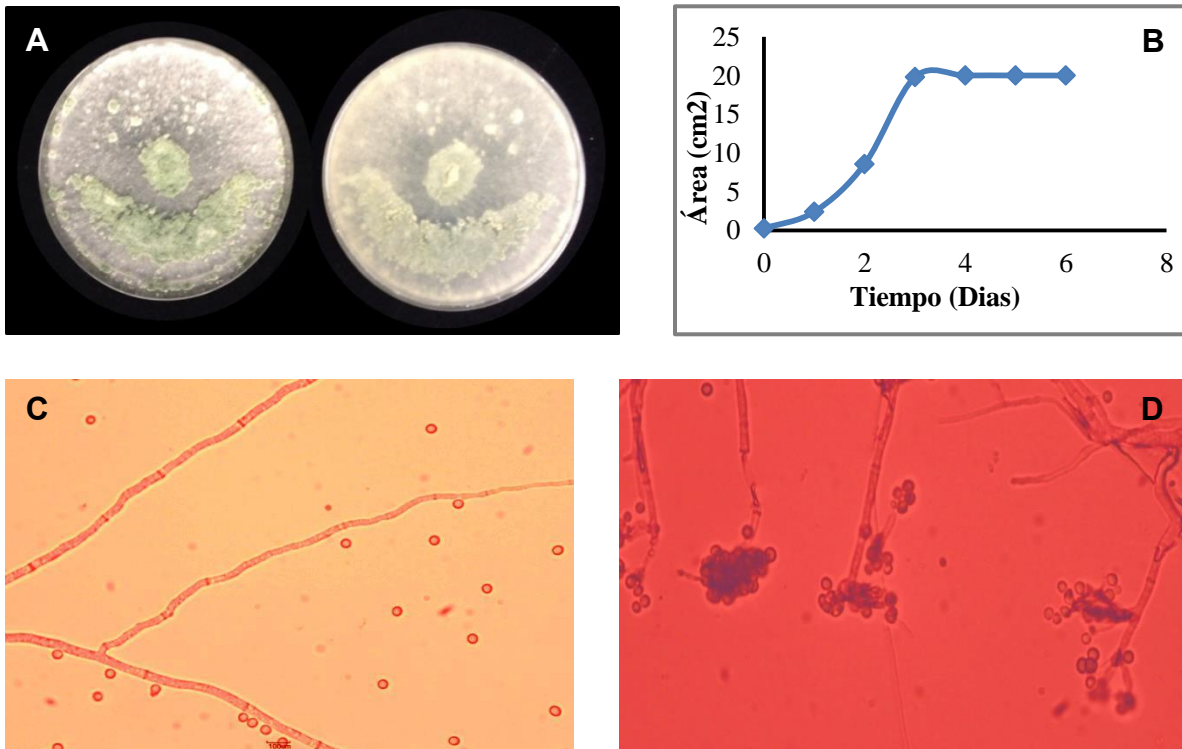


Figura 25. Fitopatógeno PBF4. A) Crecimiento de 6 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B) Curva de crecimiento; C) y D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

En las **Figuras 25 C** y **D** se observan las estructuras del fitopatógeno **PBF4** en una preparación teñida con rojo congo enfocadas a 40 X. Se aprecian hifas septadas (Fig. C), esporangiolos y amerosporas (Fig. D). Bajo estas condiciones de cultivo no se lograron observar estructuras de reproducción.

1.2 Características macroscópicas del hongo endófito PBE10 durante la curva de crecimiento

La determinación de la tasa de crecimiento de cada uno de los microorganismos en estudio, permitió establecer paralelamente las características macroscópicas de cada aislamiento puro, observándose que en algunos hongos la morfología del micelio cambia con respecto a la edad de los cultivos. Así por ejemplo, en la **Figura 26** es posible observar que en un inicio el micelio del hongo endófito PBE10, es blanco y de apariencia vellosa, después de 6 días de crecimiento, el centro de la colonia comienza a tornarse color café y finalmente al día 9 casi la totalidad de su micelio es de color café.

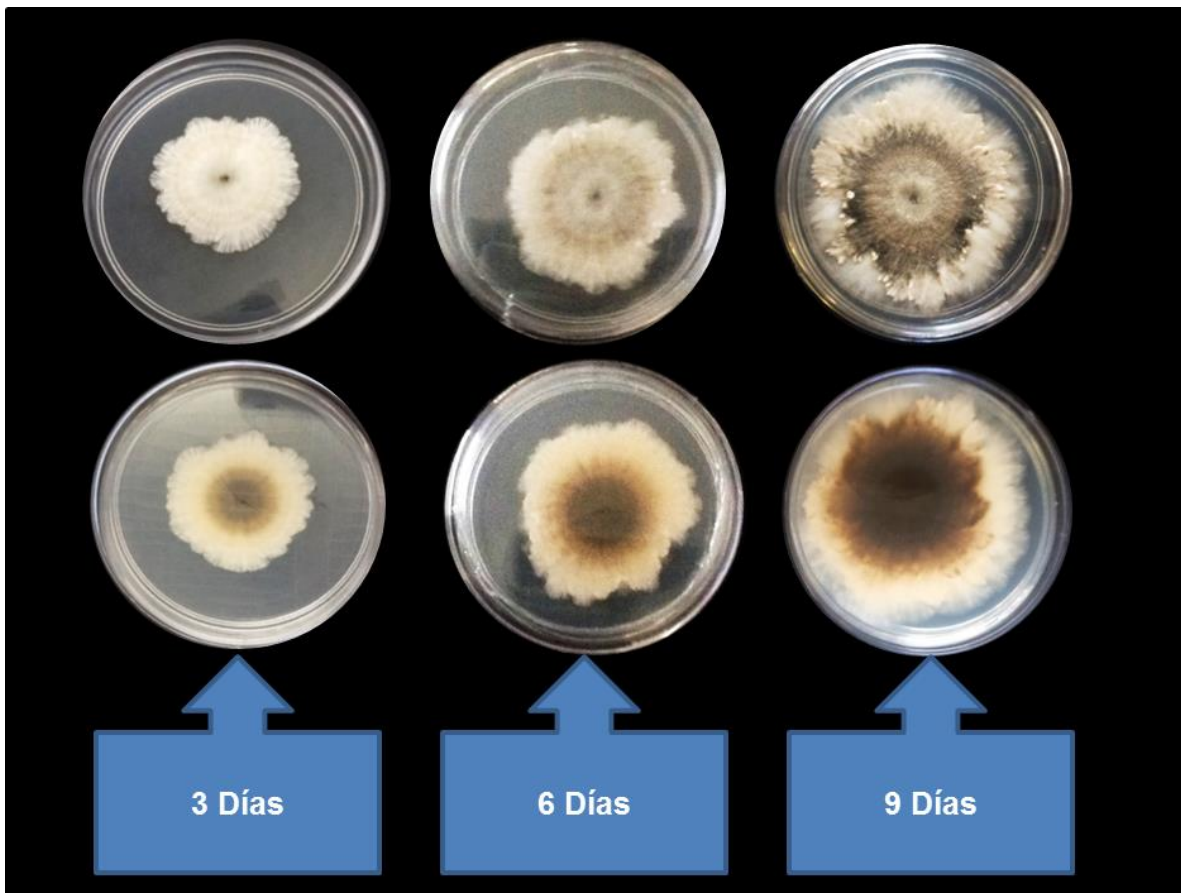


Figura 26. Endófito PBE10 a los días 3, 6 y 9 de crecimiento.

2. Obtención de cultivos en pequeña escala y fracciones primarias de los extractos orgánicos

Con el propósito de obtener los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos en estudio se cultivaron en pequeña escala empleando como medio de crecimiento arroz. Este medio de cultivo favorece el crecimiento de los hongos filamentosos, y en general, permite la producción de metabolitos secundarios con buenos rendimientos (Armendáriz-Guillén, 2013, Sandoval-Espinosa, 2014). Los microorganismos se incubaron bajo condiciones estáticas por 30 días con fotoperíodos de luz fluorescente oscuridad 12:12 h a temperatura ambiente. Transcurrido el periodo de incubación se obtuvieron los extractos orgánicos por maceración exhaustiva. Los extractos orgánicos obtenidos muestran en todos los casos dos fases: una sólida y otra oleosa muy abundante. Con el propósito de separar dichas fases se realizó un fraccionamiento primario por medio del método de reparto entre los disolventes hexano y metanol.

En el **Cuadro 5**, se muestran los rendimientos de los extractos orgánicos crudos y fracciones primarias obtenidos de los cultivos en pequeña escala en medio arroz de los 19 endófitos y 4 fitopatógenos aislados de *H. brasiletto* incubados bajo condiciones estáticas. Con excepción de los hongos endófitos PBE3, PBE5, PBE6, PBE7, PBE17, PBE19 y los fitopatógenos PBF2 y PBF4 que presentaron mayor rendimiento para las fracciones hexánicas, en general, las fracciones metanólicas se encuentran en mayor proporción. Cabe mencionar que el análisis de las fracciones primarias por CCF permitió observar la diferencia de perfiles químicos, en la que se aprecia claramente la presencia de metabolitos secundarios de diferente polaridad en cada una de las fracciones obtenidas. A manera de ejemplo se muestra la **Figura 27** el perfil cromatográfico de las fracciones primarias del hongo endófito PBE11, observándose que la fracción hexánica se compone principalmente de compuestos de baja polaridad, los cuales por su gran abundancia y naturaleza oleosa podrían estar enmascarando la actividad biológica de los metabolitos presentes en los extractos totales, motivo por el cual se decidió llevar a cabo el fraccionamiento primario por el método de

reparto y la evaluación biológica del extracto crudo y de las fracciones primarias de manera independiente.

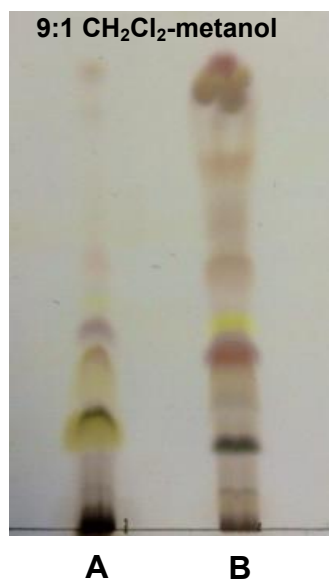


Figura 27. Perfil cromatográfico de las fracciones primarias del hongo endófito PBE11 **A)** fracción metanólica **B)** fracción hexánica.

Cuadro 5. Rendimiento de los extractos orgánicos crudos y fracciones primarias de los hongos endófitos y fitopatógenos de *H. brasiletto*.

Hongo endófito	Extracto total (mg/50 g de arroz)	Fracción metanólica (mg/50 g de arroz)	Fracción hexánica (mg/50 g arroz)	% Fracción metanólica	% Fracción hexánica
PBE1	594.4	298.8	292.6	50.2	49.2
PBE2	44.5	31.8	8.7	71.4	19.5
PBE3	276.7	101.4	172.8	36.6	62.4
PBE4	14.5	7.6	4.9	52.4	33.7
PBE5	411.6	72.2	334.4	17.5	81.2
PBE6	283.6	78.2	201.4	27.5	71.0
PBE7	332.0	157.5	170.5	47.4	51.3
PBE8	147.7	103.9	39.8	70.3	26.9
PBE9	125.2	77.4	44.8	61.8	35.7
PBE10	157.1	85.4	68.7	54.3	43.7
PBE11	1666.8	1202.8	462	72.1	27.7
PBE12	194.3	95.8	94.5	49.3	48.6
PBE13	35.0	20.7	9.3	59.1	26.5
PBE14	68.7	43.5	22.2	63.3	32.3
PBE15	24.8	19.3	2.5	77.8	10.0
PBE16	146.3	86.4	56.9	59.0	38.8
PBE17	317.2	147.4	164.8	46.4	51.9
PBE18	339.7	168.4	166.3	49.5	48.9
PBE19	1290.5	549.6	735.9	42.5	57.0
PBF1	61.4	42.1	15.3	68.5	24.9
PBF2	410.9	86.5	321.4	21.0	78.2
PBF3	264.6	172.2	87.4	65.0	33.0
PBF4	390.9	82.5	305.4	21.1	78.1

3. Determinación del potencial antifúngico

El potencial antifúngico de los extractos orgánicos crudos y las fracciones primarias se estableció cuantitativamente mediante el estudio del efecto de los mismos sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura: *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, empleando el método de dilución en agar en cajas de Petri y una concentración de prueba de 250 µg/mL.

En los **Cuadros 6 y 7** se muestra el efecto antifúngico de los extractos y las fracciones primarias de los hongos endófitos y fitopatógenos sobre el crecimiento radial de los microorganismos de prueba. Observándose que las fracciones metanólicas de los cultivos de los hongos endófitos PBE2, PBE11, PBE12, PBE14, PBE17, PBE19, PBF2, PBF4 presentan mayor actividad antifúngica en comparación con la fracción hexánica y el extracto orgánico crudo, siendo la fracción metanólica derivada del cultivo del hongo PBE2 la que presenta mayor potencial antioomiceto inhibiendo el crecimiento de *P. capsici* y *P. aphanidermatum* en un 100% a la concentración de prueba que fue de 250 µg/mL. Por su parte el endófito PBE11 inhibe significativamente el crecimiento de los cuatro microorganismos de prueba *F. oxysporum* (23.5%), *A. alternata* (22.9%), *P. capsici* (100%) y *P. aphanidermatum* (80.2%) siendo de nueva cuenta los oomicetos los más afectados. El extracto orgánico crudo del endófito PBE14 no presentó actividad significativa sobre ninguno de los microorganismos de prueba. En contraste la fracción metanólica muestra actividad significativa sobre *A. alternata* (23.7%), *P. capsici* (43.4%) y *P. aphanidermatum* (40.7%). Además la fracción hexánica inhibió significativamente el crecimiento de los dos oomicetos, *P. capsici* (55.3%) y *P. aphanidermatum* (28.2%) Por último, el fitopatógeno PBF2 inhibió significativamente el crecimiento de *F. oxysporum* (36%), *A. alternata* (45.3%) y *P. capsici* (40.4%).

Con base en el potencial antifúngico y antioomiceto obtenido y con la finalidad de establecer los valores de CI_{50} de los extractos orgánicos que mostraron la mayor actividad biológica, se cultivaron en mediana escala los hongos endófitos PBE2, PBE11, PBE14 y el hongo fitopatógeno PBF2.

Cuadro 6. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum*.

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición del crecimiento radial			
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>
PBE1	EC	11.0 ± 2.3	16.0 ± 3.0	0.0 ± 0.0	22.0 ± 2.8*
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	23.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	6.6 ± 0.0	10.7 ± 2.2	0.0 ± 0.0
PBE2	EC	0.0 ± 0.0	20.0 ± 1.5*	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	13.2 ± 3.2	20.8 ± 2.9*	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*
PBE3	EC	11.0 ± 2.5	16.0 ± 2.0	0.0 ± 0.0	14.0 ± 3.0
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	23.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0
	FM	9.8 ± 0.0	14.3 ± 1.6	13.9 ± 1.4	0.0 ± 0.0
PBE4	EC	24.0 ± 5.4*	12.0 ± 3.0	89.0 ± 2.6*	80.0 ± 3.2*
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Controles	Metalaxil	31.8 ± 2.1*	24.6 ± 1.3*	83.8 ± 5.8*	100.0 ± 0.0*
	Carbendazim	100.0 ± 0.0*	16.7 ± 1.9	4.4 ± 0.6	33.4 ± 3.1*

EC. Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica. Todos los tratamientos se evaluaron a 250 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 6. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum* (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición del crecimiento radial			
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>
PBE5	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FH	0.0 ± 0.0	12.8 ± 1.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	8.3 ± 0.0	4.7 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE6	EC	10.0 ± 3.1	12.0 ± 4.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FH	0.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	10.0 ± 1.8	16.5 ± 2.5	17.2 ± 1.1	0.0 ± 0.0
PBE7	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FH	6.7 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	10.4 ± 3.4	9.8 ± 0.9	11.9 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE8	EC	52.0 ± 2.3*	40.0 ± 2.8*	26.0 ± 1.9*	30.0 ± 3.7*
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	23.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0
	FM	9.8 ± 0.5	30.9 ± 2.8*	30.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0
Controles	Metalaxil	31.8 ± 2.1*	24.6 ± 1.3*	83.8 ± 5.8*	100.0 ± 0.0*
	Carbendazim	100.0 ± 0.0*	16.7 ± 1.9	4.4 ± 0.6	33.4 ± 3.1*

EC. Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica. Todos los tratamientos se evaluaron a 250 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 6. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum* (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición del crecimiento radial			
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>
PBE9	EC	0.0 ± 0.0	29.0 ± 1.7*	100.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0
	FH	0.0 ± 0.0	10.1 ± 1.1	57.6 ± 0.0*	30.0 ± 0.0*
	FM	13.7 ± 0.0	14.3 ± 1.6	39.2 ± 2.1*	0.0 ± 0.0
PBE10	EC	26.0 ± 3.0*	17.0 ± 2.0	13.0 ± 2.1	0.0 ± 0.0
	FH	6.1 ± 2.0	13.5 ± 2.4	13.4 ± 2.0	0.0 ± 0.0
	FM	13.7 ± 0.0	22.9 ± 1.4*	4.8 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE11	EC	24.0 ± 2.5*	12.0 ± 1.0	15.0 ± 1.0	40.0 ± 2.6*
	FH	10.6 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	23.5 ± 2.0*	22.9 ± 1.4*	100.0 ± 0.0*	80.2 ± 1.2*
PBE12	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.3 ± 2.1	0.0 ± 0.0
	FM	7.8 ± 0.9	16.6 ± 2.0	54.1 ± 1.9*	0.0 ± 0.0
Controles	Metalaxil	31.8 ± 2.1*	24.6 ± 1.3*	83.8 ± 5.8*	100.0 ± 0.0*
	Carbendazim	100.0 ± 0.0*	16.7 ± 1.9	4.4 ± 0.6	33.4 ± 3.1*

