



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS  
CARRERA INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

TEMA:

---

**“DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A  
PLANTAS MEDICINALES EN TRES LOCALIDADES DE LA  
PROVINCIA DEL TUNGURAHUA”**

---

Trabajo de Graduación, Modalidad Trabajo Estructurado de Manera Independiente, presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

**MANUEL MISAEAL BRAVO TISALEMA**

Ambato – Ecuador

2011

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En calidad de Tutor de trabajo de investigación: "DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A PLANTAS MEDICINALES EN TRES LOCALIDADES DE LA PROVINCIA DEL TUNGURAHUA", realizado por el Egdo. Manuel Misael Bravo Tisalema, certifico que el trabajo fue realizada por la persona indicada, Considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, marzo del 2011

---

Dr. Carlos Rodríguez M. ; Ph.D

**TUTOR DE TESIS**

## **AUTORIA**

El presente trabajo de investigación: "DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A PLANTAS MEDICINALES EN TRES LOCALIDADES DE LA PROVINCIA DEL TUNGURAHUA", es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido, efectos legales y académicos que se deprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Ambato, marzo del 2011

---

Manuel Misael Bravo Tisalema

180416051-1

# **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

## **UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

### **FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

### **CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

Los miembros del tribunal de grado aprueban el presente trabajo de graduación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Marzo del 2011

Para constancia firman:

---

Ing. Romel Rivera  
Presidente del Tribunal

---

Dr. Ramiro Velastegui

---

Ing. Mario Paredes

## DEDICATORIA

*A mi Dios, por darme salud y vida. Por cada respiro y por la protección que siempre me ha brindado.*

*A mis padres, por darme la vida y el apoyo en los momentos más duros de mi vida. Por ser mis mentores y depositar su confianza en mí.*

*A mis hermanos y hermanas, por su apoyo y su amor incondicional que me ha permitido cosechar triunfos.*

*A mi tía querida que está en el cielo, quién me brindo todo el apoyo en situaciones buenas y malas para seguir en mis estudios académicos.*

*Sobre todo, dedico este trabajo a mi querido sobrino Wilmer Bravo allá en el cielo, quién me inspiraba a seguir adelante, hubiese deseado que estés conmigo, pero no fue posible, y sé que estarás feliz por mi triunfo. Gracias por darme una razón más para continuar luchando en mi vida profesional.*

# AGRADECIMIENTO

Mi sincero agradecimiento principalmente a mi hermana Elevación Bravo por la confianza depositada en mí, gracias por apoyarme en mis estudios, por creer que puedo ser una mejor persona.

A la Universidad Técnica de Ambato y en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Bioquímica que me dieron la oportunidad de formar parte de ellas.

Al Dr. Carlos Rodríguez; PhD, quién a más de ser mi Tutor y Profesor; fue un amigo, gracias por sus enseñanzas y por darme la oportunidad de demostrar que una persona indígena también puede llegar a la cima.

A mi amiga incondicional Anita por darme cariño y amor cuando lo necesitaba para no sentirme solo y acompañarme en todas mis alegrías y tristezas. Gracias por darme ánimo en momentos de derrota y fuerza para seguir adelante.

A mis primos y familiares por darme motivación y apoyo moral todos los días.

A mi compañera Gaby Vinueza por su gentil colaboración, por apoyarme, por ser una amiga incondicional.

A mi amigo Ricky por estar siempre conmigo, gracias por ser una persona con un corazón bondadoso que me ayudó cuando lo necesitaba.

A mi amigo Gabriel Curipallo, quien con sus chistes y bromas nos entretenía y alegraba en los momentos difíciles.

A todos mis compañeros por compartir momentos felices en nuestra vida universitaria.

A mis amigos del barrio por abrirme las puertas cuando lo necesitaba para mis estudios.

Y a todas las personas que me dieron el visto bueno, y si me he olvidado de alguien, a ellos también mil gracias

# ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

## CAPITULO I

### EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.	Tema de la Investigación .....	1
1.3.	Planteamiento del problema .....	1
1.3.1.	Contextualización .....	1
1.3.1.1.	Macro .....	1
1.3.1.2.	Meso.....	2
1.3.1.3.	Micro.....	2
1.3.2.	Análisis Crítico .....	2
1.3.2.1.	Diagrama Causa - Efecto.....	2
1.3.2.2.	Prognosis .....	2
1.3.2.3.	Formulación del problema.....	5
1.3.2.4.	Interrogantes.....	5
1.3.2.5.	Delimitación.....	5
1.4.	Justificación.....	5
1.5.	Objetivos .....	6
1.5.1.	General.....	6
1.5.2.	Específico.....	6

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

2.1.	Antecedentes Investigativos .....	7
2.1.1.	Microorganismos endófitos y su relación con la planta .....	7
2.1.2.	Distribución y diversidad de hongos y bacterias endófitas.....	8
2.1.3.	Producción de compuestos bioactivos por microbios endófitos.....	10
2.1.4.	Capacidad antagonica de microbios endófitos .....	11
2.1.5.	Aislamiento de microorganismos endófitos.....	13
2.1.6.	Características generales de microbios modelo usados para detectar antagonismo .....	14

2.1.6.1.	Características generales de los hongos .....	14
2.1.6.2.	Características de bacterias gram positivas y gram negativas .....	14
2.1.6.3.	Generalidades de las plantas medicinales.....	15
2.1.6.4.	Ajenjo ( <i>Artemisa absinthium</i> ) .....	15
2.1.6.5.	Cedrón ( <i>Lippia citriodora</i> ).....	16
2.1.6.6.	Hierbabuena ( <i>Mentha citrato</i> ) .....	16
2.1.6.7.	Llantén ( <i>Plantago major</i> ) .....	16
2.1.6.8.	Toronjil ( <i>Melisa Officinalis</i> ) .....	16
2.2.	Fundamentación Filosófica .....	17
2.3.	Fundamento Legal.....	18
2.4.	Categorías Fundamentales.....	18
2.4.1.	Para la hipótesis de la producción de compuestos bioactivos .....	18
2.4.1.1.	Variable Dependiente .....	18
2.4.1.2.	Variable Independiente .....	18
2.5.	Hipótesis .....	20
2.5.1.	Hipótesis nula .....	20
2.5.2.	Hipótesis alternante.....	20
2.6.	Señalamiento de variables de la hipótesis.....	20

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGÍA**

3.1.	Modalidad básica de la Investigación.....	21
3.2.	Nivel o tipo de investigación.....	21
3.3.	Población y muestra .....	21
3.4.	Operacionalización de variables .....	21
3.5.	Recolección de la información .....	23
3.5.1.	Caracterización físico-química de las muestras de suelo .....	23
3.5.1.1.	Determinación del pH.....	23
3.5.1.2.	Determinación del porcentaje de humedad.....	23
3.5.1.3.	Determinación del porcentaje de materia orgánica .....	23
3.5.2.	Aislamiento y purificación de microorganismos endófitos.....	24
3.5.3.	Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de microorganismos endófitos.....	24

3.5.4.	Caracterización macroscópica de los aislamientos.....	24
3.5.5.	Caracterización microscópica de los aislamientos .....	25
3.5.6.	Determinación de la actividad antimicrobiana.....	25
3.5.6.1.	Preparación de los cultivos de microorganismos endófitos.....	25
3.5.6.2.	Preparación de los platos con los microorganismos modelo .....	25
3.5.6.3.	Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica.....	26
3.5.7.	Procesamiento y análisis.....	26
3.5.7.1.	Determinación del número de aislamientos de microorganismos endófitos ....	26
Tabla 1.	Lugares de recolección de las hojas de plantas medicinales .....	27
Tabla 2.	Plantas medicinales usadas en el presente estudio.....	27
3.5.7.2.	Formación de grupos de color (grupos-especie) .....	27
3.5.7.3.	Caracterización e Identificación preliminar de los microorganismos endófitos	27
3.5.7.4.	Determinación de la actividad antimicrobiana.....	28
Tabla 3.	Esquema del análisis de varianza .....	28

## **CAPITULO IV**

### **ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

4.1.	Análisis de resultados.....	29
4.1.1.	Caracterización físico-química de la rizósfera de plantas medicinales .....	29
4.1.2.	Determinación del número de microorganismos endófitos. ....	29
4.1.3.	Formación de grupos de color en los hongos endófitos.....	30
4.1.4.	Caracterización macroscópica de las bacterias endófitas.....	31
4.1.5.	Caracterización microscópica e identificación morfológica preliminar de los microorganismos endófitos .....	31
4.1.6.	Determinación de la actividad antimicrobiana de hongos endófitos frente a los microorganismos modelo. ....	31
4.1.6.1.	Actividad en contra de <i>Fusarium</i> . ....	32
4.1.6.2.	Actividad en contra de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	32
4.1.6.3.	Actividad en contra de la bacteria Gram positiva tipo.....	32
4.1.6.4.	Actividad en contra de la bacteria Gram negativa tipo.....	33
4.1.7.	Determinación de la actividad antimicrobiana de bacterias endófitas frente a los microorganismos modelo. ....	33
4.1.7.1.	Actividad frente a <i>Fusarium</i> . ....	34

4.1.7.2.	Actividad frente a la bacteria Gram positiva tipo.....	34
4.1.7.3.	Actividad en contra de la bacteria Gram negativa tipo.....	34
4.2.	Interpretación de Datos.....	34
4.2.1.	Caracterización físico - química de suelos.....	34
4.2.2.	Caracterización macroscópica de microorganismos endófitos.....	35
4.2.3.	Caracterización microscópica de microorganismos endófitos.....	36
4.2.4.	Diversidad de microorganismos endófitos.....	36
4.2.5.	Determinación de la producción de compuestos bioactivos de microorganismos endófitos.....	36
	Discusión general del trabajo de investigación.....	37
4.3.	Verificación de Hipótesis.....	38
4.3.1.	Hipótesis para la producción de compuestos bioactivos.....	38
4.3.1.1.	Hipótesis nula ( $H_0$ ).....	38
4.3.1.2.	Hipótesis alternante ( $H_1$ ).....	38

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1.	Conclusiones.....	39
5.2.	Recomendaciones.....	40

## **CAPITULO VI**

### **PROPUESTA**

6.1.	Datos informativos.....	41
6.1.1.	Título.....	41
6.1.2.	Institución Ejecutora.....	41
6.1.3.	Beneficiarios.....	41
6.1.4.	Ubicación.....	41
6.1.5.	Tiempo Estimado para la Ejecución.....	41
6.1.6.	Equipo Técnico Responsable.....	41
6.2.	Antecedentes de la Propuesta.....	41
6.3.	Justificación.....	42
6.4.	Objetivos.....	42

6.4.1.	General.....	42
6.4.2.	Específico.....	42
6.5.	Análisis de Factibilidad.....	42
6.6.	Fundamentación.....	43
6.7.1.	Aislamiento y purificación de microorganismos endófitos.....	43
6.7.2.	Determinación del número de microorganismos endófitos.....	44
6.7.3.	Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de microorganismos endófitos.....	44
6.7.4.	Caracterización macroscópica de los aislamientos.....	44
6.7.5.	Caracterización microscópica de los aislamientos.....	44
6.7.6.	Determinación de la actividad antimicrobiana.....	44
6.7.6.1.	Preparación de los cultivos de microorganismos endófitos.....	44
6.7.6.2.	Preparación de los platos con los microorganismos modelo.....	45
6.7.6.3.	Instalación del experimento para determinar la capacidad antagónica.....	45
6.8.	Administración.....	46
6.9.	Previsión de la evaluación.....	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		48

# ÍNDICE DE TABLAS

## ANEXO A

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

- Tabla A1.** Caracterización físico-química de muestras de suelo de plantas medicinales.
- Tabla A2.** Codificación del número de hongos endófitos.
- Tabla A3.** Codificación del número de bacterias endófitas.
- Tabla A4.** Caracterización macroscópica de los hongos endófitos.
- Tabla A5.** Origen de cada miembro de los grupos de color.
- Tabla A6.** Determinación de la diversidad de hongos endófitos de acuerdo a la especie – Ajenjo (*Artemisa absinthium*).
- Tabla A7.** Determinación de la diversidad de hongos endófitos de acuerdo a la especie – Cedrón (*Lippia citriodora*).
- Tabla A8.** Determinación de la diversidad de hongos endófitos de acuerdo a la especie – Hierbabuena (*Mentha citrato*).
- Tabla A9.** Determinación de la diversidad de hongos endófitos de acuerdo a la especie – Llantén (*Plantago major*).
- Tabla A10.** Determinación de la diversidad de hongos endófitos de acuerdo a la especie – Toronjil (*Melisa officinalis*).
- Tabla A11.** Caracterización macroscópica de bacterias endófitas.
- Tabla A12.** Grupos de color formados por las bacterias endófitas
- Tabla A13.** Caracterización microscópica e identificación morfológica preliminar de hongos endófitos.
- Tabla A14.** Caracterización microscópica de bacterias endófitas.
- Tabla A15.** Códigos de hongos endófitos no crecidos del almacenamiento para el antagonismo.
- Tabla A16.** Códigos de hongos endófitos que no presentaron actividad antimicrobiana.
- Tabla A17.** Hongos endófitos que presentaron actividad antimicrobiana.
- Tabla A18.** Diámetros de inhibición (mm) producidos por los hongos endófitos frente a *Fusarium*.
- Tabla A19.** Diámetros de inhibición (mm) producidos por los hongos endófitos frente a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabla A20.** Diámetros de inhibición (mm) producidos por los hongos endófitos frente a la bacteria Gram positiva tipo.

**Tabla A21.** Diámetros de inhibición en mm de hongos endófitos frente a la bacteria Gram negativa tipo.

**Tabla A23.** Bacterias endófitas que presentaron actividad antimicrobiana.

**Tabla A24.** Diámetro de inhibición en mm de bacterias endófitas frente a *Fusarium*.

**Tabla A25.** Diámetros de inhibición en mm de bacterias endófitas frente a la bacteria Gram positiva tipo.

**Tabla A26.** Diámetros de inhibición en mm de bacterias endófitas frente a la bacteria Gram negativa tipo.

## ANEXO B

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**Tabla B1.** Análisis de Varianza del diámetro de inhibición de hongos endófitos contra *Fusarium*.

**Tabla B2.** Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en *Fusarium*.

**Tabla B3.** Análisis de varianza del diámetro de inhibición de hongos endófitos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabla B4.** Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en la levadura.

**Tabla B5.** Análisis de varianza del diámetro de inhibición de hongos endófitos para la bacteria Gram positiva tipo.

**Tabla B6.** Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en la bacteria Gram positiva tipo.

**Tabla B7.** Análisis de varianza del diámetro de inhibición de hongos endófitos en la bacteria Gram negativa tipo.

**Tabla B8.** Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en la bacteria Gram negativa tipo.

**Tabla B9.** Análisis de varianza del diámetro de inhibición de bacterias endófitas frente a la bacteria Gram positiva tipo.

**Tabla B10.** Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram positiva tipo.

**Tabla B11.** Análisis de varianza del diámetro de inhibición de bacterias endófitas frente a la bacteria Gram negativa tipo.

**Tabla B12.** Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram negativa tipo.

## **ANEXO C**

### **GRÁFICOS**

**Figura C1.** Número de hongos endófitos aislados por sitio de recolección

**Figura C2.** Número de hongos endófitos aislados por planta medicinal.

**Figura C3.** Número de hongos endófitos aislados por lugar de recolección y planta medicinal.

**Figura C4.** Número de bacterias endófitas aisladas por sitio de recolección.

**Figura C5.** Número de bacterias endófitas aisladas por planta medicinal.

**Figura C6.** Número de bacterias endófitas aisladas por lugar de recolección y planta medicinal.

**Figura C7.** Número de grupos de color de hongos endófitos por sitio de recolección.

**Figura C8.** Número de grupos de color de hongos endófitos por planta medicinal.

**Figura C9.** Distribución de los grupos de color según la planta medicinal.

**Figura C10.** Identificación preliminar de los hongos endófitos aislados.

**Figura C11.** Actividad antagónica específica de los hongos endófitos

**Figura C12.** Tipo de actividad de los metabolitos secundarios producidos por las bacterias endófitas.

## **ANEXO D**

### **MEDIOS DE CULTIVO**

MEDIOS DE CULTIVO.

Agar PDA.

Agar Nutritivo.

## **ANEXO E**

### **FOTOGRAFÍAS**

**Fotografía 1:** Recolección de muestras de plantas medicinales.

**Fotografía 2:** Caracterización físico - química.

**Fotografía 3:** Aislamiento de microorganismos endófitos.

**Fotografía 4:** Resultados de los aislamientos.

**Fotografía 5:** Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de microorganismos endófitos.

**Fotografía 6:** Caracterización macroscópica de bacterias endófitas.

**Fotografía 7:** Caracterización microscópica de hongos endófitos.

**Fotografía 8:** Caracterización microscópica de bacterias endófitas.

**Fotografía 9:** Determinación de la actividad antimicrobiana.

**Fotografía 10:** Actividad antagónica de hongos endófitos frente a *Fusarium*.

**Fotografía 11:** Actividad antagónica de hongos endófitos frente a la levadura.

**Fotografía 12:** Actividad antagónica de hongos endófitos frente a la bacteria Gram positiva tipo.

**Fotografía 13:** Actividad antagónica de hongos endófitos frente a la bacteria Gram negativa tipo.

**Fotografía 14:** Actividad antagónica de bacterias endófitas frente a *Fusarium*.

**Fotografía 15:** Actividad antagónica de bacterias endófitas frente a la bacteria Gram positiva tipo.

## RESUMEN

Ochenta y seis hongos y dieciséis bacterias fueron aislados de la hojas esterilizadas, purificados y utilizados para la caracterización macro y microscópica. A partir de la caracterización macroscópica se determinó el color de micelio aéreo y color de pigmento difusible el cual presentó una diversidad de colores tanto en la parte aérea como al reverso de la caja para el caso de hongos. En caso de bacterias se determinó la coloración de la colonia bacteriana. En la caracterización e identificación microscópica, preliminar la mayoría de hongos estudiados presentaron micelio tabicado, esporas redondas y ovaladas identificados como *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Monilia*. Cinco aislamientos no se pudieron identificar puesto que no presentaron esporulación bajo la metodología utilizada. Los veinte y tres hongos restantes presentaron solo micelio por lo que se consideró como micelio estéril. En bacterias ocho fueron bacilares, siete cocsy una levadura. Trece mostraron ser Gram positivos y dos Gram negativos, cinco poseían cápsulas y todas las bacterias carecían de endosporas. Finalmente ochenta hongos y dieciséis bacterias endófitas fueron utilizados para la determinación de la producción de compuestos bioactivos, de las cuales el 75% (sesenta y cuatro hongos y ocho bacterias) mostraron algún actividad antimicrobiana ante microorganismos modelo; sesenta y un hongos presentaron actividad antagónica ante *Fusarium*, veinte y seis ante la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), catorce ante la bacteria Gram positiva tipo y veinte y cinco frente a la bacteria Gram negativa tipo, Tomado en cuenta que el mayor número de endófitos ejercen una acción inhibitoria ante en fitopatógeno *Fusarium*. En caso de bacterias solamente ocho presentaron actividad antagónica, uno ante *Fusarium*, cuatro frente a bacterias Gram positivas y Gram Negativas considerando como bactericidas, dos Anti Gram Negativas y una Anti Gram positiva. Muchos de estos compuestos bioactivos producidos por microorganismos endófitos estudiados fueron igual y mayor eficiente que los antibióticos de Nistatín y Sulfato de estreptomycin usados como control experimental. Los resultados de acuerdo al análisis estadístico demuestran que dichos endófitos tanto hongos como bacterias tienen la capacidad de producir compuestos bioactivos de amplio espectro. Y además que probablemente permitirá el desarrollo de uno o varios bioproductos útiles en Biotecnología para el control de hongos y bacterias causantes de enfermedades de importancia agrícola y humana.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

### 1.2. Tema de la Investigación

Determinación de la producción de compuestos bioactivos de microorganismos endófitos asociados a hojas de plantas medicinales en tres localidades de la provincia del Tungurahua.

### 1.3. Planteamiento del problema

#### 1.3.1. Contextualización

##### 1.3.1.1. Macro

La palabra endófito se deriva del griego *endon*, que significa dentro y *phyte* que significa planta, por tanto microorganismos endófitos comprende hongos y bacterias que viven dentro de los tejidos vegetales de las plantas (Muñoz & Caballero, 2002), estableciendo una interacción de mutualismo planta-endófito (Abello&Kelemu, 2006), no causan daños, y al contrario proveen beneficios (Reiter *et al*, 2002; Lehtonen *et al*, 2006; Bancon& White, 2000). Además de ayudar con el suministro de nutrientes a las plantas, los endófitos pueden conferir también un grado de protección contra enfermedades (Morrisset *et al*, 2004; Pérez *et al*, 2009). Son estudiados como fuentes potenciales de nuevos productos naturales para la medicina, agricultura y la industria (Strobel& Daisy, 2003).

La producción de compuestos bioactivos por este grupo de hongos y parte de algunas bacterias puede jugar un papel muy importante en biotecnología en todos los países, por ejemplo en la acción inhibitoria en el crecimiento de agentes patógenos de plantas (McCormack *et al*; 1994; Dibut *et al*, 2009), en farmacopea homeopática, en la acción protectora contra insectos herbívoros (Ramírez, 2006), en la producción de nuevos antibióticos para contrarrestar enfermedades (Strobel& Daisy, 2003; Castro & Bermudez, 2006), etc.

En la naturaleza mundial, dependiendo de las condiciones, se encuentran diferentes tipos de hongos endófitos. Muchos son osmotróficos, poseen una pared celular compuesta principalmente por quitina, hifas que permiten la formación de micelio, a partir del cual se desarrollan esporas. Taxonómicamente es posible encontrar a miembros de las cuatro divisiones

del Reino Fungi: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, y Basidiomycota (Carrillo, 2003). En caso de las bacterias existe una extensa diversidad, pero los que se han estudiado con mayor frecuencia pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Herbaspirillum*, *Erwinia* y *Xantomonas* (Dibutet *et al*, 2009), entre otros

#### **1.3.1.2. Meso**

Una gran parte de América latina, el estudio potencial de algunos hongos y bacterias endófitas presentan antagonismo en contra de otros microorganismos, tal como es el caso del hongo *Trichoderma*, *Fusarium oxysporum* (hongo no fitopatógeno). Bacterias del género *Bacillus*, y *Pseudomonas* producen un rango de metabolitos contra varios hongos fitopatógenos, e incluso ante algunos nematodos. Si bien es cierto que existe un potencial muy grande como agentes de biocontrol, no se ha logrado el grado de eficacia y consistencia que se necesitan para la comercialización a gran escala (Morrissey *et al*, 2004; Chaves, 2007). Es posible que el aislamiento de nuevos microorganismos endófitos permita descubrir productos bioactivos con características únicas que puedan ayudar en la agro-ecología. Por ello, estrategias creativas e imaginativas deben ser implementadas para su búsqueda (Strobel & Daisy, 2003; Chaves, 2007).

#### **1.3.1.3. Micro**

La distribución geográfica tanto de los hongos como de bacterias endófitas es cosmopolita, ya que han llegado a colonizar prácticamente todas las plantas vasculares el cual proporciona un beneficio simbiótico entre planta - endófito (Tan & Zou, 2001; Chaves, 2007). Estudios realizados en plantas medicinales han demostrado que existe una gran diversidad biológica y metabólica en hongos y bacterias que colonizan estas plantas (Gundelet *et al*, 2008; Vero & Mondino, 2002). En el Ecuador también se han realizado estudios similares, sobretodo en la parte sur del país sobre todo en la provincia de Loja, mostrando que los hongos endófitos aislados inhibían el crecimiento de bacterias, mediante la producción de compuestos bioactivos (Ramírez *et al*, 2006).

### **1.3.2. Análisis Crítico**

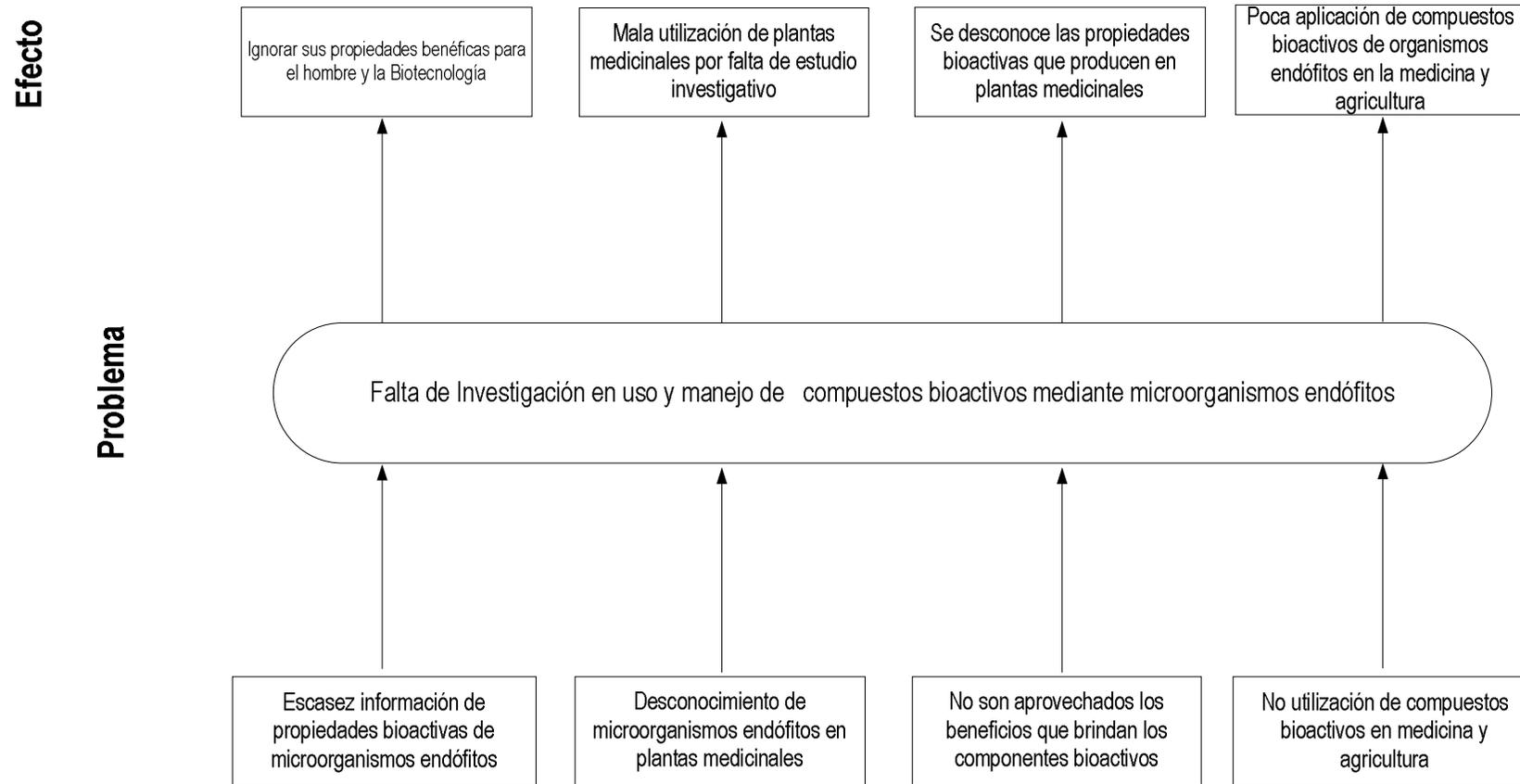
#### **1.3.2.1. Diagrama Causa - Efecto**

Ver página siguiente.

#### **1.3.2.2. Prognosis**

Al no culminar el presente trabajo de investigación, se desconocería la gran utilidad de los compuestos bioactivos producidos por hongos y bacterias endófitas aislados de tejidos de hojas de plantas medicinales. Además, el beneficio del uso de dichos compuestos en distintas áreas como en la biotecnología, salud y la agricultura en beneficio del ser humano, llegaría a ser desaprovechado.

## Diagrama Causa - Efecto



Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

### **1.3.2.3. Formulación del problema**

¿Es viable la producción de compuestos bioactivos realizado por microorganismo endófitos útiles en la Biotecnología?

### **1.3.2.4. Interrogantes**

¿Cómo se realiza el aislamiento selectivo de bacterias endófitas?

¿Cómo se realiza el aislamiento selectivo de hongos endófitos?

¿Cómo se determina la diversidad y distribución geográfica de bacterias endófitas?

¿Cómo se determina la diversidad y distribución geográfica de hongos endófitos?

¿Cómo se realiza la caracterización macro y microscópica de bacterias endófitas?

¿Cómo se realiza la caracterización macro y microscópica de hongos endófitos?

¿Cómo se determina la capacidad de producción de compuestos bioactivos de hongos y bacterias endófitas?

### **1.3.2.5. Delimitación**

Campo: Investigación

Área: Microbiología

Sub área: Biotecnología

Aspecto: Actividad antagonica de microorganismos endófitos

Geografía: Laboratorio de Ingeniería y Microbiología. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato

Temporal: Enero – Julio 2010

## **1.4. Justificación**

Actualmente, los hongos y parte de las bacterias endófitas tienen un potencial industrial muy grande para la agricultura, medicina y la industria, debido a su capacidad para la producción de compuestos bioactivos. Son también usados como microbios modelo para estudiar aspectos teóricos de la ecología de la interacción planta - microorganismo. Por otro lado, se ha demostrado que las plantas medicinales son una fuente de hongos y bacterias que presentan actividad antagonica en contra de otros microorganismos. Sin embargo, poco se conoce acerca de la diversidad biológica y metabólica de estos grupos de microorganismos, en la provincia de

Tungurahua. Por ello, la presente investigación se enfocó en la determinación de la capacidad de producción de compuestos bioactivos, de hongos y bacterias endófitas aislados de ajeno (*Artemisa absinthium*), cedrón (*Lippiacitriodora*), hierbabuena (*Mentha citrato*), llantén (*Plantagomajor*), y toronjil (*Melisa Officinalis.*), en tres localidades de la Provincia de Tungurahua. Los resultados del presente estudio permitirán obtener información básica acerca de la producción de compuestos bioactivos por estos microorganismos endófitos, permitiendo así abrir nuevas posibilidades con aplicaciones medicinales, terapéuticas y agroquímicas.

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. General**

- Determinar la producción de compuestos bioactivos por microorganismos endófitos aislados a partir de hojas de cinco plantas medicinales recolectadas en tres localidades de la provincia de Tungurahua, en contra de hongos fitopatógenos y bacterias modelo.

### **1.5.2. Específico**

- Aislar hongos y bacterias endófitas de las hojas de ajeno (*Artemisa absinthium*), cedrón (*Lippiacitriodora*), hierbabuena (*Mentha citrato*), llantén (*Plantagomajor*), y toronjil (*Melisa officinalis*), en las localidades de Angahuana, Chibuleo y Pelileo de la provincia de Tungurahua.
- Caracterizar fisicoquímicamente muestras de suelo recolectadas de la rizósfera y determinar la diversidad y distribución geográfica de microorganismos aislados de cinco plantas medicinales de las localidades de Angahuana, Chibuleo y Pelileo de la provincia del Tungurahua.
- Caracterizar macro y microscópicamente los hongos y bacterias endófitas aislados.
- Determinar la capacidad antagónica de hongos y bacterias endófitas frente a bacterias, hongos y levaduras.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Antecedentes Investigativos**

##### **2.1.1. Microorganismos endófitos y su relación con la planta**

Los hongos y bacterias endófitas son microorganismos que viven en los espacios intercelulares de tejidos vegetales de una diversidad de plantas, producen sustancias bioactivas involucradas en la relación endófito-huésped, favorece el crecimiento y desarrollo de las plantas y las protegen contra otros organismos del suelo que causan enfermedades, y representan una fuente natural y poco conocida de diversidad química (Díaz *et al*, 2009; Hallmann&Sikora, 1996). Además, establecen una asociación específica con su hospedero para mutuo beneficio (Abello&Kelemu, 2006; Muñoz & Caballero, 2002). Es notable que, de casi 300.000 especies de plantas que existen en la Tierra, más del 90% sean hospederas de uno o más hongos endófitos y parte de bacterias endófitas. Por consiguiente, la oportunidad de encontrar nuevos e interesantes microorganismos endófitos en partes de la planta como la hoja, son grandes. La biodiversidad de los endófitos es muy amplia, siendo la gran mayoría simbioses, sin embargo es posible encontrar unos pocos saprofitos agresivos o patógenos oportunos. (Strobel& Daisy, 2003; Pérez *et al*, 2009).

Tanto hongos como bacterias endófitas crecen en tallos, hojas, flores, tubérculos, y otros órganos de la planta. La magnitud de colonización del endófito en órganos y tejidos de la planta hospedera, refleja la habilidad de adaptación selectiva a estos nichos ecológicos. Por consiguiente, pueden formarse asociaciones íntimas entre organismos y plantas sin dañar los tejidos de la misma ni causar alguna alteración en el ciclo de vida de las plantas. Existen un sinnúmero de especies vegetales de importancia económica que interactúan con especies de hongos endófitos y otras con bacterias endófitas. La planta provee al microorganismo alimento, hospedaje y protección. Por su parte, aunque no hay certeza sobre los mecanismos de acción, los endófitos confieren gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas frente a condiciones adversas que generen estrés, ya sean de tipo abiótico como salinidad, y acidez, o biótico como ataque de plagas. Esta simbiosis otorga mayor habilidad competitiva a las plantas y permite una plena expresión de su potencial genético, traducido en altas tasas de germinación, mejor densidad, más biomasa en los tejidos y mayor producción de semilla (Abello&Kelemu, 2006; Chaves, 2007; Pérez *et al*,2009). Por último, la simbiosis aparece como una necesidad

para los microorganismos ya que probablemente no pueden vivir en forma aislada. A cambio, las plantas obtienen resistencia, por ejemplo al ataque de insectos como pulgones, orugas cortadoras, entre otros, a través de sustancias tóxicas como los alcaloides elaborados en este caso por los hongos (Gundel, 2008).

### **2.1.2. Distribución y diversidad de hongos y bacterias endófitas**

Los hongos endófitos al estar dentro de tejidos vegetales como el tallo, hojas, flores, frutos, incluso en raíces de la planta, de prácticamente la totalidad de miembros de la división *Spermatophyta*, hace que su distribución sea prácticamente cosmopolita (Strobel & Daisy, 2003). Se han reportado interacciones específicas como la que existe entre el cacao (*Theobroma cacao*), con los hongos *Heisteriaconcinna* y *Ouratealucens*. Recientemente han sido aislados de la misma planta más de 800 hongos endófitos con alto potencial biocontrolador (Crozier *et al*, 2006). Otro ejemplo es el hongo *Guignardiacitricarpa*, el que ha sido encontrado en varias especies de cítricos. Sin embargo, las gramíneas forrajeras son quizás el grupo vegetal en el que más se ha reportado la presencia de hongos endófitos. Entre los géneros más estudiados se encuentran miembros de *Lolium*, *Festuca* y *Brachiaria* (Siegelet *et al*, 1987). Los hongos endófitos comparten ciertas características como el ser osmotróficos, poseer pared con quitina, y micelio que en muchos casos desarrolla esporas. No se ha demostrado que todos pertenezcan a un solo grupo taxonómico. Están distribuidos en las cuatro divisiones del Reino Eumycota, o sea en Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, y Basidiomycota (Carrillo, 2003).

Muchas de las especies de endófitos con frecuencia son agrupadas en la familia *Clavicipitaceae*, cuyos géneros más representativos son *Acremonium*, *Atkinsonella*, *Balancia*, *Balansiopsis*, *Epichloe*, *Myriogenospora*, y *Neotyphodium* (Siegelet *et al*, 1987). En otras especies vegetales se han encontrado otras especies de hongos que al parecer son específicas. Tal es el caso del mango, en el que se ha detectado la presencia de *Alternariaalternata*, *Cladosporium*, *Colletotrichumgloeosporioides*, *Fusariumdecemcellulare*, *Lasiodiplodiatheobromae*, *Phomopsismangiferae*, y *Pestalotiopsis*. Estos hongos principalmente se encuentran en las hojas y ramas jóvenes, durante el período de prefloración, aunque algunos sobrepasaron la floración, ya que se ha detectado su presencia en las inflorescencias y el fruto (Morales, 2006). En Ecuador, en el sector sur del país, específicamente en la provincia de Loja, hongos endófitos han sido aislados a partir de las plantas medicinales *Baccharislatifolia*, *Baccharisobtusifolia*, *Bidensandicola*, *Borreria laevis*, *Chuquiraguajussieu* y *Piperbarbatum*, reportándose una gran biodiversidad. (Ramírez *et al*, 2006).

Los hongos endófitos que afectan generalmente a las gramíneas pertenecen a la Familia Clavicipitaceae, y son biotrofos obligados. Este grupo incluye los géneros *Balansia* y *Myriogenospora*, que afectan gramíneas que usan el ciclo C4 para la fijación del CO<sub>2</sub>, o de temporada cálida. En cambio, *Atkinsonella* y *Epichlœ* afectan gramíneas C3 o de temporada fría (Siegel&Latch, 1991). A pesar de clasificarse como endófitos, porque se mantienen en los tejidos por meses o años sin causar enfermedad, en ciertas ocasiones extremadamente raras, *Balansia*, *Atkinsonella* y *Epichlœ* pueden presentar una fase patogénica. La producción de esporas en las inflorescencias del huésped puede provocar la esterilización parcial o completa, incluyendo infecciones sistémicas transmitidas entre generaciones a través de las semillas (Stone *et al*, 1997). También es posible notar que muchos hongos endófitos no producen estructuras reproductivas cuando son cultivados *in Vitro* (Vero & Mondino, 2002). A estos se los conocen también como productores de micelio estéril (*Myceliasterilia*). Se cree que la gran diversidad de los hongos endófitos es producto de un proceso de co-evolución con sus plantas hospederas, probablemente iniciado poco después del apareamiento de las primeras plantas productoras de semillas (Ramírez *et al*, 2006).

La diversidad y número de bacterias endófitas en parte, provocada probablemente por la existencia de una fuente abundante de nutrientes. Las bacterias endófitas podrían tener algunas ventajas competitivas sobre las bacterias rizosféricas, ya que la disponibilidad de nutrientes es mayor en el interior de las plantas y a más de ello se encuentran mejor protegidas frente a los cambios medioambientales (Muñoz & Caballero, 2002). La colonización y la distribución de bacterias endófitas en la planta pueden ser influenciadas por la interacción con otros organismos asociados a la planta, como ejemplo los nemátodos parásitos, o por características propias del hospedero (Pérez *et al*, 2009).

Estudios realizados en Colombia reportan la influencia de bacterias endófitas en plantas de *Cordia alliodora* y *Tabebuia rosea*, provocando un buen desarrollo de la planta (Vargas, 2006). Se ha demostrado también que varias bacterias endófitas poseen vías metabólicas de interés en biotecnología. Tal es el ejemplo de *Burkholderia cepacia* que incrementa la tolerancia de las plantas al tolueno (Pérez *et al*, 2009), y de *Methylobacterium populum* como participante de la biodegradación de compuestos, tales como: 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (HMX) y octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina (RDX) (Van *et al*, 2005). Otras especies, como *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., aumentan el aporte de nitrógeno, influyendo directamente en el crecimiento, desarrollo y rendimiento (Chaves, 2007). Bacterias endófitas se han aislado de cultivos de piña (*Ananas comosus*), calabaza (*Cucurbita moschata*),

maíz (*Zea mays*), hierba elefante (*Pennisetumpurpleum*), papaya (*Carica papaya*), remolacha (*Beta vulgaris*. L) y zanahoria (*Daucus carota*) (Dibutet al; 2009), entre otros.

En caña de azúcar y en arroz se han descrito bacterias endófitas que fijan nitrógeno y proporcionan a las plantas parte del nitrógeno que requieren. Se estima que para la caña de azúcar la fijación de nitrógeno bacteriana puede contribuir hasta un 80% del N de la planta. La fijación de nitrógeno por endófitos es una de las posibilidades para que plantas no leguminosas puedan cultivarse con menos fertilizante químico nitrogenado. Se ha calculado que sólo un 5% de las bacterias que existen en la naturaleza se pueden cultivar en el laboratorio (Martínez *et al*; 2007), incluyendo aquellas con características endófitas. Se ha reportado que en el dominio Bacteria existe una extensa diversidad de endófitos, pero los que se han estudiado con mayor frecuencia pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Herbaspirillum*, *Erwinia* y *Xantomonas*(Dibutet al, 2009).

### **2.1.3. Producción de compuestos bioactivos por microbios endófitos**

Los hongos endófitos se caracterizan por la producción de compuestos bioactivos, que se originan a partir del metabolismo secundario. A diferencia del metabolismo primario, que agrupa a las reacciones químicas esenciales del individuo, el metabolismo secundario se caracteriza por producir compuestos de bajo peso molecular, no requeridos para la síntesis de nueva materia o para la producción de energía, y que permiten que el individuo tenga ventajas de adaptación a ciertas condiciones específicas en el medioambiente. Muchos de estos metabolitos secundarios muestran un potencial para la producción de compuestos útiles en la agricultura, industria y medicina. Es por ello que en la actualidad se ha demostrado que los endófitos son una fuente excelente de productos bioactivos naturales (Strobel& Daisy, 2003).

En el campo de la agricultura existen reportes que muestran que varios géneros de bacterias y hongos, entre los que se puede mencionar a *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Trichoderma*, producen metabolitos contra hongos fitopatógenos, lo que ha permitido desarrollar productos basados en estos microbios. Sin embargo, no se ha logrado el grado de eficacia y consistencia que se necesitan para la comercialización a gran escala. Es obvio que el desarrollo de tales productos podría proveer al agricultor con una alternativa amigable para el ambiente, disminuyendo así el uso de fungicidas (Morrissey *et al*, 2004).

Algunos endófitos tropicales producen productos naturales más activos que los endófitos templados. A partir de ellos se han obtenido productos como la oocidina, que es sintetizada por *Serratiamarcensens*, y que ha sido considerado para su uso en agricultura, principalmente para

controlar la presencia amenazante de microbios patógenos como *Pythium* y *Phytophthora*, los que cada año provocan millones de dólares en pérdidas a los agricultores alrededor del mundo (Strobel & Daisy, 2003). Otros productos han demostrado que tienen una eficiencia aceptable para el control del patógeno bacteriano *Erwinia carotovora*, ayudando así a la planta a tener un buen desarrollo (Reiter *et al*, 2002; Lehtonen *et al*, 2006).

Las bacterias endófitas también toman su importancia en la producción de sustancias bioactivas, que de una u otra manera contribuye a los beneficios del ser humano. Tal es caso de la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos tóxicos, incluyendo pesticidas y derivados del petróleo. Ya se ha demostrado la existencia de bacterias endófitas capaces de degradar el metalaxil (Zuno *et al*, 2005), y al tolueno. También se han identificado unas bacterias capaces de producir metabolitos secundarios que suprimen el crecimiento de determinados hongos causantes de daños sobre las plantas (Martínez *et al*, 2007). En agricultura se ha aprovechado la capacidad de las bacterias endófitas para producir compuestos extracelulares, sobretodo en el control de nematodos. Cada año se usan cantidades industriales de nematicidas, muchos de ellos altamente tóxicos, por lo que el uso de los compuestos producidos por los endófitos podrían reducir el consumo y de esa manera contaminar meno el medioambiente, logrando los mismos objetivos en el control (Chaves, 2007; Castro & Bermudez, 2006; Pérez *et al*, 2009). En resumen, las bacterias endófitas controlan patógenos, promueven el crecimiento en las plantas, aumentan la resistencia a enfermedades, contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (Pérez *et al*; 2009).

#### **2.1.4. Capacidad antagónica de microbios endófitos**

La actividad antagónica de los hongos endófitos se relaciona a la interacción con microbios causantes de enfermedad, causando la muerte o supresión de crecimiento de estos últimos. Como ejemplo se tiene la producción de antibióticos para el control de bacterias y de metabolitos secundarios que actúan como fungicidas en el control biológico de hongos causantes de daños en plantas. Pueden manifestar en una serie de acciones como inhibición, degradación, y en algunos casos eliminación de dicho organismo por el potencial antagónico que poseen los hongos endófitos (Ramírez, 2006). Salgado & Cepero (2005) dicen que éstos microorganismos pueden tener un potencial antagónico en contra de microbios fitopatógenos ya que en estudios anteriores han obtenidos resultados positivos para determinar la presencia de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana y antifúngica, reduciendo su incidencia y protegiendo así a las planta de infecciones causadas por patógenos.

*Trichoderma* es un hongo típico del suelo, aunque en algunas ocasiones ha sido aislado como endófito. Es reconocido como antagonista de hongos fitopatógenos como *Fusarium* y *Botrytis*. Actúa mediante diversos mecanismos que permiten la disminución y destrucción de patógenos de plantas. Antibióticos como la *harzianopiridona*, producido por *Trichoderma harzianum*, ha sido usado efectivamente en la inhibición de hongos fitopatógenos como *Venturiainaequalis* (agente causal de la sarna de manzano). Por lo tanto, la antibiosis es un mecanismo de interacción que juega un papel muy importante en el medio (Mondino, 2003).

Experiencias en el Ecuador han demostrado la efectividad de hongos endófitos aislados de plantas medicinales para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas. Varios géneros de hongos inhiben el crecimiento de ciertos patógenos como *Escherichiacoli*, *Klebsiellapneumoniae*, *Pseudomonasaeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Es importante mencionar que la gran mayoría de hongos presentaron micelio estéril. Un representante de este grupo presenta un antagonismo elevado en contra de *Klebsiellapneumoniae* (Ramírez *et al*, 2006). Estudios *in vitro* de antagonismo no solo se han enfocado en bacterias patógenas humanas, sino también han sido diseñados para conocer el efecto en contra de hongos, principalmente de patógenos de importancia agrícola en plantas. Se ha demostrado que existen hongos endófitos capaces de inhibir el crecimiento y esporulación de *Botrytiscinerea* (Molina *et al*, 2006), y *Fusarium* (Felde, 2006).

El antagonismo provocado por bacterias sigue tomando fuerza por su capacidad de supresión, reducción o inhibición de otros organismos, el potencial de estos organismos endófitos como agentes controladores de patógenos (Carrol, 1988; Bagnasco, 1998). Este fenómeno de biocontrol se presenta debido a que los endófitos pueden establecer una relación mutualista con la planta desde su interior, mediante la cual le confieren protección contra factores bióticos y abióticos adversos (Carrol, 1988; Chaves, 2007).

La antibiosis es uno de los mecanismos más estudiados en los agentes y numerosas evidencias indican que el metabolismo antimicrobiano juega un papel importante afectando la sobrevivencia de los agentes patógenos de planta. En el caso de la antibiosis provocada por *Bacillus subtilis*, una bacteria antagonista, provoca inhibición impidiendo el crecimiento de las colonias de *Botrytis squamosa* en condiciones *in vitro* (Bagnasco, 1998). Bacterias y actinomicetes aislados de lechuga, tienen la capacidad de producir quitinasas y glucanasas para degradar la pared celular del hongo fitopatógeno *Sclerotinia minor*, agente causal de la pudrición del repollo de la lechuga (Vero & Mondino, 2002).

La competencia por nutrientes, factores de crecimiento o espacio, es otro de los mecanismos mediante los cuales los agentes de control biológico controlan a los patógenos. Es probable que este sea el mecanismo más común mediante el cual agentes (bacterias, hongos y actinomicetos) de control biológico antagonizan a los patógenos. Una mayor velocidad de crecimiento, o una mayor eficiencia en el uso de un determinado recurso por parte del antagonista, hace que el mismo pueda ser utilizado rápidamente y por lo tanto ya no es disponible para el patógeno. Ha sido demostrado que *Pseudomonasfluorescentes* producen sustancias de alta afinidad por el hierro (sideróforos). Estas bacterias son capaces de secuestrar el escaso hierro disponible en la solución de suelo impidiendo que esta sea utilizada por los patógenos (Carrol, 1988; Vero & Mondino, 2002). Pero no solamente en el suelo puede ocurrir competencia por hierro, *Rhodotorulaglutinis* (una levadura antagonista) compete produciendo sideróforos en la herida de las manzanas cosechadas evitando la podredumbre azul ocasionada por *Penicilliumexpansum*. La competencia por nutrientes es un mecanismo común de antagonismo (Bagnasco, 1998).

#### **2.1.5. Aislamiento de microorganismos endófitos**

El aislamiento tradicional de hongos y bacterias endófitas se basa en el uso de medios artificiales de agar con diferentes nutrientes y antibióticos. Existen diversos protocolos para elaborar medios que permiten el crecimiento selectivo de hongos y bacterias endófitas (Salgado & Cepero, 2005; Martínez *et al*, 2007). En general, el procedimiento consiste en esterilizar superficialmente el material vegetal que se desea examinar y ponerlo en cajas petri con el medio escogido. Esta preparación se mantiene en condiciones controladas hasta que los endófitos colonicen el medio (Gamboa, 2006; Muñoz & Caballero, 2002). La esterilización superficial del material se realiza con soluciones de alcohol o cloro, para luego recortar en pedazos que se insertan en medio de aislamiento sólido. Luego de unos días de incubación es posible observar a simple vista el crecimiento de los hongos y bacterias sobre la superficie del agar (Agrious, 1995; Pérez *et al*, 2009).

La metodología de aislamiento basada en medios de cultivo presenta varios inconvenientes, entre los que se destaca en que no todos los microorganismos crecen en medios artificiales, lo que hace que la detección de muchos de ellos no sea posible mediante el cultivo en el laboratorio. Esto conlleva a una subestimación de la diversidad microbiana endófitas. Posibles soluciones a este problema son el uso de técnicas moleculares que permitan detectar la presencia de los microorganismos sin necesidad de crecer los individuos, mediante la

amplificación de su ADN, y la optimización de los métodos de aislamiento tradicionales (Gamboa, 2006; Martínez *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2009;).

## **2.1.6. Características generales de microbios modelo usados para detectar antagonismo**

### **2.1.6.1. Características generales de los hongos**

Los hongos son organismos unicelulares heterotróficos (incapaces de usar el bióxido de carbono como única fuente de carbono), e ingieren su alimento por absorción ya que los alimentos son disueltos gracias a las enzimas extracelulares que secretan. Pueden ser unicelular (septado) y hallarse sobre o dentro del sustrato. Su pared está hecha de un polisacárido llamado quitina, pero también puede contener celulosa. No son organismos móviles, pero en algunos casos sus esporas sí lo son; pueden ser haploides, homocarióticos, heterocarióticos, dicarióticos o diploides, lo que define a los hongos es su capacidad de formar largas células tubulares llamadas hifas por un procedimiento de crecimiento apical (Ruiz, 2001; Carrillo, 2003). Los hongos tienen unas estructuras ramificadas que se introducen en el sustrato para extraer nutrientes, poseen un talo aéreo que emerge de dicho sustrato y estructuras también aéreas, algunas de ellas muy complicadas y multicolores, como son los sombreros que forman los champiñones, y en las cuales se forman las esporas (Aristegui, 2002).

Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas que en algunos casos pueden servirles como factores de virulencia en el hospedado. En medios naturales las características de crecimiento de los hongos los convierten en los colonizadores más eficientes. Los hongos son organismos modulares. A partir de un propágulo inicial forman una colonia por el continuo crecimiento de las hifas, las cuales tienen un diámetro microscópico diez a cien veces menor a un milímetro. Este crecimiento es apical, es decir, ocurre radialmente, pero está restringido a la punta de las hifas. Las hifas se ramifican e invaden toda la superficie. Si los nutrientes se agotan, la colonia envía hifas exploradoras hasta encontrar nuevas fuentes nutritivas (Aristegui, 2002; Ruiz, 2001).

### **2.1.6.2. Características de bacterias grampositivas y gram negativas**

Las bacterias son organismos unicelulares que carecen de núcleo diferenciado y se reproducen por división celular sencilla, dividiéndose en dos grandes grupos: gram positivas y gram negativas, debido a las diferencias de la pared celular. El uso de diversos colorantes y lavado con alcohol (tinción de gram), permite separar fácilmente los dos tipos (Reiter *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 2004). En la pared celular de las bacterias gram negativas existen capas adicionales que sitúan en el exterior, constituidas principalmente por lipopolisacáridos, y con una

morfología parecida a la de la membrana celular. En estas bacterias la cantidad de peptidoglicano es muy baja. El peptidoglicano o mureína está formado por derivados de azúcares, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico y un pequeño grupo de aminoácidos que incluye L-alanina, D-alanina, D-glutámico. En bacterias gram positivas, el peptidoglicano representa el 90% de la pared celular, aunque presenta otra clase de componentes, como los ácidos teichoicos. Aunque algunas bacterias poseen sólo una capa de peptidoglicano rodeando a la célula, muchas otras, presentan varias capas (hasta 25 en algunos casos). En bacterias Gram negativas, el peptidoglicano constituye sólo alrededor del 10% de pared, estando constituido el resto por una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos (Madigan *et al.*, 2004).

### **2.1.6.3. Generalidades de las plantas medicinales**

Cada día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales, tanto en medicina aplicada como en investigación experimental (Roersch, 1997). El 80% de la población mundial de aproximadamente siete mil millones de personas, utilizan las plantas como principal remedio medicinal en muchas de sus dolencias, estableciendo así una necesidad de lo natural y el rechazo a una medicina moderna (Martínez, 2000). Por eso, la historia de las plantas medicinales va a la par de la historia de los medicamentos, ya que la idea ha sido siempre que exista un beneficio terapéutico (Alonso, 2002).

En los Andes ecuatorianos se ha demostrado que entre las plantas medicinales que se expenden en los mercados de las capitales de provincia, 432 son especies silvestres, mientras que 92 son cultivadas por agricultores. Se incluye no solamente a las plantas cultivadas en los Andes, sino también a algunas plantas de procedencia amazónica tropical del Ecuador. Dentro de las principales plantas medicinales se mencionan al ajenjo (*Artemisa absinthium*), cedrón (*Lippiacitriodora*), hierbabuena (*Mentha citrato*), llantén (*Plantagomajor*), y toronjil (*Melisa Officinalis*) (Cerón, 2006).

### **2.1.6.4. Ajenjo (*Artemisa absinthium*)**

Pertenece a la familia Asteraceae (Hierbas del Ecuador, 1982). Contiene aceites esenciales y principios amargos. Es un estimulante de funciones ligadas al apetito y la digestión, favorece la menstruación (Chiereghin, 2000). Es usado también como antiséptico, antiespasmódico, tónico febrífugo, estomático (Hierbas del Ecuador; 1982). Se lo conoce también como hierba maestra, y hierba santa (González, 2004). Las partes utilizadas son las hojas y copas florecientes (Hierbas del Ecuador; 1982)

#### **2.1.6.5. Cedrón (*Lippiacitriodora*)**

Pertenece a la familia Verbenaceae (Hierbas del Ecuador, 1982). Es una hierba perenne, de hojas caducas de intenso olor a limón, ásperas y de característico color verde claro (González, 2004). Se usa para aliviar diarreas, dolor de estómago, cólicos en los niños, además controla los nervios alterados y estimula al corazón (Michoacán, 2006). También es febrífugo y sedante. Las partes utilizadas son las hojas y cabezas en flor (Hierbas del Ecuador, 1982).

#### **2.1.6.6. Hierbabuena (*Mentha citrata*)**

Pertenece a la familia Labiatae (Hierbas del Ecuador, 1982). Esta hierba procede de la hibridación de dos tipos de menta. La mezcla de la menta negra que tiene un tono violáceo, y la menta blanca, de un color verde más uniforme, es el origen de la hierbabuena, la que ofrece un fuerte aroma que la distingue de otros tipos de mentas (Michoacán, 2006). Es utilizada como tenífugo y vermífugo, para la expulsión de la solitaria, es uno de los remedios más conocidos en el mercado. Sus partes utilizadas son la hoja y copos florecientes (Hierbas del Ecuador, 1982).

#### **2.1.6.7. Llantén (*Plantago major*)**

Pertenece a la familia Plantaginaceae (Hierbas del Ecuador, 1982). Casi todas las especies que la componen, unas 400, pertenecen al género de los llantenes o plantago. Todas ellas son plantas de porte variado y tienen en común el contener abundante mucílago en sus semillas. El llantén mayor forma un grueso tronco enterrado, de color amarillento o parduzco, con una larga cabellera de raíces blancas todas iguales. Las hojas nacen de esta cepa y son muy grandes, radiales, con bordes enteros o ligeramente sinuados. Se utiliza como astringente, demulcente, diurético (Michoacán, 2006), como expectorante, hemostático, desobstruyente etc. Las partes que se utilizan son la raíz, hojas, espigas de flor y semillas (Hierbas del Ecuador, 1982).

#### **2.1.6.8. Toronjil (*Melisa Officinalis*)**

Pertenece a la familia Labiatae (Hierbas del Ecuador, 1982). Es una planta perenne, conocida por el agradable y característico olor a limón que desprende en verano, sus flores son azules y blancas. Puede multiplicarse por esquejes o semillas. Es utilizado como antiespasmódico, calmante, carminativo (Michoacán, 2006), también como diaforético, febrífugo, entre otros. Es un remedio común para enfermedades femeninas. Se utiliza principalmente las hojas (Hierbas del Ecuador, 1982).

## 2.2. Fundamentación Filosófica

La presente investigación se basa en el paradigma positivista que tiene como escenario de investigación el laboratorio a través de un diseño preestructurado y esquematizado. Su lógica de análisis está orientado a lo confirmatorio, reduccionista, verificación, inferencial e hipotético deductivo mediante el respectivo análisis de resultados. Además de realidad es única y fragmentable en partes que se pueden manipular independientemente, y la relación sujeto – objeto es independiente. Para este enfoque la realidad es algo exterior, ajeno, objetivo y puede y debe ser estudiada y por tanto conocida.

Rojas manifiesta que en la antigüedad la ciencia era una de las formas de conocimiento entre otras. Pero ha sido la Modernidad la que ha destacado la ciencia como la principal forma de conocimiento. El éxito de la ciencia no sólo está en el conocimiento del mundo sino también en la vida práctica de los seres humanos, a través de la técnica, le dio cada vez un mayor impulso; hasta tal punto que la sociedad moderna es consustancialmente una con la ciencia. Durand (2008) ha propuesto que Ciencia está ligada a la aplicación de los conocimientos y desarrollos científicos. De hecho, una de la ciencia que toma importancia es la "biotecnología que es el uso de organismos vivos para la obtención de un producto o servicio útil para el hombre", generando una estrecha relación "ciencia", donde el conocimiento es la materia prima clave y la inversión en investigación y desarrollo como un pilar fundamental de la biotecnológica. La biotecnología se presenta entonces como una herramienta científica cuya aplicación no sólo representa un beneficio para el consumidor y un adelanto científico, sino también un negocio que emprenden empresas y personas del cual aspiran sacar rédito económico. Este negocio requiere no sólo habilidad y estrategia, sino grandes inversiones en investigación y desarrollo, y una permanente búsqueda de ampliar los conocimientos. Por otra parte, esta actividad se encuadra en un marco regulatorio, y un debate a nivel nacional e internacional donde cabe preguntarse si el conocimiento y la investigación no avanzan más rápido que las leyes.

El desarrollo de la biotecnología mediante diferentes políticas es generalmente percibida como una tecnología muy disruptiva, capaz de producir innovaciones en muchos sectores industriales diferentes y muchas áreas de la actividad humana a través de norma y estándares de producción de calidad (Saviotti, 2000).

Suárez (2008) dice que la ambientalización en sus primeros pasos puede concebirse como alfabetización ambiental, proporcionando una mínima información sobre el efecto de nuestras actividades sobre el medio ambiente. Como segundo paso debemos incorporar a nuestra vida los criterios de sostenibilidad, para que nuestras acciones repercutan lo menos posibles en el

medio ambiente. De esta manera, ampliar el concepto de ambientalización, a partir de incorporar la dimensión activa, transformadora, que propicia un cambio radical de nuestros comportamientos hacia la sostenibilidad. Todo ello posibilitaría promover actitudes responsables con el medio ambiente (Kolakowski, 1988).

### **2.3. Fundamento Legal**

La presente investigación se apoya en el Art, 400 de la Constitución de la República del Ecuador en el Capítulo segundo (Biodiversidad y Recursos Naturales) en la Sección Segunda (Biodiversidad) mencionado que el Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, cuya administración y gestión se realizará con responsabilidad intergeneracional. Se declara interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola y silvestre y el patrimonio genético del país.

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) en el Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe señala que la Biodiversidad requiere la unificación de metodologías para el análisis de la biodiversidad genética, funcional y morfológica en agro ecosistemas naturales, entre otros.

### **2.4. Categorías Fundamentales**

#### **2.4.1. Para la hipótesis de la producción de compuestos bioactivos**

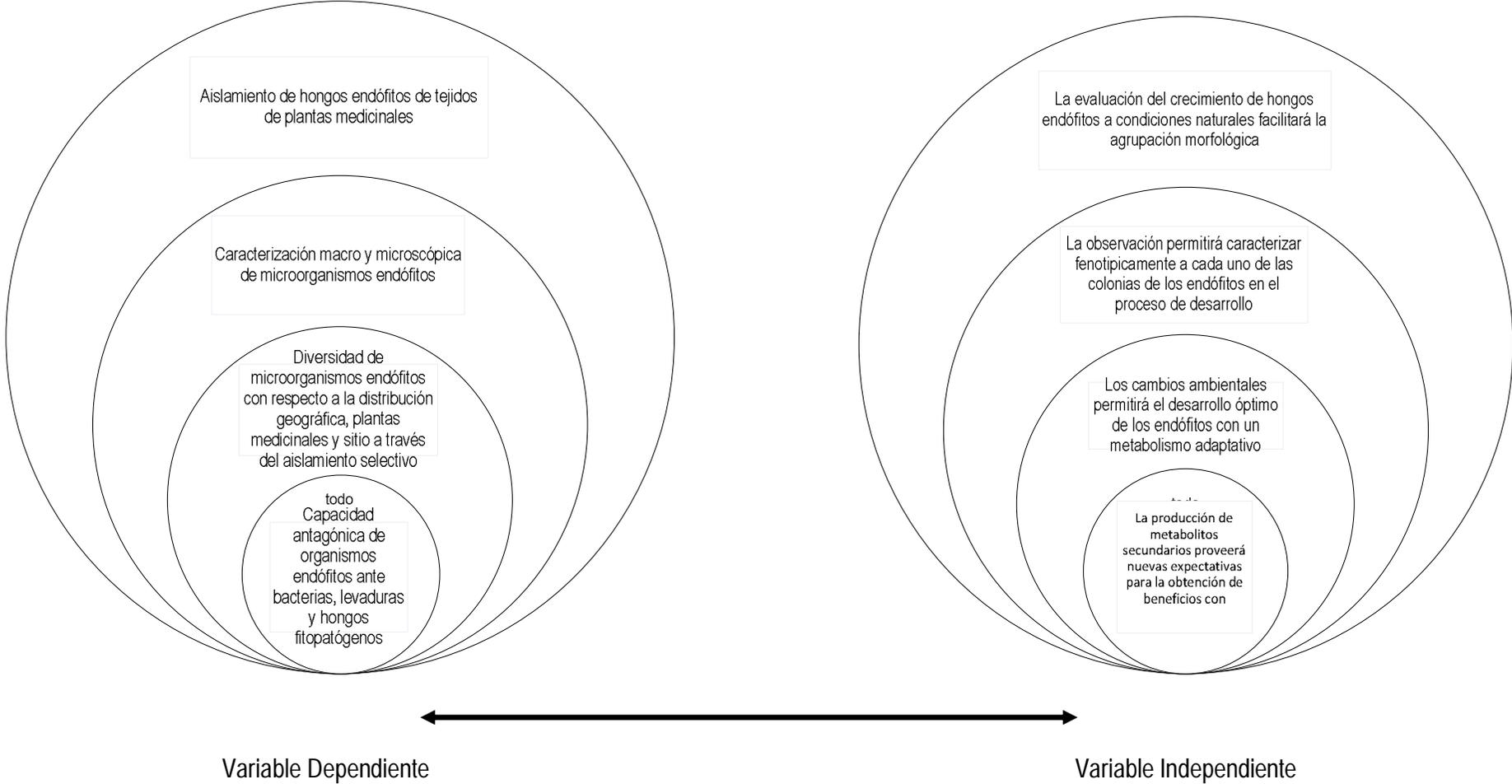
##### **2.4.1.1. Variable Dependiente**

Ver página siguiente

##### **2.4.1.2. Variable Independiente**

Ver página siguiente

### Categorías Fundamentales - Variables



Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

## **2.5. Hipótesis**

### **2.5.1. Hipótesis nula**

Algunos microorganismos endófitos aislados hojas de plantas medicinales no producen compuestos bioactivos

### **2.5.2. Hipótesis alternante**

Algunos microorganismos endófitos aislados de hojas de plantas medicinales inhiben o bloquean el crecimiento de otros microorganismos.