EC. Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica. Todos los tratamientos se evaluaron a 250 µg/mL. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 6. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum* (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición del crecimiento radial			
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>
PBE13	EC	26.0 ± 2.3*	86.0 ± 3.1*	90.0 ± 4.0*	0.0 ± 0.0
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	9.7 ± 1.7	25.8 ± 2.5*	9.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE14	EC	14.0 ± 2.0	7.0 ± 1.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FH	0.0 ± 0.0	8.3 ± 2.1	55.3 ± 1.9*	28.2 ± 0.7*
	FM	12.3 ± 2.7	23.7 ± 2.9*	43.4 ± 1.1*	40.7 ± 1.3*
PBE15	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	11.0 ± 1.8	26.0 ± 2.0
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	6.6 ± 0.0	24.6 ± 2.4*	14.8 ± 1.1	0.0 ± 0.0
PBE16	EC	19.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	32.0 ± 2.2*
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.4 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	12.2 ± 2.03	22.1 ± 0.0*	37.5 ± 3.7*	0.0 ± 0.0
Controles	Metalaxil	31.8 ± 2.1*	24.6 ± 1.3*	83.8 ± 5.8*	100.0 ± 0.0*
	Carbendazim	100.0 ± 0.0*	16.7 ± 1.9	4.4 ± 0.6	33.4 ± 3.1*

EC. Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica. Todos los tratamientos se evaluaron a 250 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 6. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum* (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición del crecimiento radial			
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>
PBE17	EC	10.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	14.0 ± 1.5
	FH	5.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.1 ± 1.1	0.0 ± 0.0
	FM	9.8 ± 0.0	17.9 ± 2.2	12.5 ± 1.3	0.0 ± 0.0
PBE18	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FH	9.3 ± 0.0	22.9 ± 2.0*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	6.5 ± 0.0	21.3 ± 2.0*	48.6 ± 2.5*	0.0 ± 0.0
PBE19	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.0 ± 2.0	0.0 ± 0.0
	FH	8.7 ± 2.0	0.0 ± 0.0	8.9 ± 1.2	0.0 ± 0.0
	FM	4.9 ± 0.0	17.5 ± 1.6	11.2 ± 1.4	0.0 ± 0.0
Controles	Metalaxil	31.8 ± 2.1*	24.6 ± 1.3*	83.8 ± 5.8*	100.0 ± 0.0*
	Carbendazim	100.0 ± 0.0*	16.7 ± 1.9	4.4 ± 0.6	33.4 ± 3.1*

EC. Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica. Todos los tratamientos se evaluaron a 250 µg/mL. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 7. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos fitopatógenos aislados de *H. brasiletto* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum*.

Hongo Fitopatógeno	Extracto	% Inhibición del crecimiento radial			
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A.alternata</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>
PBF1	EC	0.0 ± 0.0	40.0 ± 2.2*	40.0 ± 1.8*	100.0 ± 0.0*
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	23.0 ± 2.9*	0.0 ± 0.0
	FM	7.7 ± 0.1	12.0±1.8	44.0 ± 2.2*	0.0 ± 0.0
PBF2	EC	0.0 ± 0.0	47.0 ± 3.1*	37.0 ± 2.0*	80.0 ± 3.0*
	FH	6.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	24.0 ± 2.0*	0.0 ± 0.0
	FM	36.0 ± 1.9*	45.3 ± 2.6*	40.4 ± 0.0*	20.7 ± 1.7*
PBF3	EC	41.0 ± 2.1*	30.0 ± 2.8*	0.0 ± 0.0	25.0 ± 1.9
	FH	10.6 ± 0.0	15.3 ± 1.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	7.3 ± 0.1	11.7 ± 1.0	58.9 ± 1.1*	12.5 ± 1.0
PBF4	EC	38.0 ± 4.0*	29.0 ± 3.0*	8.0 ± 0.0	27.0 ± 2.5*
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	11.53 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	29.6 ± 3.2*	39.1 ± 2.1*	36.3±1.1*	0.0 ± 0.0
Controles	Metalaxil	31.8 ± 2.1*	24.6 ± 1.3*	83.8 ± 5.8*	100.0 ± 0.0*
	Carbendazim	100.0 ± 0.0*	16.7 ± 1.9	4.4 ± 0.6	33.4 ± 3.1*

EC. Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica. Todos los tratamientos se evaluaron a 250 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P<0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

4. Determinación del potencial fitotóxico

La actividad fitotóxica de los extractos derivados de los cultivos en pequeña escala y sus fracciones primarias, se evaluó cuantitativamente por medio del bioensayo de dilución en agar, utilizando cajas Petri y una concentración de prueba de 100 µg/mL sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración durante el proceso de germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*.

En los **Cuadros 8 y 9** se observa el efecto fitotóxico sobre la semilla de *A. hypochondriacus* y en los **Cuadros 10 y 11**, se muestra la actividad sobre *S. lycopersicum*. La germinación de las semillas de *A. hypochondriacus*, únicamente es inhibida significativamente por 7 de los endófitos en estudio. El extracto orgánico crudo y la fracción metanólica del hongo endófito PBE2 inhiben en un 100 % su germinación. Las fracciones metanólicas derivadas del cultivo de los hongos PBE6 (100%), PBE7 (44.4%), PBE12 (44.4%), PBE18 (66.6%), PBE20 (44.4%) y del fitopatógeno PBF4 (80.0%) inhibieron significativamente y en mayor grado la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* en comparación con los extractos crudos, siendo el endófito PBE6 el que presentó el mayor potencial fitotóxico.

Con respecto a las semillas de *S. lycopersicum* las fracciones metanólicas provenientes del cultivo de 9 hongos endófitos PBE2 (100%), PBE5 (26.0%), PBE6 (46.3%), PBE8 (47.8%), PBE10 (30.4%), PBE11 (100%), PBE19 (33.3%) y 2 fitopatógenos PBF1 (33.3%) y PBF4 (88.8%) inhiben significativamente su germinación. Cabe mencionar que tanto el extracto orgánico crudo como la fracción metanólica de PBE2 inhiben un 100%.

En general, el crecimiento de la raíz fue el proceso más afectado en ambas especies de prueba al ser inhibido significativamente por al menos uno de los tres tratamientos en estudio (extracto orgánico crudo, fracción hexánica y fracción metanólica). El extracto orgánico crudo de los endófitos PBE2 (100%), PBE6

(65.0%) PBE11 (62.0%), y de la fracción hexánica de los hongos PBE2 (40.2%), PBE6 (46.7%), PBE11 (35.2%), así como, la fracción metanólica de PBE2 (100%), PBE6 (100%) y PBE11 (33.5%), son los tratamientos que muestran los mayores porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus*. La fracción metanólica de PBE2 (100%), PBE11 (100%), PBE14 (39.6%), PBE19 (33.6%), PBE20 (54.3%) son los tratamientos que provocaron el mayor efecto inhibitorio sobre la longitud de la raíz de *S. lycopersicum*.

Finalmente, la respiración durante el proceso de germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* únicamente es inhibida significativamente por la fracción hexánica del endófito PBE6 (21.8%), y las fracciones metanólicas de los hongos PBE2 (40.7%), PBE6 (31.5%), PBE9 (42.5%) y el fitopatógeno PBF2 (23.5%). La respiración de las plántulas de *S. lycopersicum* solo se vio afectada significativamente por la fracción metanólica de PBE2 (63.8%). Cabe destacar que el endófito PBE2 inhibe significativamente en un 100% la germinación y el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*. Con base en los resultados expuestos en los **Cuadros 8, 9, 10 y 11** y con la finalidad de determinar los valores de CI_{50} se cultivaron en mediana escala, los endófitos PBE2, PBE6, PBE9, PBE11 y el hongo fitopatógeno PBF2.

Cuadro 8. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *A. hypochondriacus*.

Hongo endófito	Extracto	% de Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBE1	EC	0.0 ± 0.0	52.0 ± 3.4*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	6.2 ± 0.5	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	4.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
PBE2	EC	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	40.2 ± 3.5*	0.0 ± 0.0
	FM	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	40.7 ± 2.8*
PBE3	EC	2.0 ± 0.5	44.0 ± 2.1*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	35.1 ± 2.6*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	15.7 ± 2.9
PBE4	EC	0.0 ± 0.0	46.0 ± 1.2*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	30.2 ± 1.9*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Control	Rival®	44.6 ± 2.5	40.5 ± 1.3	41.3 ± 1.7

EC. Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica, NR. No se realizó. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 8. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *A. hypochondriacus* (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% de Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBE5	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	25.8 ± 1.9*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE6	EC	2.8 ± 0.2	65.0 ± 2.3*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	46.7 ± 0.0*	21.8 ± 1.1*
	FM	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	31.5 ± 2.5*
PBE7	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	44.4 ± 3.0*	18.1 ± 1.5	0.0 ± 0.0
PBE8	EC	1.1 ± 0.6	49.0 ± 2.1*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	20.9 ± 0.0*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	11.1 ± 0.4	14.6 ± 0.9
Control	Rival®	44.6 ± 2.5	40.5 ± 1.3	41.3 ± 1.7

EC. Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica. NR. No se realizó. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 8. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *A. hypochondriacus* (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% de Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBE9	EC	0.0 ± 0.0	66.0 ± 4.0*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	22.3 ± 2.4*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	39.2 ± 3.5*	42.5 ± 0.3*
PBE10	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	78.7 ± 0.0*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	31.3 ± 3.2*	0.0 ± 0.0
PBE11	EC	5.2 ± 0.7	62.0 ± 3.4*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	35.2 ± 4.5*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	33.5 ± 2.2*	9.6 ± 0.6
PBE12	EC	22.1 ± 0.1*	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	14.7 ± 0.9	0.0 ± 0.0
	FM	44.4 ± 0.0*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Control	Rival®	44.6 ± 2.5	40.5 ± 1.3	41.3 ± 1.7

EC. Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica, NR. No se realizó. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 8. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *A. hypochondriacus*. (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% de Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBE13	EC	5.3 ± 0.7	83.0 ± 6.1	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE14	EC	3.6 ± 0.5	63.0 ± 2.8	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	16.0 ± 2.2	0.0 ± 0.0
PBE15	EC	3.0 ± 0.5	20.0 ± 1.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	16.2 ± 1.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.1 ± 1.3
PBE16	EC	6.2 ± 0.4	24.0 ± 1.6*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Control	Rival®	44.6 ± 2.5	40.5 ± 1.3	41.3 ± 1.7

EC. Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica, NR. No se realizó. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 8. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *A. hypochondriacus* (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBE17	EC	2.8 ± 0.4	21.0 ± 2.2*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	25.2 ± 1.8*	0.0 ± 0.0
	FM	66.6 ± 1.1*	0.0 ± 0.0	12.1 ± 1.9
PBE18	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	39.0 ± 3.5*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	15.0 ± 2.1	0.0 ± 0.0
PBE19	EC	4.2 ± 0.5	38.0 ± 4.3*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	38.1 ± 3.9*	0.0 ± 0.0
	FM	44.4 ± 0.0*	23.4 ± 1.9*	0.0 ± 0.0
Control	Rival®	44.6 ± 2.5	40.5 ± 1.3	41.3 ± 1.7

EC. Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica, NR. No se realizó. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 9. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos fitopatógenos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *A. hypochondriacus*.

Hongo fitopatógeno	Extracto	% de Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBF1	EC	3.8 ± 0.6	54.0 ± 5.3*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	30.3 ± 3.9*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBF2	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	26.9 ± 2.1*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	15.9 ± 1.0	23.5 ± 2.6*
PBF3	EC	3.1 ± 0.2	48.0 ± 5.0*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	26.0 ± 2.6*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	13.6 ± 0.9	10.1 ± 1.6
PBF4	EC	2.0 ± 0.5	39.0 ± 3.3*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	19.9 ± 1.5	0.0 ± 0.0
	FM	80.0 ± 0.0*	6.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0
Control	Rival®	44.6 ± 2.5	40.5 ± 1.3	41.3 ± 1.7

EC Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica, NR. No se realizó. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 10. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *S. lycopersicum*.

Hongo endófito	Extracto	% de Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBE1	EC	0.0 ± 0.0	33.0 ± 2.0*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	4.8 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	30.4 ± 4.9	0.0 ± 0.0
PBE2	EC	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	NR
	FH	0.0 ± 0.0*	32.2 ± 2.8	0.0 ± 0.0
	FM	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0*	63.8 ± 0.0*
PBE3	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	18.3 ± 1.1	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	4.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0
PBE4	EC	0.0 ± 0.0	92.0 ± 5.0*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	14.7 ± 0.9	0.0 ± 0.0
	FM	6.6 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Control	Rival®	55.2 ± 2.1	41.3 ± 1.2	60.1 ± 3.5

EC Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica, NR. No se realizó. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 10. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *S. lycopersicum* (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% de Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBE5	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	32.9 ± 3.8*	0.0 ± 0.0
	FM	26.0 ± 0.8*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE6	EC	0.0 ± 0.0	25.0 ± 1.5*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	46.3 ± 2.0*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE7	EC	0.0 ± 0.0	26.0 ± 3.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE8	EC	0.0 ± 0.6	51.0 ± 1.5*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	15.8 ± 0.9	0.0 ± 0.0
	FM	47.8 ± 0.5*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Control	Rival®	55.2 ± 2.1	41.3 ± 1.2	60.1 ± 3.5

EC Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica, NR. No se realizó. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 10. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *S. lycopersicum* (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% de Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBE9	EC	0.0 ± 0.0	85.0 ± 3.7*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	7.0 ± 1.2	0.0 ± 0.0
PBE10	EC	3.4 ± 0.5	26.0 ± 2.8*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	22.4 ± 1.4*	0.0 ± 0.0
	FM	30.4 ± 1.0*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE11	EC	2.9 ± 0.8	26.0 ± 3.1*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0
PBE12	EC	3.3 ± 0.5	50.0 ± 0.0*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	13.0 ± 0.3	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Control	Rival®	55.2 ± 2.1	41.3 ± 1.2	60.1 ± 3.5

EC Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica, NR. No se realizó. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 10. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *S. lycopersicum* (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% de Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBE13	EC	3.1 ± 0.5	43.0 ± 4.1*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE14	EC	0.0 ± 0.0	14.0 ± 1.5	NR
	FH	0.0 ± 0.0	4.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	39.6 ± 3.8*	0.0 ± 0.0
PBE15	EC	3.3 ± 0.2	16.0 ± 3.9	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE16	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	11.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0
Control	Rival®	55.2 ± 2.1	41.3 ± 1.2	60.1 ± 3.5

EC Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica, NR. No se realizó. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 10. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos endófitos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *S. lycopersicum* (continuación).

Hongo endófito	Extracto	% de Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBE17	EC	4.5 ± 0.8	27.0 ± 2.5*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	16.8 ± 0.9	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE18	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	15.8 ± 1.0	0.0 ± 0.0
	FM	77.7 ± 2.0*	33.6 ± 3.6*	0.0 ± 0.0
PBE19	EC	3.4 ± 0.9	46.0 ± 3.7*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	21.4 ± 1.4*	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	54.3 ± 5.7*	0.0 ± 0.0
Control	Rival®	55.2 ± 2.1	41.3 ± 1.2	60.1 ± 3.5

EC Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica, NR. No se realizó. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 µg/mL * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 11. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos crudos y sus fracciones primarias obtenidos de los hongos fitopatógenos aislados de *H. brasiletto* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de *S. lycopersicum*.

Hongo fitopatógeno	Extracto	% de Inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
PBF1	EC	0.0 ± 0.0	11.0 ± 2.1	NR
	FH	0.0 ± 0.0	17.9 ± 1.7	0.0 ± 0.0
	FM	33.3 ± 0.9*	16.8 ± 2.3	0.0 ± 0.0
PBF2	EC	0.0 ± 0.0	34.0 ± 4.8*	NR
	FH	0.0 ± 0.0	12.3 ± 1.6	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	13.4 ± 1.3	0.0 ± 0.0
PBF3	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	FM	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBF4	EC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NR
	FH	0.0 ± 0.0	13.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0
	FM	88.8 ± 0.0*	18.0 ± 1.1	0.0 ± 0.0
Control	Rival®	55.2 ± 2.1	41.3 ± 1.2	60.1 ± 3.5

EC Extracto orgánico crudo, FH. Fracción hexánica, FM. Fracción metanólica, NR. No se realizó. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.

5. Obtención de cultivos y extractos en mediana escala

Los hongos endófitos y fitopatógenos con mayor actividad antifúngica y/o herbicida (PBE2, PBE6, PBE9, PBE11, PBE14 y PBF2) presentada por los extractos orgánicos crudos y fracciones primarias se cultivaron en mediana escala empleando medio arroz (300 g) por 30 días, bajo condiciones de incubación estáticas. Una vez transcurrido el período de incubación, los cultivos se sometieron a un proceso de maceración exhaustivo empleando hexano y posteriormente una mezcla de CH₂Cl₂-CH₃OH (9:1). El perfil cromatográfico de los extractos obtenidos se comparó por CCF, observándose que en todos los casos eran diferentes.

En el **Cuadro 12** se muestran los rendimientos de los extractos orgánicos obtenidos de los cultivos en mediana escala de los endófitos y el fitopatógeno aislados de *H. brasiletto* con mayor potencial biológico.

Cuadro 12. Rendimiento de los cultivos en mediana escala de los endófitos y fitopatógenos de *H. brasiletto* con mayor actividad biológica.

Hongo endófito	Rendimiento (mg /300 g arroz)			
	Extracto hexánico	Extracto CH ₂ Cl ₂ / CH ₃ OH (9:1)	% Hexánico	% CH ₂ Cl ₂ / CH ₃ OH (9:1)
PBE2	893.2	1261.8	41.4	58.5
PBE6	333.4	172.2	65.9	34.0
PBE9	253.7	119.9	67.9	32.0
PBE11	446.9	818.1	35.3	64.6
PBE14	417.6	508.4	45.0	55.0
PBF2	5399.6	49.6	99.0	1.0

A continuación, se procedió a verificar cuantitativamente el potencial biológico de los extractos orgánicos, evaluando el efecto de los mismos sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, así como sobre la germinación y longitud de la raíz de las dos plantas de prueba blanco, empleando el método de

dilución en agar a una concentración de prueba de 250 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente.

6. Verificación del potencial biológico de los extractos en mediana escala

En el **Cuadro 13** se muestra el efecto antifúngico de los extractos orgánicos a 250 µg/mL del medio de cultivo y micelio obtenidos sobre los cuatro microorganismos de prueba. En general, se observa que el extracto CH₂Cl₂-CH₃OH (9:1) muestra la mayor actividad biológica al inhibir significativamente al menos a uno de los microorganismos fitopatógenos de prueba, en contraste, con excepción del hongo PBE9 que inhibe significativamente en un 23.1% al hongo *A. alternata*, ningún extracto hexánico presenta actividad sobre los microorganismos de prueba. Corroborando los resultados obtenidos por las fracciones primarias hexánicas derivadas de los cultivos en pequeña escala.

Cuadro 13. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos de los cultivos en mediana escala de los hongos endófitos y fitopatógenos de *H. brasiletto* con mayor actividad biológica sobre los cuatro microorganismos de prueba.

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición del crecimiento radial			
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>
PBE2	Hexánico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	9.8 ± 0.9	36.9 ± 1.9*	14.3 ± 2.2	0.0 ± 0.0
PBE6	Hexánico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	5.9 ± 0.4	14.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE9	Hexánico	0.0 ± 0.0	23.1 ± 0.0*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	10.8 ± 0.4	47.5 ± 1.7*	100.0 ± 0.0*	20.0 ± 1.7
PBE11	Hexánico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.8 ± 0.4
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	9.2 ± 0.8	25.0 ± 1.8*	100.0 ± 0.0*	66.3 ± 5.1*
PBE14	Hexánico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	18.2 ± 2.1	18.5 ± 1.7	53.4 ± 1.3*	25.7 ± 2.1*
PBF2	Hexánico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	26.6 ± 1.1*	49.9 ± 3.1*	28.0 ± 1.5*	0.0 ± 0.0
Controles	Metalaxil	33.8 ± 2.0*	21.6 ± 1.0*	85.9 ± 5.2*	100.0 ± 0.0*
	Carbendazim	100.0 ± 0.0*	19.9 ± 1.4	3.4 ± 0.6	38.4 ± 3.1*

En el **Cuadro 14** se muestra el efecto fitotóxico de los extractos orgánicos derivados de los cultivos de mediana escala a una concentración de prueba de 100 µg/mL, sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*. De nueva cuenta, el crecimiento de la raíz de ambas semillas de prueba es el proceso más afectado. Los extractos obtenidos con CH₂Cl₂-MeOH 99:1 presentan porcentajes de inhibición significativos en un rango de 33.0–81.9 %. En contraste y con excepción de PBE9 que presenta un porcentaje de inhibición significativo de 26.1% sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* los extractos hexánicos no presentan actividad fitotóxica. La germinación de ambas semillas de prueba no es afectada de forma significativa por ninguno de los dos tratamientos.

Cuadro 14. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de los cultivos en mediana escala de los endófitos y fitopatógenos de *H. brasiletto* con mayor actividad biológica sobre el crecimiento de la raíz y germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*.

Endófito	Extracto	% Inhibición sobre el crecimiento de la germinación		% Inhibición sobre el crecimiento de la raíz	
		<i>A. hypochondriacus</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>S. lycopersicum</i>
PBE2	Hexánico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	12.1 ± 0.4
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	6.6 ± 0.4	6.6 ± 0.5	41.5 ± 3.2*	33.0 ± 1.2*
PBE6	Hexánico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	12.3 ± 0.4	0.0 ± 0.0
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	5.0 ± 0.8	6.6 ± 0.5	35.1 ± 2.4*	14.3 ± 0.4
PBE9	Hexánico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	26.1 ± 2.4*	17.2 ± 1.2
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	3.0 ± 0.7	3.3 ± 0.2	81.9 ± 3.0*	60.3 ± 0.6*
PBE11	Hexánico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	12.7 ± 1.0	14.1 ± 1.2
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	2.5 ± 0.9	1.6 ± 0.8	50.3 ± 1.2*	47.0 ± 1.3*
PBE14	Hexánico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.2 ± 0.3
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	4.1 ± 0.8	5.8 ± 0.9	18.6 ± 2.0	37.5 ± 1.8*
PBF2	Hexánico	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH 9:1	6.6 ± 0.5	1.6 ± 0.1	11.1 ± 0.2	18.8 ± 2.0
Controles	RIVAL®	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	44.6 ± 0.4	44.8 ± 1.8
	Hexazinona	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	50.1 ± 2.0	45.1 ± 1.2

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

Con base en los porcentajes de inhibición presentados en los **Cuadros 13 y 14**, se decidió profundizar en el potencial fitotóxico y antifúngico de los extractos de CH₂Cl₂-MeOH 9:1, mediante la obtención de las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las semillas de prueba *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*, así como, sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos de importancia agrícola *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*.

7. Determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀)

7.1 Potencial antifúngico

Con la finalidad de obtener los valores de CI₅₀ de los 6 extractos activos obtenidos de los cultivos a mediana escala extraídos con una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH en una proporción 9:1, se evaluó su efecto sobre cada uno de los fitopatógenos con importancia económica empleando cuatro diferentes concentraciones de prueba.

En las **Figuras 28-31** se muestra el efecto antifúngico de los extractos evaluados en un rango de 25-1000 µg/mL. Cabe mencionar que no se graficaron los extractos fúngicos que mostraron porcentajes de inhibición menores de 18.1% a la máxima concentración de prueba (1000 µg/mL).

Los extractos de los hongos PBE9, PBE11 y PBE14 mostraron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración. En contraste, el extracto del hongo PBE6 muestra un efecto de saturación, inhibiendo su crecimiento en aproximadamente un 7% a todas las concentraciones de prueba sobre los hongos *F. oxysporum* y *A. alternata*. Por otra parte, el oomiceto fitopatógeno *P. capsici* es inhibido de manera dependiente de la concentración por los extractos de los hongos PBE2, PBE9, PBE11, PBE14. Los extractos de los hongos PBE11 y PBE9 inhiben en un 100% el crecimiento de *P. capsici* mostrando un efecto mayor que el

provocado por el control positivo el Ridomil Gold 4E®, evaluado a la misma concentración de prueba que fue de 250 µg/mL (83.8%). Finalmente, *P. aphanidermatum* es inhibido de forma dependiente de la concentración por los extractos de los endófitos PBE9, PBE11 y PBE14.

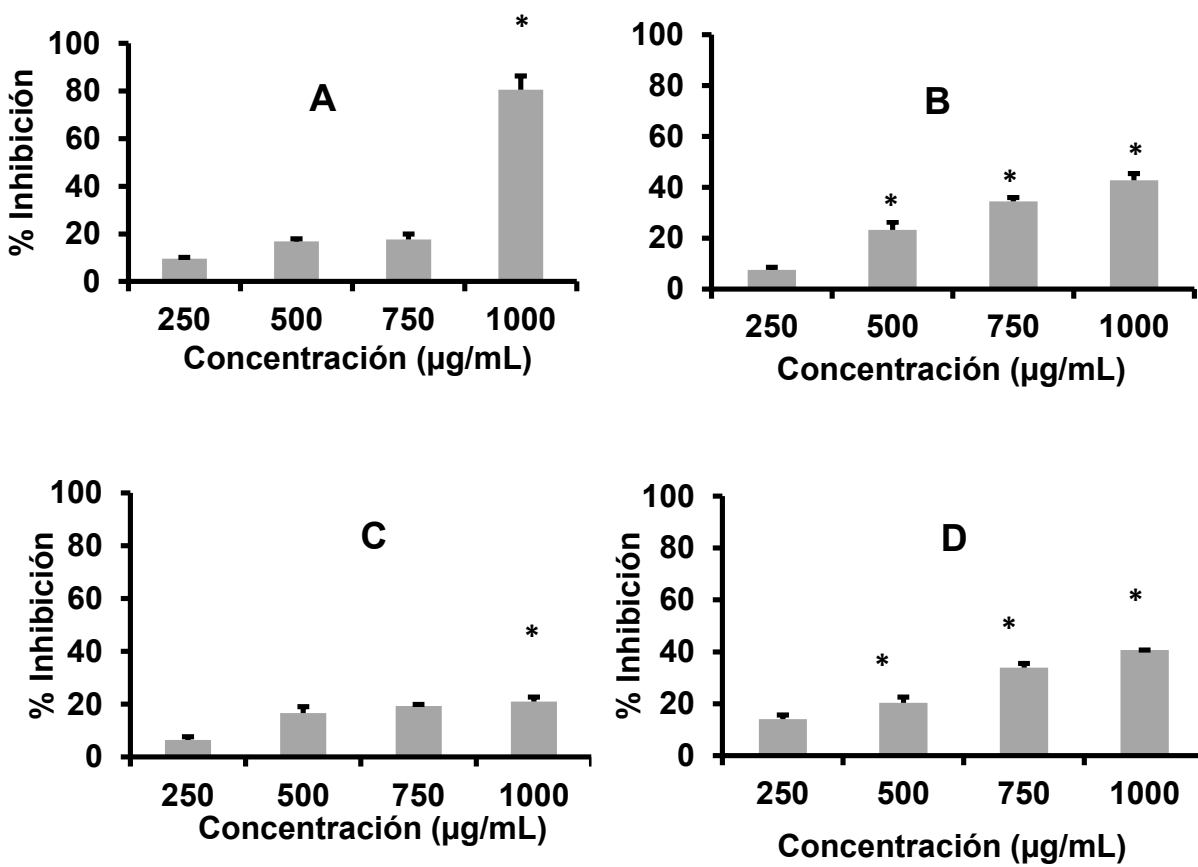


Figura 28. Efecto antifúngico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos de cultivos en mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*: **A)** PBE9 **B)** PBE11 **C)** PBE14 **D)** PBF2.

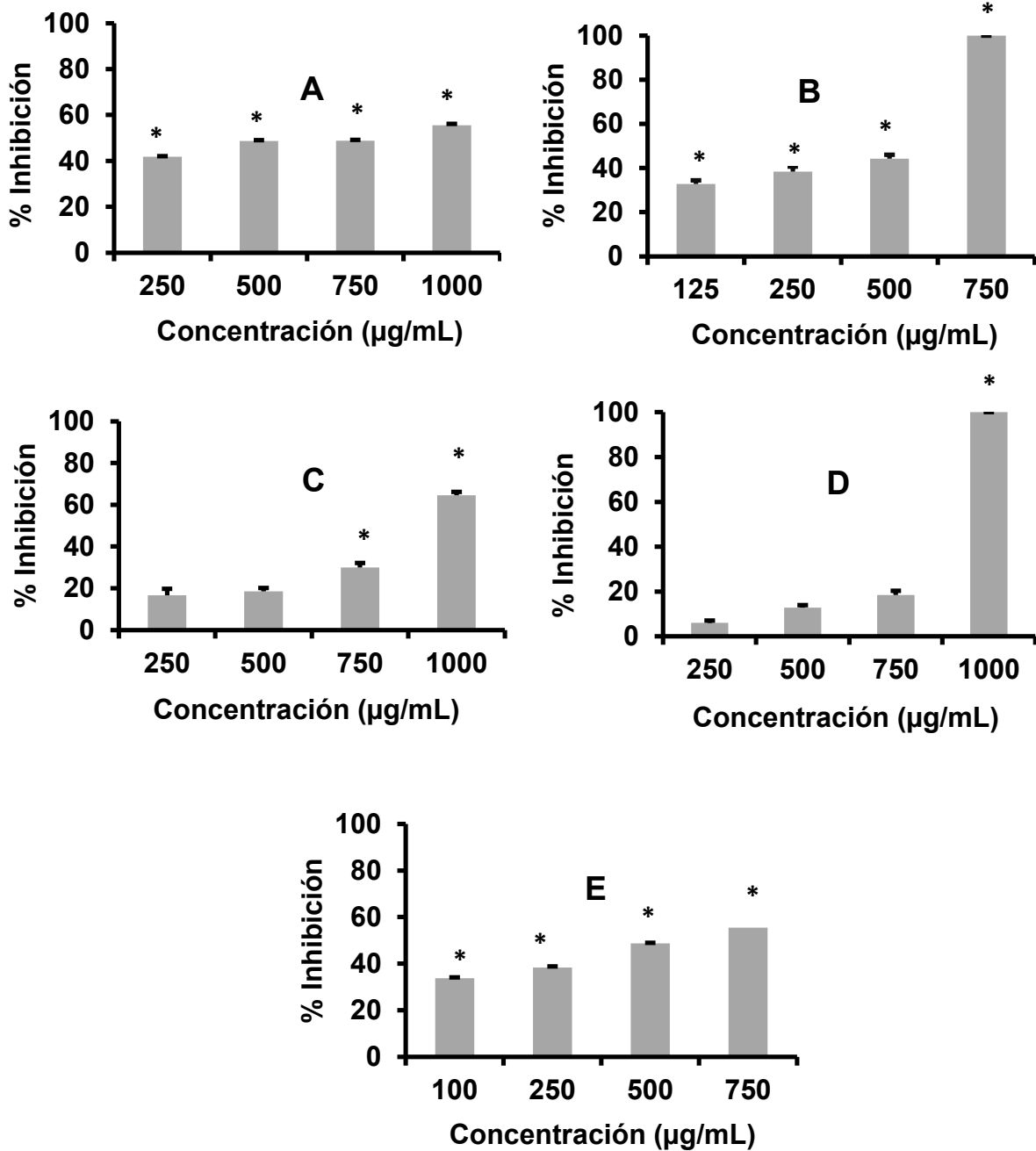


Figura 29. Efecto antifúngico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos de cultivos en mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento radial de *A. alternata*: **A)** PBE2 **B)** PBE9 **C)** PBE11 **D)** PBE14 **E)** PBF2.

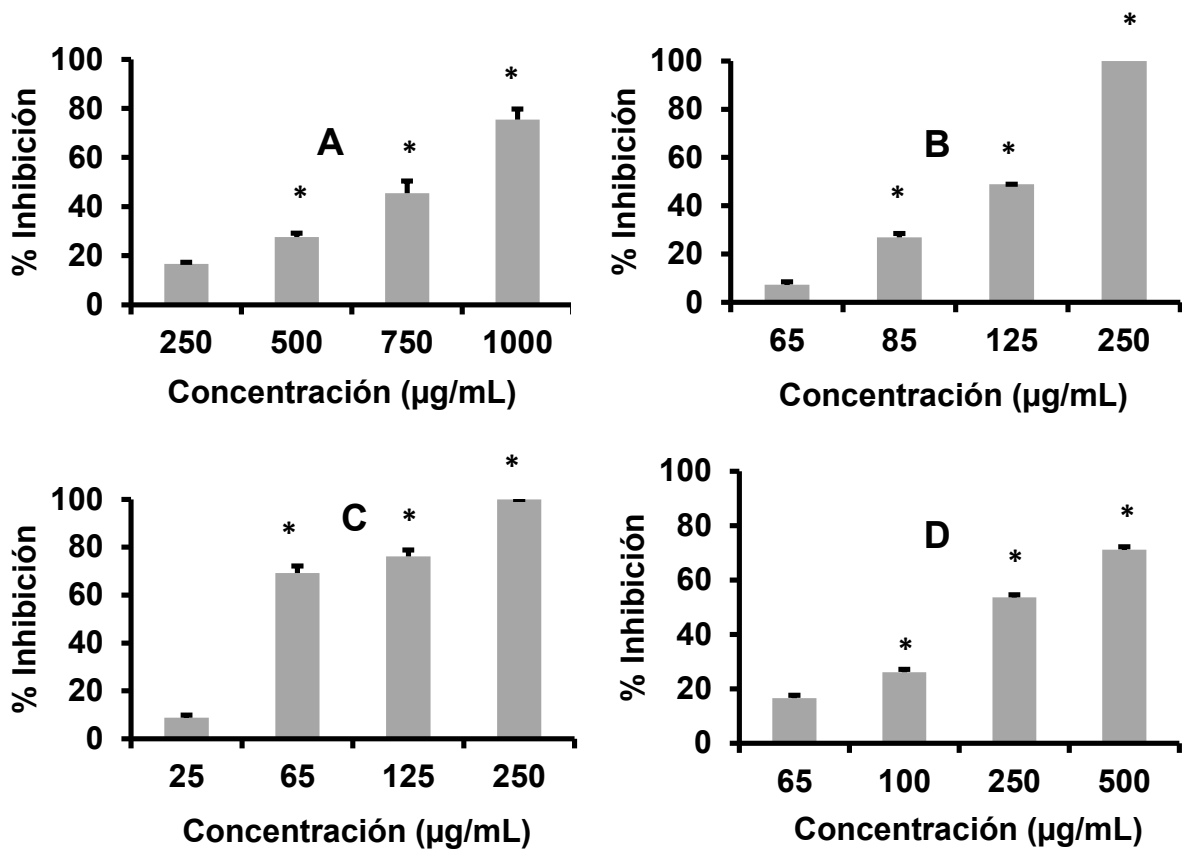


Figura 30. Efecto antifúngico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos de cultivos en mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento radial de *P. capsici*: **A)** PBE2 **B)** PBE9 **C)** PBE11 **D)** PBE2.