## **2.6. Señalamiento de variables de la hipótesis**

- Número de hongos y bacterias endófitos aislados por planta medicinal
- Número de hongos endófitos y bacterias aislados por sitio de recolección de las plantas medicinales
- Diversidad de hongos y bacterias endófitas
- Distribución geográfica de hongos y bacterias endófitas aislados
- Características de color de las colonias
- Características microscópicas
- Pruebas de antagonismo en contra de bacterias y hongos modelo.

# CAPÍTULO III

## METODOLOGÍA

### 3.1. Modalidad básica de la Investigación

Experimental

### 3.2. Nivel o tipo de investigación

Básica Exploratoria

### 3.3. Población y muestra

En los sectores de Angahuana Parroquia Santa Rosa, Chibuleo y Pelileo, ubicados en la provincia de Tungurahua, se recolectaron hojas de las plantas medicinales sajenjo (*Artemisa absinthium*), cedrón (*Lippiacitriodora*), hierbabuena (*Mentha citrato*), llantén (*Plantagomajor*) y toronjil (*Melisa officinalis*). Para ello se cortaron las hojas de 5 a 10 cm del tallo principal, de tal manera que varias hojas fueron recolectadas. Las muestras se colocaron en fundas limpias de papel, transportadas al laboratorio, y almacenadas en refrigeración para su posterior uso. También se recolectó suelo de la rizósfera de las plantas medicinales, con la ayuda de un barreno estéril. Se recolectaron los primeros 20 centímetros. Las muestras fueron transferidas asépticamente a frascos estériles para su transporte. En el laboratorio se procedió a homogeneizarlas, mediante el uso de un mortero y pistilo, esterilizados previamente con alcohol al 70%. Las muestras homogeneizadas fueron almacenadas en frascos estériles. Para la fase de determinación de la producción de compuestos bioactivos se usaron 80 hongos y 16 bacterias endófitas aisladas de las plantas arriba mencionadas.

### 3.4. Operacionalización de variables

Ver siguiente página.

HIPÓTESIS	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADORES	ÍNDICES	INSTRUMENTOS
Los microorganismos endófitos en las hojas de las plantas medicinales de cinco plantas no producen compuestos bioactivos	Dependiente	Diversidad de microorganismos endófitos, tanto por sitio de recolección como por planta medicinal	Diversidad de hongos y bacterias endófitas.	Número de hongos y bacterias endófitas	Calculadora
	Independientes	Características fenotípicas como producto de la expresión visible de los genes de cada individuo.	Grupos de color	Coloración del reverso de la colonia, micelio aéreo y cualquier producción de pigmento difusible	Tabla de colores Microsoft Excel.
			Características microscópicas	Tipo de morfología de las estructuras reproductivas Posible género de hongo y bacterias	Microscopio Claves y descripciones taxonómicas de hongos
			Características físico-químicas de los suelos en donde crecen las plantas medicinales	Valores de pH y materia orgánica	Balanza analítica pHmetro
	Producción de compuestos bioactivos	Presencia de zonas de inhibición de los platos con los microorganismos modelo	Diámetro de la zona de inhibición en milímetros	Regla. Software estadístico.	

### 3.5. Recolección de la información

#### 3.5.1. Caracterización físico-química de las muestras de suelo

##### 3.5.1.1. Determinación del pH

Se colocaron 5 gramos de suelo en un vaso de precipitación y se añadió agua destilada hasta obtener una película de aproximadamente 1 cm de altura sobre el suelo. La suspensión se agitó por cinco minutos y posteriormente se dejó reposar durante media hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, utilizando un pHmetro calibrado, y sin agitar la muestra, se tomaron cinco lecturas de pH, que fueron promediadas para obtener el pH final.

##### 3.5.1.2. Determinación del porcentaje de humedad

Se pesaron cápsulas de porcelana junto con 3 gramos de suelo (Peso <sub>1</sub>) de cada una de las muestras. Posteriormente, fueron colocadas en la estufa a 105° C por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo establecido se dejó enfriar en un desecador y se procedió a pesar nuevamente (Peso <sub>2</sub>).

Para la determinación del porcentaje de humedad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{Peso_1 - Peso_2}{Peso_1} \times 100$$

Donde:

Peso <sub>1</sub> :       Peso suelo antes de la estufa.

Peso <sub>2</sub> :       Peso suelo después de la estufa.

##### 3.5.1.3. Determinación del porcentaje de materia orgánica

Las muestras sin humedad obtenidas en el paso anterior fueron trasvasadas a un crisoly pesadas (Peso<sub>1</sub>). Posteriormente, fueron colocadas en una mufla a 500° C durante 2 horas. Al término de este tiempo se dejó enfriar las muestras en un desecador hasta temperatura ambiente y finalmente se obtuvo el peso final (Peso <sub>2</sub>).

El porcentaje de materia orgánica se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%M. O. = \frac{Peso_1 - Peso_2}{Peso_1} \times 100$$

Donde:

Peso <sub>1</sub> :       Peso suelo seco antes de la mufla.

Peso <sub>2</sub> :       Peso suelo después de la mufla.

### **3.5.2. Aislamiento y purificación de microorganismos endófitos**

Se realizó mediante un proceso de aislamiento selectivo. Se utilizaron cinco hojas por planta, las cuales fueron sumergidas en agua de llave estéril durante cinco minutos para remover tierra y otras impurezas de la superficie. Posteriormente, con la ayuda de un bisturí estéril se cortó un centímetro de los extremos de las hojas para sumergirlas en agua estéril por 1 minuto, seguido de una solución de hipoclorito de sodio (al 50% del producto comercial), durante 30 segundos, lavado con agua estéril por 1 minuto, alcohol al 70% durante 30 segundos, y nuevamente en agua estéril por 1 minuto. De la muestra lavada, se cortaron cuadrados de 1 cm de lado en una caja petri estéril utilizando un bisturí también estéril. Una vez que las muestras se esterilizaron superficialmente se colocaron en cajas que contenían medio agar papa dextrosa (PDA; Anexo D). En cada caja se insertaron 3 cortes de la muestra, formando un triángulo. Las cajas fueron incubadas a 26°C durante 7 días.

Para el aislamiento y purificación de los cultivos, se tomaron los hongos que fueron observados en cada uno de los tratamientos. Para ello, se utilizó un asa en punta con la cual se tomó una parte del micelio del hongo y se colocó en el centro de cajas que contenían PDA. Las cajas fueron incubadas a 26°C durante 7 días. Las bacterias endófitas fueron aisladas mediante estrías compuestas en cajas petri, tanto con medio PDA, como en Agar Nutritivo (AN; Anexo D), para determinar el medio que permitía el mejor crecimiento. Los platos fueron incubados a 26°C por 7 días. El proceso se repitió hasta observar que sobre la superficie de los medios de cultivo creció solamente un solo tipo morfológico de microorganismo.

### **3.5.3. Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de microorganismos endófitos.**

La conservación a largo plazo de hongos y bacterias endófitas aisladas se realizó mediante la transferencia de material de cada cultivo puro hacia un criovial que contenía 1200 µl de glicerol al 20% (w/v). Los tubos fueron almacenados en un congelador a -20°C en el Laboratorio de Microbiología – Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

### **3.5.4. Caracterización macroscópica de los aislamientos.**

Los cultivos puros de hongos y bacterias endófitas fueron caracterizados de acuerdo al tamaño, forma y coloración de las colonias.

### **3.5.5. Caracterización microscópica de los aislamientos**

Se tomó una muestra del cultivo puro de cada hongo endófito con la ayuda de un asa de transferencia estéril de punta, preferentemente de un sitio cercano al centro de la caja, debido a que el micelio más antiguo tiene probabilidad de presentar estructuras reproductivas ya formadas. El micelio tomado se colocó en una gota de azul de lactofenol (sobre un portaobjetos limpio), para finalmente colocar un cubreobjetos. Las muestras fueron observadas con la ayuda de un microscopio compuesto, y se identificaron las estructuras reproductivas de cada hongo. Así, se realizó una clasificación preliminar a nivel de género, usando claves y descripciones de hongos (Trillas, 1974; Darpoux, 1983; Domschet *al*, 1993). Para las bacterias endófitas, se realizó la determinación del tipo de célula y pared, usando la tinción de Gram mediante el froteado de la muestra que consiste en la dispersión y calentado lento de la muestra para la fijación. Se determinó también la presencia de cápsulas, y en el caso de las bacterias gram positivas con forma bacilar, se determinó la presencia de endosporas. Los protocolos usados fueron obtenidos del manual de prácticas de laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la UTA.

### **3.5.6. Determinación de la actividad antimicrobiana**

#### **3.5.6.1. Preparación de los cultivos de microorganismos endófitos**

Los hongos y bacterias endófitas fueron utilizados para determinar la capacidad de producción de compuestos bioactivos de interés en Biotecnología. Los hongos fueron crecidos en PDA, de tal manera que el micelio cubrió por completo la superficie del medio de cultivo. Las bacterias fueron crecidas de acuerdo al medio en el que se obtuvo un mejor crecimiento, así se realizó la siembra en AN o en PDA. Los platos fueron incubados a 26°C por 7 días.

#### **3.5.6.2. Preparación de los platos con los microorganismos modelo**

Inicialmente, un cultivo del hongo fitopatógeno *Fusarium* y una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, fueron crecidos en PDA a 26°C por 7 días, provocando la esporulación completa del hongo y el crecimiento de la levadura. Así mismo, una bacteria gram positiva tipo y otra gram negativa tipo fueron cultivadas en AN por 4 días a 28°C. Una vez obtenidos los cultivos de cada microorganismo, se prepararon los platos para la determinación del antagonismo siguiendo la técnica detallada por Phillips (1994). En la primera etapa se prepararon suspensiones con las esporas de *Fusarium*, y las células de la levadura y bacterias. Para ello se raspó la superficie del medio de cultivo de cada microorganismo y el material recogido se transfirió a un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina estéril. A partir de éste se realizaron diluciones seriadas. Para hongos se usó un hemocitómetro para

determinar la concentración de esporas. En el caso de las bacterias, se usó una placa de Petroff-Hausser. Posteriormente, con éstos valores se calculó el volumen de inóculo necesario para obtener concentraciones finales de  $1 \times 10^6$  células/ml de medio de cultivo para bacterias y  $1 \times 10^3$  esporas/ml de medio de cultivo para el hongofitopatógeno y la levadura mencionada anteriormente.

El volumen calculado fue transferido asépticamente a medio de cultivo estéril, enfriado previamente a  $50^\circ\text{C}$ . Las botellas fueron agitadas hasta obtener una suspensión uniforme de esporas o células, y el medio vertido en cajas tetrapetri estériles, cuidando que el espesor del medio sea uniforme en todos los compartimientos.

### **3.5.6.3. Instalación del experimento para determinar la capacidad antagonica**

Utilizando un sacabocados de 6 mm de diámetro, se extrajeron bloques cilíndricos tanto de partes del micelio de cada cultivo de hongo endófito como partes de la colonia de la bacteria. La profundidad del medio donde se extrajeron los bloques fue la misma en todos los casos.

Para la inoculación con los hongos, primeramente se extrajo un bloque del medio que contenía los microorganismos modelo para en su lugar colocar los bloques de los hongos. En el caso de las bacterias y la levadura, los bloques se colocaron sobre la superficie de los platos de cultivo que contenían los microorganismos modelo, colocando la parte del crecimiento en contacto con el medio, para así permitir una difusión más rápida de los metabolitos producidos.

Además se prepararon platos en los que se colocaron 5 microlitros de nistatín (100 mg/ml; concentración stock) y sulfato de estreptomicina (25 mg/ml; concentración stock), como control experimental para los ensayos de hongos y bacterias respectivamente. Los platos preparados fueron incubados a  $26^\circ\text{C}$  por 7 días, y los perfiles de actividad biológica se determinaron midiendo los diámetros de las zonas de inhibición, en milímetros, de aquellos hongos y bacterias que mostraron actividad antimicrobiana.

### **3.5.7. Procesamiento y análisis**

#### **3.5.7.1. Determinación del número de aislamientos de microorganismos endófitos**

El número de hongos y bacterias endófitas aislados y purificados fue usado para determinar la abundancia en función de los sitios de recolección (Tabla 1) y de las plantas medicinales estudiadas (Tabla 2). No se realizó análisis estadístico de los resultados debido al número muy bajo de microorganismos endófitos que crecieron en cada plato de aislamiento, ya que incluso en muchos casos no se pudo observar la presencia de hongos o bacterias luego del período de incubación.

**Tabla 1. Lugares de recolección de las hojas de plantas medicinales**

Lugar	Observación
Angahuana – Parroquia Santa Rosa Chibuleo Pelileo	Todas fueron recolectadas de sectores agrícolas

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla 2. Plantas medicinales usadas en el presente estudio**

Nombre común	Nombre científico
Ajenjo	( <i>Artemisa absinthium</i> )
Cedrón	( <i>Lippiacitriodora</i> )
Hierbabuena	( <i>Mentha citrato</i> )
Llantén	( <i>Plantagomajor</i> )
Toronjil	( <i>Melisa officinalis</i> )

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

### **3.5.7.2. Formación de grupos de color (grupos-especie)**

Los cultivos de hongos se agruparon de acuerdo a los datos de color del micelio aéreo y pigmento difusible. Las bacterias fueron agrupadas de acuerdo a la coloración y forma de la colonia. Los resultados fueron usados para determinar la distribución general (diversidad) de los microorganismos aislados. Se determinó el número de grupos de color de hongos endófitos tanto por sitio de recolección, como por el tipo de planta medicinal.

### **3.5.7.3. Caracterización e Identificación preliminar de los microorganismos endófitos**

Los resultados del tipo, tamaño y forma de las estructuras reproductivas de cada hongo endófito fueron usados para establecer una clasificación preliminar, a nivel de género. Para ello se utilizaron claves y descripciones taxonómicas de los principales grupos de hongos. En el caso de las bacterias, éstas fueron divididas en dos grandes grupos de acuerdo a los resultados de la tinción de Gram.

### 3.5.7.4. Determinación de la actividad antimicrobiana

Los diámetros de las zonas de inhibición provocados por aquellos hongos y bacterias que presentaron actividad antagonista se utilizaron para realizar un análisis de varianza (Tabla 3). Se realizó un diseño completo al azar con 2 repeticiones. El único factor en estudio fue la capacidad antagonista de los microorganismos aislados, determinada para cada uno de los microorganismos modelo usados en la presente investigación. Solamente aquellos microorganismos que presentaron actividad antimicrobiana fueron considerados en el análisis final, y cada uno fue considerado como un tratamiento. La separación de medias fue realizada al encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, usando la prueba de Tukey al 5% de significancia.

Además, a los hongos y bacterias se los clasificó de acuerdo al tipo de actividad antagonista. Aquellos considerados como bactericidas presentaron inhibición solamente a las bacterias Gram+ y Gram-, pero no a los hongos. Los que presentaron actividad antifúngica solamente afectaron a *Fusarium* y a la levadura, pero no a las bacterias. Finalmente, los que presentaron amplio espectro inhibieron el crecimiento tanto de bacterias como de hongos.

**Tabla 3. Esquema del análisis de varianza**

Fuente de variación	Grados de libertad	
Repeticiones	$(r - 1)$	1
Tratamientos	$(t - 1)$	X
Error	$(r - 1) (t)$	1
Total	$(r \times t) - 1$	Z

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

X = Los tratamientos para cada organismo de prueba varían puesto que no todos mostraron antagonismo para todos los microorganismos modelo.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1. Análisis de resultados

##### 4.1.1. Caracterización físico-química de la rizósfera de plantas medicinales

En la Tabla A1 (Anexo A) se muestra las características de pH, humedad y materia orgánica de las 15 muestras de suelo recolectadas en la rizósfera de cada planta medicinal. El pH más alto obtenido fue de 7.6 en la rizósfera de llantén (*Plantagomajor*) en la localidad de Pelileo y el pH más bajo fue 6.3 en la rizósfera de hierbabuena (*Mentha citrato*) en el sector de Chibuleo. El porcentaje de materia orgánica más alto se encontró en la rizósfera de cedrón (*Lippiacitriodora*) en la localidad de Chibuleo con un valor de 12.39%, mientras que el menor porcentaje de materia orgánica fue de 4.19% en la rizósfera de llantén (*Plantagomajor*) de la localidad de Pelileo.

##### 4.1.2. Determinación del número de microorganismos endófitos.

Se aislaron y purificaron ochenta y seis hongos endófitos. Los detalles se encuentran en la Tabla A2 (Anexo A). Treinta y tres fueron aislados del sector de Angahuana, veinte y nueve de la localidad de Chibuleo y veinte y cuatro del sector de Pelileo como se muestra en la Figura C1 (Anexo C). En relación con las plantas medicinales, el mayor número de hongos endófitos fueron aislados de las hojas de cedrón, y el número más bajo se encontró en las hojas de ajeno (Figura C2; Anexo C). Como se puede observar en la Figura C3 (Anexo C), en todos los lugares de recolección, y en todas las plantas medicinales se pudo aislar hongos endófitos. En relación al lugar de recolección vs. tipo de planta medicinal, el mayor número de aislamientos se obtuvo de las hojas de cedrón recolectadas en Angahuana. Por el contrario, solamente tres cepas fúngicas fueron aisladas de las hojas de llantén en Pelileo. En el caso de las bacterias endófitas, dieciséis fueron aisladas y purificadas. Los detalles de cada una se encuentra en la Tabla A3 (Anexo A). La distribución de las mismas en función del lugar de recolección mostró que tres fueron aisladas en Angahuana, siete en Chibuleo, y seis en Pelileo (Figura C4; Anexo C). En relación con las plantas medicinales, el mayor número de bacterias endófitas fueron aisladas de las hojas de hierbabuena, mientras que en las hojas de llantén no se encontró ninguna bacteria (Figura C5; Anexo C). Como se puede observar en la Figura C6 (Anexo C), solamente las hojas de ajeno y hierbabuena, recolectadas en los tres lugares, permitieron el aislamiento de bacterias endófitas. En las hojas de cedrón, las recolectadas en Angahuana y Chibuleo dieron resultados positivos. En toronjil, solo Chibuleo y Pelileo permitieron

el aislamiento de las bacterias, mientras que ninguna de las hojas de llantén recolectadas presentó bacterias endófitas.

#### **4.1.3. Formación de grupos de color en los hongos endófitos**

En la Tabla A4 (Anexo A), se muestra la caracterización macroscópica de los ochenta y seis hongos endófitos utilizados en el estudio. Luego del análisis de los resultados, éstos fueron ubicados en cuarenta y dos grupos de color, de los cuales veinte estaban formados por más de un miembro. El grupo de color más numeroso fue el veinte y seis, el mismo que estaba constituido por diez miembros. La mayoría de grupos de color presentaron principalmente tonalidades del micelio aéreo, grises, blancas y verdes. La producción de pigmento difusible solo se pudo detectar en veinte y siete grupos de color.

La Tabla A5 (Anexo A) muestra el origen de cada miembro de los grupos de color, es decir, se detalla el tipo de planta medicinal, y el lugar en donde fue recolectada la muestra. En los grupos multimiembro, se pudo observar que solamente ocho de los veinte grupos mostraron características endémicas, sea para el lugar de recolección, tipo de planta medicinal, o la combinación de las dos. Así, los grupos cuatro, doce y quince fueron asociados solamente a ajeno, hierbabuena y llantén, respectivamente. El grupo catorce fue aislado solamente de muestras recolectadas en Pelileo, mientras que el veinte en el sector de Angahuana. Finalmente los grupos veinte y cinco, treinta y tres y treinta y ocho, mostraron que fueron aislados solamente en un tipo de planta medicinal y en una sola localidad (Grupo 25: Toronjil, Pelileo; Grupo 33: Cedrón, Angahuana; Grupo 38: Ajeno, Chibuleo). Obviamente, todos los grupos formados por un solo miembro fueron asociados a una sola planta con su respectiva localidad.

Se puede observar claramente en la Figura C7 (Anexo C), que la mayor diversidad de hongos endófitos se encontró en la localidad de Angahuana, con veinte y cuatro grupos de color. Al otro extremo encontramos que solamente trece grupos de color se formaron con los cultivos aislados de las muestras recolectadas en Pelileo. En lo referente al tipo de plantas, los resultados se muestran en la Figura C8 (Anexo C). No hay diferencias tan extremas como en el caso anterior, ya que todos los grupos presentaron una distribución uniforme de grupos de color, siendo las hojas de las plantas de hierbabuena las que más grupos presentaron con catorce, mientras que en llantén solo se formaron once grupos de color diferentes. Los resultados más detallados de los grupos de color por planta medicinal y por localidad se muestran en las tablas A6, A7, A8, A9, y A10, del Anexo A.

#### **4.1.4. Caracterización macroscópica de las bacterias endófitas**

La Tabla A11 (Anexo A) muestra la caracterización macroscópica de las bacterias endófitas obtenidas en el estudio. La gran mayoría presentaron una coloración crema de las colonias. También se pudo reportar la presencia de colonias de color amarillo, rojo y rosado. Las dieciséis bacterias fueron asignadas a cuatro grupos de color (Tabla A12), tres de los cuales estuvieron formados por un miembro. Solamente el grupo cuatro constó de un solo miembro. En la Figura C9 (Anexo C) se puede observar la distribución de los aislamientos según el grupo de color y planta medicinal. Todos los grupos multimiembro están formados por cultivos provenientes de más de una planta medicinal.

#### **4.1.5. Caracterización microscópica e identificación morfológica preliminar de los microorganismos endófitos**

En la Tabla A13 (Anexo A), se muestra la caracterización microscópica e identificación preliminar de los hongos aislados. De los ochenta y seis cultivos, se pudo identificar en forma preliminar hasta nivel de género, cincuenta y ocho aislamientos. De los cultivos restantes, cinco mostraron esporulación, pero fue imposible su comparación con las descripciones de las claves taxonómicas usadas y no se pudo identificar. Los restantes veinte y tres cultivos solo produjeron micelio sin esporulación, por lo que a todos estos se los clasificó como micelio estéril. Dentro de los cultivos identificados, los más abundantes fueron los pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Monilia*, tal como se puede observar en la Figura C10 (Anexo C).

En la Tabla A14 (Anexo A) se muestra la caracterización microscópica de las bacterias endófitas. El aislamiento con el código BA011 fue identificado como levadura. De los quince cultivos bacterianos restantes, trece fueron identificados como gram positivos y solamente dos como gram negativos. La gran mayoría presentaron forma bacilar sin cápsulas. Ninguno de los cultivos bacterianos mostró presencia de endosporas.

#### **4.1.6. Determinación de la actividad antimicrobiana de hongos endófitos frente a los microorganismos modelo.**

De los ochenta y seis hongos endófitos utilizados en el estudio, seis hongos no se pudieron recuperar de los stocks debido a que no soportaron la temperatura de almacenamiento (Tabla A15, Anexo A). Por tal motivo, para el antagonismo se utilizaron ochenta aislamientos de los cuales dieciséis no presentaron ninguna actividad antagónica en contra de los microorganismos modelo usados en la presente investigación (Tabla A16, Anexo A). De los sesenta y cuatro que presentaron actividad (Tabla A17, Anexo A), cuarenta y siete mostraron poseer actividad específica, ya sea

como fungicida o bactericida (Figura C11, Anexo C). El grupo mayoritario fue aquel que presentó actividad antifúngica específica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium*, con veinte y cuatro cultivos. En el otro extremo, solamente el hongo HA035 presentó actividad bactericida específica en contra de la bacteria gram positiva, HA081 solo contra la gram negativa y HA086 únicamente contra los dos tipos. Solo ocho hongos endófitos mostraron poseer una capacidad antagonista de amplio espectro al inhibir el crecimiento de todos los microorganismos modelo. El resto de hongos (diecisiete), mostraron perfiles variables de inhibición.

#### **4.1.6.1. Actividad en contra de *Fusarium*.**

Sesenta y un cultivos de hongos presentaron actividad antagonista frente al hongo fitopatógeno *Fusarium* (Tabla A18, Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos, como se indica en la Tabla B1 (Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5% (Tabla B2, Anexo B) dividió a los tratamientos en 20 niveles. Los tratamientos 15 (HA025), 31 (HA048), 36 (HA054), 37 (HA055), 38 (HA056), 40 (HA059), 42 (HA061), 10 (HA018), 5 (HA011) y 13 (HA023), produjeron las zonas de inhibición más grandes con 40,00 mm de diámetro. El tratamiento 47 (HA068) presentó la zona más pequeña con 10,50mm. Seis hongos presentaron un diámetro de inhibición de 19,50 mm igual al del control experimental con nistatín (100 mg/ml) correspondiente al tratamiento 61. Cabe mencionar que treinta y un hongos produjeron una zona de inhibición más grande que el testigo.

#### **4.1.6.2. Actividad en contra de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.**

Veinte y seis cultivos de hongos presentaron antagonismo frente a la levadura (Tabla A19, Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla B3, Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 12 niveles como se muestra en la Tabla B4 (Anexo B). El tratamiento 2 (HA018), produjo la zona de inhibición más grande con 30,50 mm de diámetro. El tratamiento 23 (HA080) presentó la zona más pequeña con 9,50mm. Seis hongos endófitos produjeron una zona de inhibición más grande que el tratamiento 26 correspondiente al control experimental con nistatín (100 mg/ml).

#### **4.1.6.3. Actividad en contra de la bacteria Gram positiva tipo.**

Catorce cultivos de hongos endófitos presentaron antagonismo frente a la bacteria Gram positiva tipo (Tabla A20, Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla B5, Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 7 niveles como se muestra en la Tabla B6 (Anexo B). Los tratamientos 4 (HA040) y 13 (HA086) produjeron las zonas de inhibición más grandes con 40,00 mm de diámetro. El

tratamiento1 (HA024) presentó la zona de inhibición más pequeña con 7,50mm. Tres hongos endófitos produjeron una zona de inhibición más grande que el tratamiento 14 correspondiente al control experimental con sulfato de estreptomicina (25 mg/ml).

#### **4.1.6.4. Actividad en contra de la bacteria Gram negativa tipo.**

Veinte y cinco cultivos de hongos endófitos presentaron antagonismo frente a la bacteria Gram negativa tipo (Tabla A21, Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla B7, Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 12 niveles como se muestra en la Tabla B8 (Anexo B). Los tratamientos 10 (HA040), 21 (HA081), 22 (HA083), 11 (HA042), 23 (HA085), 24 (HA086) y 14 (HA065) produjeron las zonas de inhibición más grandes con 40,00mm de diámetro. El tratamiento 7 (HA027) presentó la zona de inhibición más pequeña con 7,50mm. Doce hongos endófitos produjeron una zona de inhibición más grande que el tratamiento 25 correspondiente al control experimental con sulfato de estreptomicina (25 mg/ml).

#### **4.1.7. Determinación de la actividad antimicrobiana de bacterias endófitas frente a los microorganismos modelo.**

De las dieciséis bacterias endófitas utilizadas en el estudio, ocho no presentaron ninguna actividad antagónica en contra de los microorganismos modelo usados en la presente investigación (Tabla A22, Anexo A). De las ocho que presentaron actividad (Tabla A23, Anexo A), cuatro bacterias endófitas presentaron capacidad bactericida al inhibir el crecimiento de la bacteria gram positiva tipo y gram negativa tipo. No se encontraron bacterias con capacidad antifúngica porque ninguna inhibió el crecimiento de *Fusarium* y *Saccharomyces cerevisiae*. Tampoco se encontró bacterias con capacidad antagónica de amplio espectro, ya que ninguna produjo compuestos que inhiban el crecimiento de todos los microorganismos modelo, usados en el presente estudio. Lo que si se encontró fueron bacterias con actividad específica. La bacteria BA013 mostró ser efectiva para el control de *Fusarium*, aunque no pudo alcanzar los diámetros de inhibición provocados por el control experimental (Tabla A24, Anexo A). La bacteria BA015 fue efectiva solamente para el control de la bacteria gram positiva tipo, mientras que BA05 y BA012 mostraron eficiencia exclusiva contra la bacteria gram negativa tipo. BA01, BA03, BA08 y BA017 presentaron capacidad bactericida al inhibir el crecimiento tanto de bacteria gram positiva tipo como gram negativa tipo. Los resultados se pueden observar claramente en la Figura C12 (Anexo C).

#### **4.1.7.1. Actividad frente a *Fusarium*.**

La bacteria BA013 fue la única que presentó actividad frente al hongo fitopatógeno *Fusarium* (Tabla A24, Anexo A) con 7,50 mm de diámetro de inhibición. Esta produjo una zona de inhibición más pequeña que el control experimental con nistatín (100 mg/ml).

#### **4.1.7.2. Actividad frente a la bacteria Gram positiva tipo.**

Cinco bacterias endófitas presentaron antagonismo frente a la bacteria Gram positiva tipo (Tabla A25, Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla B9, Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 3 niveles como se muestra en la Tabla B10 (Anexo B). El tratamiento 5 correspondiente al control experimental con sulfato de estreptomicina (25 mg/ml) produjo la zona de inhibición más grande con 22,50 mm de diámetro. El tratamiento 1 (BA003) presentó la zona de inhibición más pequeña con 7,00 mm. Las cinco bacterias endófitas produjeron una zona de inhibición más pequeña que el control experimental.

#### **4.1.7.3. Actividad en contra de la bacteria Gram negativa tipo.**

Seis bacterias endófitas presentaron antagonismo frente a la bacteria Gram negativa tipo (Tabla A26, Anexo A). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla B11, Anexo B). La separación de medias por la prueba de Tukey al 5%, dividió a los tratamientos en 5 niveles como se muestra en la Tabla B12 (Anexo B). El tratamiento 2 (BA005) produjo la zona de inhibición más grande con 26,00 mm de diámetro. El tratamiento 5 (BA017) presentó la zona de inhibición más pequeña con 14,50 mm. El tratamiento 4 (BA012) produjo una zona de inhibición igual que el tratamiento 6 correspondiente al control experimental con sulfato de estreptomicina (25 mg/ml). Tres bacterias produjeron diámetros de inhibición más grandes que el control experimental.

### **4.2. Interpretación de Datos**

#### **4.2.1. Caracterización físico - química de suelos**

En la región sierra del Ecuador existe gran variedad de tipos de suelos los cuales permiten encontrar una amplia biodiversidad de especies de plantas medicinales. Los suelos de toda la región interandina son suelos de tipo franco limoso en las zonas bajas y de tipo limoso en las partes altas por la presencia de gran cantidad de materia orgánica. Los valores de pH y humedad obtenidos a partir de la rizósfera de las plantas medicinales en las zonas bajas (Pelileo) corresponden a los reportados en bibliografía donde se menciona que los suelos de las zonas bajas tienen un pH de

alrededor de 6,7 a 7,8 con una humedad que varía del 4 a 14 %. En Angahuana y Chibuleo los valores obtenidos de pH y humedad están acorde a los valores reportados donde se menciona que en las zonas altas el pH oscila entre 6,6 a 7,1 con una humedad del 9 al 30%. Es importante recalcar que cada uno de estos factores puede variar dependiendo del estado meteorológico en el que se encuentre la región (Roersch, 1997; Hierbas del Ecuador, 1982; González, 2004). Aparentemente no existe influencia entre las condiciones de crecimiento de la planta, y la diversidad de los microorganismos endófitos, ya que como se ha dicho, no existen diferencias significativas entre los valores de pH y materia orgánica de los diferentes suelos.