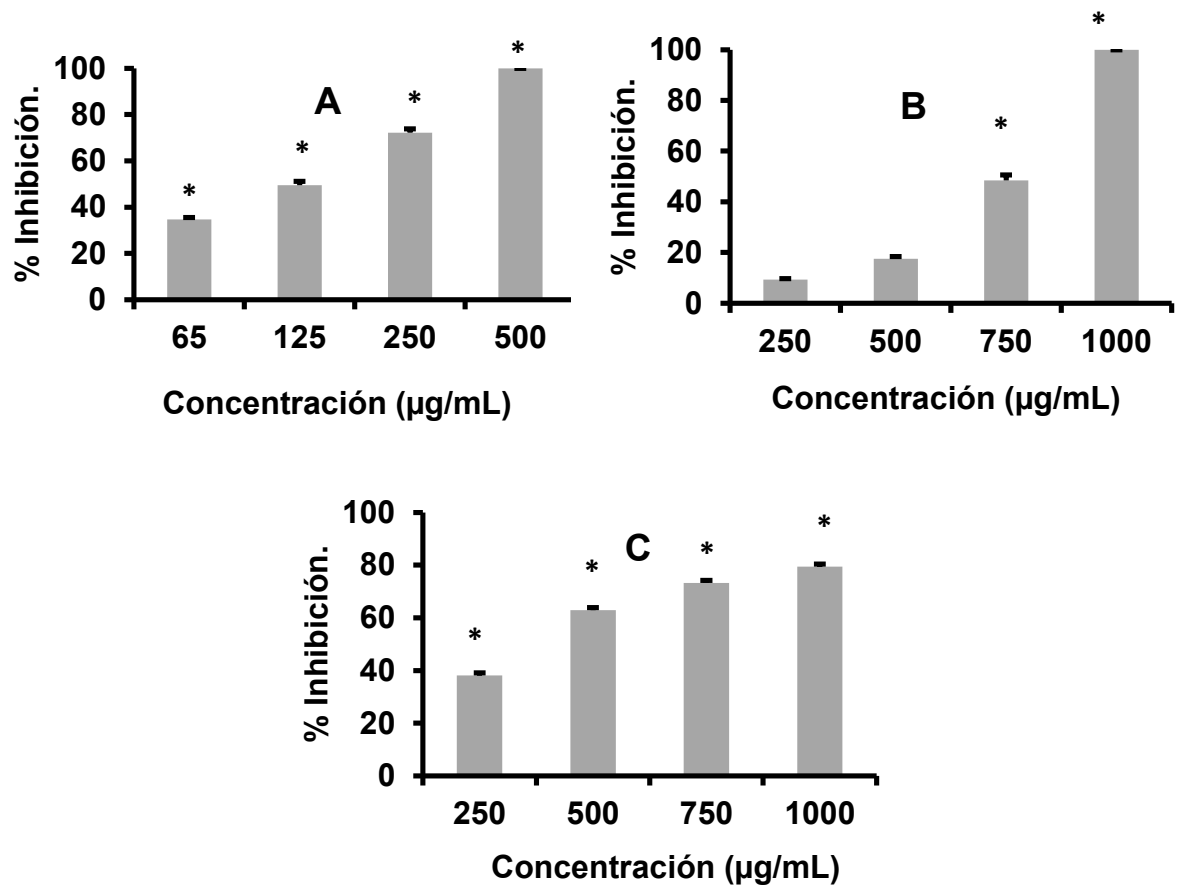


Figura 31. Efecto antifúngico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos de cultivos en mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento radial de *P. aphanidermatum*: **A)** PBE11 **B)** PBE9 **C)** PBE14.

En el **Cuadro 15** se aprecia que, con excepción de PBE9 que muestra un valor de CI_{50} de 864.4 $\mu\text{g/mL}$ sobre el crecimiento de *F. oxysporum* todos los tratamientos presentan valores de CI_{50} superiores a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, en general, todos los extractos evaluados muestran concentraciones inhibitorias medias menores a 1000 $\mu\text{g/mL}$ sobre el crecimiento de *A. alternata* siendo menores a la del fungicida comercial Carbendazim que exhibe un valor de $CI_{50} >1000 \mu\text{g/mL}$. Los extractos de los hongos PBE9, PBE11 y PB14 muestran concentraciones inhibitorias medias menores a 1000 $\mu\text{g/mL}$ sobre los oomicetos *P. aphanidermatum* y *P. capsici*. Con excepción del extracto de PBE11 sobre el crecimiento de *P. capsici*, ninguno de los extractos mostró un valor de CI_{50} comparable a la del control Metalaxil (1.4 $\mu\text{g/mL}$).

Cabe destacar que los extractos provenientes de los hongos PBE9, PBE11 y PBE14 muestran un mayor potencial antifúngico al mostrar valores de CI_{50} menores a 1000 $\mu\text{g/mL}$ sobre al menos tres de los microorganismos de importancia económica en la agricultura.

Cuadro 15. Concentraciones inhibitorias medias sobre el crecimiento radial de los hongos fitopatógenos de importancia en la agricultura *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*.

Endófito	Concentración inhibitoria media ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>P. capsici</i>
PBE2	>1000	658.4	> 1000	736.8
PBE6	>1000	>1000	>1000	>1000
PBE9	864.4	611.2	776.3	157.9
PBE11	>1000	886.4	232.9	49.4
PBE14	>1000	774.7	345.4	191.8
PBF2	>1000	571.6	>1000	>1000
Metalaxil	> 1000	641.0	1.4	50
Carbendazim	2.0	> 1000	> 1000	> 1000

7.2 Actividad fitotóxica

Con el objetivo de obtener el valor de CI_{50} sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* y con base en la inhibición presentada en el **Cuadro 15** por los 6 extractos orgánicos obtenidos de los cultivos en mediana escala se evaluaron cuatro diferentes concentraciones de prueba en un rango de 25-500 $\mu\text{g/mL}$.

Como puede observarse en las **Figuras 32** y **33** los extractos de los hongos PBE6, PBE9, PBE11, y PBE14 mostraron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración sobre el crecimiento de la raíz de ambas semillas de prueba. Por otro lado, la germinación de la semilla de *S. lycopersicum* se vio afectada en un 100% por la concentración más alta de los extractos PBE9 (100 $\mu\text{g/mL}$), PBE11 (200 $\mu\text{g/mL}$), PBE14 (200 $\mu\text{g/mL}$). Para la semilla de prueba *A. hypochondriacus* la germinación se vio afectada significativamente y en un 100% únicamente por la concentración más alta evaluada del extracto del hongo PBE9 (100 $\mu\text{g/mL}$). Por último, en la **Figura 34** se muestra el efecto sobre el proceso de respiración durante la germinación. En general, este proceso se vio afectado significativamente en un intervalo de 22-45% por los extractos de los hongos endófitos PBE9, PBE11 para las semillas de *S. lycopersicum* y por el extracto PBE9 sobre la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus*. Por lo tanto, estos últimos extractos resultaron candidatos idóneos para realizar un estudio específico sobre la cadena respiratoria con el fin de conocer su mecanismo de acción, convirtiéndolos en una fuente de metabolitos secundarios con potencial uso como agentes de control de malezas con un efecto sobre respiración. A manera de ejemplo en la **Figura 35** se muestra el efecto del extracto del hongo PBE9 sobre la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus* y en la **Figura 36** el efecto provocado por el extracto de PBE11 sobre la respiración durante la germinación de las semillas de *S. lycopersicum*. En ambos casos el efecto inhibitorio es dependiente de la concentración, es decir, el consumo de oxígeno disminuye conforme aumenta la concentración del tratamiento.

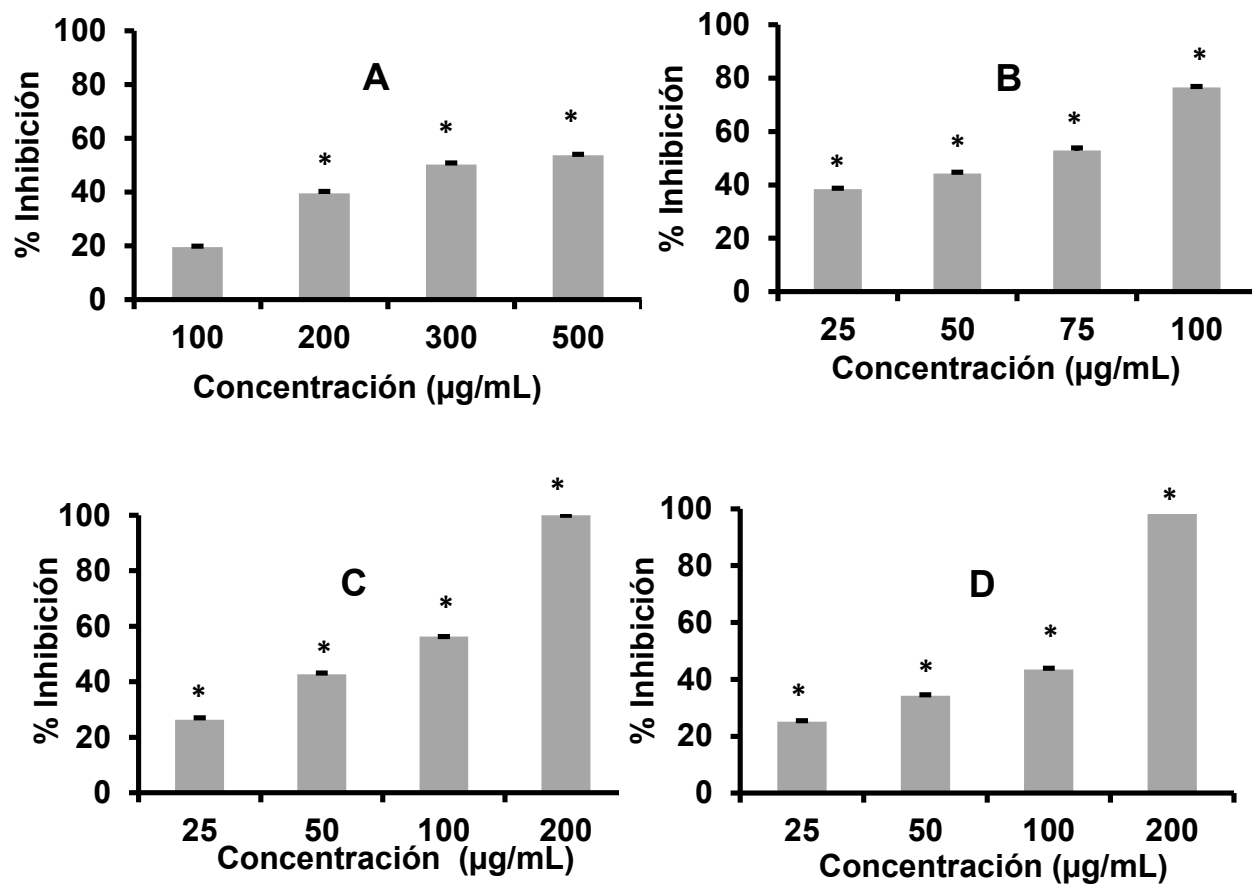


Figura 32. Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos del cultivo a mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico, evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento de la raíz de la semilla *S. lycopersicum*: **A)** PBE6 **B)** PBE9 **C)** PBE11 **D)** PBE14.

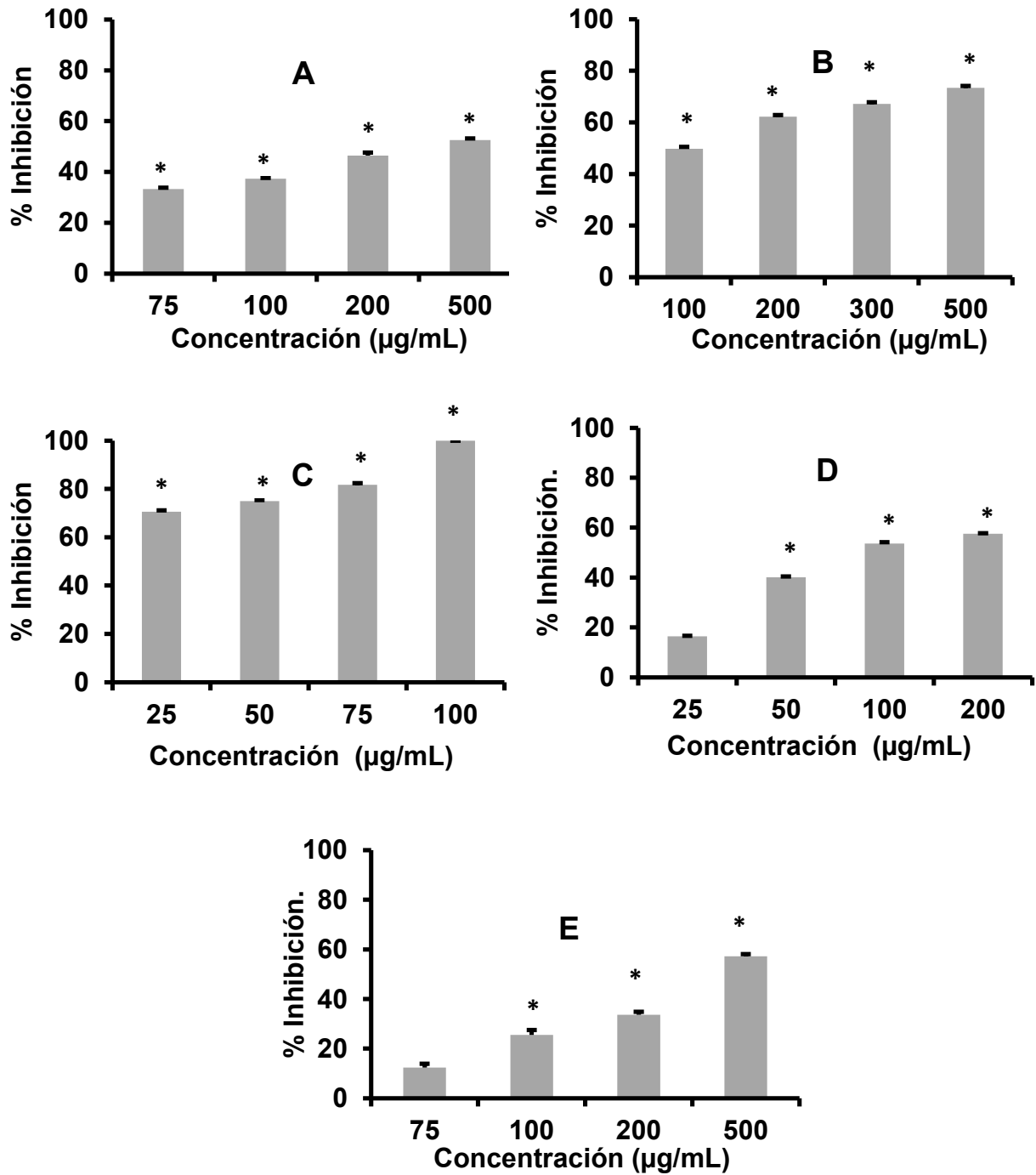


Figura 33. Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos del cultivo a mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico, evaluados a cuatro concentraciones sobre el crecimiento de la raíz de la semilla *A. hypochondriacus*: **A)** PBE2 **B)** PBE6 **C)** PBE9 **D)** PBE11 **E)** PBE14.

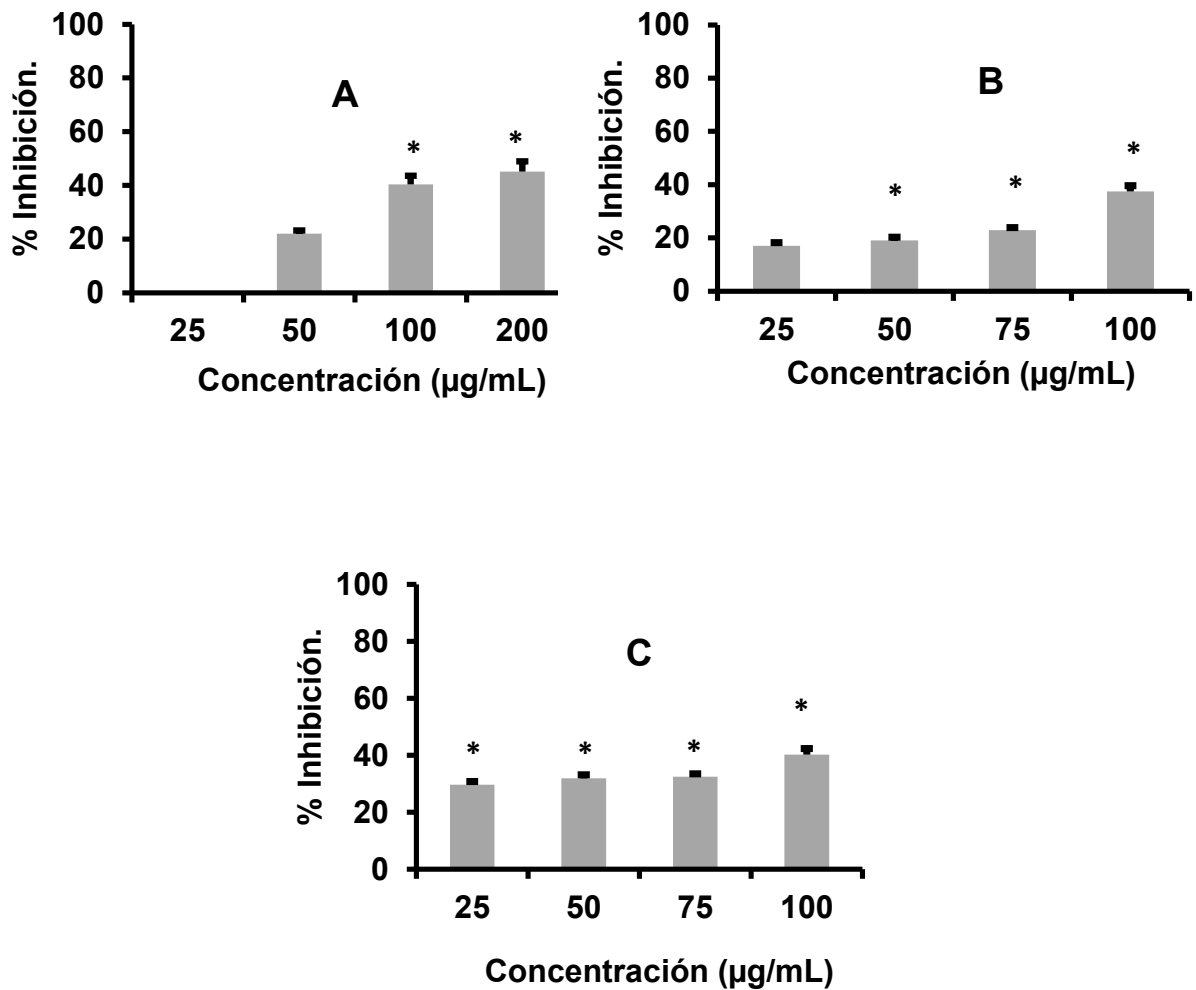


Figura 34. Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos del cultivo a mediana escala de los hongos con mayor potencial biológico, evaluados a cuatro concentraciones sobre el consumo de O₂ de las semillas de *S. lycopersicum*: **A)** PBE11 **B)** PBE9 y *A. hypochondriacus* **C)** PBE9.

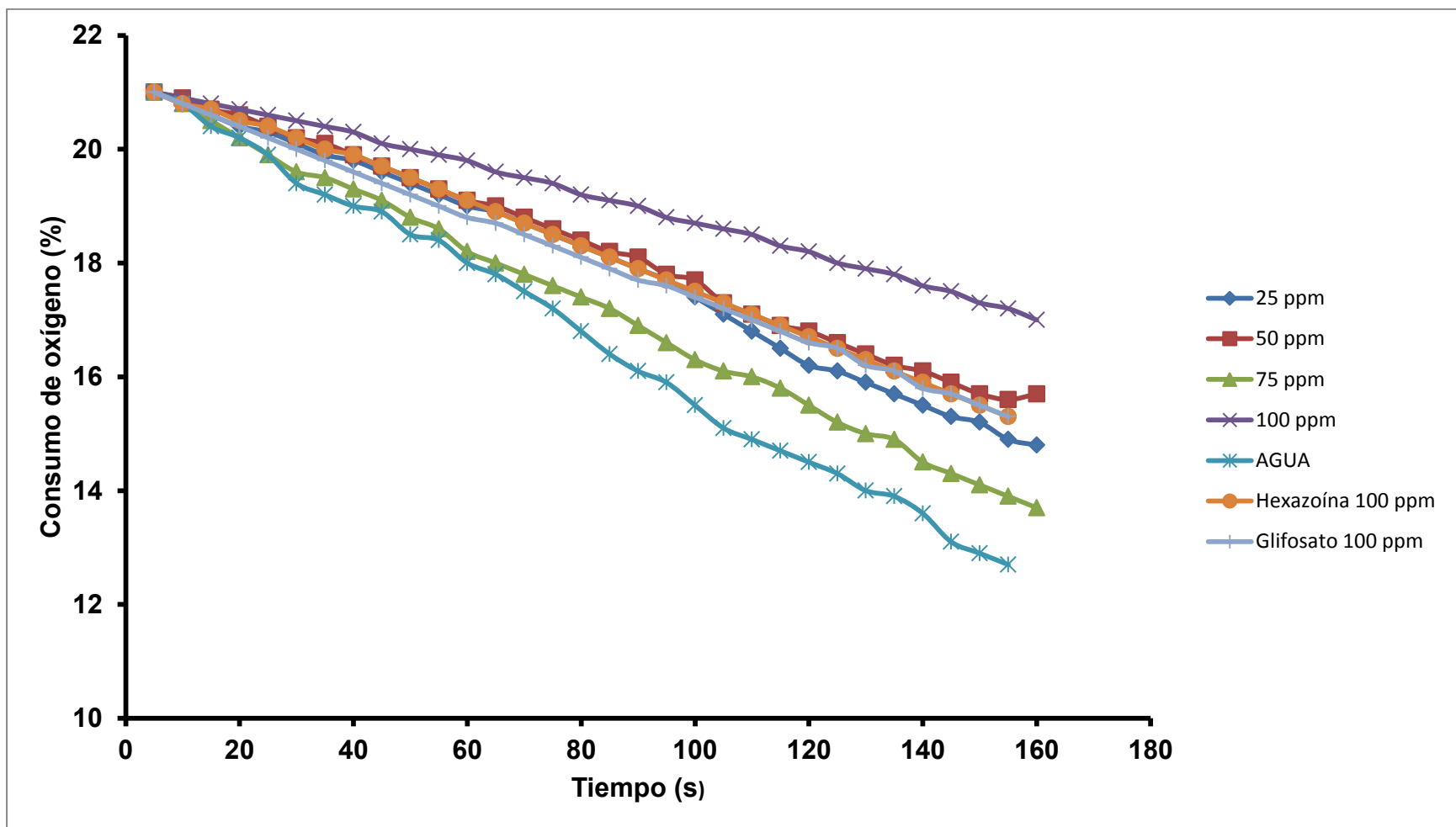


Figura 35. Efecto del extracto orgánico derivado de la maceración con $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ del cultivo en mediana escala de PBE9, sobre el consumo de O_2 de las plántulas de *A. hypochondriacus*.

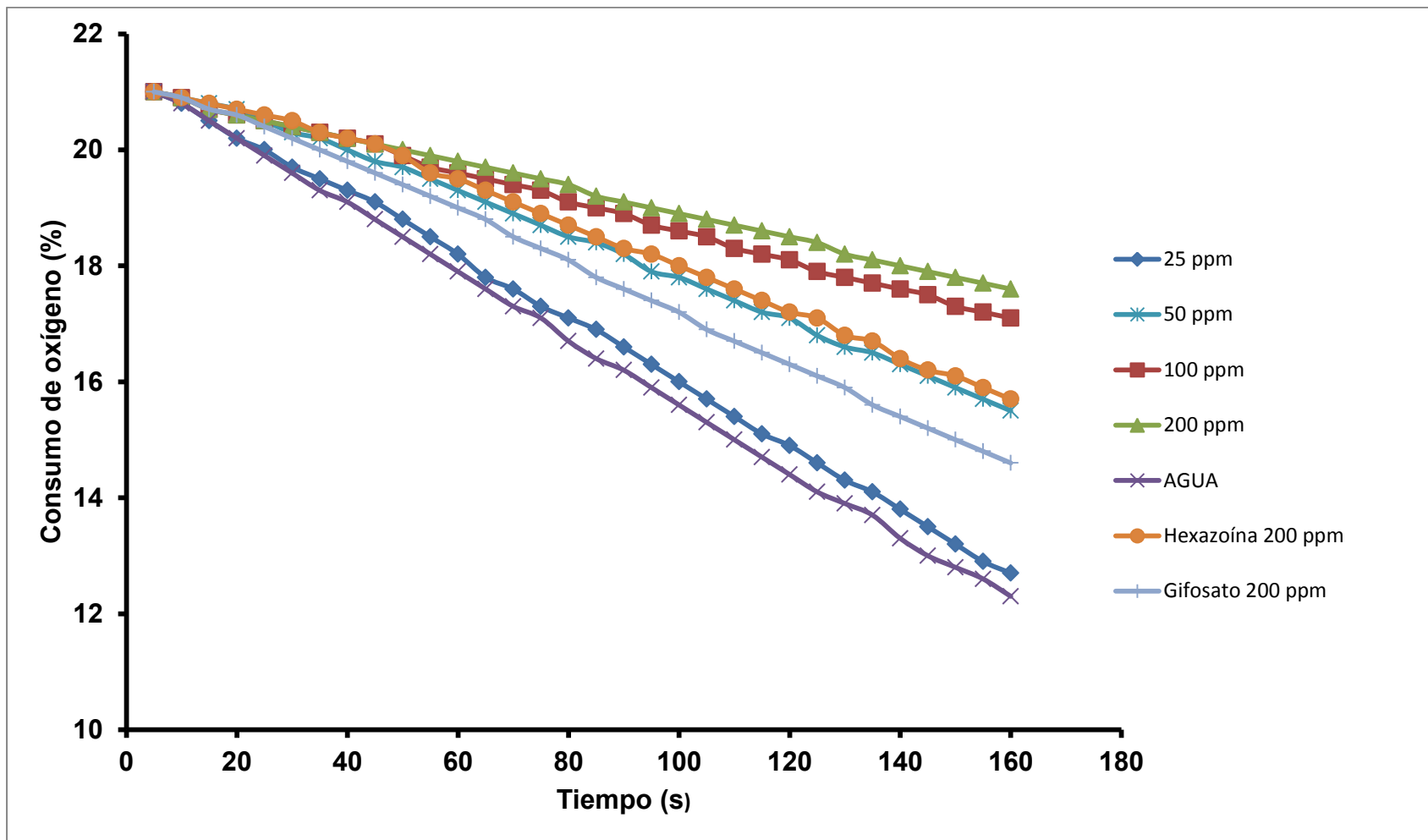


Figura 36. Efecto del extracto orgánico derivado de la maceración con $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ del cultivo en mediana escala de PBE11, sobre el consumo de O_2 de las plántulas de *S. lycopersicum*.

Los **Cuadros 16** y **17** muestran los valores de CI_{50} obtenidos sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de ambas semillas de prueba observándose, que el extracto PBE9 tiene una concentración inhibitoria media de 78.1 $\mu\text{g/mL}$ sobre la germinación de *A. hypochondriacus* comparable a la provocada por el herbicida comercial RIVAL® (66.7 $\mu\text{g/mL}$). La germinación de *S. lycopersicum* es inhibida con valores de CI_{50} menores a la del RIVAL® (117.8 $\mu\text{g/mL}$) por los extractos PBE9 (63.8 $\mu\text{g/mL}$), PBE11 (77.8 $\mu\text{g/mL}$) y PBE14 (70.0 $\mu\text{g/mL}$). Por otra parte, con respecto al crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus*, los valores de CI_{50} obtenidos por los extractos fúngicos de los hongos PBE6 (101.6 $\mu\text{g/mL}$) y PBE11 (71.8 $\mu\text{g/mL}$) son menores al mostrado por el control positivo Hexazinona (121.8 $\mu\text{g/mL}$) y cercanos al del RIVAL® (64.6 $\mu\text{g/mL}$). Las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) de los extractos de PBE9 (60.2 $\mu\text{g/mL}$) y PBE11 (58.8 $\mu\text{g/mL}$) son menores al valor de CI_{50} presentado por el control RIVAL® sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *S. lycopersicum*.

En general las concentraciones inhibitorias medias mostradas sobre la respiración durante la germinación de ambas semillas no se pudieron determinar al ser mayores a la máxima concentración de prueba de todos los tratamientos.

Cuadro 16. Concentraciones Inhibitorias medias (CI_{50}) de los extractos obtenidos de los hongos endófitos con mayor potencial biológico sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus*.

Endófito	Concentración inhibitoria media ($\mu\text{g/mL}$)		
	Germinación	Longitud de la raíz	Consumo de oxígeno.
PBE2	> 500	404.3	> 500
PBE6	> 500	101.6	> 500
PBE9	78.1	345.9	> 100
PBE11	> 100	71.8	> 100
PBE14	> 500	369.9	> 500
PBF2	> 500	> 500	> 500
RIVAL®	66.7	64.6	>1000
Hexazinona	> 200	121.8	> 200

Cuadro 17. Concentraciones inhibitorias medias de los extractos obtenidos de los hongos endófitos con mayor potencial biológico sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de *S. lycopersicum*

Endófito	Concentración inhibitoria media (µg/mL)		
	Germinación	Longitud de la raíz	Consumo de oxígeno.
PBE2	> 500	> 500	> 500
PBE6	> 500	300.0	> 500
PBE9	63.8	60.2	> 100
PBE11	77.8	58.8	> 200
PBE14	70.0	93.5	> 200
PBF2	> 500	> 500	> 500
RIVAL®	117.8	61.4	>1000
Hexazinona	> 200	> 200	> 200

8. Potencial antagónico

Con base en los porcentajes de inhibición mostrados por los extractos de los hongos endófitos cultivados en pequeña y mediana escala se seleccionaron a los hongos endófitos PBE2, PBE8, PBE9, PBE11, PBE12, PBE14 y PBE19 para realizar bioensayos de antagonismo directo múltiple *in vitro* con la finalidad de seleccionar posibles especies útiles como agentes de control biológico y contribuir al estudio de las interacciones inter específicas dentro de las comunidades fúngicas en la naturaleza (Flores-Reséndiz, 2014).

El potencial antagónico de los hongos endófitos se estableció con base en las tasas de crecimiento de los hongos puros, mediante bioensayos de antagonismo entre endófito-fitopatógeno con importancia económica. Para el registro del potencial antagónico y el índice de antagonismo (IA) se tomó en cuenta el **Cuadro 4** que muestra un modificación de las categorías asignadas por Yuen y colaboradores (1999). En todos los casos se muestran las imágenes correspondientes a los antagonismos observados a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.

En la **Figura 37** se muestra un ejemplo representativo del control de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos a los días de interacción antagónica registrados.

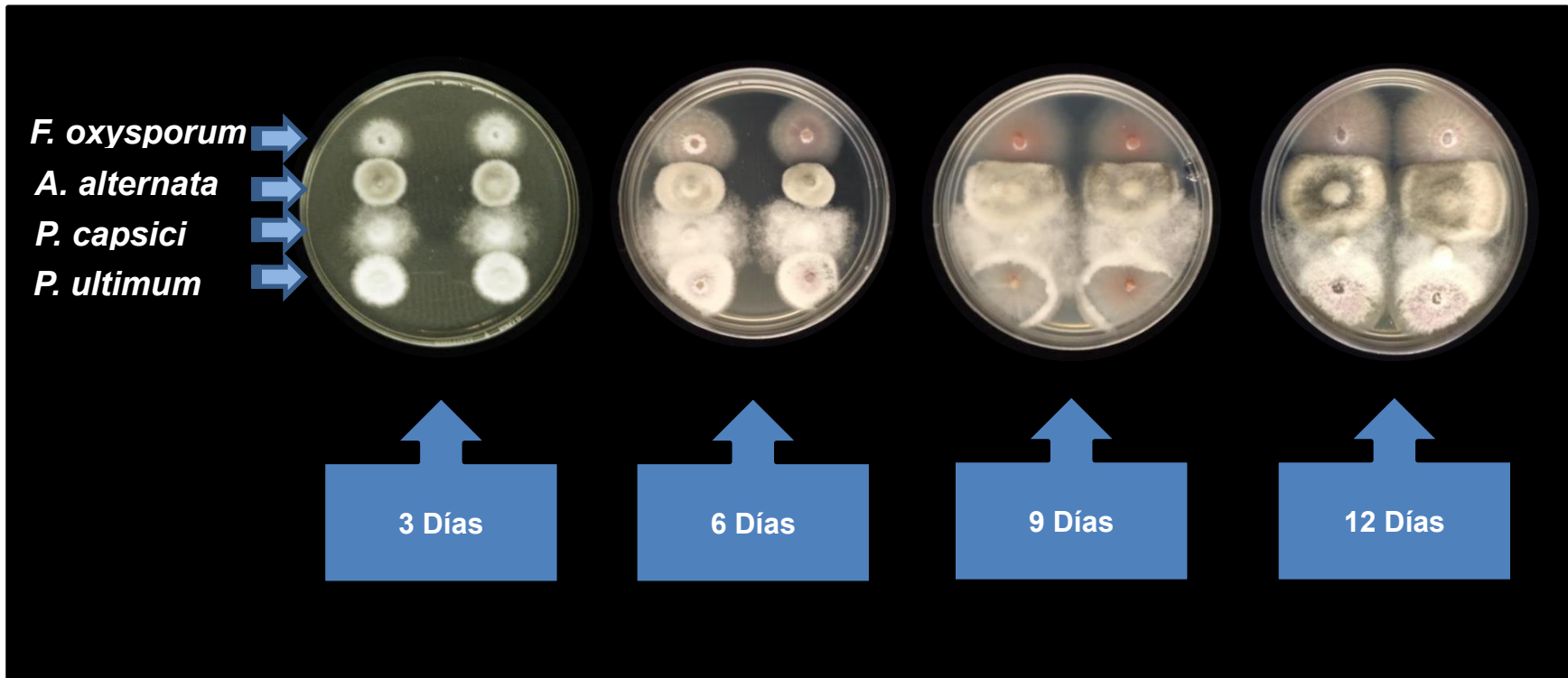


Figura 37. Controles de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de bioensayo.

8.1 Antagonismo entre el endófito PBE2 y los fitopatógenos de importancia económica

En la **Figura 38** se ilustra la interacción entre el endófito PBE2 y los fitopatógenos de prueba. Se puede observar que *A. alternata* es el hongo más afectado presentando una interacción tipo E (**Cuadro 4**) donde el endófito inhibe a distancia al fitopatógeno. En el **Cuadro 18** se muestran los porcentajes de inhibición sobre su crecimiento mostrando una inhibición del 100% a lo largo de todo el bioensayo. El segundo microorganismo más afectado es *P. capsici* al presentar una inhibición de 100% en los 3 y 6 días de interacción antagónica además de una interacción tipo E, sin embargo, esta inhibición disminuye hasta un 40.2% en el día 12 de bioensayo. *F. oxysporum* y *P. ultimum* son los microorganismos que presentan porcentajes de inhibición menores mostrando interacciones tipo B a lo largo de todo el bioensayo en la que el hongo fitopatógeno crece en contacto con el endófito y cesa el crecimiento de ambas especies.