#### **4.2.2. Caracterización macroscópica de microorganismos endófitos**

La definición ampliamente aceptada de organismos endófitos es que son aquellos microorganismos que colonizan tejidos internos de plantas vivas sin causar ningún efecto negativo inmediato. La mayoría de plantas no han sido estudiadas para el aislamiento de sus endófitos pero en los pocos estudios realizados frecuentemente se logra aislar hongos y bacterias como en el caso de nuestro estudio. Se aislaron ochenta y seis hongos endófitos y dieciséis bacterias a partir de especies de plantas medicinales las cuales fueron seleccionadas por poseer una historia etnobotánica, es decir, plantas que han sido utilizadas en la medicina tradicional y de las cuales se puede asumir que sus poderes curativos descubiertos por las personas en la antigüedad pueden ser facilitados por los compuestos producidos por las mismas plantas o más específicamente por los endófitos asociados a las mismas (Strobel & Daisy, 2003).

Al realizar la caracterización macroscópica de los hongos endófitos se obtuvieron cuarenta y dos grupos de color de acuerdo a las características observadas visualmente pero esta separación no es muy apropiada debido a que los hongos presentan distintas características no solo en el color del micelio aéreo sino también en la forma de crecimiento y a ciertas características especiales como la presencia de pigmentación. En cuanto a las bacterias no se obtuvo una gran diversidad ya que macroscópicamente muchas de ellas fueron similares en color. Al comparar en número los aislamientos de bacterias con los aislamientos de hongos la proporción es distinta y esto es una característica común al aislar endófitos como reporta Strobel & Daisy (2003) ya que señala que frecuentemente se aíslan mayor cantidad de hongos endófitos que bacterias a partir de plantas.

#### **4.2.3. Caracterización microscópica de microorganismos endófitos**

Abello&Kelemu (2006) y Mondino (2003), manifiestan que la identificación de microorganismos es un proceso dificultoso, puesto que la mayoría de los microorganismos no se pueden identificar a través de un microscopio. Sin embargo, mediante el uso de claves y descripciones de hongos (Trillas, 1974; Darpoux, 1983; Domschet *al*, 1993) se logró realizar la caracterización microscópica de los ochenta y seis hongos endófitos utilizados en el estudio. De esta manera, se obtuvieron varios géneros de hongos como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Monilia*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Macrosporium*, *Mammaria*, *Colletotrichum*, *Gonytrichum*, *Helmintospora*, *Humicola*, *Nigrospora*, *Ulocladium* y *Zigospora*. También se obtuvieron géneros como *Alternaria*, *Fusarium* y *Botrytis* que son considerados patógenos de plantas silvestres y cultivadas pues se conoce de su capacidad fitopatogénica en diversos hospederos. Pero lo más interesante fue la observación de los veinte y tres aislamientos que presentaron solo micelio vegetativo o también llamado micelio estéril ya que no presentan fructificaciones (*Myceliasterilia*) el cual es común en estudios de endófitos (Huanget *al*, 2008; Ramírez *et al*, 2006). Vale la pena también resaltar el aislamiento de varios individuos del género *Trichoderma*. Tradicionalmente, estos hongos son típicos del suelo, que en su mayoría han tenido reportes y estudios acerca de las cepas de *Trichoderma* endófitas que producen quitinasas, glucanasas, entre otros.

#### **4.2.4. Diversidad de microorganismos endófitos**

Si bien es cierto que los diferentes microbios aislados fueron ubicados en grupos de color, se puede notar claramente la diversidad del origen de los aislamientos, principalmente en los grupos multimiembro. Esto lleva a pensar que existen algunos grupos de microorganismos endófitos que están distribuidos en varias regiones geográficas y en varias plantas medicinales (Crozier *et al*, 2006). Así mismo, es evidente que existen otros con características endémicas, es decir, que solo se encuentran asociados a un tipo de planta medicinal y sitio de recolección. Será necesario aplicar técnicas de biología molecular para comprobar la congruencia de la ubicación de los diferentes microorganismos en los grupos de color, y así sacar conclusiones mucho más firmes acerca de la diversidad y distribución geográfica de los mismos.

#### **4.2.5. Determinación de la producción de compuestos bioactivos de microorganismos endófitos.**

La diversidad microbiana de los microorganismos endófitos estudiados se evidenció con la amplia actividad metabólica mostrada, al producir compuestos bioactivos que claramente inhibieron el crecimiento de los microorganismos modelo. La mayoría de los hongos y bacterias endófitas

presentaron antagonismo, y en muchos casos se alcanzaron resultados mejores que los obtenidos usando antibióticos, en el control experimental. Este estudio concuerda con los reportes de Strobel & Daisy (2003), Reiter *et al* (2002), y Zuno *et al* (2005), quienes manifiestan que la actividad antagónica de los microorganismos se debe a la producción de compuestos bioactivos que causan la pérdida de actividad de aquellos que son susceptibles, y que claramente se ha demostrado en la presente investigación.

La actividad metabólica de cada uno de los microorganismos endófitos estudiados, probablemente podría llevar hacia el descubrimiento de nuevos metabolitos con un potencial biotecnológico a gran escala, tanto en agricultura como en la industria farmacéutica relacionada al combate de infecciones provocadas por microorganismos en humanos (Mondino, 2003; Molina *et al*, 2006).

### **Discusión general del trabajo de investigación**

En el presente estudio se trató de buscar una metodología para la determinación de la producción de compuestos bioactivos producidos por microorganismo endófitos de la rizósfera de varias plantas medicinales, el mismo que incluyó desde el aislamiento selectivo hasta la determinación de la actividad antagónica. Los resultados alcanzados demuestran que existe una diversidad muy grande de microorganismos endófitos asociados a las plantas medicinales de ajeno (*Artemisa absinthium*), cedrón (*Lippiacitriodora*), hierbabuena (*Mentha citrato*), llantén (*Plantagomajor*), y toronjil (*Melisa Officinalis*), recolectadas en tres localidades de la Provincia de Tungurahua, y no solamente eso, sino que esa diversidad se ve expresada en la producción de metabolitos secundarios que inhiben o matan a otros microorganismos. Se ha obtenido una cantidad importante de información básica que permitirá el desarrollo de nuevas investigaciones con un objetivo claro al final: la elaboración de un producto para el control de enfermedades provocadas por microorganismos, ya sea en agricultura o en medicina animal y humana.

En el caso de los hongos endófitos, casi el 75% presentó algún tipo de actividad antagónica, lo que significa un porcentaje bastante alto, si se considera que en otros estudios no se ha llegado a identificar actividad en menos del 25% de los organismos estudiados. En palabras más simples, eso significa que tres de cada cuatro aislamientos tienen la posibilidad de producir algún tipo de antibiótico útil. Al misma tendencia se observa en las bacterias endófitas estudiadas, ya que el 50% presenta actividad antimicrobiana.

En la actualidad se afirma que máximo en 30 años, la gran mayoría de antibióticos conocidos serán inefectivos (Ramírez *et al*, 2006). Es por eso que éste tipo de estudios son necesarios, ya que es imperativo encontrar nuevas moléculas que reemplacen a las actuales. Además, en el caso de la

agricultura, se ha demostrado el efecto perjudicial del uso indiscriminado de fungicidas sintéticos para el control de enfermedades provocadas por hongos en plantas. Los resultados de la inhibición provocada por los hongos endófitos en contra de *Fusarium*, adquieren una gran importancia, debido a que no solamente se comportaron mucho mejor que el control experimental, sino que lo superaron ampliamente. Las pérdidas económicas provocadas por éste patógeno llegan a los cientos de millones de dólares cada año, alrededor del mundo. El uso de una molécula de origen biológico podría significar una disminución drástica en el consumo de fungicidas sintéticos, abaratando costos de producción, pero principalmente cultivando vegetales más limpios, no contaminantes del medioambiente.

El presente trabajo ha contribuido con resultados básicos, que abren un amplio estudio de futuras investigaciones, puesto que se han sentado bases científicas sólidas que permitirán que se continúe con el desarrollo y búsqueda de uno o varios bioproductos posibles, que puedan actuar como agentes de biocontrol en biotecnología y agricultura, con beneficios directos para el ser humano.

### **4.3. Verificación de Hipótesis**

#### **4.3.1. Hipótesis para la producción de compuestos bioactivos**

##### **4.3.1.1. Hipótesis nula ( $H_0$ )**

Algunos microorganismos endófitos aislados de plantas medicinales no producen compuestos bioactivos

##### **4.3.1.2. Hipótesis alternante ( $H_1$ )**

Algunos microorganismos endófitos aislados de plantas medicinales producen compuestos bioactivos

Después de realizar el análisis de los resultados del antagonismo microbiano, "se acepta la hipótesis alternante ( $H_1$ )" afirmando que varios microorganismos, incluyendo hongos y bacterias endófitas, producen compuestos bioactivos que provocan la inhibición del crecimiento de los microorganismos modelo usados en la presente investigación.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- A partir del aislamiento selectivo de las hojas de ajeno (*Artemisa absinthium*), cedrón (*Lippiacitriodora*), hierbabuena (*Mentha citrato*), llantén (*Plantagomajor*), y toronjil (*Melisa Officinalis*), recolectados de las localidades de Angahuana, Chibuleo y Pelileo en la Provincia de Tungurahua se obtuvieron ochenta y seis hongos, quince bacterias y una levadura con características endófitas.
- Se logró obtener cuarenta y dos grupos de color en los hongos endófitos y cuatro grupos de color en las bacterias.
- Se realizó la identificación morfológica preliminar de miembros de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Monilia*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Macrosporium*, *Mammaria*, *Colletotrichum*, *Gonytrichum*, *Helmintospora*, *Humicola*, *Nigrospora*, *Ulocladium* y *Zigospora*.
- Sesenta y cuatro cultivos de hongos endófitos presentaron algún tipo de actividad antimicrobiana en contra de la bacteria gram positiva tipo, bacteria gram negativa tipo, *Fusarium* y la levadura *Saccharomyces cervisiae*.
- Se encontró actividad antimicrobiana específica provocada por la producción de antibióticos por hongos endófitos. Veinte y cuatro fueron específicos para *Fusarium*, y ocho mostraron un amplio espectro de acción al inhibir el crecimiento tanto de bacterias como de hongos.
- En la determinación de la actividad antimicrobiana provocada por de bacterias endófitas se encontraron cuatro que presentaron capacidad bactericida. No se encontraron bacterias con capacidad antifúngica y por ende no se encontró ninguna bacteria que posea un amplio espectro de acción. No se encontraron bacterias endófitas que presenten actividad en contra de la levadura *Saccharomyces cervisiae*.
- Muchos de los compuestos bioactivos producidos por los hongos y bacterias endófitas fueron igual o más eficientes que los antibióticos usados como control experimental, nistatín y sulfato de estreptomicina.

## 5.2. Recomendaciones

- Realizar la caracterización molecular, principalmente de aquellas que produjeron metabolitos secundarios para ubicarlas en grupos ya existentes o para saber si se tratase una nueva especie.
- Ampliar los estudios a otro tipo de plantas y lugares en la región central del Ecuador.
- Realizar una fermentación líquida con los hongos productores de metabolitos secundarios para la obtención de un bioproducto. Luego de las pruebas de laboratorio, realizar pruebas de campo para conocer la efectividad de los compuestos bioactivos en condiciones reales para el control de enfermedades principalmente en plantas de interés agrícola.

# CAPÍTULO VI

## PROPUESTA

### 6.1. Datos informativos

#### 6.1.1. Título

Determinación de la producción de compuestos bioactivos a partir de hongos endófitos aislados del rizoplano de plantas medicinales.

#### 6.1.2. Institución Ejecutora

Universidad Técnica de Ambato.

#### 6.1.3. Beneficiarios

Investigadores y Estudiantes de Universidades y Escuelas Politécnicas del País. Centros de Investigaciones en Biotecnología. Empresas públicas y privadas relacionadas a la Agrobiotecnología.

#### 6.1.4. Ubicación

Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos / Campus Ingahurco / Ambato

#### 6.1.5. Tiempo Estimado para la Ejecución

Seis meses.

#### 6.1.6. Equipo Técnico Responsable

Docentes, Investigadores y Estudiantes trabajando en experimentos de búsqueda de compuestos bioactivos de microorganismos útiles en Biotecnología.

### 6.2. Antecedentes de la Propuesta

Los microorganismos endófitos son aquellos que habitan biotopos específicos como las plantas superiores en una relación mutualista benéfica. Son considerados como una fuente de nuevos metabolitos secundarios con un gran potencial para la medicina, agricultura o la industria. La investigación "*Determinación de la producción de compuestos bioactivos de microorganismos endófitos asociados a plantas medicinales en tres localidades de la provincia del Tungurahua*", demostró que se puede determinar la producción de compuestos bioactivos provenientes de endófitos a través de la actividad antagónica ante microorganismos modelo. El 74,4% de hongos

endófitos y el 50% de bacterias endófitas utilizadas en la fase terminal del experimento demostraron poseer capacidad antagónica inhibiendo el crecimiento total o parcial de otro microorganismo. De esta manera, se demostró que tanto hongos como bacterias endófitas pueden ser fuente de metabolitos de interés en Biotecnología.

### **6.3. Justificación**

El estudio "*Determinación de la producción de compuestos bioactivos de microorganismos endófitos asociados a plantas medicinales en tres localidades de la provincia del Tungurahua*", demostró que a partir de hongos y bacterias endófitas asociadas a las hojas de plantas medicinales, es posible determinar su capacidad antagónica a través de pruebas en contra de microorganismos modelo. Por tanto la metodología utilizada significaría la posible obtención de nuevos compuestos bioactivos de interés en agricultura. Por otro lado, no existen muchos datos acerca de la diversidad y distribución de microorganismos endófitos asociados a las raíces de las plantas. Los resultados que se obtengan podrían permitir comparar el comportamiento y colonización de los microorganismos para así determinar si los mismos tienen preferencia por las raíces o las hojas para establecerse como endófitos, y si su capacidad de producción de compuestos bioactivos es similar que las que se determinaron en el estudio mencionado anteriormente.

### **6.4. Objetivos**

#### **6.4.1. General**

- Determinar la producción de compuestos bioactivos de hongos endófitos aislados a partir del rizoplasma de plantas medicinales.

#### **6.4.2. Específico**

- Aislar hongos endófitos del rizoplasma de ajeno (*Artemisaabsinthium*), cedrón (*Lippiacitriodora*), hierbabuena (*Menthacitrato*), llantén (*Plantagomajor*), y toronjil (*Melisaofficinalis*).
- Caracterizar macro y microscópicamente los hongos endófitos aislados.
- Determinar la capacidad antagónica de hongos endófitos frente a bacterias, hongos y levaduras.

### **6.5. Análisis de Factibilidad**

La viabilidad del tema "*Determinación de la producción de compuestos bioactivos a partir de hongos endófitos aislados del rizoplasma de plantas medicinales.*", se asegura con los resultados

obtenidos en la investigación "*Determinación de la producción de compuestos bioactivos de microorganismos endófitos asociados a plantas medicinales en tres localidades de la provincia del Tungurahua*". Además, el cumplimiento adecuado de los objetivos específicos planteados en la presente propuesta garantizará el cumplimiento del objetivo general.

Por consiguiente, los siguientes resultados de la investigación en la que se basa la propuesta, conlleva a que los resultados de la presente propuesta sean alcanzados sin ningún inconveniente.

- La caracterización macro y microscópica de hongos endófitos a través de claves y descripciones de hongos. De ser posible utilizar otras técnicas de identificación las cuales aseguren que todos los individuos estudiados posean características morfológicas y fisiológicas similares de acuerdo a claves para la identificación.
- La parte de la fundamentación legal que reglamente el acceso y uso responsable de la biodiversidad con fines desarrollo investigativo en beneficio del ser humano. Siempre y cuando, pensando en la preservación del ecosistema para futuras generaciones.

## **6.6. Fundamentación**

La investigación "*Determinación de la producción de compuestos bioactivos de microorganismos endófitos asociados a plantas medicinales en tres localidades de la provincia del Tungurahua*", es la base científica que permite la formulación de la presente propuesta.

## **6.7. Metodología – Modelo operativo**

### **6.7.1. Aislamiento y purificación de microorganismos endófitos**

Se realizará mediante un proceso de aislamiento selectivo. Se utilizarán tres cortes de raíz por planta, las cuales serán sumergidas en agua de llave estéril durante cinco minutos para remover tierra y otras impurezas de la superficie. Posteriormente, con la ayuda de un bisturí estéril se cortará un centímetro de los extremos de las raíces para sumergirlas en agua estéril por 1 minuto, solución de hipoclorito de sodio al 50% del producto comercial durante 30 segundos, agua estéril por 1 minuto, alcohol al 70% durante 30 segundos, y nuevamente en agua estéril por 1 minuto. De la muestra lavada, se cortarán segmentos de 1 cm de en una caja petri estéril utilizando un bisturí estéril.

Una vez que las muestras se esterilizaron superficialmente se colocarán en cajas que contengan medio PDA (Anexo D). En cada caja se insertarán tres cortes de la muestra en forma de triángulo. Las cajas serán incubadas a 26°C durante 7 días.

Para la purificación de los cultivos se aislarán los hongos que fueron observados en cada uno de los tratamientos iniciales. Para la inoculación se utilizará un asa en punta con la cual se tomará una parte del micelio del hongo y se colocará en el centro de las cajas que contengan medio PDA (Anexo D). Las cajas serán incubadas a 26°C durante 7 días.

#### **6.7.2. Determinación del número de microorganismos endófitos**

El número de hongos se determinará de acuerdo al número de aislamientos obtenidos en cada especie de planta medicinal en cada una de las repeticiones.

#### **6.7.3. Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de microorganismos endófitos.**

La conservación a largo plazo de hongos y bacterias endófitas aisladas se realizará mediante la transferencia de material de cada cultivo puro hacia un criovial que contenga 1200 µl de glicerol al 20% (w/v). Los tubos serán almacenados en un congelador a -20°C.

#### **6.7.4. Caracterización macroscópica de los aislamientos.**

Los cultivos puros de hongos endófitos se agruparán en función de similitud de las características visuales en cada aislamiento, como el color del micelio aéreo, color del micelio del sustrato y presencia de pigmentación.

#### **6.7.5. Caracterización microscópica de los aislamientos**

Se tomará una muestra del cultivo puro de cada hongo endófito con la ayuda de un asa de transferencia estéril, preferentemente de un sitio cercano al centro de la caja, debido a que el micelio más antiguo tiene probabilidad de presentar estructuras reproductivas ya formadas. El micelio tomado se colocará en una gota de azul de lactofenol (sobre un portaobjetos limpio), para finalmente colocar un cubreobjetos. Las muestras serán observadas con la ayuda de un microscopio, y se identificarán las estructuras reproductivas de cada hongo. Así, se realizará una clasificación preliminar a nivel de género, usando claves y descripciones de hongos (Trillas, 1974; Darpoux, 1983; Domschet *al*, 1993).

#### **6.7.6. Determinación de la actividad antimicrobiana**

##### **6.7.6.1. Preparación de los cultivos de microorganismos endófitos**

Los hongos endófitos serán utilizados para determinar la capacidad de producción de compuestos bioactivos de interés en Biotecnología. Los hongos se crecerán en PDA, de tal manera que el micelio cubra por completo la superficie del medio de cultivo. Los platos serán incubados a 26°C por 7 días.

### **6.7.6.2. Preparación de los platos con los microorganismos modelo**

Inicialmente, un cultivo del hongo fitopatógeno *Fusarium* y una levadura, serán crecidos en PDA a 26°C por 7 días, provocando la esporulación completa del hongo y el crecimiento de la levadura. Así mismo, una bacteria gram positiva y otra gram negativa serán cultivadas en AN por 4 días a 28°C. Una vez obtenidos los cultivos de cada microorganismo, se prepararán los platos para la determinación del antagonismo siguiendo la técnica detallada por Phillips (1994).

En la primera etapa se preparará suspensiones con las esporas de *Fusarium*, y las células de la levadura y las bacterias. Para ello se raspará la superficie del medio de cultivo de cada microorganismo y el material recogido se transferirá a un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina estéril. A partir de éste se realizarán diluciones seriadas. Para hongos se usará un hemocitómetro para determinar la concentración de esporas. En el caso de las bacterias, se utilizará una placa de Petroff-Hausser. Posteriormente, con éstos valores se calculará el volumen de inóculo necesario para obtener concentraciones finales de  $1 \times 10^6$  células/ml de medio de cultivo para bacterias y  $1 \times 10^3$  esporas/ml de medio de cultivo para el hongo fitopatógeno y la levadura.

El volumen calculado será transferido asépticamente a medio de cultivo estéril, enfriado previamente a 50°C. Las botellas serán agitadas hasta obtener una suspensión uniforme de esporas o células, y el medio vertido en cajas tetrapetri estériles, cuidando que el espesor del medio sea uniforme en todos los compartimientos.

### **6.7.6.3. Instalación del experimento para determinar la capacidad antagonica**

Utilizando un sacabocados de 6 mm de diámetro, se extraerán bloques cilíndricos de partes del micelio de cada cultivo de hongo endófito. La profundidad del medio donde se extrajeron los bloques debe ser la misma en todos los casos. Para los hongos, primeramente se extraerá un bloque del medio que contenga los microorganismos modelo para en su lugar colocar los bloques de los hongos. Además se prepararán platos en los que se colocará 5 microlitros de nistatín (100 mg/ml; concentración stock) y sulfato de estreptomicina (25 mg/ml; concentración stock), como control experimental para los ensayos de hongos y bacterias respectivamente. Los platos preparados serán incubados a 26°C por 7 días, y los perfiles de actividad biológica se determinarán midiendo los diámetros de las zonas de inhibición, en milímetros, de aquellos hongos que muestren actividad antimicrobiana.

## 6.8. Administración

INDICADORES AMEJORAR	SITUACIÓN ACTUAL	RESULTADOS ESPERADOS	ACTIVIDADES	RESPONSABLES
Pruebas antimicrobianas de hongos endófitos aislados del rizoplaneo de plantas medicinales	Búsqueda de compuestos bioactivos a partir de hongos endófitos del rizoplaneo	Obtención de metabolitos secundarios a partir de endófitos	Caracterización macroscópica de los aislamientos	Docente
Capacidad antagónica de hongos endófitos		Determinación de la efectividad en el campo de compuestos bioactivos a partir de hongos endófitos	Caracterización microscópica de los aislamientos	
		Ahorro de recursos económicos al utilizar bioproductos en lugar de productos químicos	Pruebas antagónicas	Estudiante
			Análisis de datos de inhibición	

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

## 6.9. Previsión de la evaluación

<b>PRESUNTAS BÁSICAS</b>	<b>EXPLICACIÓN</b>
¿Quiénes solicitan evaluar?	Docentes Investigador
¿Por qué evaluar?	Proporciona información del mecanismos antagónicos para la búsqueda de metabolitos de interés
¿Para qué evaluar?	Para determinar la capacidad antagónica que permitan obtener biocompuestos de mayor efectividad
¿Qué evaluar?	Datos obtenidos a partir de pruebas antagónicas
¿Quién evalúa?	Docente
¿Cuándo evaluar?	Al finalizar la pruebas de actividad antagónica
¿Cómo evaluar?	Mediante análisis estadísticos
¿Con qué evaluar?	Programa estadístico Statgraphics

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ABELLO, J. & KELEMU, S.**, 2006, Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, Colombia, 7(2):55-57.
2. **AGRIOUS. G. N**, 1995, Fitopatología, 2da Edición Catedrático, Departamento de Fitopatología, Universidad de Massachussets, UTEHA, Noriega Editores, México, España, Venezuela, Colombia, p. 003-288.
3. **ALONSO, M.**, 2002, El Medicamento en la Oficina de Farmacia; Plantas Medicinales del Colegio Oficial de Farmacéutica, Barcelona.
4. **ARISTEGUI**, 2002, Reino de los Hongos. *RevIberoamMicol*.
5. **BANCON, C. & WHITE, J.**, 2000, *Microbial Endhopytes*, Marcel Dekker Inc. New York, N.Y.
6. **BAGNASCO, P.; DE LA FUENTE, L.; GUALTIERA, G.; NOYA, F. & ARIAS, A.**, 1998, Fluorescent *Pseudomonas* spp, As biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi; *Soil Biology and Biochemistry*. 30, 1317-1322.
7. **CARRILLO, L.**, 2003, *Microbiología Agrícola*. Vol 7, p. 1-14.
8. **CARROL, G.**, 1988, Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbionz, *Ecology* 69(1):2-9.
9. **CASTRO, S. & BERMUDEZ, C.**, 2006, Bacterias endófitas de *Cordiaalliodora* y *Tabebuia rosea*. Potencial como promotoras de crecimiento vegetal en la propagación de su hospedero y potencial antagónico, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Microbiología agrícola, Bogotá.
10. **CERÓN, C. M.**, 2006, Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos, Escuela de Biología de la Universidad Central del Ecuador. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, p. 285-293.
11. **CHAVES,N.**, 2009, Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholussimilis*, Programa de educación para el desarrollo y la conservación, Escuela de posgrado, Agricultura Ecológica, Turrialba, Costa Rica.
12. **CHIEREGHIN, P.**, 2000, *Farmacia Verde. Manual Práctico de Herboristería*, AMV Ediciones, Mundi PRENSA, 4ta Edición, p. 22-185.

13. **CROZIER, J.; AIME, M. & HOLMES, K.**, 2006, Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobromacacao*, Plant Pathology, 55: 783-791.
14. **DARPOUX, H.**, 1983, Clasificación de los Champiños Phytopathógenos, Station Centrale de Pathologie Végétale, Ecole Nationale Supérieure d'Horticulture, Weinstein.
15. **DÍAZ, A.; DARIAS, A.; SUÁREZ, C.; ÁLVAREZ, G.; ARTILES, R.; VALLEJO, G. & RUIZ, L.**, 2009, Química y Biotecnología de Productos Naturales, Dep. Ciencia y Tecnología, Vol 4, p.34-42.
16. **DIBUT, B.; MARTÍNEZ, R.; ORTEG, M.; RÍOS, Y.; TEJEDA, G.; PLANAS, L. & RODRÍGUEZ, J.**, 2009, Situación actual y perspectiva de las relaciones endófitas planta-bacteria, Estudio de caso *Gluconacetobacter diazotrophicus*-cultivos de importancia económica, Cultivos Tropicales, vol. 30, no. 4, p. 16-23.
17. **DOMSCH, K.; GAMS, W. & ANDERSON, T.**, 1993, Compendium of Soil Fungi, IHW – Verlag.
18. **DURAND, V.**, 2008, Biotecnología en la mira: Problema de percepción filosófica, Biotecnología de ArgenBio.
19. **FELDE, A.; POCASANGRE, A.; CARÑIZARES, C.; SIKORA, R.; ROSALES, F. & RIVEROS, A.**, 2006, Efecto de inoculaciones combinadas de hongos endófitos en el biocontrol de *Radopholussimilis*, Hongos endófitos, InfoMusa- Vol. 15 No. 1-2.
20. **GAMBOA, G. M.Sc.**, 2006, Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento actual y Perspectivas, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá-Colombia. Vol 6 No 2-3.
21. **GONZÁLEZ, M.**, 2004, Plantas Medicinales, Principios Farmacéuticos, Vol 3 No 5.
22. **GUNDEL, P.**, 2008, Ingeniero Agrónomo, Hongos benéficos, para mayor producción forrajera, Sitio Argentino de Producción Animal, 16(206):24-32.
23. **HALLMANN, J. & SIKORA, R.**, 1996, Toxicity of fungal endophytic secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi, European Journal of Plant Pathology. 102:155-162.
24. **HIERBAS DEL ECUADOR**, 1982, Plantas Medicinales, Edición LibriMundi, Quito, 2da Edición, p. 17-292.

25. **KOLAKOWSKI**, 1998, Positivismo de la ciencia, Fundamentos de Filosofía.
26. **LEHTONEN, P.; HELANDER, M.; SHAHID, S.; LEHTO, K. & SAIKKONEN, K.**, 2006, Endophytic fungus decreases plant virus infections in meadow ryegrass (*Lolium pratense*), Fungus decreases virus infections, Finland, Vol2, p620–623.
27. **MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BERNAN, V.; DWORKIN, M. & SHRRMAN, D.**, 2004, Isolation and Characterization de Novel Marine-Derived *Actinomycete* Taxa Tich in Bioactive Metabilites. Applied and Environmental Microbiology, 70(12).
28. Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la UTA, 2009.
29. **MARTÍNEZ, I, P.**, 2000, *Las Plantas Medicinales*, Rev Cubana Oncol, 16(1):66.
30. **MARTÍNEZ, R.; MARTÍNEZ, L.; HERNÁNDEZ, I.; CABALLERO, M. & FUENTES, R.**, 2007, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM. Ap. P. 565-A Cuernavaca, Mor. México, emartine@cifn.unam.mx.
31. **McCORMACK, P.; WILDMAN, H. & JEFFRIES, P.**, 1994, Production of Antibacterial Compounds by Phylloplane - Inhabiting Yeasts and Yeastlike Fungi, Applied and Environmental Microbiolog, University of Kent, Canterbury, Vol. 60, No. 3, p. 927-931.
32. **MICHOACÁN, E.**, 2006, El Huerto Medicinal, Cultivo u Uso de Plantas Medicinales y Aromáticas, México, p. 03-58.
33. **MOLINA, G.; ZALDÚA, S.; GONZÁLEZ, G. & SANFUENTES, E.**, 2006, Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile, Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Laboratorio de Patología Forestal, Victoria, BOSQUE 27(2): 126-134.
34. **MONDINO, P.**, 2003, Ingeniero Agrónomo, Control de Plagas y Enfermedades, Ingeniería Ambiental, Uruguay, Vol 5. N°32, p.198-206.
35. **MORALES, R.**, 2006, Hongos endófitos en plantaciones de mango 'Haden' de la planicie de Maracaibo, Venezuela; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Maracaibo – Venezuela, Rev. Fac. Agron. (LUZ), 23: 273-283.
36. **MORRISSEY, J.; DOW, J.; MARK, G. & GARA, F.**, 2004, Are microbes at the root of a solution to world food production, Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture, European Molecular Biology Organization, VOL 5, NO 10, p.922-927.

37. **MUÑOZ, J. & CABALLERO, J.**, 2002, *Gluconacetobacter diazotrophicus*. modelo de bacteria endófito, Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre, Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal No.565-A, Cuernavaca Morelos.
38. **PÉREZ, C.; ROJAS, S. & VALE, M.**, 2009, Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas, Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Brasilia, departamento de Fitopatología, Brasil, Rev. Colombiana cienc. Anim. 1(2).
39. **PHILIPS, L.**, 1994, Manual de *Actinomycetes*, 150.
40. **PILLAY, V. & NORWARK, J.**, 1997, Inoculum, density, temperature, and genotype effect on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum L.*), seedling inoculated with a Pseudomonas bacterium. Canadian Journal of Microbiology, v 43, p.354-361.
41. **RAMÍREZ, R.; DELGADO, E.; RODOLFI, M. & SOLVEIG, T.**, 2006, Actividad antagonista de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas, Centro de Biología Celular y Molecular, Universidad Técnica particular de Loja, Vol. 21 : 49 – 53.
42. **REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H. & SESSITSCH, A.**, 2002, Response of Endophytic Bacterial Communities in Potato Plants to Infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 5, p. 2261–2268.
43. **ROERSCH, C.**, 1997, Plantas Medicinales: Como evitar su extinción, Instituto de Medicina Dominicana, Santo Domingo - República Dominicana; p. 1-17.
44. **ROMEO, C.**, 2002, La Genética y la Biotecnología en las Fronteras del Derecho, Bioética.
45. **RUIZ, J.**, 2001, El asombroso reino de los hongos; Hongo y taxonomía, *Rev. Perspectiva*, Vol:20.
46. **SALGADO, C. & CEPERO, M. C.**, 2005, Aislamiento de hongos endófitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia, Centro de Investigaciones Microbiológicas CIMIC; Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá – Colombia, 22: 99-101.
47. **SAVIOTTI, P.**, 2000, Biotecnología, Vigilancia de informe Tecnológica.
48. **SIEGEL, M. & LATCH, G.**, 1991, Expression of antifungal activity in agar culture by isolates of grass endophytes; *Mycology*, 83; 529–537.