Con base en las observaciones asignadas de acuerdo al **Cuadro 4** el hongo endófito PBE2 muestra un índice de antagonismo **IA** de 10 a los 3 y 6 días, y de 6 a los 9 y 12 días.

Cuadro 18. Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo *in vitro* contra el endófito PBE2.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	19.9 ± 2.0	38.7 ± 2.5*	37.4 ± 2.3*	41.0 ± 4.0*
<i>A. alternata</i>	100.0 ± 0.0.*	100.0 ± 0.0.*	100.0 ± 0.0.*	100.0 ± 0.0.*
<i>P. capsici</i>	100.0 ± 0.0.*	100.0 ± 0.0.*	41.79 ± 2.9*	40.2 ± 1.5*
<i>P. ultimum</i>	36.7 ± 4.0*	38.2 ± 2.6*	38.7 ± 3.4*	38.0 ± 1.3*
IA	10	10	6	6

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$), Se presenta el promedio de 6 repeticiones.

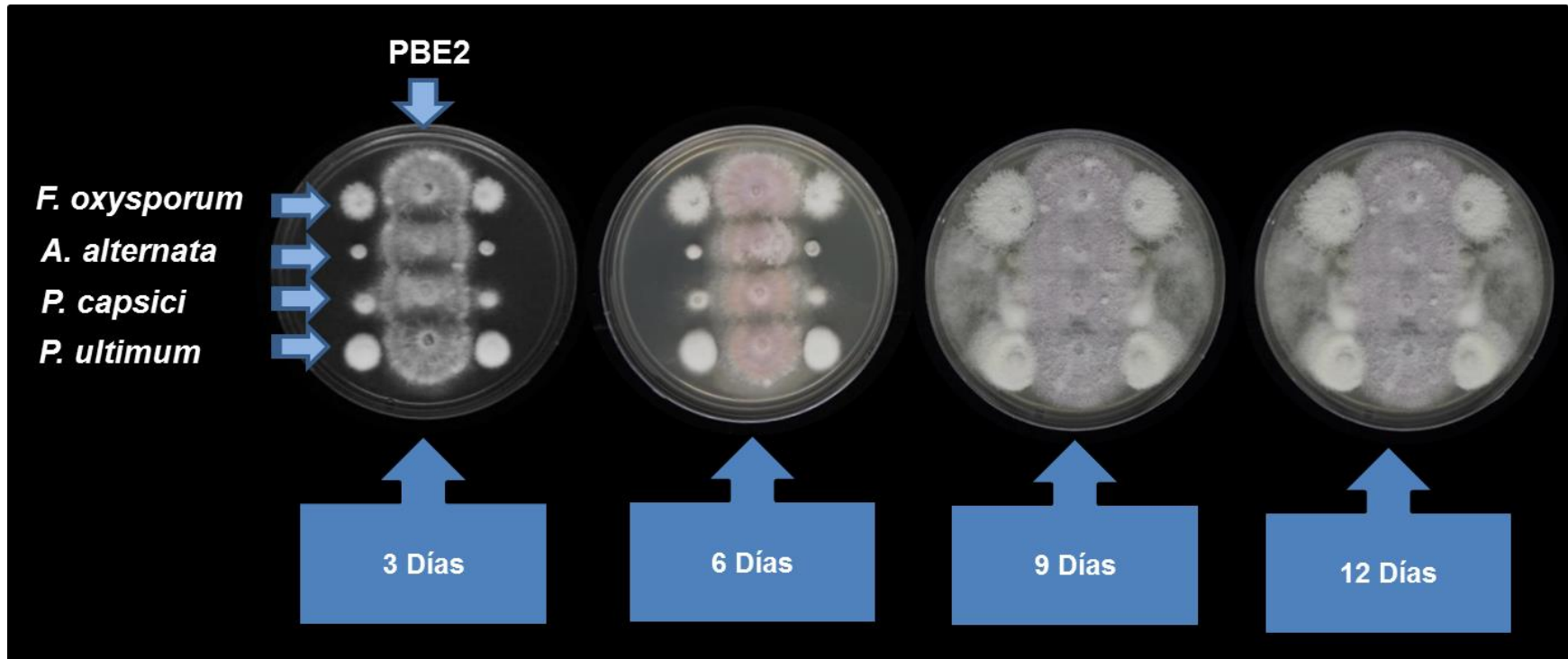


Figura 38. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE2 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.

8.2 Antagonismo entre el endófito PBE8 y los fitopatógenos de importancia económica

La **Figura 39** muestra la interacción entre PBE8 y los microorganismos de prueba. Se puede observar que desde el día 3 hasta el día 12 de interacción se aprecia una inhibición a distancia de los 4 fitopatógenos debida a la presencia del endófito PBE8, generando una interacción tipo E. Es decir, el endófito inhibe a distancia a sus competidores, posiblemente podría estar por medio de metabolitos secundarios difundidos en el medio de cultivo o bien por compuestos orgánicos volátiles (VOCs), los cuales comprenden una amplia gama de compuestos químicos incluyendo alcoholes, aldehídos, cetonas, terpenos y compuestos aromáticos de los cuales muchos tienen propiedades antifúngicas, y están involucrados en las respuestas de defensa de las plantas y hongos (Stadler y Sterner 1998; Abraham, 2001; Cheng *et al.*, 2005).

En el **Cuadro 19** se observa que los fitopatógenos *P. ultimum* (100%) y *P. capsici* (54.8%) son los más afectados al día 3 de interacción, sin embargo, al finalizar el bioensayo *P. ultimum* es inhibido solo en un 40%. Los microorganismos *F. oxysporium*, *A. alternata* y *P. capsici* son inhibidos de manera dependiente del tiempo de bioensayo mostrando porcentajes de inhibición de 68.7%, 66.4% y 86.2%, respectivamente, al día 12 de interacción. El endófito PBE8 muestra un **IA** de 16 que se mantiene a lo largo de todo el bioensayo.

Cuadro 19. Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo *in vitro* contra el endófito PBE8.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	41.0 ± 5.0*	44.2 ± 4.9*	56.5 ± 2.0*	68.7 ± 2.8*
<i>A. alternata</i>	49.2 ± 5.1*	57.1 ± 5.1*	60.9 ± 5.9*	66.4 ± 2.6*
<i>P. capsici</i>	54.8 ± 6.0*	75.9 ± 4.5*	76.0 ± 2.5*	86.2 ± 1.1*
<i>P. ultimum</i>	100.0 ± 2.0*	54.5 ± 0.0*	41.6 ± 3.3*	40.0 ± 0.0*
IA	16	16	16	16

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$), Se presenta el promedio de 6 repeticiones.

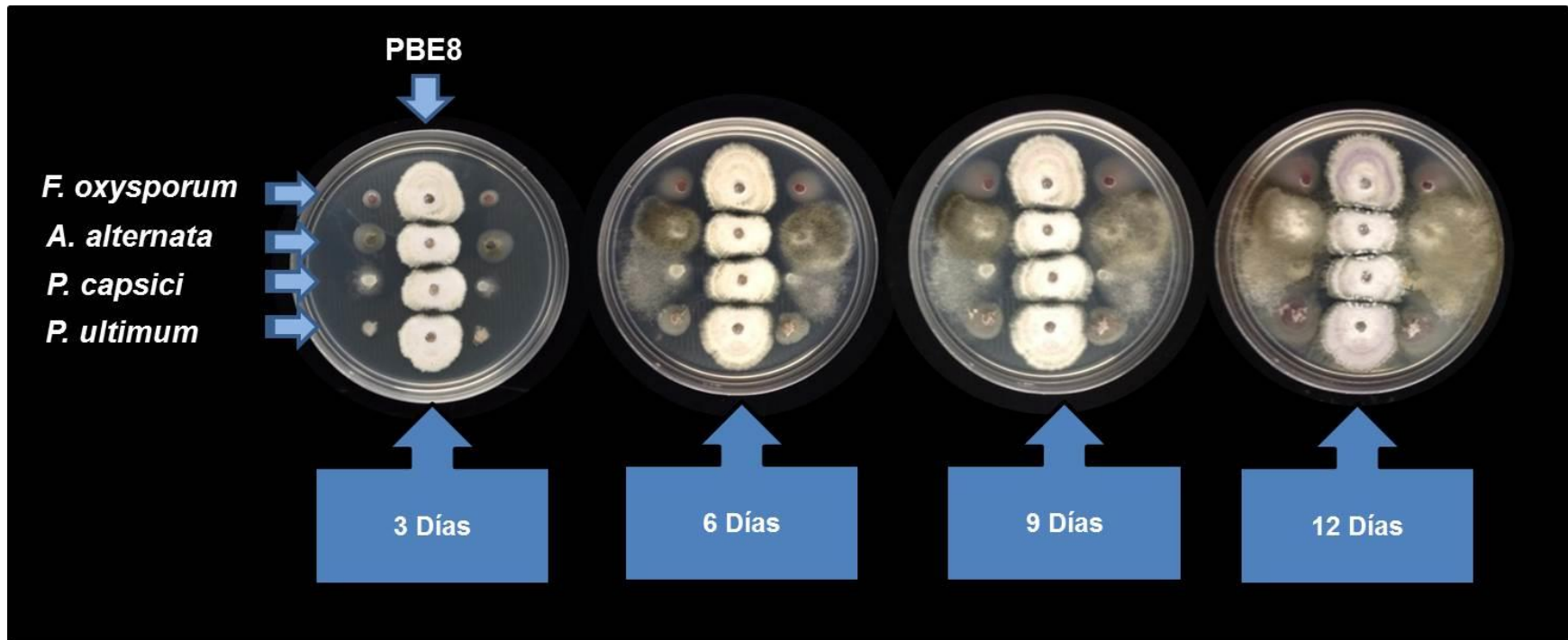


Figura 39. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE8 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.

8.3 Antagonismo entre el endófito PBE9 y los fitopatógenos de importancia económica

En la **Figura 40** se muestran fotografías del antagonismo directo entre el endófito PBE9 y los fitopatógenos de importancia económica, se puede observar que a partir del día 3 de interacción antagonica y hasta el día 12, el endófito PBE9 mantiene una interacción tipo B frente a sus competidores, donde ambas especies crecen en contacto cesando su crecimiento, por lo tanto se obtuvo un IA de 4, que se mantuvo a lo largo de todo el bioensayo.

El **Cuadro 20** se observa que los fitopatógenos que resultaron más afectados al día 12 de interacción antagonica son *A. alternata* (62.5%) y *P. capsici* (43.6%) mostrando porcentajes de inhibición significativos seguidos de *P. ultimum* (39.7%) y *F. oxysporum* (39.5%).

Cuadro 20. Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo *in vitro* contra el endófito PBE9.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	31.4 ± 2.0*	37.6 ± 0.6*	38.4 ± 2.2*	39.5 ± 1.9*
<i>A. alternata</i>	44.4 ± 1.2*	46.3 ± 4.7*	47.4 ± 2.3*	62.5 ± 1.1*
<i>P. capsici</i>	31.9 ± 3.4*	39.5 ± 2.6*	39.9 ± 1.3*	43.6 ± 3.2*
<i>P. ultimum</i>	5.5 ± 0.2	13.2 ± 2.3	28.5 ± 1.8*	39.7 ± 1.2*
IA	4	4	4	4

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$), Se presenta el promedio de 6 repeticiones.

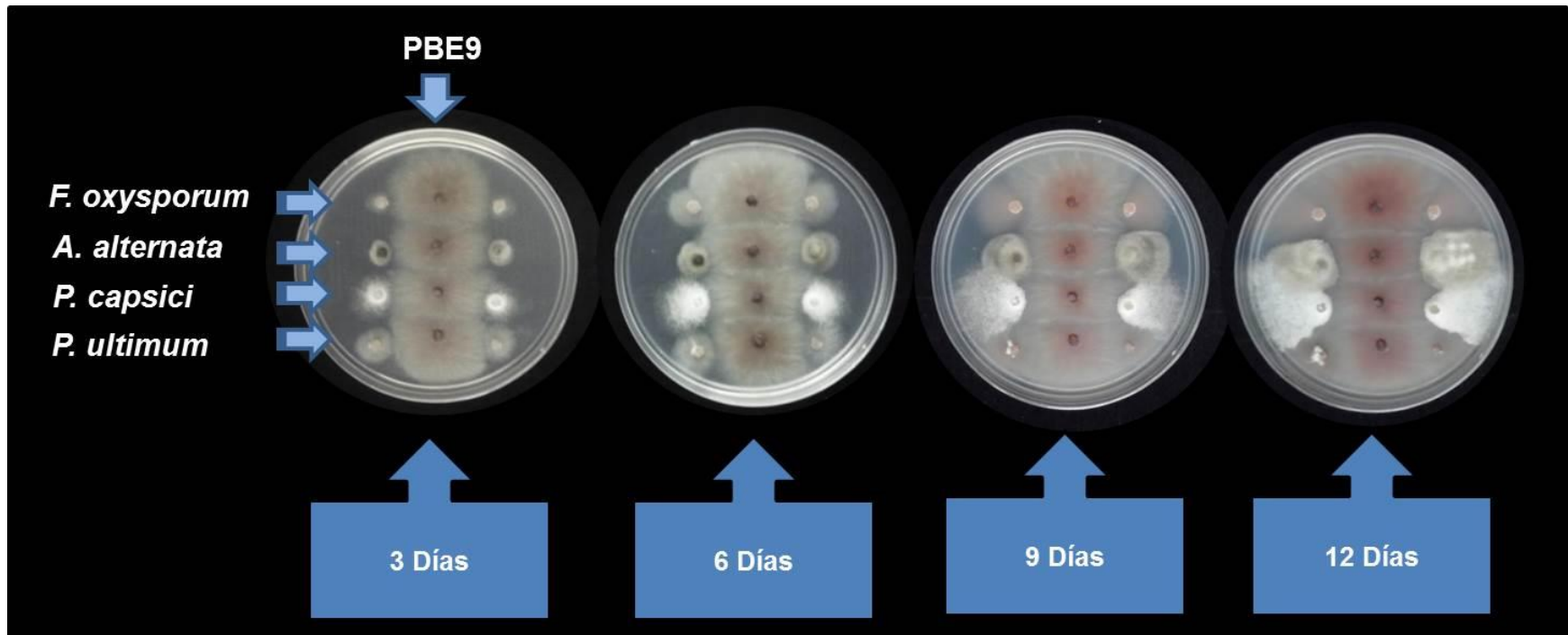


Figura 40. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE9 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.

8.4 Antagonismo entre el endófito PBE11 y los fitopatógenos de importancia económica

En la **Figura 41** se presentan a manera de ejemplo fotografías del antagonismo directo *in vitro* entre el hongo endófito PBE11 y 4 fitopatógenos de importancia en la agricultura. Se puede observar que a partir del día 3 y hasta el día 12 de interacción antagónica la presencia del hongo endófito PBE11 produce sobre el crecimiento de *A. alternata* y *P. capsici* una interacción tipo E es decir, una inhibición a distancia (**Cuadro 4**), la cual como ya se mencionó anteriormente podría estar mediada por VOCs y/o por la difusión de metabolitos secundarios a través del sustrato (Rayner *et al.*, 1994; Boddy, 2000). También es posible observar que a partir del día 6 el micelio del endófito PBE11 crece encima de *F. oxysporum* manteniendo una interacción tipo D, en la cual el endófito crece sobre su competidor inhibiendo su crecimiento. Estas observaciones indican que posiblemente el endófito PBE11 sea un micoparásito de *F. oxysporum* y en consecuencia este microorganismo podría constituir un agente de control biológico sobre esta especie (Cao *et al.*, 2009) Por otro lado *P. ultimum* presenta una interacción tipo B contribuyendo con un punto al cálculo del índice de antagonismo (**Cuadro 4**). El endófito PBE11 muestra un **IA** de 12 puntos a partir del día 6 de interacción de 10 a 12 puntos.

En el **Cuadro 21** se aprecia en general, que los microorganismos fitopatógenos son inhibidos significativamente por la presencia de PBE11, mostrando mayores porcentajes de inhibición al día 12 de interacción antagónica siendo *A. alternata* (61.4%) y *P. capsici* (60.1%) las especies más afectadas.

Cuadro 21. Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo *in vitro* contra el endófito PBE11.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	26.6 ± 2.3*	44.0 ± 3.5*	51.2 ± 0.8*	51.2 ± 1.2*
<i>A. alternata</i>	12.8 ± 1.0	56.2 ± 0.7*	61.4 ± 2.0*	61.4 ± 1.3*
<i>P. capsici</i>	42.1 ± 4.3*	58.8 ± 2.2*	59.5 ± 4.3*	60.0 ± 2.4*
<i>P. ultimum</i>	21.9 ± 1.5*	36.7 ± 1.9*	45.9 ± 3.2*	46.0 ± 2.1*
IA	10	12	12	12

IA Índice de antagonismos, * Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$), Se presenta el promedio de 6 repeticiones.