49. **SIEGEL, M.; LATCH, G. & JOHNSON, M.**, 1987, Fungal endophytes of grasses; *Ann, Rev. Phytopath*, 25: 293-315.
50. **STONE, J. & PETRINI, O.**, 1997, Endophytes of forest trees: a model for fungus-plant interactions, *The mycota V part B Plant relationships* (Carrol/Tudzynski eds.), Springer Verlag - Berlin Heidelberg, pp. 129-140.
51. **STROBEL, G. & DAISY, B.**, 2003, Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 67, No. 4, p. 491-500.
52. **SUÁREZ, C.**, 2008, propuesta para elevar la formación ambiental de los ingenieros agrónomos de la facultad agropecuaria de montaña del escambray.
53. **TRILLAS, H.**, 1974, Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina, México.
54. **TAN, R. & ZOU, W.**, 2001, Endophytes: a rich source of functional metabolites, *Nat. Prod*; Vol. 18: p448-459.
55. **VAN, L.; BARAC, T.; TAGHAVI, S. & VANGRONVELD, J.**, 2005, Response to Newman, New uses of endophytic bacteria to improve phytoremediation, *TRENDS in Biotechnology*. V. 23, N. 1. 8-1.
56. **VARGAS, C.**, 2006, Caracterización de bacterias endófitas diazótroficas y productoras de Ácidoindolacético con *Tabebuia rosea* (Guayacán rosado) y *Cordia alliodora* (Nogal cafetero), Trabajo de investigación para optar el Título en Microbiología, Universidad Nacional de Colombia.
57. **VERO, S. & MONDINO, P.**, 2002, Control Biológico de Enfermedades de Plantas, Perfil Ambiental, Uruguay, Ana Domínguez y Rubén Prieto (Coordinadores), p. 81-92.
58. **ZUNO, F.; MUÑOZ, C. & CONTRERAS, A.**, 2005, Degradación de metalaxil por bacterias endófitas en plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv alpha.

**ANEXO A**

**RESULTADOS  
EXPERIMENTALES**

**Tabla A1. Caracterización físico-química de muestras de suelo de plantas medicinales.**

<b>Especie/Localidad</b>	<b>Angahuana</b>			<b>Chibuleo</b>			<b>Pelileo</b>		
	<b>pH</b>	<b>%H</b>	<b>% M.O.</b>	<b>pH</b>	<b>%H</b>	<b>%M.O.</b>	<b>pH</b>	<b>%H</b>	<b>%M.O.</b>
Ajenjo	6,8	20,62	9,11	6,4	23,70	9,28	6,7	14,71	5,04
Cedrón	6,7	20,86	8,20	6,4	26,19	12,39	7,3	16,14	6,54
Hierbabuena	6,8	18,36	7,01	6,3	23,35	10,64	7,2	12,08	6,30
Llantén	6,9	24,67	8,35	6,5	22,54	11,22	7,6	16,99	4,19
Toronjil	7,1	19,91	9,17	7,0	24,04	9,76	6,5	15,59	4,91

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A2. Codificación del número de hongos endófitos.**

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<b>Medio</b>	<b>Localidad</b>	<b>Especie</b>
1	HA001	PDA	Angahuana	Ajenjo
2	HA002	PDA	Angahuana	Ajenjo
3	HA003	PDA	Angahuana	Ajenjo
4	HA004	PDA	Angahuana	Ajenjo
5	HA005	PDA	Angahuana	Cedrón
6	HA006	PDA	Angahuana	Cedrón
7	HA007	PDA	Angahuana	Cedrón
8	HA008	PDA	Angahuana	Cedrón
9	HA009	PDA	Angahuana	Cedrón
10	HA010	PDA	Angahuana	Cedrón
11	HA011	PDA	Angahuana	Cedrón
12	HA012	PDA	Angahuana	Cedrón
13	HA013	PDA	Angahuana	Cedrón
14	HA014	PDA	Angahuana	Cedrón
15	HA015	PDA	Angahuana	Hierbabuena
16	HA016	PDA	Angahuana	Hierbabuena
17	HA017	PDA	Angahuana	Hierbabuena
18	HA018	PDA	Angahuana	Hierbabuena
19	HA019	PDA	Angahuana	Hierbabuena
20	HA020	PDA	Angahuana	Hierbabuena

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A2. Continuación...**

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<b>Medio</b>	<b>Localidad</b>	<b>Especie</b>
21	HA021	PDA	Angahuana	Hierbabuena
22	HA022	PDA	Angahuana	Llantén
23	HA023	PDA	Angahuana	Llantén
24	HA024	PDA	Angahuana	Llantén
25	HA025	PDA	Angahuana	Llantén
26	HA026	PDA	Angahuana	Llantén
27	HA027	PDA	Angahuana	Llantén
28	HA028	PDA	Angahuana	Llantén
29	HA029	PDA	Angahuana	Toronjil
30	HA030	PDA	Angahuana	Toronjil
31	HA031	PDA	Angahuana	Toronjil
32	HA032	PDA	Angahuana	Toronjil
33	HA033	PDA	Angahuana	Toronjil
34	HA034	PDA	Chibuleo	Ajenjo
35	HA035	PDA	Chibuleo	Ajenjo
36	HA036	PDA	Chibuleo	Ajenjo
37	HA037	PDA	Chibuleo	Ajenjo
38	HA038	PDA	Chibuleo	Ajenjo
39	HA039	PDA	Chibuleo	Ajenjo
40	HA040	PDA	Chibuleo	Cedrón
41	HA041	PDA	Chibuleo	Cedrón
42	HA042	PDA	Chibuleo	Cedrón
43	HA043	PDA	Chibuleo	Cedrón
44	HA044	PDA	Chibuleo	Hierbabuena
45	HA045	PDA	Chibuleo	Hierbabuena
46	HA046	PDA	Chibuleo	Hierbabuena
47	HA047	PDA	Chibuleo	Hierbabuena
48	HA048	PDA	Chibuleo	Hierbabuena
49	HA049	PDA	Chibuleo	Hierbabuena
50	HA050	PDA	Chibuleo	Llantén
51	HA051	PDA	Chibuleo	Llantén

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A2. Continuación...**

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<b>Medio</b>	<b>Localidad</b>	<b>Especie</b>
52	HA052	PDA	Chibuleo	Llantén
53	HA053	PDA	Chibuleo	Llantén
54	HA054	PDA	Chibuleo	Llantén
55	HA055	PDA	Chibuleo	Llantén
56	HA056	PDA	Chibuleo	Llantén
57	HA057	PDA	Chibuleo	Llantén
58	HA058	PDA	Chibuleo	Llantén
59	HA059	PDA	Chibuleo	Toronjil
60	HA060	PDA	Chibuleo	Toronjil
61	HA061	PDA	Chibuleo	Toronjil
62	HA062	PDA	Chibuleo	Toronjil
63	HA063	PDA	Pelileo	Ajenjo
64	HA064	PDA	Pelileo	Ajenjo
65	HA065	PDA	Pelileo	Ajenjo
66	HA066	PDA	Pelileo	Ajenjo
67	HA067	PDA	Pelileo	Cedrón
68	HA068	PDA	Pelileo	Cedrón
69	HA069	PDA	Pelileo	Cedrón
70	HA070	PDA	Pelileo	Cedrón
71	HA071	PDA	Pelileo	Cedrón
72	HA072	PDA	Pelileo	Cedrón
73	HA073	PDA	Pelileo	Hierbabuena
74	HA074	PDA	Pelileo	Hierbabuena
75	HA075	PDA	Pelileo	Hierbabuena
76	HA076	PDA	Pelileo	Hierbabuena
77	HA077	PDA	Pelileo	Hierbabuena
78	HA078	PDA	Pelileo	Llantén
79	HA079	PDA	Pelileo	Llantén
80	HA080	PDA	Pelileo	Llantén
81	HA081	PDA	Pelileo	Toronjil

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A2. Continuación...**

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<b>Medio</b>	<b>Localidad</b>	<b>Especie</b>
82	HA082	PDA	Pelileo	Toronjil
83	HA083	PDA	Pelileo	Toronjil
84	HA084	PDA	Pelileo	Toronjil
85	HA085	PDA	Pelileo	Toronjil
86	HA086	PDA	Pelileo	Toronjil

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A3. Codificación del número de bacterias endófitas.**

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<b>Medio</b>	<b>Localidad</b>	<b>Especie</b>
1	BA001	PDA	Angahuana	Ajenjo
2	BA002	PDA	Angahuana	Cedrón
3	BA003	AN	Angahuana	Hierbabuena
4	BA005	AN	Chibuleo	Ajenjo
5	BA006	PDA	Chibuleo	Cedrón
6	BA007	AN	Chibuleo	Cedrón
7	BA008	AN	Chibuleo	Hierbabuena
8	BA009	AN	Chibuleo	Hierbabuena
9	BA010	PDA	Chibuleo	Hierbabuena
10	BA011	PDA	Chibuleo	Toronjil
11	BA012	AN	Pelileo	Ajenjo
12	BA013	AN	Pelileo	Ajenjo
13	BA014	AN	Pelileo	Hierbabuena
14	BA015	AN	Pelileo	Hierbabuena
15	BA016	PDA	Pelileo	Toronjil
16	BA017	AN	Pelileo	Toronjil

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A4. Caracterización macroscópica de los hongos endófitos.**

<b>Grupos de Color</b>	<b>Color de micelio</b>	<b>Color de pigmento difusible</b>	<b>Observación</b>	<b>ID hongo</b>
1	Amarillo	Amarillo	-	HA023, HA048, HA054, HA061
2	Blanco	-	Presenta coloración verde alrededor.	HA037, HA029
3	Blanco	-	Crecimiento medio.	HA040
4	Blanco	-	Crecimiento excesivo.	HA002, HA065
5	Blanco	Tomate	-	HA060
6	Blanco	-	Presenta puntos con coloración verde.	HA056
7	Blanco	Café	Presenta puntos con coloración negra.	HA076
8	Blanco	-	Crecimiento voluminoso.	HA045
9	Blanco	-	Crecimiento en forma de fibras.	HA030
10	Blanco	-	Crecimiento abultado como algodón.	HA021
11	Blanco	-	Presenta puntos con coloración verde alrededor de la colonia.	HA033, HA064
12	Blanco	Rojo	Presenta puntos con coloración roja.	HA016, HA049
13	Blanco	Café	Esporulación verde encima del micelio.	HA008
14	Café	-	Presenta coloración blanca alrededor.	HA069, HA074
15	Gris	Azul	Esporulación gris oscuro.	HA024, HA051
16	Gris	Café	Presenta puntos con coloración negra.	HA041

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A4. Continuación...**

<b>Grupos de Color</b>	<b>Color de micelio</b>	<b>Color de pigmento difusible</b>	<b>Observación</b>	<b>ID hongo</b>
17	Gris	Azul	Presencia de puntos blancos y gotas de agua encima del micelio.	HA004, HA058
18	Gris	Café	Presenta esporulación plomo verdoso en el centro de la caja.	HA031
19	Gris	Negro	Presenta esporulación verde.	HA017, HA052
20	Gris	Azul	Presenta esporulación plomo verdoso.	HA007, HA019, HA027, HA028
21	Gris	Café	Presenta esporulación negra.	HA005, HA006, HA009, HA047
22	Gris	-	Presenta puntos blancos y negros.	HA034
23	Gris	-	Esporulación color gris oscuro.	HA013
24	Gris	Negro	Presenta esporulación blanca alrededor	HA020, HA032, HA084
25	Gris	-	Presenta puntos negros.	HA081, HA083, HA086
26	Gris	Café	Esporulación gris oscura.	HA010, HA026, HA035, HA050, HA053, HA057, HA073, HA075, HA077, HA078
27	Gris	Negro	Presenta esporulación color café y espacios entre el micelio.	HA062
28	Gris	Negro	Presenta puntos blancos.	HA082
29	Gris	Café	Presenta puntos negros y blanco en el centro de la caja.	HA079

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A4. Continuación...**

<b>Grupos de Color</b>	<b>Color de micelio</b>	<b>Color de pigmento difusible</b>	<b>Observación</b>	<b>ID hongo</b>
30	Gris	Café	Esporulación verdosa y abultada.	HA070
31	Negro	Azul	-	HA044
32	Rojo	Rojo	Presenta gotas de color tomate.	HA015
33	Tomate	Rojo	Presenta puntos amarillos, rosados y rojos sobre el micelio.	HA012, HA014
34	Verde	Negro	Presenta esporulación blanca.	HA038
35	Verde	-	Presenta puntos cafés.	HA001
36	Verde	-	-	HA003,HA018, HA046
37	Verde	Tomate	-	HA025
38	Verde	Rojo	Presenta esporulación rosada y blanca.	HA036, HA039
39	Verde	Café	Crecimiento excesivo y presencia de puntos blancos.	HA022
40	Verde	Amarillo	-	HA011, HA055, HA059, HA066, HA072
41	Verde	Azul	-	HA068, HA071, HA080
42	Verde	-	Presenta esporas polvosas.	HA042, HA043, HA063, HA067, HA085

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A5. Origen de cada miembro de los grupos de color.**

<b>Código</b>	<b>Localidad</b>	<b>Especie</b>	<b>Grupo Color</b>	<b>Código</b>	<b>Localidad</b>	<b>Especie</b>	<b>Grupo Color</b>
HA023	Angahuana	Llantén	1	HA074	Pelileo	Hierbabuena	14
HA048	Chibuleo	Hierbabuena	1	HA024	Angahuana	Llantén	15
HA054	Chibuleo	Llantén	1	HA051	Chibuleo	Llantén	15
HA061	Chibuleo	Toronjil	1	HA041	Chibuleo	Cedrón	16
HA029	Angahuana	Toronjil	2	HA004	Angahuana	Ajenjo	17
HA037	Chibuleo	Ajenjo	2	HA058	Chibuleo	Llantén	17
HA040	Chibuleo	Cedrón	3	HA031	Angahuana	Toronjil	18
HA002	Angahuana	Ajenjo	4	HA017	Angahuana	Hierbabuena	19
HA065	Pelileo	Ajenjo	4	HA052	Chibuleo	Llantén	19
HA060	Chibuleo	Toronjil	5	HA007	Angahuana	Cedrón	20
HA056	Chibuleo	Llantén	6	HA019	Angahuana	Hierbabuena	20
HA076	Pelileo	Hierbabuena	7	HA027	Angahuana	Llantén	20
HA045	Chibuleo	Hierbabuena	8	HA028	Angahuana	Llantén	20
HA030	Angahuana	Toronjil	9	HA005	Angahuana	Cedrón	21
HA021	Angahuana	Hierbabuena	10	HA006	Angahuana	Cedrón	21
HA033	Angahuana	Toronjil	11	HA009	Angahuana	Cedrón	21
HA064	Pelileo	Ajenjo	11	HA047	Chibuleo	Hierbabuena	21
HA016	Angahuana	Hierbabuena	12	HA034	Chibuleo	Ajenjo	22
HA049	Chibuleo	Hierbabuena	12	HA013	Angahuana	Cedrón	23
HA008	Angahuana	Cedrón	13	HA020	Angahuana	Hierbabuena	24
HA069	Pelileo	Cedrón	14	HA032	Angahuana	Toronjil	24

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A5. Continuación...**

<b>Código</b>	<b>Localidad</b>	<b>Especie</b>	<b>Grupo Color</b>	<b>Código</b>	<b>Localidad</b>	<b>Especie</b>	<b>Grupo Color</b>
HA084	Pelileo	Toronjil	24	HA014	Angahuana	Cedrón	33
HA081	Pelileo	Toronjil	25	HA038	Chibuleo	Ajenjo	34
HA083	Pelileo	Toronjil	25	HA001	Angahuana	Ajenjo	35
HA086	Pelileo	Toronjil	25	HA003	Angahuana	Ajenjo	36
HA010	Angahuana	Cedrón	26	HA018	Angahuana	Hierbabuena	36
HA026	Angahuana	Llantén	26	HA046	Chibuleo	Hierbabuena	36
HA035	Chibuleo	Ajenjo	26	HA025	Angahuana	Llantén	37
HA050	Chibuleo	Llantén	26	HA036	Chibuleo	Ajenjo	38
HA053	Chibuleo	Llantén	26	HA039	Chibuleo	Ajenjo	38
HA057	Chibuleo	Llantén	26	HA022	Angahuana	Llantén	39
HA073	Pelileo	Hierbabuena	26	HA011	Angahuana	Cedrón	40
HA075	Pelileo	Hierbabuena	26	HA055	Chibuleo	Llantén	40
HA077	Pelileo	Hierbabuena	26	HA059	Chibuleo	Toronjil	40
HA078	Pelileo	Llantén	26	HA066	Pelileo	Ajenjo	40
HA062	Chibuleo	Toronjil	27	HA072	Pelileo	Cedrón	40
HA082	Pelileo	Toronjil	28	HA068	Pelileo	Cedrón	41
HA079	Pelileo	Llantén	29	HA071	Pelileo	Cedrón	41
HA070	Pelileo	Cedrón	30	HA080	Pelileo	Llantén	41
HA044	Chibuleo	Hierbabuena	31	HA042	Chibuleo	Cedrón	42
HA015	Angahuana	Hierbabuena	32	HA043	Chibuleo	Cedrón	42
HA012	Angahuana	Cedrón	33	HA063	Pelileo	Ajenjo	42

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A6. Determinación de la diversidad de hongos endófitos de acuerdo a la especie – Ajenjo (*Artemisa absinthium*).**

<b>Nº</b>	<b>Grupo Color</b>	<b>Color de micelio</b>	<b>Color de pigmento</b>	<b>Observación</b>	<b>Código (s)</b>	<b>Localidad</b>
1	2	Blanco	-	Presenta coloración verde alrededor.	HA037	Chibuleo
2	4	Blanco	-	Crecimiento excesivo.	HA002, HA065	Angahuana Pelileo
3	11	Blanco	-	Presenta puntos con coloración verde alrededor de la colonia.	HA064	Pelileo
4	17	Gris	Azul	Presencia de puntos blancos y gotas de agua encima del micelio.	HA004	Angahuana
5	26	Gris	Café	Esporulación gris oscura.	HA035	Chibuleo
6	22	Gris	-	Presenta puntos blancos y negros.	HA034	Chibuleo
7	34	Verde	Negro	Presenta esporulación blanca.	HA038	Chibuleo
8	35	Verde	-	Presenta puntos cafés.	HA001	Angahuana
9	36	Verde	-	-	HA003	Angahuana
10	38	Verde	Rojo	Presenta esporulación rosada y blanca.	HA036, HA039	Chibuleo
11	40	Verde	Amarillo	-	HA066	Pelileo
12	42	Verde	-	Presenta esporas polvosas.	HA063	Pelileo

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A7. Determinación de la diversidad de hongos endófitos de acuerdo a la especie – Cedrón (*Lippiacitriodora*).**

<b>Nº</b>	<b>Grupo Color</b>	<b>Color de micelio</b>	<b>Color de pigmento</b>	<b>Observación</b>	<b>Código (s)</b>	<b>Localidad</b>
1	3	Blanco	-	Crecimiento medio.	HA040	Chibuleo
2	14	Café	-	Presenta coloración blanca alrededor.	HA069	Pelileo
3	16	Gris	Café	Presenta puntos con coloración negra.	HA041	Chibuleo
4	23	Gris	-	Esporulación color gris oscuro.	HA013	Angahuana
5	20	Gris	Azul	Presenta esporulación plomo verdoso.	HA007	Angahuana
6	30	Gris	Café	Esporulación verdosa y abultada.	HA070	Pelileo
7	21	Gris	Café	Presenta esporulación negra.	HA005, HA006, HA009	Angahuana
8	26	Gris	Café	Esporulación gris oscura.	HA010	Angahuana
9	13	Blanco	Café	Esporulación verde encima del micelio.	HA008	Angahuana
10	33	Tomate	Rojo	Presenta puntos amarillos, rosados y rojos sobre el micelio.	HA012, HA014	Angahuana
11	41	Verde	Azul	-	HA068, HA071	Pelileo
12	40	Verde	Amarillo	-	HA011, HA072	Angahuana, Pelileo
13	42	Verde	-	Presenta esporas polvosas.	HA042, HA043, HA067	Chibuleo Pelileo

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A8. Determinación de la diversidad de hongos endófitos de acuerdo a la especie – Hierbabuena (*Mentha citrato*).**

Nº	Grupo Color	Color de micelio	Color de pigmento	Observación	Código (s)	Localidad
1	1	Amarillo	Amarillo	-	HA048	Chibuleo
2	8	Blanco	-	Crecimiento voluminoso.	HA045	Chibuleo
3	10	Blanco	-	Crecimiento abultado como algodón.	HA021	Angahuana
4	7	Blanco	Café	Presenta puntos con coloración negra.	HA076	Pelileo
5	12	Blanco	Rojo	Presenta puntos con coloración roja.	HA016, HA049	Angahuana, Chibuleo
6	14	Café	-	Presenta coloración blanca alrededor.	HA074	Pelileo
7	19	Gris	Negro	Presenta esporulación verde.	HA017	Angahuana
8	26	Gris	Café	Esporulación gris oscura.	HA073, HA075, HA077	Pelileo
9	24	Gris	Negro	Presenta esporulación blanca alrededor.	HA020	Angahuana
10	21	Gris	Café	Presenta esporulación negra.	HA047	Chibuleo
11	20	Gris	Azul	Presenta esporulación plomo verdoso.	HA019	Angahuana
12	31	Negro	Azul	-	HA044	Chibuleo
13	32	Rojo	Rojo	Presenta gotas de color tomate.	HA015	Angahuana
14	36	Verde	-	-	HA018, HA046	Angahuana, Chibuleo

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A9. Determinación de la diversidad de hongos endófitos de acuerdo a la especie – Llantén (*Plantago major*).**

<b>Nº</b>	<b>Grupo Color</b>	<b>Color de micelio</b>	<b>Color de pigmento</b>	<b>Observación</b>	<b>Código (s)</b>	<b>Localidad</b>
1	1	Amarillo	Amarillo	-	HA023, HA054	Angahuana, Chibuleo
2	6	Blanco	-	Presenta puntos con coloración verde.	HA056	Chibuleo
3	15	Gris	Azul	Esporulación gris oscuro.	HA024, HA051	Angahuana, Chibuleo
4	17	Gris	Azul	Presencia de puntos blancos y gotas de agua encima del micelio.	HA058	Chibuleo
5	19	Gris	Negro	Presenta esporulación verde.	HA052	Chibuleo
6	26	Gris	Café	Esporulación gris oscura.	HA026, HA050,HA053, HA057, HA078, HA079	Angahuana, Chibuleo, Pelileo,
7	20	Gris	Azul	Presenta esporulación plomo verdoso.	HA027, HA028	Angahuana
8	41	Verde	Azul	-	HA080	Pelileo
9	40	Verde	Amarillo	-	HA055	Chibuleo
10	37	Verde	Tomate	-	HA025	Angahuana
11	39	Verde	Café	Crecimiento excesivo y presencia de puntos blancos.	HA022	Angahuana

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A10. Determinación de la diversidad de hongos endófitos de acuerdo a la especie – Toronjil (*Melisa officinalis*).**

<b>Nº</b>	<b>Grupo Color</b>	<b>Color de micelio</b>	<b>Color de pigmento</b>	<b>Observación</b>	<b>Código (s)</b>	<b>Localidad</b>
1	1	Amarillo	Amarillo	-	HA061	Chibuleo
2	2	Blanco	-	Presenta coloración verde alrededor.	HA029	Angahuana
3	5	Blanco	Tomate	-	HA060	Chibuleo
4	9	Blanco	-	Crecimiento en forma de fibras.	HA030	Angahuana
5	11	Blanco	-	Presenta puntos con coloración verde alrededor de la colonia.	HA033	Angahuana
6	18	Gris	Café	Presenta esporulación plomo verdoso en el centro de la caja.	HA031	Angahuana
7	24	Gris	Negro	Presenta esporulación blanca alrededor.	HA084	Pelileo
8	25	Gris	-	Presenta puntos negros.	HA081, HA083, HA086	Pelileo
9	27	Gris	Negro	Presenta esporulación color café y espacios entre el micelio.	HA062	Chibuleo
10	28	Gris	Negro	Presenta puntos blancos.	HA082	Pelileo
11	24	Gris	Negro	Presenta esporulación blanca alrededor	HA032	Angahuana
12	42	Verde	-	Presenta esporas polvosas.	HA085	Pelileo
13	40	Verde	Amarillo	-	HA059	Chibuleo

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A11. Caracterización macroscópica de bacterias endófitas**

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<b>Color de colonia</b>
1	BA001	Rojo
2	BA002	Amarillo
3	BA003	Crema
4	BA005	Crema
5	BA006	Rojo
6	BA007	Amarillo
7	BA008	Crema
8	BA009	Crema
9	BA010	Rojo
10	BA011	Rosado
11	BA012	Crema
12	BA013	Crema
13	BA014	Amarillo
14	BA015	Amarillo
15	BA016	Amarillo
16	BA017	Crema

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A12. Grupos de color formados por las bacterias endófitas**

<b>Grupo de color</b>	<b>Color de colonia</b>	<b>Medio de aislamiento</b>	<b>Lugar</b>	<b>Planta</b>	<b>Código</b>
		PDA	Angahuana	Cedrón	BA002
		AN	Chibuleo	Cedrón	BA007
1	Amarillo	AN	Pelileo	Hierbabuena	BA014
		AN	Pelileo	Hierbabuena	BA015
		PDA	Pelileo	Toronjil	BA016
		AN	Angahuana	Hierbabuena	BA003
		AN	Chibuleo	Ajenjo	BA005
		AN	Chibuleo	Hierbabuena	BA008
2	Crema	AN	Chibuleo	Hierbabuena	BA009
		AN	Pelileo	Ajenjo	BA012
		AN	Pelileo	Ajenjo	BA013
		AN	Pelileo	Toronjil	BA017
		PDA	Angahuana	Ajenjo	BA001
3	Rojo	PDA	Chibuleo	Cedrón	BA006
		PDA	Chibuleo	Hierbabuena	BA010
4	Rosado	PDA	Chibuleo	Toronjil	BA011

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A13. Caracterización microscópica e identificación morfológica preliminar de hongos endófitos.**

N°	Código	Micelio (tipo)	Tamaño de hifa ( $\mu\text{m}$ )	Forma espora	Tamaño de la espora			Organismo (posible)
					L( $\mu\text{m}$ )	$\Theta$ ( $\mu\text{m}$ )	A ( $\mu\text{m}$ )	
1	HA001	Tabicado	5,00	Redondo	-	3,75	-	<i>Aspergillus</i>
2	HA002	No tabicado	2,50	-	-	-	-	-
3	HA003	-	-	Redondo	-	2,50	-	<i>Trichoderma</i>
4	HA004	No tabicado	5,00	Redondo	-	8,75	-	<i>Rhizopus</i>
5	HA005	Tabicado	5,00	Redondo	-	10,00	-	-
6	HA006	Tabicado	6,25	Redondo	-	8,75	-	-
7	HA007	Tabicado	3,75	-	-	-	-	-
8	HA008	Tabicado	3,75	-	-	-	-	-
9	HA009	Tabicado	5,00	-	-	-	-	-
10	HA010	Tabicado	3,75	-	-	-	-	<i>Monilia</i>
11	HA011	-	-	Redondo	-	2,50	-	<i>Trichoderma</i>
12	HA012	No tabicado	3,75	Redondo	-	10,00	-	<i>Rhizopus</i>
13	HA013	Tabicado	5,00	-	-	-	-	-
14	HA014	No tabicado	3,75	Redondo	-	12,50	-	<i>Rhizopus</i>
15	HA015	-	-	Alargado	47,50	-	5,00	<i>Colletotrichum</i>
16	HA016	No tabicado	3,75	-	-	-	-	-
17	HA017	Tabicado	6,25	-	-	-	-	-

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

Tabla A13. Continuación...

N°	Código	Micelio (tipo)	Tamaño de hifa ( $\mu\text{m}$ )	Forma espora	Tamaño de la espora			Organismo (posible)
					L( $\mu\text{m}$ )	$\Theta$ ( $\mu\text{m}$ )	A ( $\mu\text{m}$ )	
18	HA018	-	-	Redondo	-	2,50	-	<i>Trichoderma</i>
19	HA019	No tabicado	5,00	-	-	-	-	-
20	HA020	Tabicado	5,00	Redondo	-	7,50	-	-
21	HA021	No tabicado	3,75	-	-	-	-	-
22	HA022	Tabicado	3,75	Ovalado	8,75	-	5,00	<i>Monilia</i>
23	HA023	-	-	Redondo	-	2,50	-	<i>Trichoderma</i>
24	HA024	Tabicado	3,75	-	-	-	-	-
25	HA025	Tabicado	3,75	Redondo	-	16,25	-	<i>Macrosporium</i>
26	HA026	Tabicado	3,75	Esporangio	17,50	-	10,00	<i>Alternaria</i>
27	HA027	Tabicado	5,00	-	-	-	-	-
28	HA028	Tabicado	6,25	-	-	-	-	-
29	HA029	No tabicado	2,50	-	-	-	-	-
30	HA030	No tabicado	2,50	-	-	-	-	-
31	HA031	Tabicado	3,75	Esporangio	10,00	-	6,25	<i>Monilia</i>
32	HA032	No tabicado	2,50	-	-	-	-	-
33	HA033	Tabicado	7,50	Redondo	-	3,75	-	<i>Aspergillus</i>
34	HA034	No tabicado	3,75	Redondo	-	12,50	-	<i>Rhizopus</i>

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

Tabla A13. Continuación...

N°	Código	Micelio (tipo)	Tamaño de hifa ( $\mu\text{m}$ )	Forma espora	Tamaño de la espora			Organismo (posible)
					L( $\mu\text{m}$ )	$\Theta$ ( $\mu\text{m}$ )	A ( $\mu\text{m}$ )	
35	HA035	Tabicado	3,75	Ovalado	11,25	-	5,00	<i>Monilia</i>
36	HA036	No tabicado	5,00	Redondo	-	11,25	-	<i>Gonytrichum</i>
37	HA037	Tabicado	2,50	Ovalado	2,50	-	1,25	<i>Botrytis</i>
38	HA038	No tabicado	3,75	-	-	-	-	-
39	HA039	Tabicado	3,75	Redondo	-	10,00	-	<i>Macrosporium</i>
40	HA040	No tabicado	5,00	Redondo	-	12,50	-	<i>Zigospora</i>
41	HA041	Tabicado	3,75	Redondo	-	3,75	-	-
42	HA042	Tabicado	6,25	Redondo	-	2,50	-	<i>Aspergillus</i>
43	HA043	Tabicado	5,00	Redondo	-	2,50	-	<i>Aspergillus</i>
44	HA044	-	-	Redondo	-	2,50	-	<i>Trichoderma</i>
45	HA045	Tabicado	2,50	-	-	-	-	-
46	HA046	Tabicado	5,00	Redondo	-	5,00	-	<i>Trichoderma</i>
47	HA047	Tabicado	5,00	-	-	-	-	<i>Nigrospora</i>
48	HA048	Tabicado	2,50	Ovalado	3,75	-	2,50	<i>Trichoderma</i>
49	HA049	Tabicado	3,75	Alargado	50,00	-	3,75	<i>Fusarium</i>
50	HA050	Tabicado	3,75	Ovalado	11,25	-	6,25	<i>Monilia</i>
51	HA051	Tabicado	5,00	-	-	-	-	-

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

Tabla A13. Continuación...

N°	Código	Micelio (tipo)	Tamaño de hifa ( $\mu\text{m}$ )	Forma espora	Tamaño de la espora			Organismo (posible)
					L( $\mu\text{m}$ )	$\Theta$ ( $\mu\text{m}$ )	A ( $\mu\text{m}$ )	
52	HA052	No tabicado	5,00	Redondo	-	8,75	-	<i>Mucor</i>
53	HA053	No tabicado	5,00	-	-	-	-	-
54	HA054	Tabicado	3,75	Redondo	-	2,50	-	<i>Trichoderma</i>
55	HA055	-	-	Ovalado	3,125	-	2,50	<i>Trichoderma</i>
56	HA056	Tabicado	2,50	Redondo	-	3,75	-	<i>Humicola</i>
57	HA057	Tabicado	3,75	Ovalado	8,75	-	3,75	<i>Monilia</i>
58	HA058	Tabicado	3,75	-	-	-	-	-
59	HA059	-	-	Redondo	-	2,50	-	<i>Trichoderma</i>
60	HA060	No tabicado	6,25	Redondo	-	8,75	-	<i>Mucor</i>
61	HA061	No tabicado	2,50	Redondo	-	5,00	-	<i>Mucor</i>
62	HA062	Tabicado	5,00	-	-	-	-	-
63	HA063	Tabicado	5,00	Redondo	-	3,75	-	<i>Aspergillus</i>
64	HA064	Tabicado	5,00	Redondo	-	2,50	-	<i>Aspergillus</i>
65	HA065	No tabicado	2,50	-	-	-	-	-
66	HA066	Tabicado	3,75	Redondo	-	2,50	-	<i>Trichoderma</i>
67	HA067	Tabicado	6,25	Redondo	-	2,50	-	<i>Aspergillus</i>
68	HA068	Tabicado	5,00	Ovalado	7,50	-	5,00	<i>Mammaria</i>

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

Tabla A13. Continuación...

N°	Código	Micelio (tipo)	Tamaño de hifa ( $\mu\text{m}$ )	Forma espora	Tamaño de la espora			Organismo (posible)
					L( $\mu\text{m}$ )	$\Theta$ ( $\mu\text{m}$ )	A ( $\mu\text{m}$ )	
69	HA069	Tabicado	5,00	Redondo	-	3,75	-	-
70	HA070	Tabicado	3,75	Redondo	-	6,25	-	<i>Aspergillus</i>
71	HA071	Tabicado	2,50	Ovalado	6,25	-	3,75	<i>Mammaria</i>
72	HA072	-	-	Redondo	-	3,75	-	<i>Trichoderma</i>
73	HA073	Tabicado	5,00	Redondo	-	12,50	-	<i>Monilia</i>
74	HA074	Tabicado	5,00	Redondo	-	2,50	-	<i>Aspergillus</i>
75	HA075	Tabicado	3,75	Ovalado	18,75	-	10,00	<i>Ulocladium</i>
76	HA076	Tabicado	6,25	Redondo	-	6,25	-	<i>Aspergillus</i>
77	HA077	Tabicado	3,75	Ovalado	16,25	-	8,75	<i>Alternaria</i>
78	HA078	Tabicado	5,00	Ovalado	15,00	-	11,25	<i>Monilia</i>
79	HA079	Tabicado	3,75	Ovalado	31,25	-	12,50	<i>Helminthospora</i>
80	HA080	Tabicado	5,00	Redondo	-	3,75	-	<i>Aspergillus</i>
81	HA081	Tabicado	3,75	Redondo	-	35,00	-	*Posible ascomicete
82	HA082	Tabicado	5,00	Redondo	-	35,00	-	*Posible ascomicete
83	HA083	Tabicado	3,75	Redondo	-	32,50	-	*Posible ascomicete
84	HA084	Tabicado	3,75	-	-	-	-	-
85	HA085	Tabicado	6,25	Redondo	-	2,50	-	<i>Aspergillus</i>
86	HA086	Tabicado	5,00	Redondo	-	35,00	-	*Posible ascomicete

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

\* Por Confirmar

**Tabla A14. Caracterización microscópica de bacterias endófitas.**

N°	Código	Forma	Gram	Tinción (+/-)		Tamaño		
				Cápsulas	Endosporas	L(μm)	Θ(μm)	A(μm)
1	BA002	Bacilo	-	+	-	3,70	-	1,10
2	BA003	Bacilo	-	-	-	2,60	-	0,50
3	BA011	Levadura	ND	ND	ND	-	4,21	-
4	BA001	Bacilo	+	+	-	1,10	-	0,30
5	BA005	Bacilo	+	-	-	3,20	-	0,50
6	BA010	Bacilo	+	-	-	1,10	-	0,30
7	BA012	Bacilo	+	+	-	1,60	-	0,50
8	BA015	Bacilo	+	+	-	3,70	-	1,30
9	BA016	Bacilo	+	-	-	3,20	-	0,50
10	BA008	Coco	+	-	-	-	0,39	-
11	BA009	Coco	+	-	-	-	1,05	-
12	BA013	Coco	+	+	-	-	0,53	-
13	BA017	Coco	+	-	-	-	0,79	-
14	BA006	Coco	+	-	-	-	0,53	-
15	BA007	Coco	+	-	-	-	0,53	-
16	BA014	Coco	+	-	-	-	0,53	-

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A15. Códigos de hongos endófitos no crecidos del almacenamiento para el antagonismo.**

<b>N°</b>	<b>ID hongo</b>
1	HA016
2	HA030
3	HA033
4	HA043
5	HA062
6	HA064

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A16. Códigos de hongos endófitos que no presentaron actividad antimicrobiana.**

<b>N°</b>	<b>ID hongo</b>
1	HA002
2	HA004
3	HA005
4	HA008
5	HA009
6	HA014
7	HA021
8	HA022
9	HA026
10	HA034
11	HA039
12	HA051
13	HA058
14	HA074
15	HA076
16	HA082

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A17. Hongos endófitos que presentaron actividad antimicrobiana.**

N°	Código	<i>Fusarium</i> (inhibición)	Levadura (inhibición)	Gram + (inhibición)	Gram - (inhibición)
1	HA001	+	-	-	-
2	HA003	+	-	-	+
3	HA006	+	-	-	-
4	HA007	+	-	-	-
5	HA010	+	-	-	-
6	HA011	+	-	-	+
7	HA012	+	-	-	+
8	HA013	+	-	-	+
9	HA015	+	+	+	+
10	HA017	+	+	-	-
11	HA018	+	+	-	+
12	HA019	+	-	-	-
13	HA020	+	-	-	-
14	HA023	+	+	-	-
15	HA024	+	-	+	+
16	HA025	+	+	+	-
17	HA027	+	-	-	+
18	HA028	+	-	-	-
19	HA029	+	-	-	+
20	HA031	+	-	-	-
21	HA032	+	-	-	-
22	HA035	-	-	+	-
23	HA036	+	+	-	-
24	HA037	+	+	-	+
25	HA038	+	-	-	-
26	HA040	+	+	+	+
27	HA041	+	-	-	-
28	HA042	+	+	-	+
29	HA044	+	-	-	-
30	HA045	+	+	-	-

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

Tabla A17. Continuación...

N°	Código	<i>Fusarium</i> (inhibición)	Levadura (inhibición)	Gram + (inhibición)	Gram – (inhibición)
31	HA046	+	-	-	-
32	HA047	+	-	-	-
33	HA048	+	-	-	-
34	HA049	+	-	-	-
35	HA050	+	-	-	+
36	HA052	+	+	-	-
37	HA053	+	-	-	-
38	HA054	+	-	-	-
39	HA055	+	+	-	-
40	HA056	+	+	-	+
41	HA057	+	+	-	-
42	HA059	+	+	-	-
43	HA060	+	+	-	-
44	HA061	+	+	-	-
45	HA063	+	+	+	-
46	HA065	+	+	+	+
47	HA066	+	+	+	+
48	HA067	+	+	+	+
49	HA068	+	-	-	-
50	HA069	+	-	-	-
51	HA070	+	-	-	-
52	HA071	+	-	-	-
53	HA072	+	+	-	-
54	HA073	+	-	-	+
55	HA075	+	-	-	-
56	HA077	+	+	+	+
57	HA078	+	-	+	+
58	HA079	+	-	-	+
59	HA080	+	+	-	-
60	HA081	-	-	-	+
61	HA083	+	+	+	+
62	HA084	+	-	-	-
63	HA085	+	+	+	+
64	HA086	-	-	+	+

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A18. Diámetros de inhibición (mm) producidos por los hongos endófitos frente a *Fusarium*.**

<b>N°</b>	<b>ID hongo</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
1	HA001	20	21
2	HA003	21	20
3	HA006	20	20
4	HA007	25	26
5	HA010	17	16
6	HA011	40	40
7	HA012	20	18
8	HA013	13	15
9	HA015	19	20
10	HA017	20	18
11	HA018	40	40
12	HA019	21	19
13	HA020	23	21
14	HA023	40	40
15	HA024	17	18
16	HA025	40	40
17	HA027	17	18
18	HA028	21	23
19	HA029	32	34
20	HA031	19	18
21	HA032	21	18
22	HA036	13	12
23	HA037	31	30
24	HA038	16	17
25	HA040	30	29
26	HA041	13	12
27	HA042	17	18
28	HA044	17	15
29	HA045	21	22
30	HA046	17	18
31	HA047	26	27

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A18. Continuación...**

<b>N°</b>	<b>ID hongo</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
32	HA048	40	40
33	HA049	29	28
34	HA050	19	20
35	HA052	20	19
36	HA053	21	19
37	HA054	40	40
38	HA055	40	40
39	HA056	40	40
40	HA057	20	19
41	HA059	40	40
42	HA060	14	13
43	HA061	40	40
44	HA063	19	20
45	HA065	26	27
46	HA066	15	16
47	HA067	15	16
48	HA068	10	11
49	HA069	22	23
50	HA070	21	23
51	HA071	15	15
52	HA072	24	24
53	HA073	17	18
54	HA075	25	23
55	HA077	13	12
56	HA078	16	14
57	HA079	17	15
58	HA080	22	21
59	HA083	24	26
60	HA084	14	14
61	HA085	16	14
62	Control	20	19

**Tabla A19. Diámetros de inhibición (mm) producidos por los hongos endófitos frente a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.**

N°	ID hongo	R1	R2
1	HA015	15	14
2	HA017	16	15
3	HA018	29	32
4	HA023	30	29
5	HA025	14	13
6	HA036	12	12
7	HA037	11	12
8	HA040	18	17
9	HA042	12	11
10	HA045	15	16
11	HA052	25	25
12	HA055	25	24
13	HA056	26	25
14	HA057	17	16
15	HA059	18	19
16	HA060	16	15
17	HA061	14	13
18	HA063	16	14
19	HA065	20	21
20	HA066	15	16
21	HA067	12	13
22	HA072	15	16
23	HA077	14	15
24	HA080	9	10
25	HA083	13	14
26	HA085	12	11
27	Control	20	19

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A20. Diámetros de inhibición (mm) producidos por los hongos endófitos frente a la bacteria Gram positiva tipo.**

<b>N°</b>	<b>ID hongo</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
1	HA015	12	13
2	HA024	8	7
3	HA025	11	12
4	HA035	10	9
5	HA040	40	40
6	HA063	12	12
7	HA065	12	13
8	HA066	22	21
9	HA067	13	12
10	HA077	9	8
11	HA078	10	9
12	HA083	35	34
13	HA085	13	14
14	HA086	40	40
15	Control	22	23

Elaborado por: Manuel Bravo, 201

1.

**Tabla A21. Diámetros de inhibición en mm de hongos endófitos frente a la bacteria Gram negativa tipo.**

<b>N°</b>	<b>ID hongo</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
1	HA003	25	26
2	HA011	28	27
3	HA012	29	28
4	HA013	16	16
5	HA015	20	21
6	HA018	16	17
7	HA024	18	19
8	HA027	8	7
9	HA029	18	20
10	HA037	20	21
11	HA040	40	40
12	HA042	40	40
13	HA050	23	23
14	HA056	14	15
15	HA065	40	40
16	HA066	25	27
17	HA067	13	11
18	HA073	16	15
19	HA077	13	12
20	HA078	21	20
21	HA079	20	20
22	HA081	40	40
23	HA083	40	40
24	HA085	40	40
25	HA086	40	40
26	Control	22	23

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A22. Códigos de bacterias endófitas que no presentaron actividad antimicrobiana.**

<b>N°</b>	<b>ID hongo</b>
1	BA002
2	BA006
3	BA007
4	BA009
5	BA010
6	BA011
7	BA014
8	BA016

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A23. Bacterias endófitas que presentaron actividad antimicrobiana.**

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<i>Fusarium</i>	<b>Levadura</b>	<b>Gram+</b>	<b>Gram -</b>
1	BA001	-	-	+	+
2	BA003	-	-	+	+
3	BA005	-	-	-	+
4	BA008	-	-	+	+
5	BA012	-	-	-	+
6	BA013	+	-	-	-
7	BA015	-	-	+	-
8	BA017	-	-	+	+

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A24. Diámetro de inhibición en mm de bacterias endófitas frente a *Fusarium*.**

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
1	BA013	8	7
2	Control	20	19

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A25. Diámetros de inhibición en mm de bacterias endófitas frente a la bacteria Gram positiva tipo.**

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
1	BA001	11	12
2	BA003	7	7
3	BA008	7	8
4	BA015	12	13
5	BA017	12	13
6	Control	22	23

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla A26. Diámetros de inhibición en mm de bacterias endófitas frente a la bacteria Gram negativa tipo.**

<b>N°</b>	<b>Código</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
1	BA001	21	22
2	BA003	17	18
3	BA005	26	26
4	BA008	20	19
5	BA012	22	23
6	BA017	14	15
7	Control	22	23

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

# **ANEXO B**

# **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

**Tabla B1. Análisis de Varianza del diámetro de inhibición de hongos endófitos contra *Fusarium*.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	F.C	Probabilidad
Tratamientos	61	9433,59	154,649	189,87	0.000
Error	62	50,50	0,814516		
Total	123	9484,09			

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B2. Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en *Fusarium*.**

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
15	HA025	40,00	a
31	HA048	40,00	a
36	HA054	40,00	a
37	HA055	40,00	a
38	HA056	40,00	a
40	HA059	40,00	a
42	HA061	40,00	a
10	HA018	40,00	a
5	HA011	40,00	a
13	HA023	40,00	a
18	HA029	33,00	b
22	HA037	30,50	bc
24	HA040	29,50	bcd
32	HA049	28,50	cde
44	HA065	26,50	def
30	HA047	26,50	def
3	HA007	25,50	efg
58	HA083	25,00	efgh
51	HA072	24,00	fghi
53	HA075	24,00	fghi
48	HA069	22,50	ghij

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B2. Continuación...**

<b>Tratamiento</b>	<b>Código</b>	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Rango</b>
17	HA028	22,00	ghijk
49	HA070	22,00	ghijk
12	HA020	22,00	ghijk
28	HA045	21,50	hijk
57	HA080	21,50	hijk
1	HA003	20,50	ijkl
0	HA001	20,50	ijkl
35	HA053	20,00	jklm
11	HA019	20,00	jklm
2	HA006	20,00	jklm
33	HA050	19,50	jklmn
34	HA052	19,50	jklmn
8	HA015	19,50	jklmn
39	HA057	19,50	jklmn
20	HA032	19,50	jklmn
43	HA063	19,50	jklmn
61	Control	19,50	jklmn
9	HA017	19,00	jklmno
6	HA012	19,00	jklmno
19	HA031	18,50	klmnop
16	HA027	17,50	lmnopq
14	HA024	17,50	lmnopq
52	HA073	17,50	lmnopq
26	HA042	17,50	lmnopq
29	HA046	17,50	lmnopq
4	HA010	16,50	mnopqr
23	HA038	16,50	mnopqr
56	HA079	16,00	nopqrs
27	HA044	16,00	nopqrs
46	HA067	15,50	opqrs
45	HA066	15,50	opqrs
55	HA078	15,00	pqrs

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B2. Continuación...**

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
60	HA085	15,00	pqrs
50	HA071	15,00	pqrs
59	HA084	14,00	qrst
7	HA013	14,00	qrst
41	HA060	13,50	rst
54	HA077	12,50	st
25	HA041	12,50	st
21	HA036	12,50	st
47	HA068	10,50	t

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B3. Análisis de varianza del diámetro de inhibición de hongos endófitos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	F.C	Probabilidad
Tratamientos	26	1617,93	62,2279	93,34	0.000
Error	27	18,00	0,66666		
Total	53	135,93			

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B4. Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en la levadura.**

Tratamiento	Código	Diámetro (mm)	Rango
2	HA018	30,50	a
3	HA023	29,50	a
12	HA056	25,50	b
10	HA052	25,00	b
11	HA055	24,50	b
18	HA065	20,50	c
26	Control	19,50	cd
14	HA059	18,50	de
7	HA040	17,50	ef
13	HA057	16,50	fg
15	HA060	15,50	gh
1	HA017	15,50	gh
9	HA045	15,50	gh
19	HA066	15,50	gh
21	HA072	15,50	gh
17	HA063	15,00	ghi
22	HA077	14,50	hi
0	HA015	14,50	hi
16	HA061	13,50	ij
24	HA083	13,50	ij
4	HA025	13,50	ij
20	HA067	12,50	jk
5	HA036	12,00	jk
6	HA037	11,50	k
8	HA042	11,50	k
25	HA085	11,50	k
23	HA080	9,50	l

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B5. Análisis de varianza del diámetro de inhibición de hongos endófitos para la bacteria Gram positiva tipo.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F.C</b>	<b>Probabilidad</b>
Tratamientos	14	3613,47	258,105	645,26	0,000
Error	15	6,00	0,400		
Total	29	3619,47			

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B6. Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en la bacteria Gram positiva tipo.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Código</b>	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Rango</b>
4	HA040	40,00	a
13	HA086	40,00	a
11	HA083	34,50	b
14	Control	22,50	c
7	HA066	21,50	c
12	HA085	13,50	d
0	HA015	12,50	de
8	HA067	12,50	de
6	HA065	12,50	de
5	HA063	12,00	e
2	HA025	11,50	e
10	HA078	9,50	f
3	HA035	9,50	f
9	HA077	8,50	fg
1	HA024	7,50	g

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B7. Análisis de varianza del diámetro de inhibición de hongos endófitos en la bacteria Gram negativa tipo.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F.C</b>	<b>Probabilidad</b>
Tratamientos	25	5507,56	220,302	458,23	0,000
Error	26	12,50	0,48076		
Total	51	5520,06			

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B8. Separación de medias para el diámetro de zona de inhibición en la bacteria Gram negativa tipo.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Código</b>	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Rango</b>
10	HA040	40,00	a
21	HA081	40,00	a
22	HA083	40,00	a
11	HA042	40,00	a
23	HA085	40,00	a
24	HA086	40,00	a
14	HA065	40,00	a
2	HA012	28,50	b
1	HA011	27,50	bc
15	HA066	26,00	bc
0	HA003	25,50	cd
12	HA050	23,00	de
25	Control	22,50	ef

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B8. Continuación...**

<b>Tratamiento</b>	<b>Código</b>	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Rango</b>
9	HA037	20,50	efg
19	HA078	20,50	efg
4	HA015	20,50	efg
20	HA079	20,00	fg
8	HA029	19,00	gh
6	HA024	18,50	ghi
5	HA018	16,50	hij
3	HA013	16,00	ij
17	HA073	15,50	j
13	HA056	14,50	jk
18	HA077	12,50	k
16	HA067	12,00	k
7	HA027	7,50	l

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B9. Análisis de varianza del diámetro de inhibición de bacterias endófitas frente a la bacteria Gram positiva tipo.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F.C</b>	<b>Probabilidad</b>
Tratamientos	5	311,75	62,35	149,64	0.000
Error	6	2,50	0,41666		
Total	11	314,25			

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B10. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram positiva tipo.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Código</b>	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Rango</b>
5	Control	22,50	a
3	BA015	12,50	b
4	BA017	12,50	b
0	BA001	11,50	b
2	BA008	7,50	c
1	BA003	7,00	c

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B11. Análisis de varianza del diámetro de inhibición de bacterias endófitas frente a la bacteria Gram negativa tipo.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F.C</b>	<b>Probabilidad</b>
Tratamientos	6	170,429	28,4048	66,28	0,000
Error	7	3,00	0,42857		
Total	13	173,29			

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Tabla B12. Separación de medias para el diámetro de la zona de inhibición en la bacteria Gram negativa tipo.**

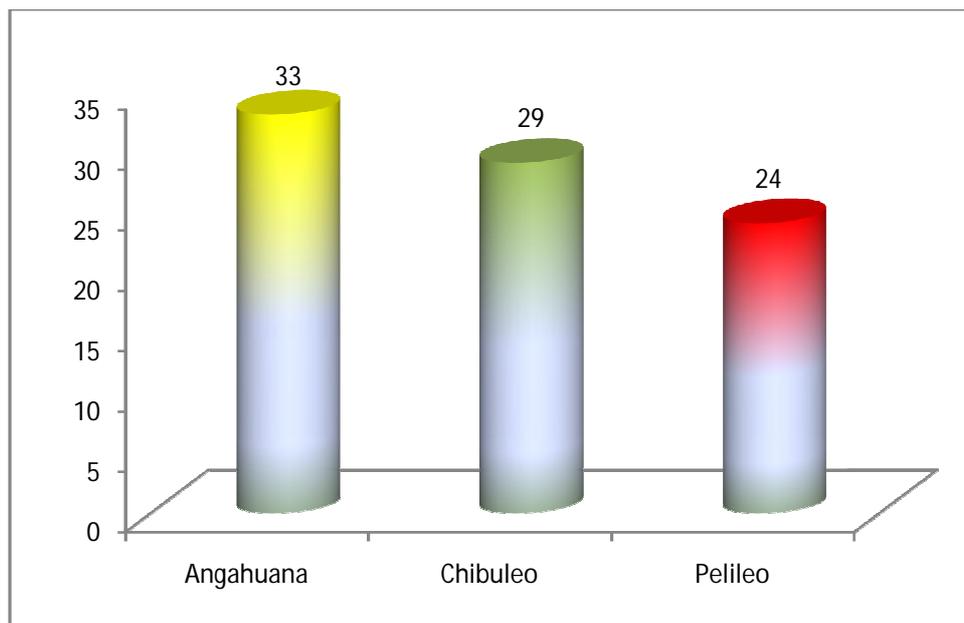
<b>Tratamiento</b>	<b>Código</b>	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Rango</b>
2	BA005	26,00	a
4	BA012	22,50	b
6	Control	22,50	b
0	BA001	21,50	bc
3	BA008	19,50	cd
1	BA003	17,50	d
5	BA017	14,50	e

Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

# **ANEXO C**

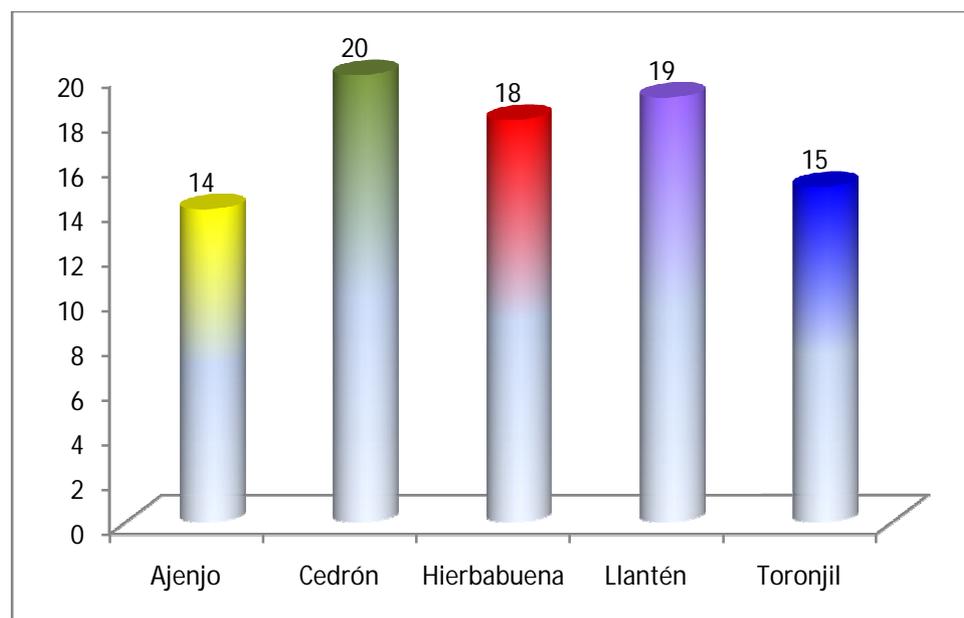
# **GRÁFICOS**

**Figura C1. Número de hongos endófitos aislados por sitio de recolección**



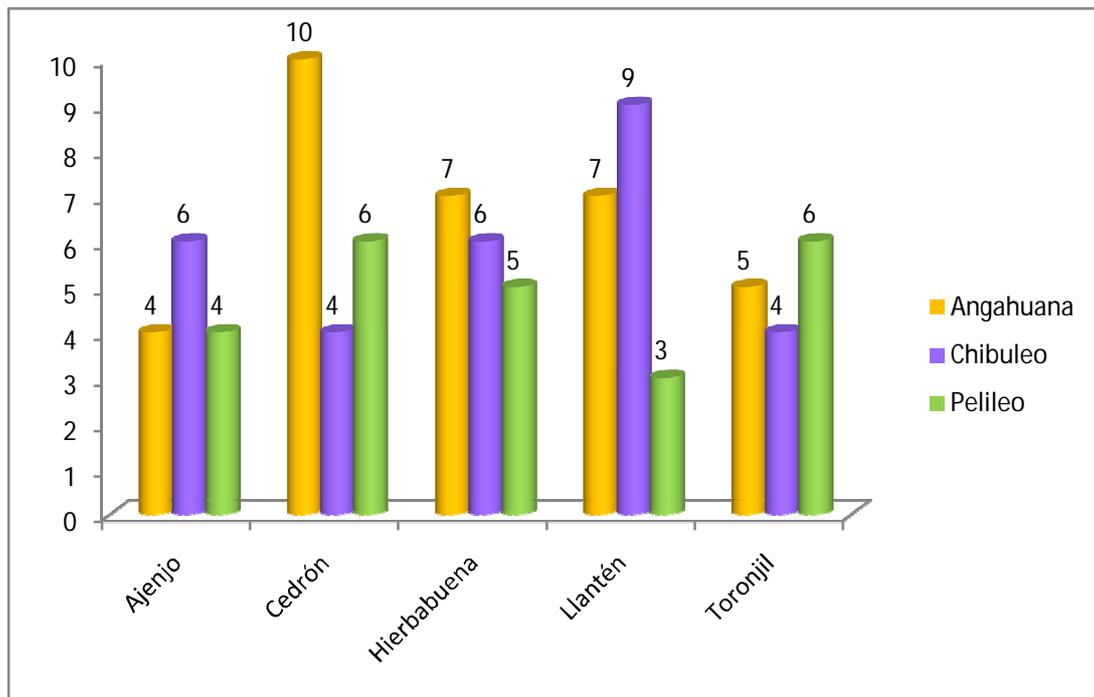
Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Figura C2. Número de hongos endófitos aislados por planta medicinal**



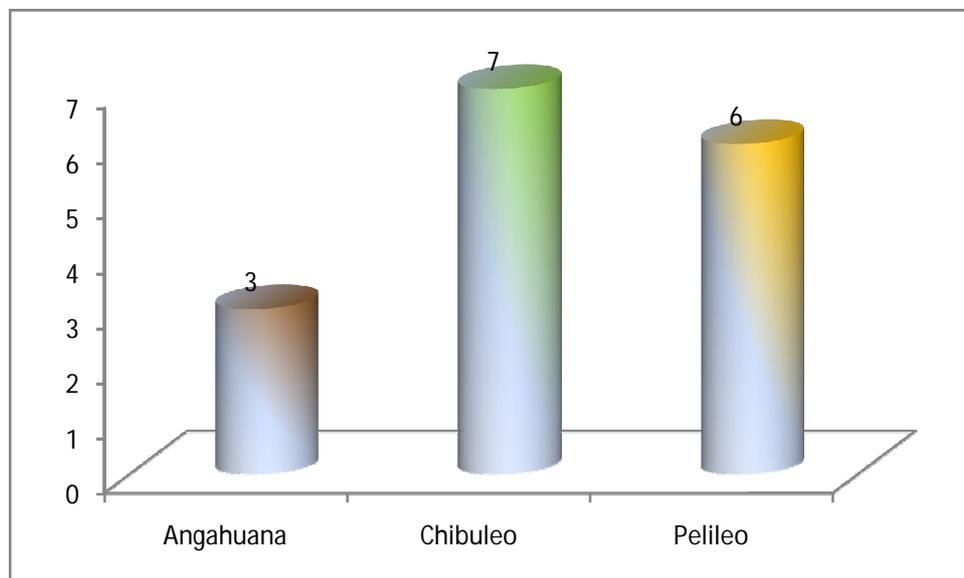
Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Figura C3. Número de hongos endófitos aislados por lugar de recolección y planta medicinal**



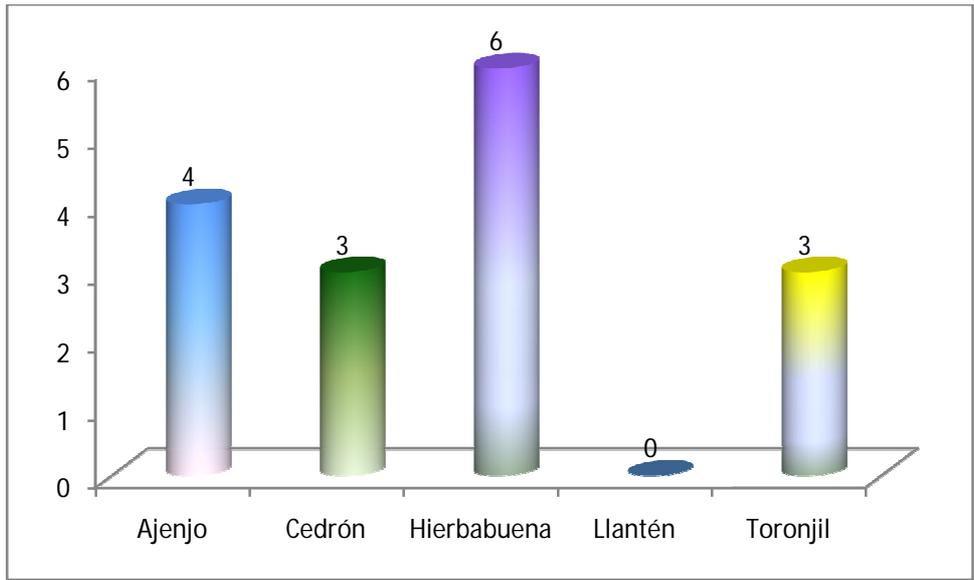
Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Figura C4. Número de bacterias endófitas aisladas por sitio de recolección**