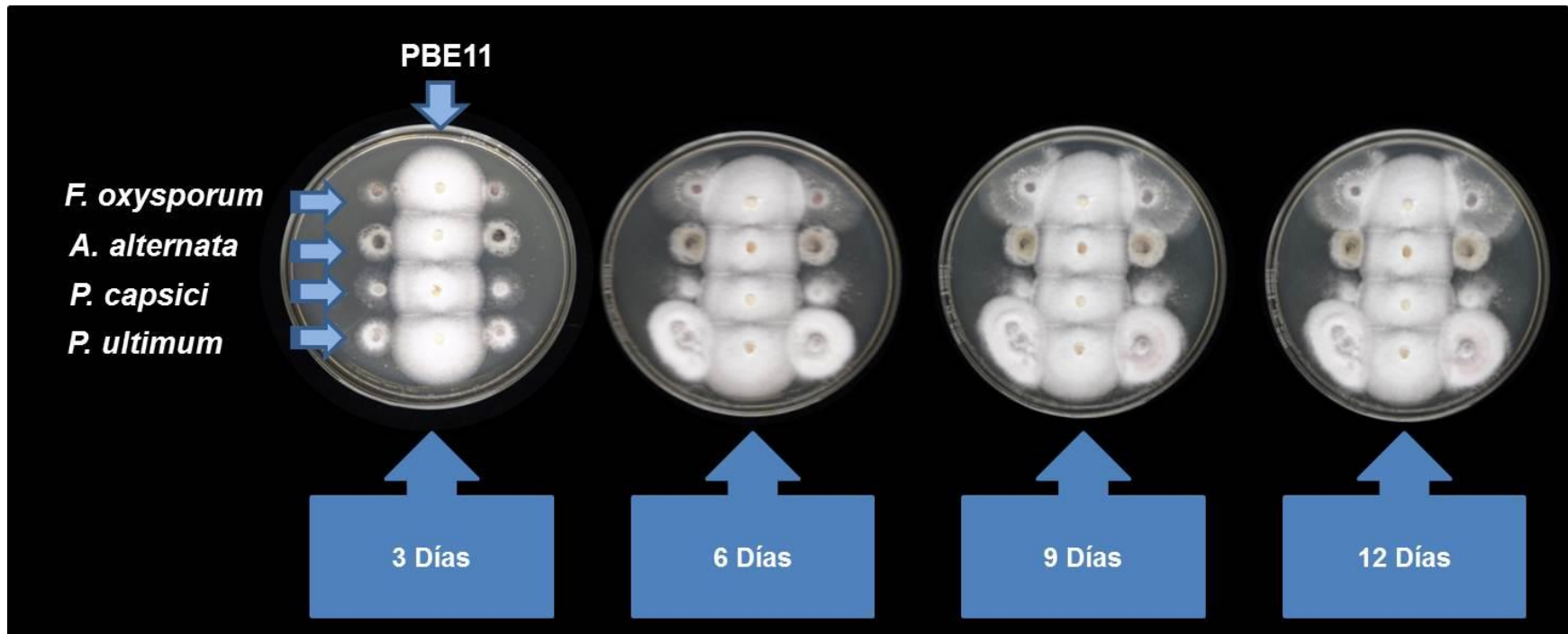


Figura 41. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE11 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.

8.5 Antagonismo entre el endófito PBE12 y los fitopatógenos de importancia económica

En la **Figura 42** se observan las fotografías del antagonismo directo entre el PBE12 y cuatro microorganismos competidores de prueba. Con excepción del fitopatógeno *A. alternata* que es inhibido a distancia, generando una interacción tipo D la cual que mantiene durante todo el bioensayo. Se aprecia en general que el endófito PBE12 y los hongos fitopatógenos *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici* y *P. ultimum* crecen hasta hacer contacto las hifas de su micelio, disminuyendo su crecimiento desarrollando en consecuencia una interacción tipo B con un valor de 1 punto (**Cuadro 4**). El IA del hongo PBE12 es de 7 puntos y este se mantiene durante los 12 días de interacción antagónica.

En el **Cuadro 22** se muestran los porcentajes de inhibición provocados por el endófito PBE12 sobre los microorganismos de prueba mostrando porcentajes de inhibición significativos a partir del día 6. *A. alternata* (56.7%) y *P. capsici* (41.4%) son los más inhibidos al día 12 de interacción.

Cuadro 22. Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en bioensayo de antagonismo directo *in vitro* contra el endófito PBE12.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	3.9 ± 0.7	29.0 ± 1.3*	29.2 ± 1.0*	38.2 ± 1.1*
<i>A. alternata</i>	31.4 ± 3.9*	46.5 ± 2.4*	51.1 ± 2.0*	56.7 ± 3.2*
<i>P. capsici</i>	25.1 ± 3.3*	32.8 ± 3.1*	34.6 ± 4.4*	41.4 ± 2.2*
<i>P. ultimum</i>	20.1 ± 2.8*	29.4 ± 2.4*	37.0 ± 2.9*	37.5 ± 1.3*
IA	7	7	7	7

IA. Índice de antagonismo, * Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$), Se presenta el promedio de 6 repeticiones.

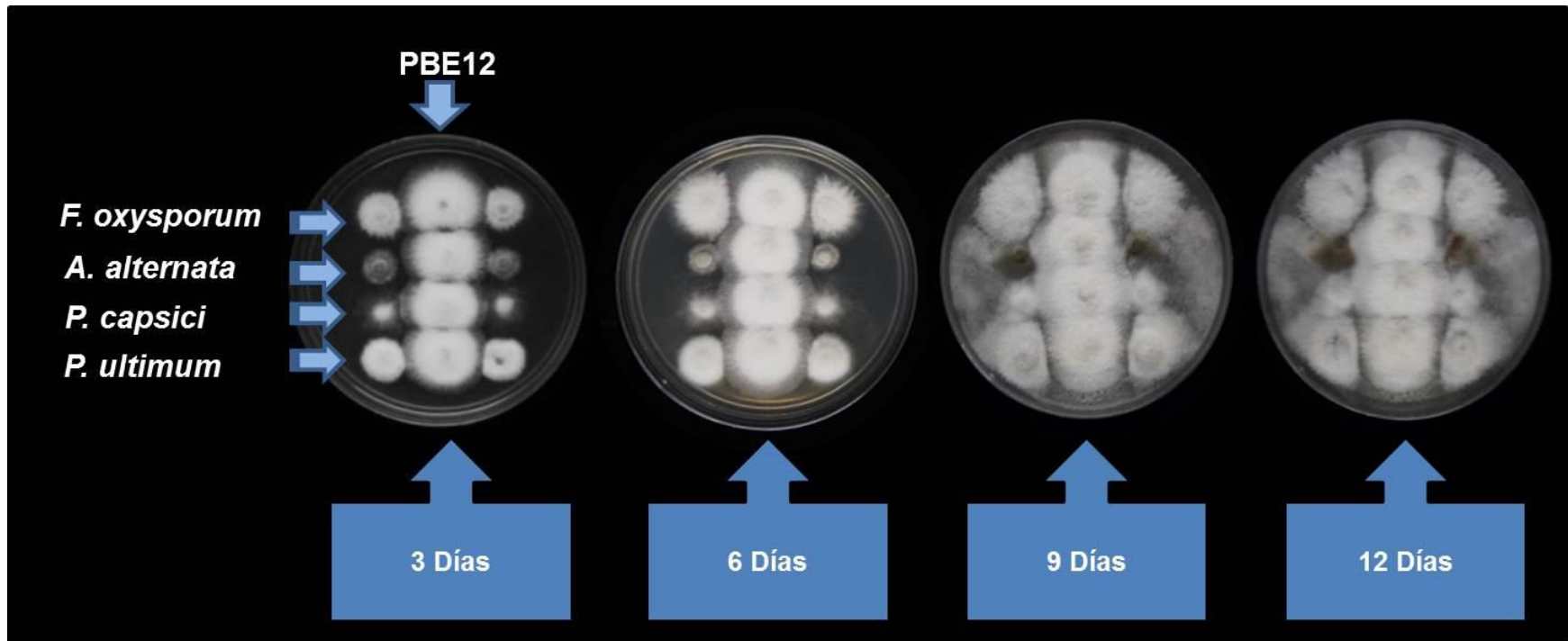


Figura 42. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE12 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción

8.6 Antagonismo entre el endófito PBE14 y los fitopatógenos de importancia económica

En la **Figura 43** se muestran a manera de ejemplo fotografías del bioensayo de antagonismo directo entre el endófito PBE14 y fitopatógenos competidores. Con excepción del fitopatógeno *A. alternata* que es inhibido a distancia generando una interacción tipo E con un valor de 4 puntos, a lo largo de todo el bioensayo. Todos los fitopatógenos de prueba presentan una interacción tipo B con el endófito PBE14 (**Cuadro 4**) El IA de PBE14 es de 7 y se mantiene durante todo el bioensayo.

En el **Cuadro 23** se muestra el porcentaje de inhibición de los microorganismos competidores. En general al día 12 de interacción PBE14 muestra valores de porcentajes de inhibición significativos superiores al 50 %. *A. alternata* (78.4%) es la especie más afectada.

Cuadro 23. Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en el bioensayo de antagonismo directo *in vitro* contra el endófito PBE14.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	20.7 ± 1.1*	37.5 ± 3.5*	46.4 ± 2.7*	56.0 ± 2.1*
<i>A. alternata</i>	29.7 ± 1.2*	65.9 ± 3.2*	72.4 ± 6.1*	78.4 ± 2.9*
<i>P. capsici</i>	39.4 ± 2.3*	43.7 ± 2.7*	54.0 ± 1.3*	54.0 ± 1.2*
<i>P. ultimum</i>	70.3 ± 3.5*	47.5 ± 3.4*	45.4 ± 2.9*	45.4 ± 2.8*
IA	7	7	7	7

IA. Índice de antagonismo, * Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$), Se presenta el promedio de 6 repeticiones.

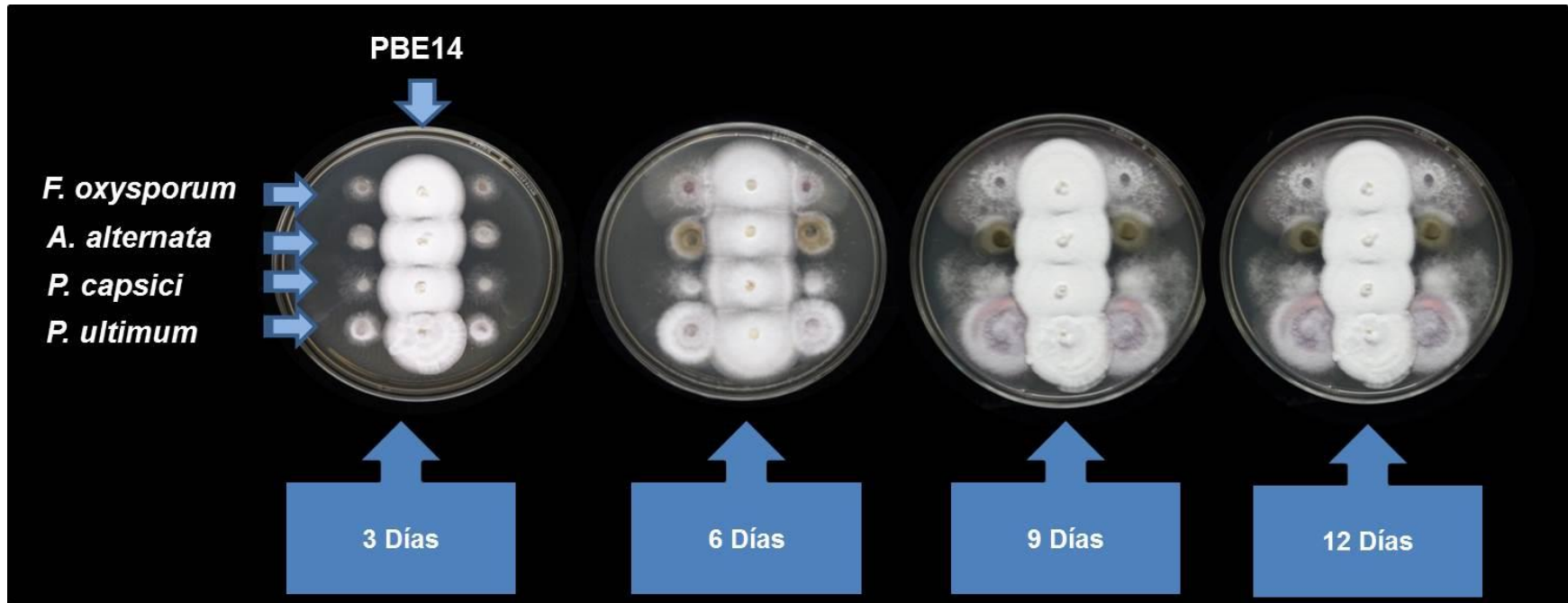


Figura 43. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE14 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción.

8.7 Antagonismo entre el endófito PBE19 y los fitopatógenos de importancia económica.

En la **Figura 44** se observan las fotografías del antagonismo directo entre el hongo PBE19 y 4 microorganismos de importancia en la agricultura. Se aprecia a partir del día 6 una interacción tipo C₂ con valor de 2 puntos con todos sus competidores, en donde el endófito PBE19 forma una barrera micelial inhibiendo el crecimiento de sus competidores e impidiendo el contacto entre las hifas de su micelio observándose un **IA** de 8 puntos. La presencia de la barrera micelial indica que el hongo endófito PBE19 posee además, mecanismos de defensa físicos (Yuen *et al.*, 1999)

En el **Cuadro 24** se muestran los porcentajes de inhibición sobre los fitopatógenos de prueba, observándose en general, valores significativos próximos al 50% al día 12 de bioensayo *F. oxysporum* (54.1%) y *P. capsici* (61.1%) muestran los mayores porcentajes de inhibición.

Cuadro 24. Índice de antagonismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica en bioensayo de antagonismo directo *in vitro* contra el endófito PBE19.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	14.9 ± 1.3	51.4 ± 5.0*	54.1 ± 6.8*	54.1 ± 6.8*
<i>A. alternata</i>	24.7 ± 3.0*	42.8 ± 3.8*	51.8 ± 5.0*	51.8 ± 5.0*
<i>P. capsici</i>	45.1 ± 3.3*	59.4 ± 6.0*	61.7 ± 4.0*	61.7 ± 4.0*
<i>P. ultimum</i>	7.6 ± 0.7	41.0 ± 4.9*	45.6 ± 2.2*	45.6 ± 2.2*
IA	4	4	4	4

IA. Índice de antagonismo, * Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$), Se presenta el promedio de 6 repeticiones.

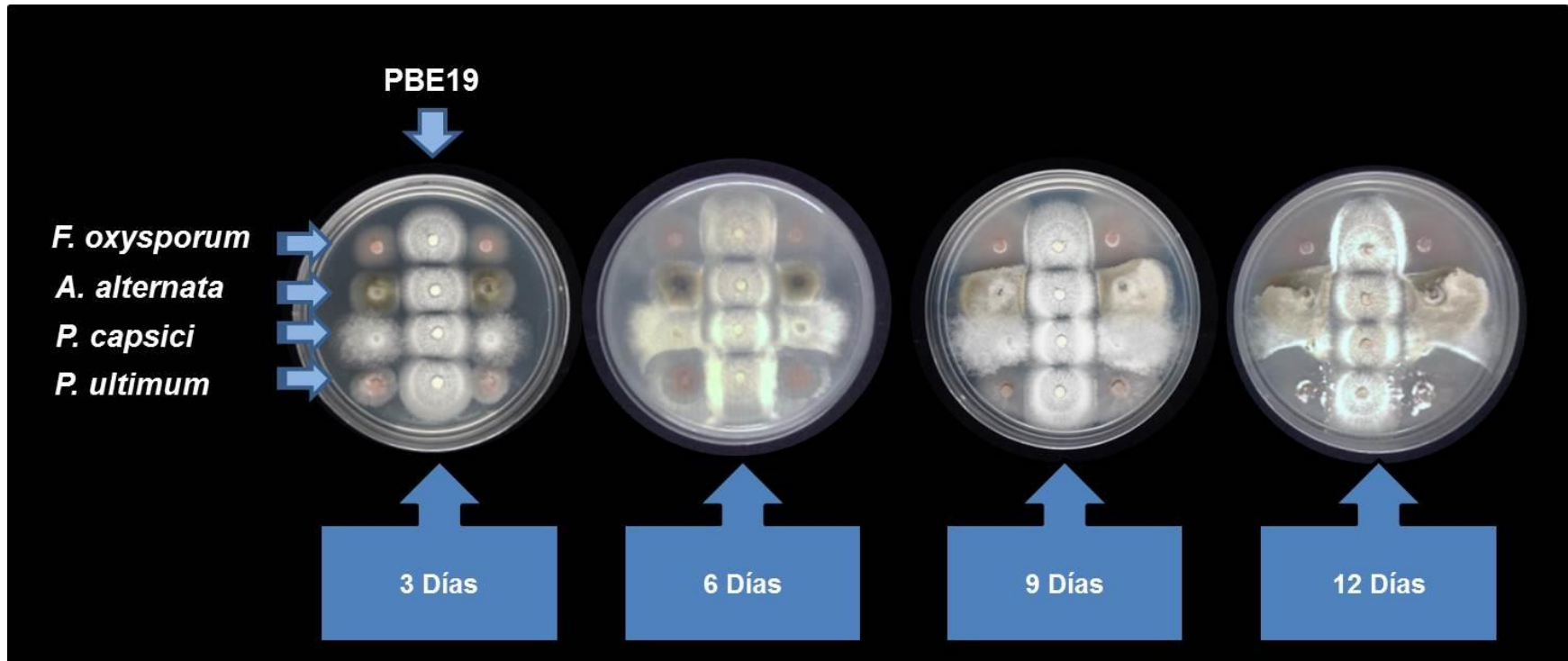


Figura 44. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE19 y 4 microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción

VII. Conclusiones

El análisis detallado de las características macroscópicas y microscópicas de los 19 hongos endófitos y 4 fitopatógenos aislados de *H. brasiletto*, permitió determinar la pureza y la tasa de crecimiento de los aislamientos. Asimismo, permitió inferir que los aislamientos PBE6 y PBE8 posiblemente pertenecen al género *Aspergillus*; los hongos PBE2, PBE3, PBE9 y PBF2 al género *Fusarium*; PBE10 al género *Xylaria*; PBE12 al género *Acremonium* y PBE1 al género *Verticillium*.

El cultivo en pequeña escala de los hongos 23 hongos en estudio de *H. brasiletto* en medio arroz permitió el crecimiento favorable de todos los microorganismos. Con excepción de los hongos endófitos PBE2, PBE4, PBE13, PBE15 y PBF1, el cultivo en medio arroz, proporcionó rendimientos del orden de 0.125–1.2 g por 50 g arroz.