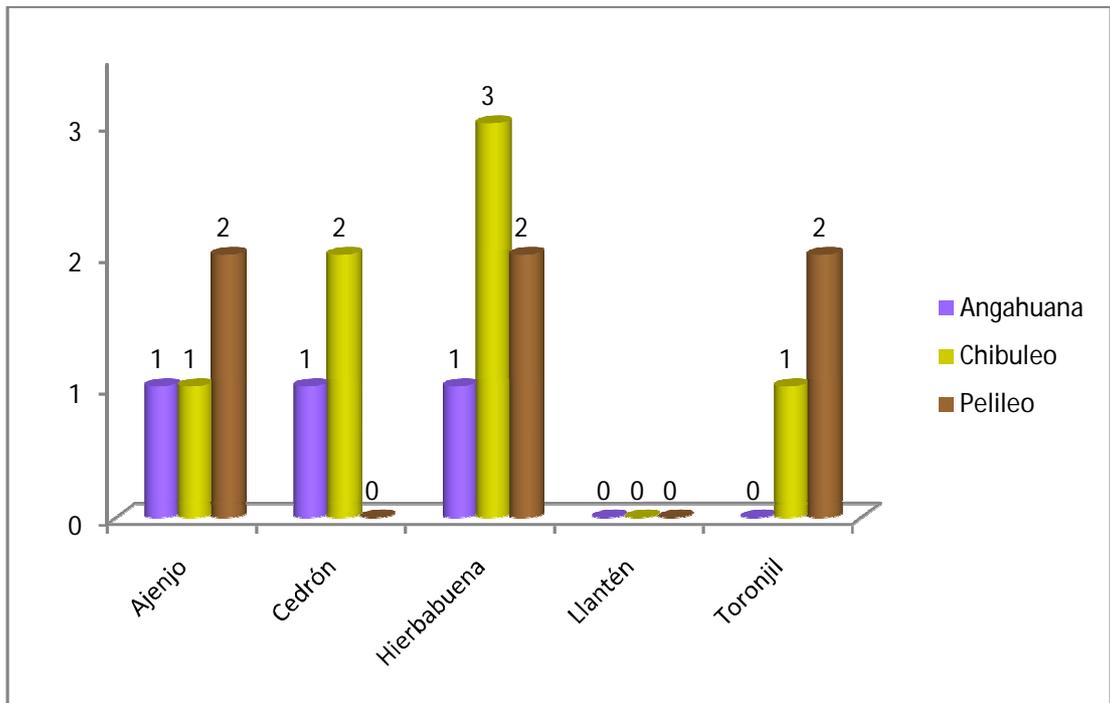
Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Figura C5. Número de bacterias endófitas aisladas por planta medicinal**



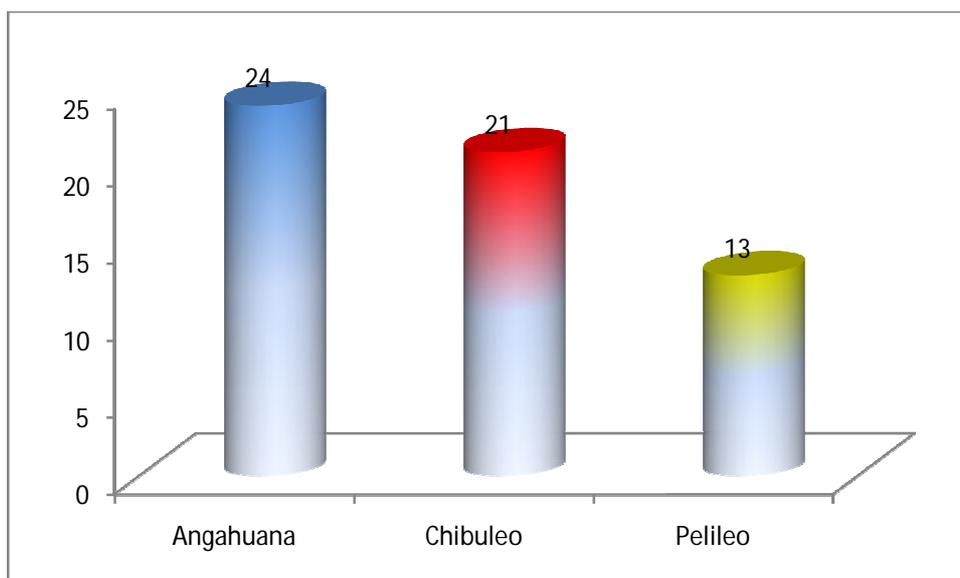
Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Figura C6. Número de bacterias endófitas aisladas por lugar de recolección y planta medicinal**



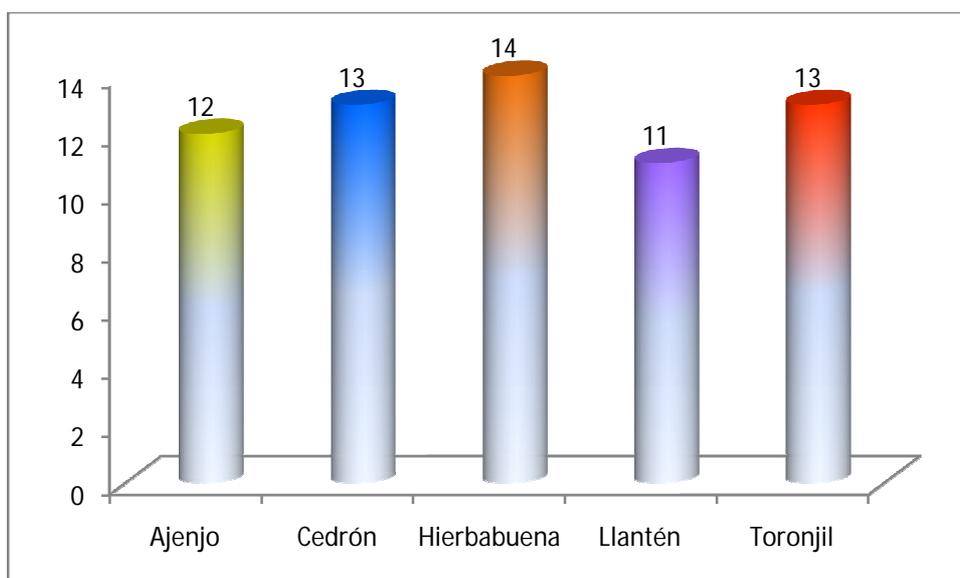
Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Figura C7. Número de grupos de color de hongos endófitos por sitio de recolección**



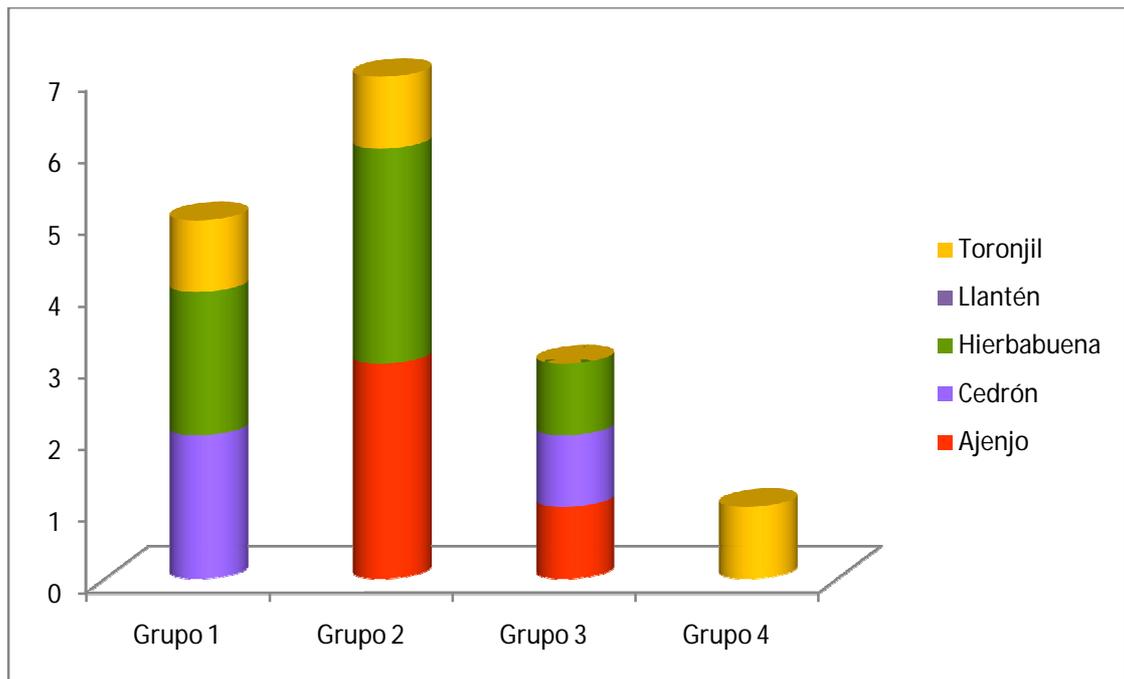
Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Figura C8. Número de grupos de color de hongos endófitos por planta medicinal**



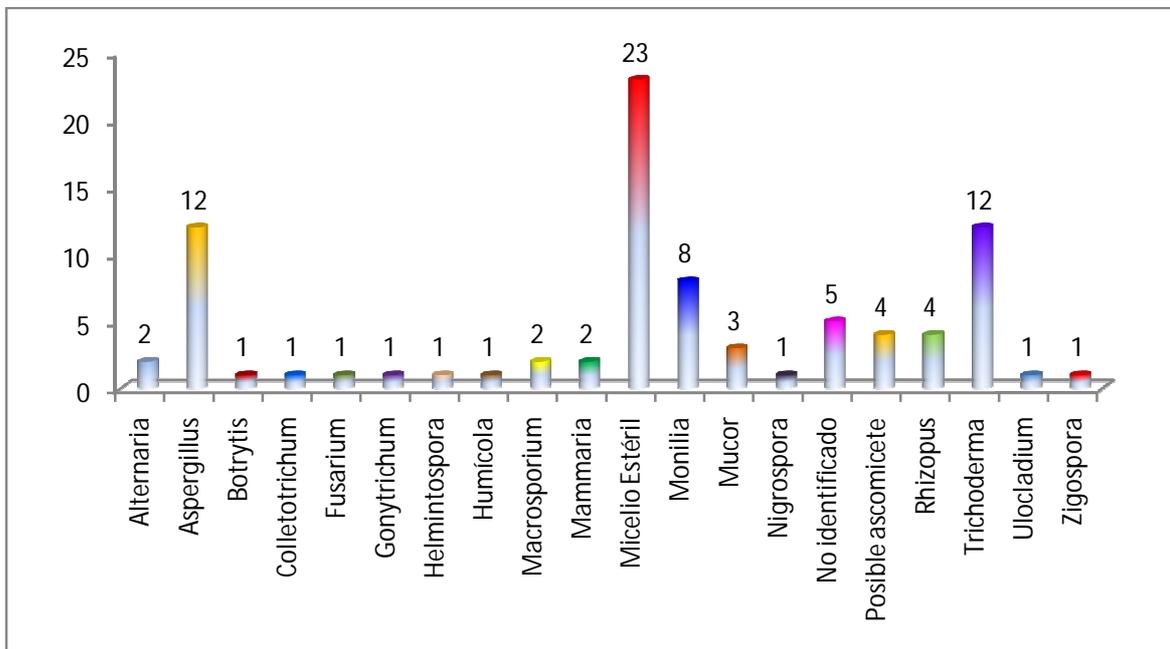
Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Figura C9. Distribución de los grupos de color según la planta medicinal**



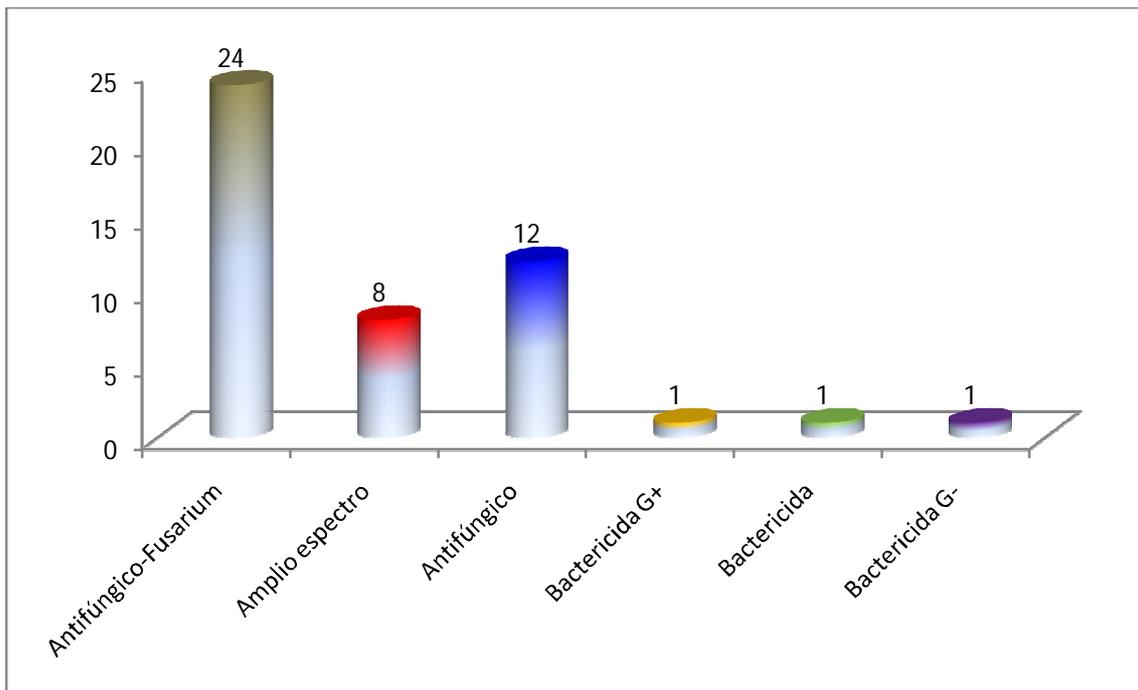
Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Figura C10. Identificación preliminar de los hongos endófitos aislados**



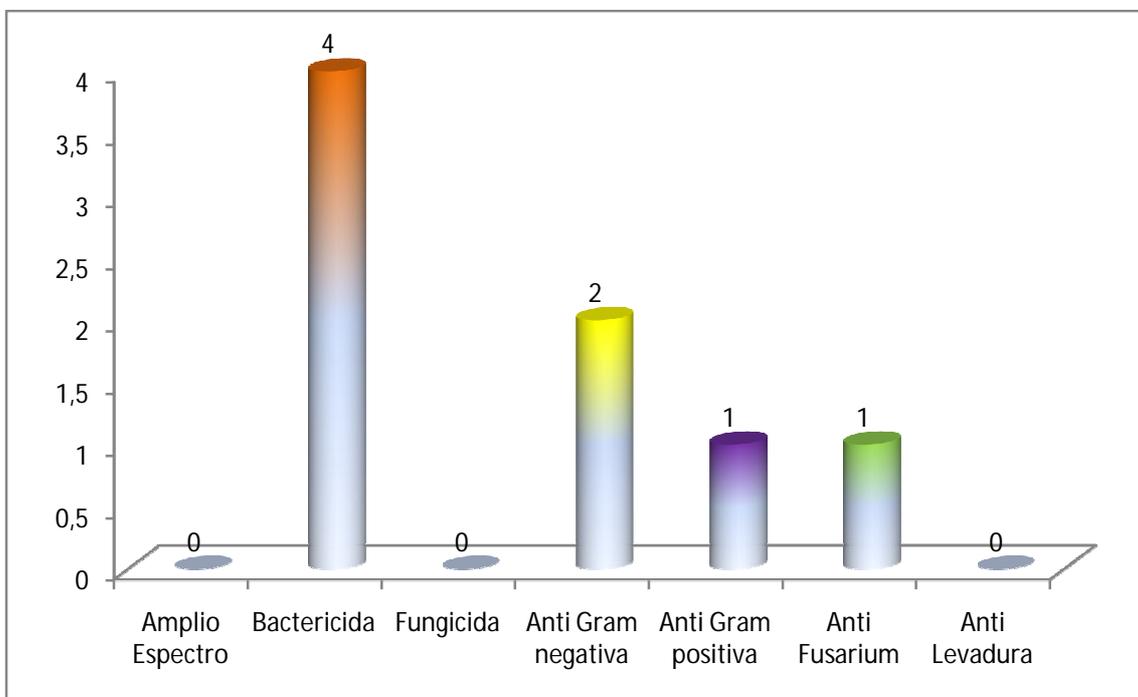
Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Figura C11. Actividad antagonica especifica de los hongos endofitos**



Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**Figura C12. Tipo de actividad de los metabolitos secundarios producidos por las bacterias endofitas.**



Elaborado por: Manuel Bravo, 2011.

**ANEXO D**  
**MEDIOS DE CULTIVO Y**  
**SOLUCIONES**

## MEDIOS DE CULTIVO

### Agar PDA

---

Agar Papa Dextrosa	39.00 g
Agua	1000.00 ml

---

### Agar Nutritivo

---

Agar Nutritivo	23.00 g
Agua	1000.00 ml

---

# **ANEXO E**

# **FOTOGRAFÍAS**

Fotografía 1: Recolección de muestras de plantas medicinales



Ajeno  
(*Artemisa absinthium*)



Cedrón  
(*Lippiacitriodora*)



Hierbabuena  
(*Mentha citrato*)



Llantén  
(*Plantagomajor*)



Toronjil  
(*Melisa Officinalis*)

## Fotografía 2: Caracterización físico - química

### Determinación de pH



Paso 1



Paso 2

### Determinación del porcentaje de humedad



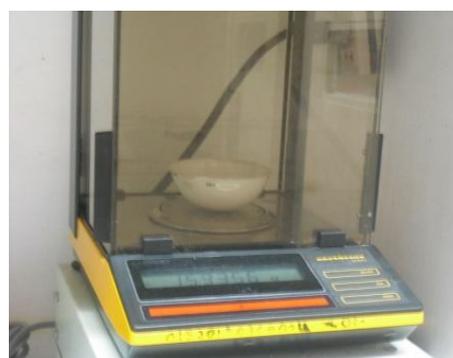
Paso 1



Paso 2



Paso 3



Paso 4

### Fotografía3: Aislamiento de microorganismos endófitos



Preparación de medios



Materiales y reactivos (aislamiento)



Paso 1



Paso 2



Paso 3



Paso 4



Paso 5



Paso 6

**Fotografía4: Resultados de los aislamientos**

**Sector Angahuana**



**Sector Chibuleo**



**Sector Pelileo**



**Fotografía5: Almacenamiento y conservación de los cultivos puros de microorganismos endófitos**

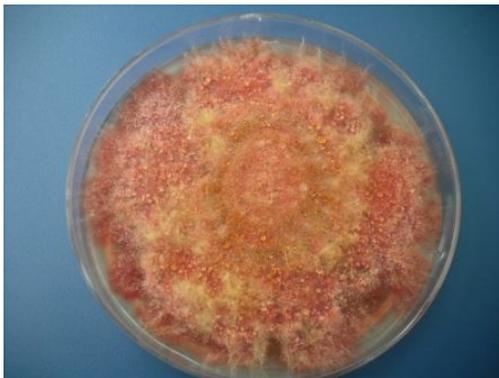


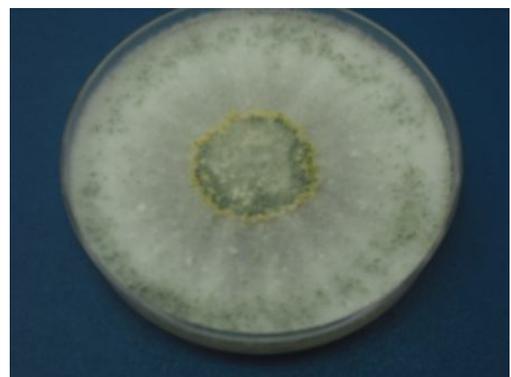
Paso 1

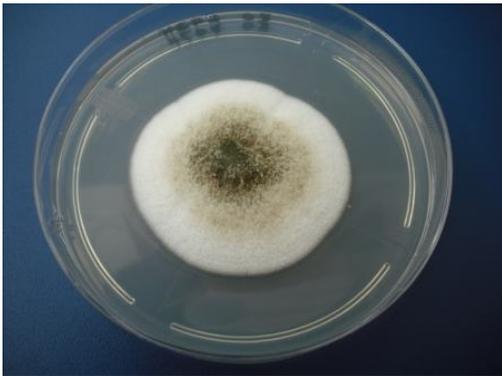
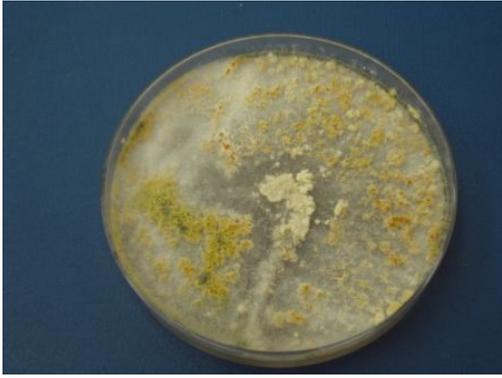


Paso 2

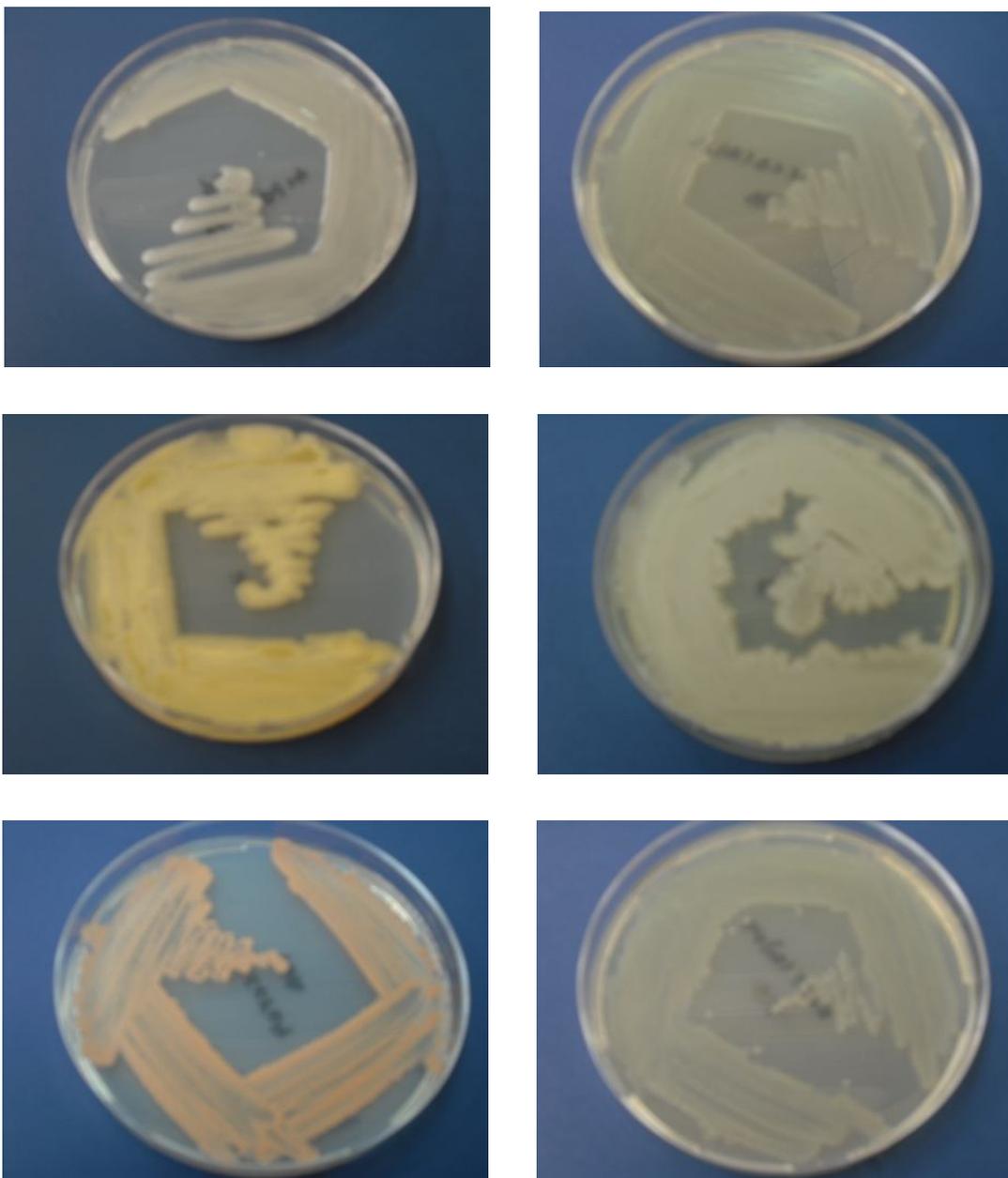
**Caracterización macroscópica de hongos endófitos**



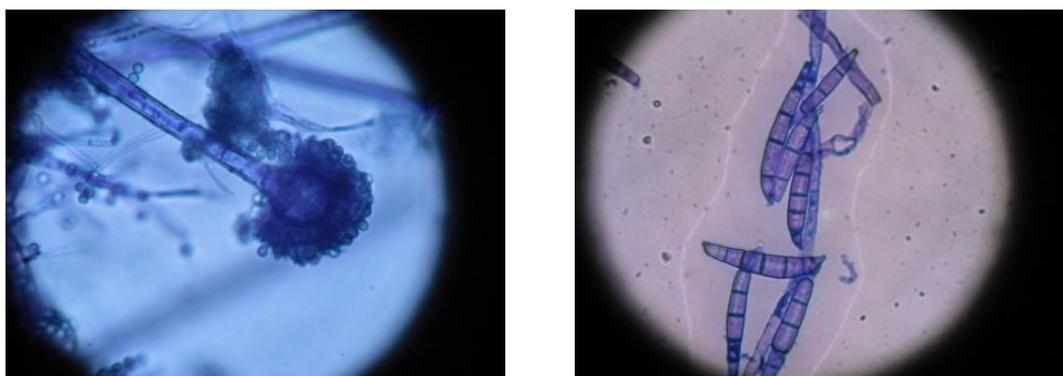


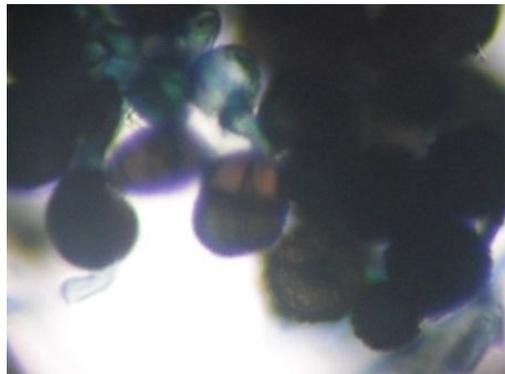
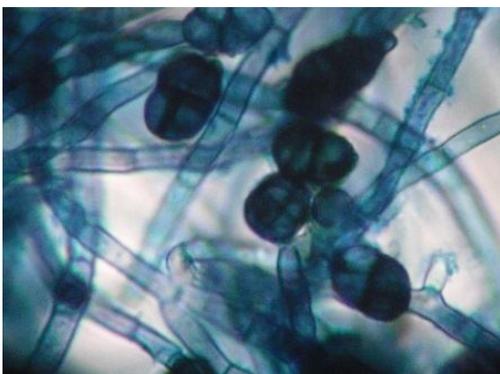
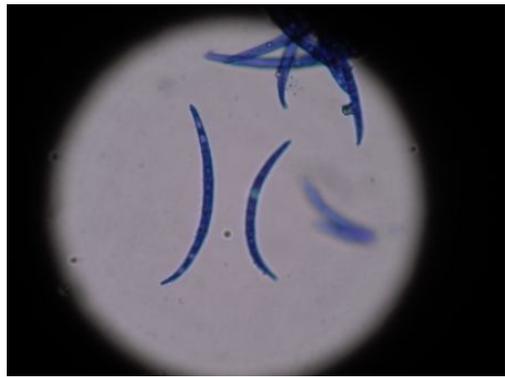
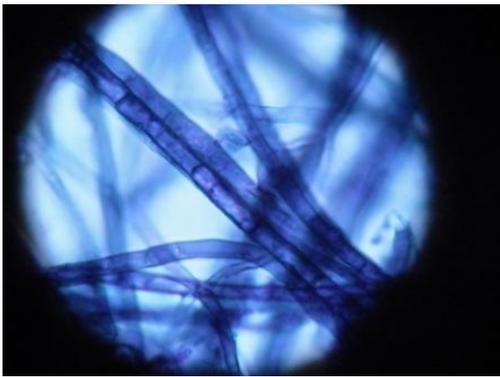
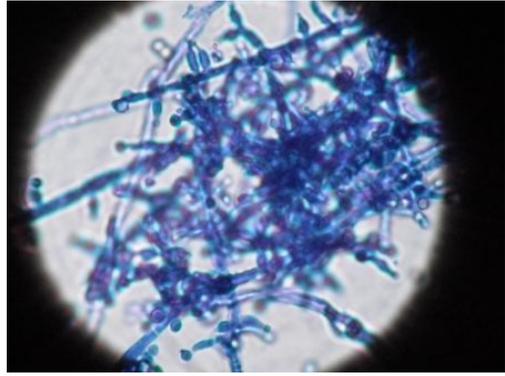
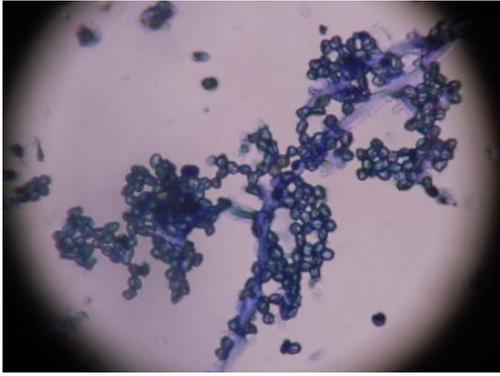


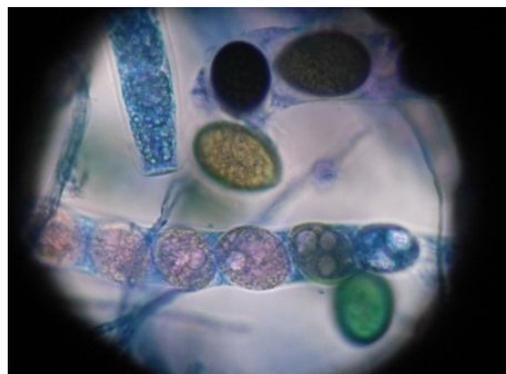
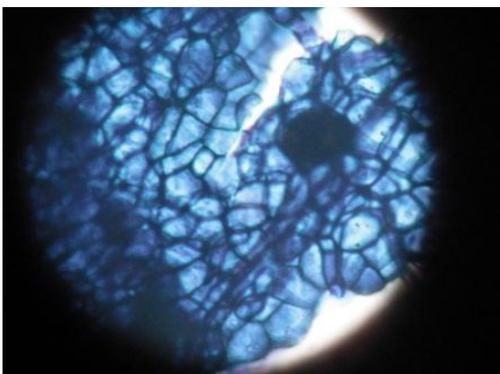
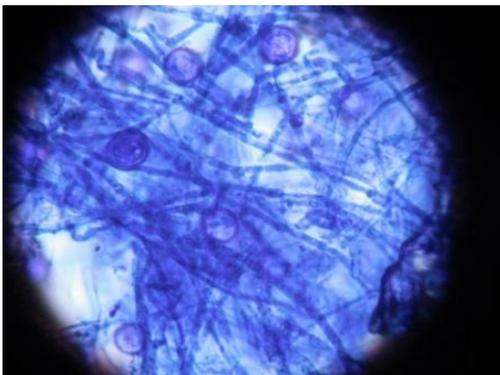
**Fotografía6: Caracterización macroscópica de bacterias endófitas**

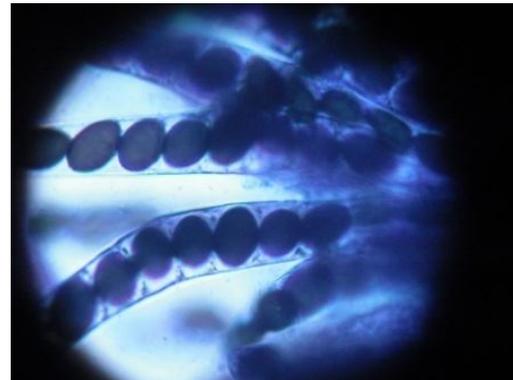
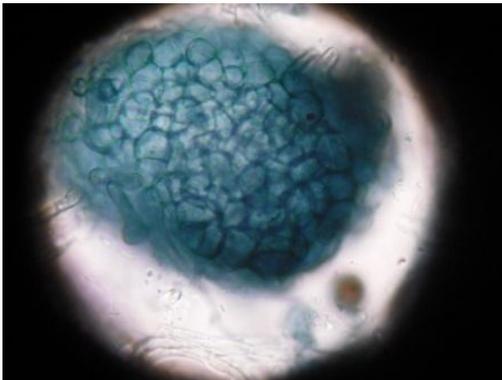
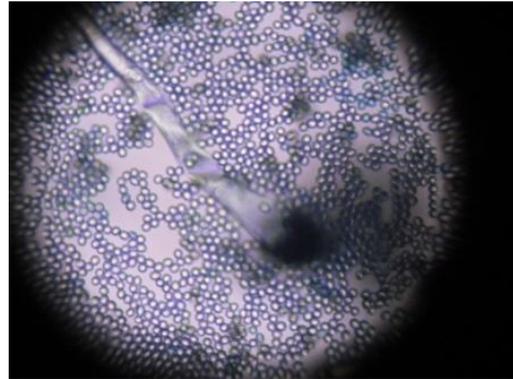
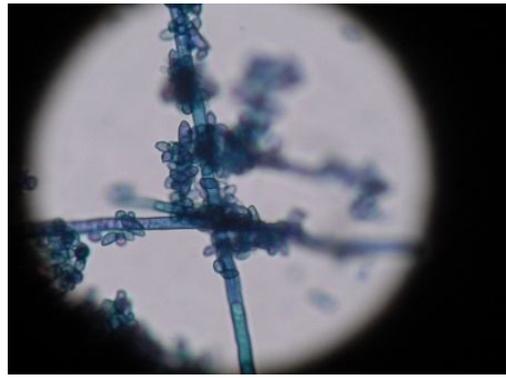
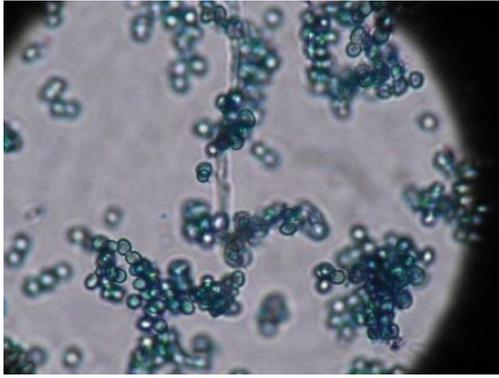


**Fotografía7: Caracterización microscópica de hongos endófitos**



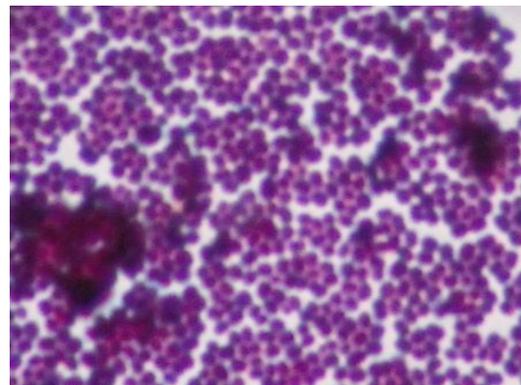


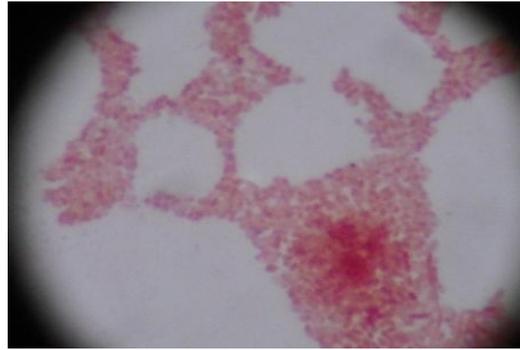
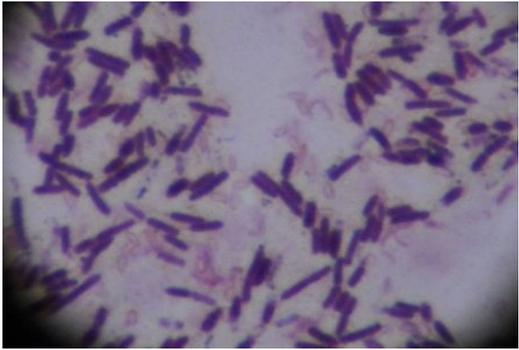
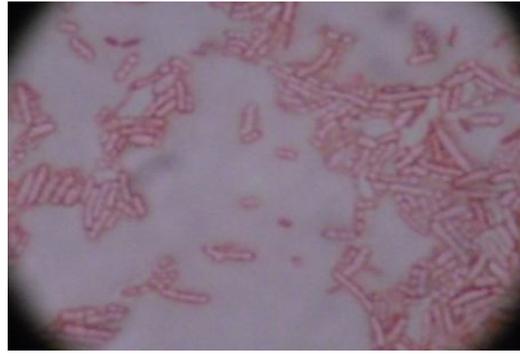
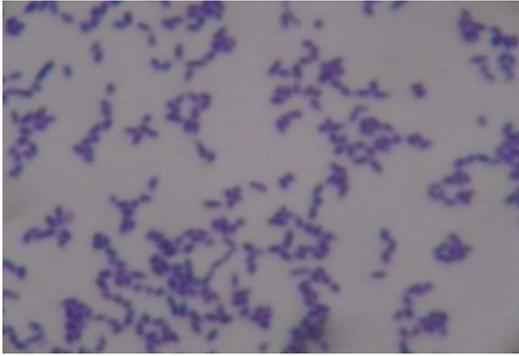




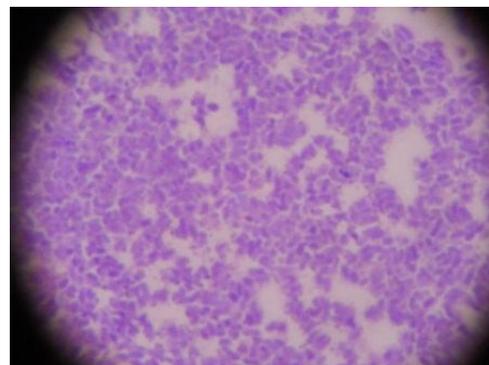
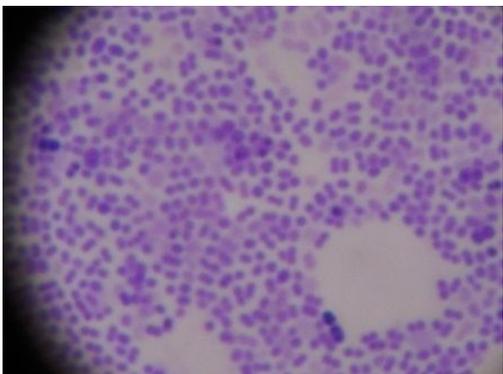
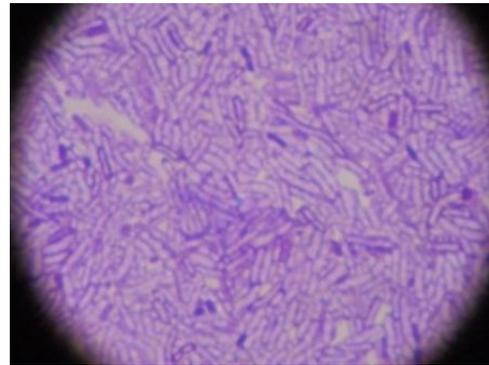
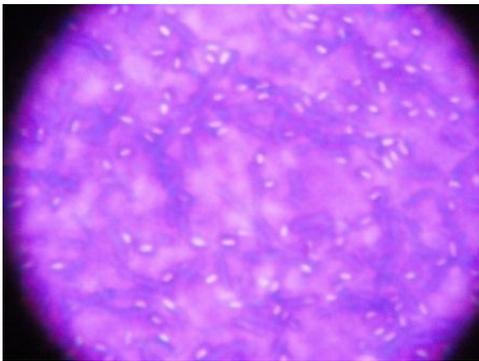
**Fotografía8: Caracterización microscópica de bacterias endófitas**

**Tinción de Gram**

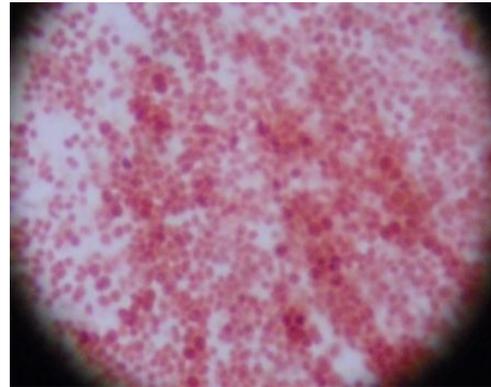
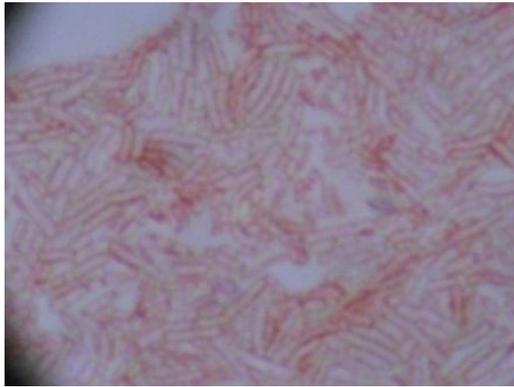




**Tinción de cápsulas**

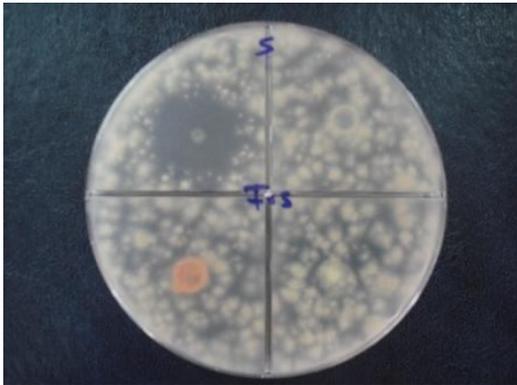


### Tinción de endosporas

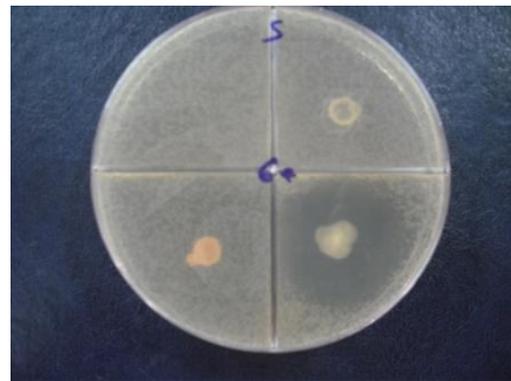


Fotografía9: Determinación de la actividad antimicrobiana

### Control experimental

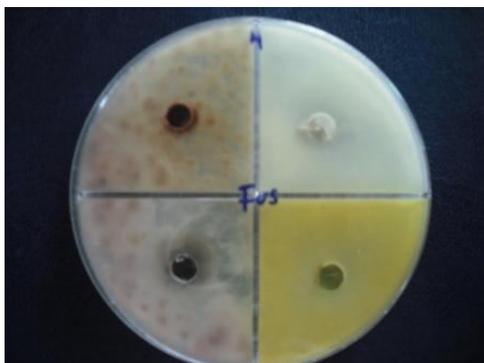


Nistatin para hongos y levaduras



Sulfato de estreptomicina para bacterias

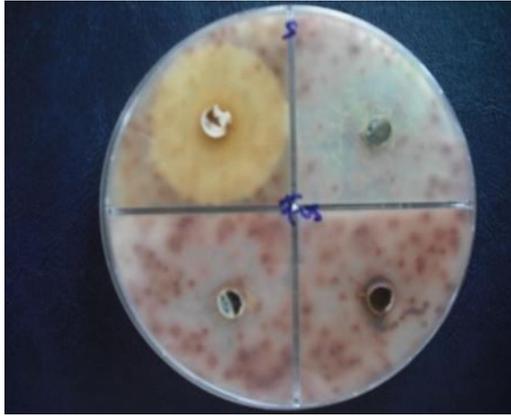
Fotografía10: Actividad antagonista de hongos endófitos frente a *Fusarium*



Atrás



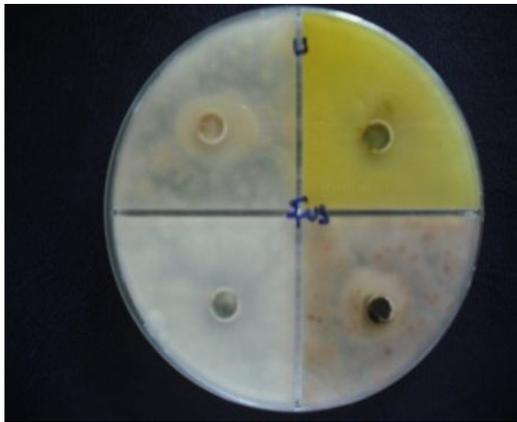
Frente



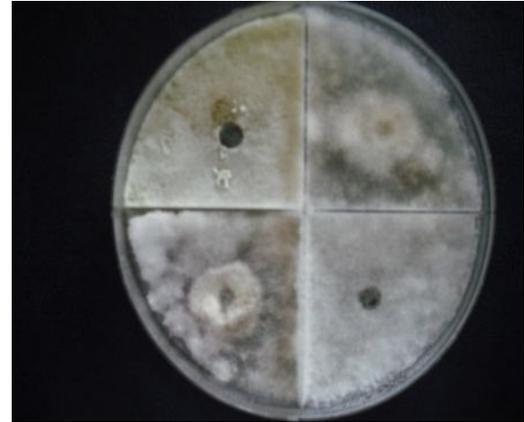
Atrás



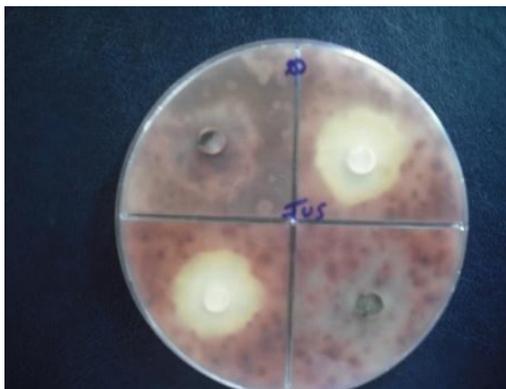
Frente



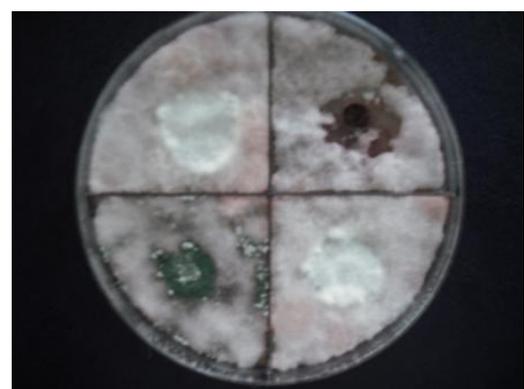
Atrás



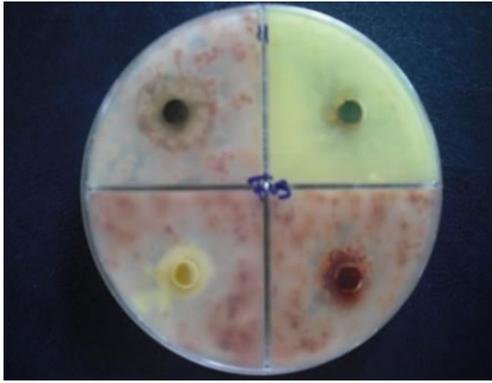
Frente



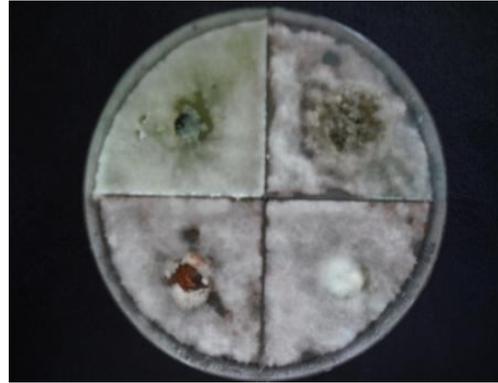
Atrás



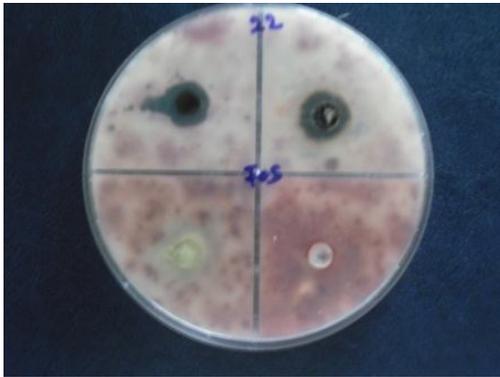
Frente



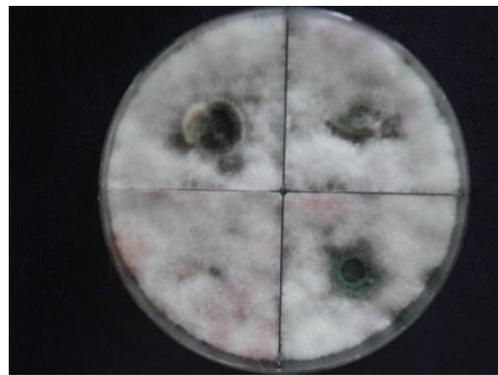
Atrás



Frente

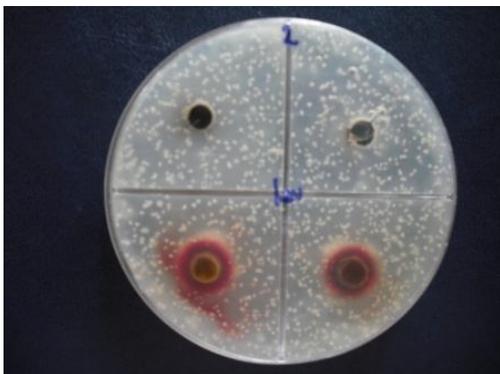


Atrás

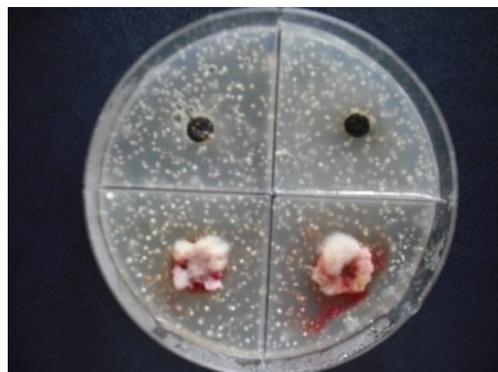


Frente

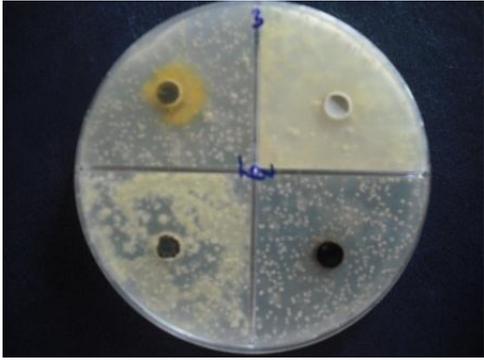
**Fotografía11: Actividad antagónica de hongos endófitos frente a la levadura**



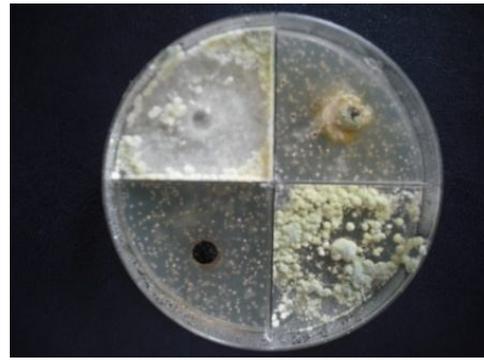
Atrás



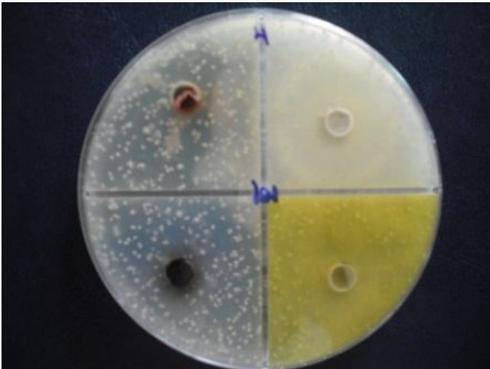
Frente



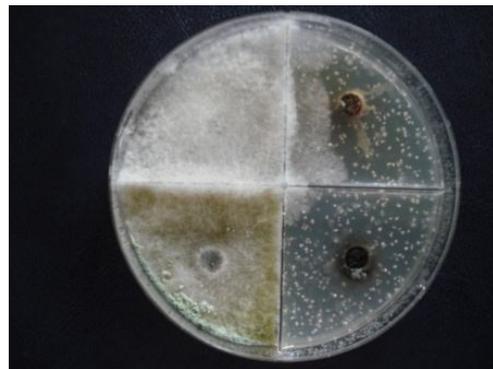
Atrás



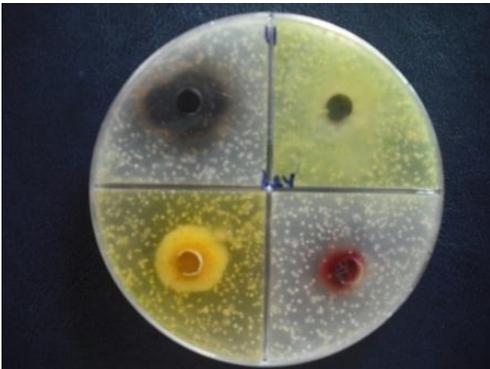
Frente



Atrás



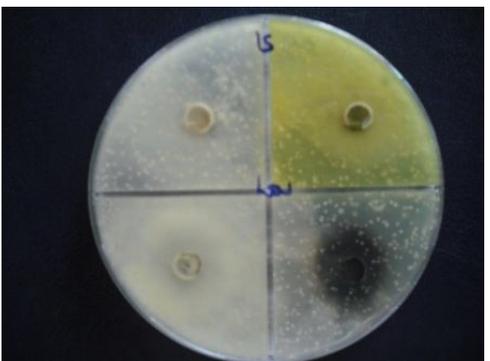
Frente



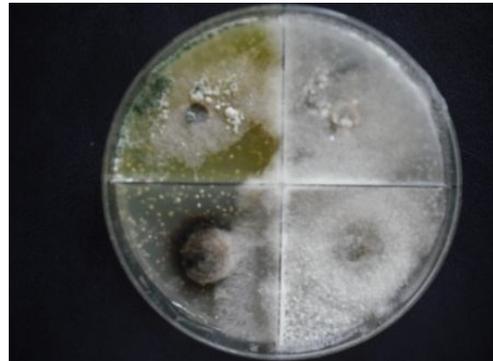
Atrás



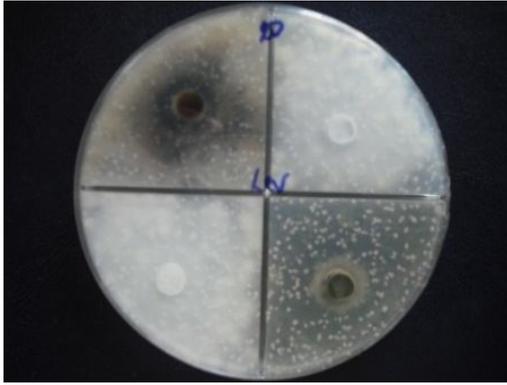
Frente



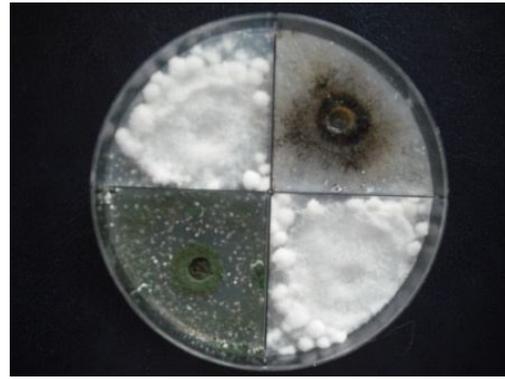
Atrás



Frente

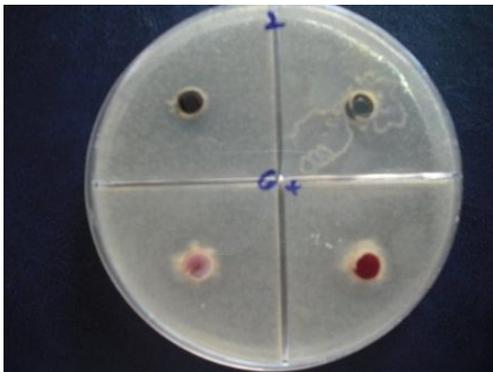


Atrás

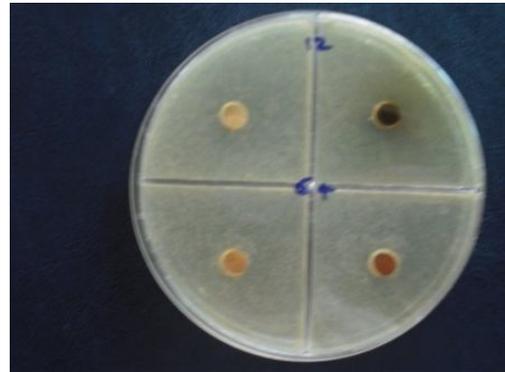


Frente

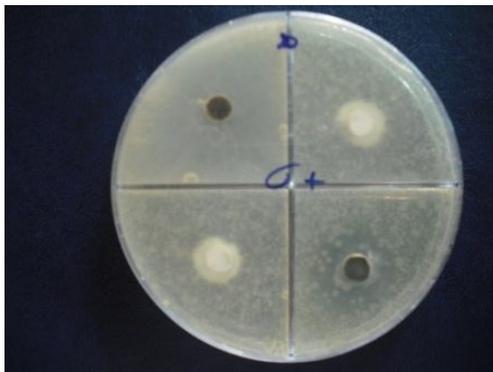
**Fotografía12: Actividad antagónica de hongos endófitos frente a la bacteria Gram positiva tipo**



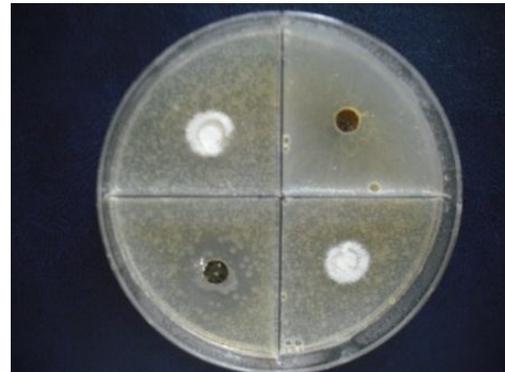
Atrás



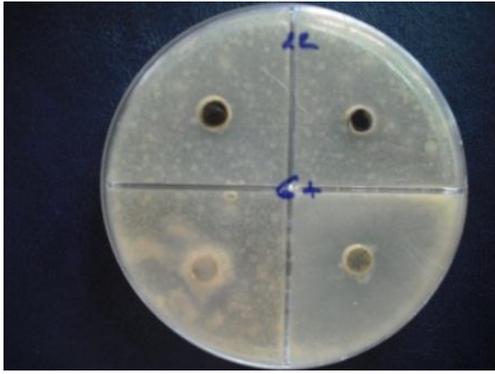
Atrás



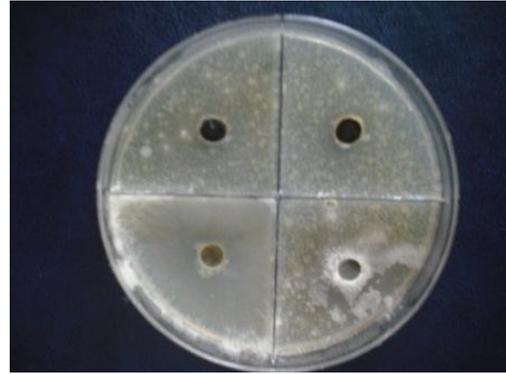
Atrás



Frente



Atrás

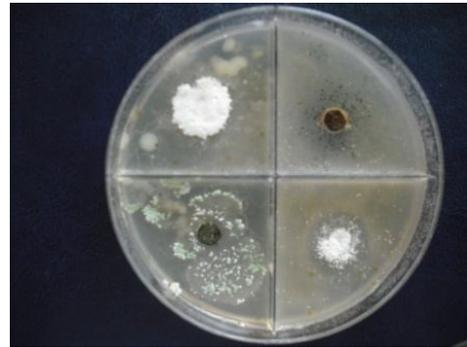


Frente

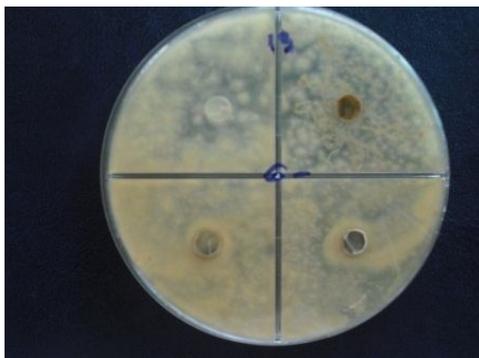
**Fotografía13: Actividad antagonica de hongos endófitos frente a la bacteria Gram negativa tipo**



Atrás



Frente



Atrás



Frente

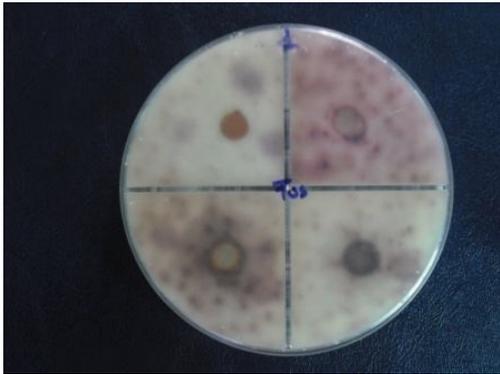


Atrás

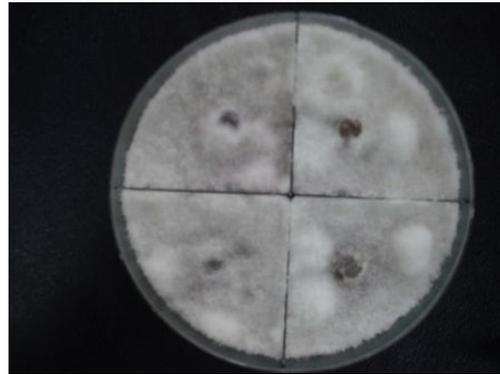


Frente

**Fotografía14: Actividad antagonista de bacterias endófitas frente a *Fusarium***

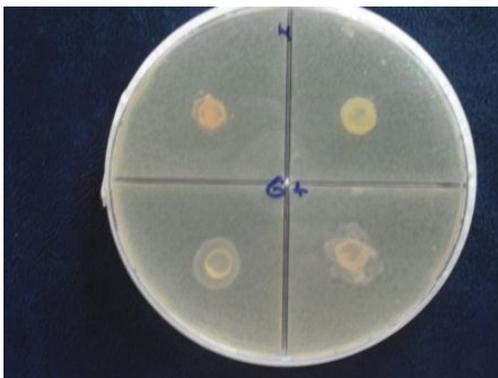


Atrás

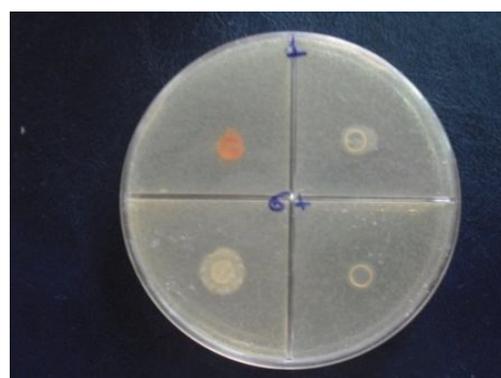


Frente

**Fotografía 15: Actividad antagonista de bacterias endófitas frente a la bacteria Gram positiva tipo**



Atrás



Atrás