El método de reparto entre hexano y metanol aplicado sobre todos los extractos fúngicos crudos, permitió obtener una fracción constituida por componentes de baja polaridad y otra por metabolitos secundarios polares.

La determinación del efecto sobre el crecimiento de microorganismos y plantas para cada uno de los extractos crudos y fracciones primarias permitió seleccionar los endófitos con mayor potencial antifúngico y/o fitotóxico, respectivamente.

En general, se observó que las fracciones metanólicas presentan mayor actividad antifúngica y/ o herbicida.

Las fracciones metanólicas de los endófitos PBE2, PBE11, PBE14 y el fitopatógeno PBF2 presentan mayor potencial antifúngico y antioomiceto. En particular sobre los oomicetos *P. capsici* y *P. aphanidermatum*.

Las fracciones metanólicas de los hongos PBE2, PBE6, PBE11 y PBE14 inhiben en mayor grado la germinación y/o crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*. El extracto PBE11 inhibe además de forma significativa la respiración de *S. lycopersicum*

Las fracciones metanólicas de PBE9 y PBF2 inhiben selectivamente el proceso de respiración durante la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*.

Los hongos PBE2, PBE6, PBE9, PBE11, PBE14 y PBF2 con mayor potencial antifúngico y/o fitotóxico se cultivaron en mediana escala empleando 300 g de arroz.

Los extractos CH₂Cl₂-CH₃OH (9:1) de los hongos PBE9 y PB11 derivados de los cultivos en mediana escala presentan los menores valores de CI₅₀, sobre el crecimiento de las plantas y microorganismos blanco, constituyendo candidatos ideales para realizar estudios químicos biodirigidos con el fin de obtener metabolitos secundarios con potencial uso en la agricultura para el desarrollo de agentes con actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica.

Los bioensayos de antagonismo directo múltiple *in vitro* permitieron poner en evidencia, el potencial antagónico de 7 endófitos puros con mayor actividad biológica a nivel de extractos orgánicos. En general, los hongos endófitos inhibieron significativamente el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. ultimum* y *P. capsici*, posiblemente debido a la producción de metabolitos secundarios difusibles en el medio de cultivo, corroborando el efecto antimicrobiano demostrado a nivel de extracto orgánico. Los endófitos PBE8, PBE11 y PBE14 inhiben a distancia el crecimiento de al menos de uno de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba. El endófito PBE11 también se comportó como un posible micoparásito del fitopatógeno *F. oxysporum* al crecer sobre su micelio, constituyendo candidatos para estudio como posibles agentes de control biológico.

Los bioensayos de antagonismo directo múltiple *in vitro* entre los hongos endófitos y fitopatógenos, permiten además, inferir las posibles interacciones que establecen con su hospedera y como son capaces de subsistir ya sea por mecanismos físicos (barreras miceliales, mayor producción de micelio, engrosamiento de hifas etc.) o químicos (producción de metabolitos orgánicos

volátiles o compuestos que difunden en el medio de cultivo), y al mismo tiempo permiten inferir el posible papel de defensa de los endófitos hacia su hospedera por el ataque de microorganismo patógenos.

El presente proyecto demuestra que el estudio químico y biológico de los hongos asociados a las plantas es de suma importancia para la búsqueda y desarrollo de compuestos novedosos que presenten actividad biológica y que puedan ser útiles como agroquímicos naturales alternativos, para el control de plantas indeseables y enfermedades presentes en la agricultura moderna. Asimismo, permite inferir los posibles beneficios que ofrecen los endófitos a su hospedera.

VIII. Perspectivas

- ∞ Clasificar taxonómicamente por métodos moleculares las especies de hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *H. brasiletto*.
- ∞ Realizar el estudio químico biodirigido de los extractos fúngicos de PBE11 y PBE9 que demostraron mayor actividad biológica en los cultivos en mediana escala.
- ∞ Aislar y purificar el mayor número de metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica demostrada por las fracciones activas y determinar cuantitativamente el efecto antifúngico, antioomicetos y fitotóxico.
- ∞ Identificar por el método micro extracción en fase sólida de los posibles VOCs producidos durante la interacción antagonico hongo endófito-microorganismo fitopatógeno.
- ∞ Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados, mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas y de difracción de rayos X.
- ∞ Determinar los efectos citotóxicos de los extractos y compuestos puros, sobre diferentes líneas celulares y macrófagos, con el fin de establecer posibles efectos tóxicos sobre el hombre y los animales.

IX. Bibliografía.

- ∞ Albert L. A. (2005). **Panorama de los plaguicidas en México.** *Revista de Toxicología*, 29 (8), 1-17.
- ∞ Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Muller, W. E. G., Kozytska, S., Hentschel, U., Proksch, P., (2008). **Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. Isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*.** *Phytochemistry*, 69 (8), 1716-1725.
- ∞ Amason, J.T., Sims, S.R., Scott, I.M. (2008). **Natural Products From Plants as Insecticides.** *Phytochemistry and pharmacognosy*, 12 (2), 2-3.
- ∞ AMIFAC (2015). **Buen uso y manejo de agroquímicos (BUMA).** Recuperado 21 de febrero de 2015 en http://arteym.com/amifac_primera/buma.html.
- ∞ Aneja M., Gianfagna T.J., Hebbar P. K. (2005). **Trichoderma harzianum produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens.** *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(6), 304-307.
- ∞ Armendáriz-Guillén, B. (2013). **Hongos Endófitos Productores de Metabolitos Secundarios con Potencial Fitotóxico y Antifúngico.** (Tesis de licenciatura). Facultad de Química UNAM.
- ∞ Boddy, L. (2000). **Interspecific Combative Interactions Between Wood-Decaying Basidiomycetes.** Federation of European Microbiological Societies. *Microbiology ecology*, 31, 185-94.
- ∞ Bonifaz, J.A. (2012). **Micología Médica Básica.** 4a Ed. Mc Graw Hill, p.1-40.
- ∞ Camp, A.R., Dillard, H.R., Smart, C, D. (2008). **Efficacy of *Muscodor albus* for the control of Phytophthora blight of sweet pepper and butternut squash.** *Plant Disease*, 92 (11), 1488-1492.
- ∞ Cao, R., Liu, X., Gao, K., Mendgen, K., Kang, Z., Gao, J., Wang, X. (2009). **Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in Vitro.** *Current Microbiology*, 59 (6), 584–592.

- ☞ Dayan, F.E., Canttrel, C.L., Duke, S.O. (2009). **Natural Products in Crop Protection.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17 (12), 4022-4034.
- ☞ Debbab, A., Aly, A. H., Edrada-Ebel, A., Müller, E. G., Mosaddak, M., Hakiki, A., Ebel, R., Proksch, P. (2009). **Bioactive Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Chaetomium sp.* Isolated from *Salvia officinalis* Growing in Morocco.** *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 13 (2), 229-234.
- ☞ Dubey, N.K., Shukla R., Kumar A., Singh P. y Prakash B. (2011). **Global scenario on the application of natural products in integrated pest management programmes in Natural products in plant pest Management.** Ed. Nawal H. Dubey. CABI, UK.
- ☞ Dugan , F., (2006). **The indentification of fungi** . 2ª edición. United States of America.
- ☞ FAO (2002). **World agricultura: towards World agricultura: towards 2015/2030.** p.106
- ☞ FAO (2009). **La FAO en México más de 60 años de cooperación 1945-2009.** p. 152-161.
- ☞ Förster, H., Driever, G.F., Thompson, D.C and Adaskaveg, J.E. (2007). **Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the “reduced-risk” fungicides fludioxonil and fenhexamid.** *Plant disease*, 91 (2), 209-215.
- ☞ Gaceta Innovación (2014). Reduce perdidas la detección oportuna de enfermedades en hortalizas y ornamentales. Recuperado 2 de enero de 2015 en <http://www.foroconsultivo.org.mx/innovacion.gaceta/component/content/article/12-innovadores/11-reduce-perdidas-la-deteccion-oportuna-de-enfermedades-en-hortalizas-y-ornamentales>
- ☞ Giménez, C., Cabrera, R., Reina, M., González, A. (2007). **Fungal Endophytes and their role in plant protection.** *Current Organic Chemistry*, 11 (3), 707-720.

- ☞ Glaber F.M., Fassel, R., Mercie, J., Smilanick, J.L. (2006). **Influence of temperature, inoculation interval, and dosage on biofumigation with *Muscodor albus* to control postharvest gray mold on grapes.** *Plant Disease*, 90 (8), 1019-1025.
- ☞ Grover, F., y Gijzen, M. (2006). ***Phytophthora* genomics: The plant destroyer genome decoded.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1 (12), 1295-1301.
- ☞ Goates, B.J., Mercier J. (2011). **Control of common bunt of wheat under field conditions with the biofumigant fungus *Muscodor albus*.** *European Journal Plant Pathology*, 23 (6), 765-777.
- ☞ González-Coloma, A., Reina, M., Gutiérrez, C., Fraga, B. (2002). **Natural insecticides: Structure Diversity, Effects and Structure-Activity Relationships.** *Studies in Natural Products Chemistry*, 26 (5), 849-879.
- ☞ Ibarra, J. E., Castro, M. C. D. R., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Bravo, A. (2006). **Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos.** *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48 (2), 113–120.
- ☞ Jvfen, Y., Ningbo, Q., Suping, W., Kiran, G., Shulin, Y. (2014) **Characterization of Secondary Metabolites of an Endophytic Fungus from *Curcuma wenyujin*.** *Current Microbiology*, 69 (5), 740-744.
- ☞ Khan, A.L., Hamayun, M., Hussain, J., Kang, S. M., y Lee, I. J (2007). **The newly isolated endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. LK1 produces ascotoxin.** *Molecules*, 17 (1), 1103-1112.
- ☞ Labrada, J.C., Caseley, C., Parker, R (1996). **Manejo de malezas para países en desarrollo.** Plant Production and Protection Paper No. 120, FAO, p.3
- ☞ Lee, S.O., Kim, H. Y., Choi, G. J., Lee, H. B., Jang, K. S., Choi, Y. H., & Kim, J. (2009). **Mycofumigation with root rot on moth orchid *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and rhizoctonia.** *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1213-1219.

- ☞ Leyva, J.B., García de la Parra, L.M., Bastidas, P.J., Astorga, J.E., Bejarano, J., Cruz, A., Martínez, I. E., Betancourt, M. (2014). **Uso de plaguicidas en un valle agrícola tecnificado en el noroeste de México.** *Revista internacional de contaminación ambiental*, 30(3), 247-261.
- ☞ Li, J. Y., y Strobel, G. A. (2001). **Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*.** *Phytochemistry*, 57(2), 261-265.
- ☞ Lira-Saldivar R.H (2007). **Bioplaguicidas y control biológico.** *CIQA*, p.30, 38.
- ☞ Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap, y D.P. Clark. (2009). **BROCK Biología de los Microorganismos.**
- ☞ Macías-Rubalcava, M. L., Hernández, B., Jiménez, M., González, C., Gleen, A., Hanlin, R., Hernandez, S., Saucedo, A., Muria, J., Anaya, A. (2008). **Napthoquinone Spiroketals whit 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), 112-231.
- ☞ Macías-Rubalcava, M.L., Ruíz, M. L. E., Meléndez, C., Hernández, S. (2014). **Napthoquinone Spiroketals and organic extracts from the endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as potencial herbicides.** *Journal of agricultural and food chemistry*, 62 (16), 3553-3562.
- ☞ Maczulak, A. (2011). **Encyclopedia of Microbiology.** Facts on File. p. 327-334.
- ☞ Maheshwari, R. (2005). **Fungi Experimental Methods in Biology/Ramesh Maheshwari.** Ed. J.W Bennett. Taylor & Francis. p. 3-17, 223-233.

- ∞ Mann, R. S., Kaufman, P.E. (2012). **Natural Product Pesticides: Their Devepment, Delevery and Use Against Insect Vectors.** *Reviews in organic Chemistry*, 9 (7), 545-567.
- ∞ Mercier, J., Jiménez, J.L. (2009). **Demonstration of the biofumigation activity of *Muscodor albus* against *Rhizoctonia solani* in soil and potting mix.** *BioControl*, 54 (6), 797-805.
- ∞ Megbeahuruike, A. C., Sun H., Fransson, P., Kasanen, R., Daniel, G., Karlsson, M., Asiegbu, F. (2011). **Screening of *Phlebiopsis gigantean* isolates for traits associated with biocontrol of the conifer pathogen *Heterobasidion annosum*.** *Journal Biology Control*, 30 (4), 321-342.
- ∞ Mier, T.F., Rivera-Becerril, M.A., Ayala-Zermeño, C., Toriello, Aguilar-Ogarrio, S, y Ulloa, M. (2013). **Métodos Experimentales para el estudio de hongos microscópicos.** México. p 1-9.
- ∞ Nepote, D.M., Lamarque, A.L., Zygadio, J.A. (2006). **Natural Products as Antioxidants.** *Phytochemistry*, 2 (8), 234-245.
- ∞ Park, M.S, Ahn, J., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang K.S., Kim, J.C. (2010). **Potential of the volatile-producing fungus *Nodulisporium* sp. CF016 for the control of postharvest diseases of apple.** *Plant Pathology Journal*, 26 (7), 253-259.
- ∞ Rai, M., Rathod, D., Agarkar, G., Dar, M., Brestic, M., Pastore, G. M., & Junior, M. R. M. (2014). **Fungal growth promotor endophytes: A pragmatic approach towards sustainable food and agriculture.** *Symbiosis*, 62 (2), 63–79.
- ∞ Rayner, A. D. M., Griffith, G.S. y Wildman, H.G. (1994). **Induction of metabolic and morphogenetic changes during mycelial interactions among species of higher fungi.** *Biochemical Society transactions*, 22 (2), 389-394.
- ∞ Reigosa, M., 1999. **Ecophysiological Approach in Allelopathy.** *Critical Reviews in Plant Sciencies*, 18 (5), 577-608.

- ∞ Reséndiz-Flores M. (2014). **Hongos endófitos de *Gliricidia sepium* con potencial antagónico.** (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
- ∞ Rhoden, S.A., Garcia, A., Bongiorno, V. A., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A. (2012). **Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Trichilia elegans* A. Juss.** *Journal of Applied Pharmacy Science*, 2 (8), 456-460.
- ∞ Rodriguez, R.J., White, J.F., Arnold, E., y Redman, R.S. (2009). **Fungal endophytes: diversity and functional roles.** *The New phytologist*, 182(2), 314-330.
- ∞ Rosa, L. H., Tabanca, N., Zhigiang, T., David, P., Wedge, E., Morales, R. (2012). **Antifungal activity of extracts from endophytic fungi associated with *Samolanthus* maintained in vitro as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse.** *Canadian. Journal of Microbiology*, 58 (6), 432-445.
- ∞ SAGARPA (2007). Programa sectorial de desarrollo agropecuario y pesquero 2007-2012.
- ∞ Sánchez-Fernández, R.E. (2010). **Potencial Alelopático de Extractos de Micelio y Medio de Cultivo de un Hongo Endófito Aislado de *Lonchocarpus castilloi* (Fabaceae).** (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
- ∞ Sánchez-Fernández, R.E., Sánchez-Ortiz, B.L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, A., Armendáriz-Guillen, B., García-Méndez, C.M., y Macías-Rubalcava, M. L. (2013). **Hongos endófitos: fuente de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina.** TIP Revista especializada en ciencia químico-biológicas, 16 (2), 132-146.
- ∞ Stierle, A. y G. Strobel. (1995). **The Search for a Taxol-Producing Microorganism Among the Endophytic Fungi of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia*.** *Journal of natural products*, 58 (9), 1315-1324.

- ☞ Strobel, G., y Daisy, B. (2003). **Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products.** *Microbiology and molecular biology review*, 67 (4), 491-502.
- ☞ Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo, y J. Harper. (2004). **Natural Products from Endophytic Microorganisms.** *Journal of natural products*, 67(2), 257-68.
- ☞ Tan, R. X. y W.X. Zou. (2001). **Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites.** *Natural product reports*, 18(4), 448-59.
- ☞ Varughese, T., Riosa, N., Higginbotham, S., Arnold, A. E., Coley, P. D., Kursar, T.A., Gerwick, W., Cubilla-Ríos, L. (2013). **Antigungal Depsidone Metabolites from *Cordyceps dipterigena*, an Endophytic Fungus Antagonistic to the Phytopathogen *Gibberella fujikuroi*.** *Tetrahedron left*, 53(13), 1624-1626.
- ☞ Villanueva-Silva, R. (2014). **Potencial antagónico de hongos endófitos de *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarpum*.** (Tesis de licenciatura). Facultad de Química UNAM.
- ☞ Worapong, J., Strobel, G.A. (2009). **Biocontrol of a root rot of kale by *Muscodor albus* strain MFC2.** *BioControl*, 54 (2), 301-306.
- ☞ Yuen, T.K., Hyde, K. D., y Hodgkiss, I.J. (1999). **Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi.** *Microbial Ecology*, 37 (4), 257-262.
- ☞ Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 5, p. 944.
- ☞ Zhang, K., Li, G., Xu, J., Liu, Y (2007). **Nematicidal Substances from Fungi.** *Recent Patents on Biotechnology*, 1(3), 212-233.
- ☞ Zhang, H.W., Soong, Y.C., Tan, R.X. (2006). **Biology and chemistry of endophytes.** *Natural product reports*, 23 (5), 753-771.
- ☞ Zhao, J., Shan, T., Mou, Y., Zhou, L (2011). **Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi.** *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(2), 159-168.

œ Zhi-Lin, Y., Yi-Cun, C., Bai-Ge, X., y Chu-Long, Z. (2012). **Current perspectives on the volatile-producing fungal endophytes.** *Critical Reviews in Biotechnology*, 32 (4),363–73.