

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Actividad antibacteriana de hongos y actinomicetos endofíticos de *Baccharis salicifolia* "chilca". Ayacucho 2009 - 2010.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO**

ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. GAMBOA MARTINEZ, ELMER FÉLIX

AYACUCHO, PERÚ

2013

Acta de Sustentación de Tesis
R.D.N° 053-13-UNSCH-FCB-D
Bach. Elmer Félix Gamboa Martínez


En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro y diez de la tarde del día diecisiete de mayo de 2013, se reunieron los miembros del Jurado Evaluador, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, la misma que estuvo presidida por el Dr. Segundo Tomas Castro Carranza e integrada por el Mg. Serapio Romero Gavilán, Mg. José Alarcón guerrero (que actuó como secretario docente encargado), Dr. Saúl A. Chuchón Martínez (miembro-asesor), Dr. Víctor Alegría Valeriano. Se reunieron con la finalidad de recepcionar la tesis presentada por el Bach. Elmer Félix Gamboa Martínez titulada: *Actividad Antibacteriana de Hongos y Actinomyceos Endofíticos de Baccharis salicifolia* “Chilca”. Ayacucho 2009-2010, quien pretende optar el título de Biólogo, especialidad de Microbiología. El presidente dio las indicaciones correspondientes del caso dando el visto bueno para la exposición del trabajo de tesis la cual duro cuarenta minutos. Acto seguido el Decano-Presidente ordeno pasar a la fase de la ronda de preguntas por los miembros del jurado iniciando con la participación del Dr. Víctor Alegría, Mg. José Alarcón, Mg. Serapio Romero, Dr. Saúl Chuchón. Culminada esta fase se pasó a la deliberación por los miembros del jurado para lo cual el presidente invitó al sustentante y público en general a abandonar el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas temporalmente para al final emitir la calificación correspondiente, la que es como sigue:

Jurado Calificador	Exposición	Rpta. Preguntas	Promedio
Dr. Victor Alegría Valeriano	17	13	15
Dr. Saúl Chuchón Martínez	16	12	14
Mg. Serapio Romero Gavilán	15	15	15
Mg. José Alarcón Guerrero	15	12	14

Promedio:

De la evaluación y deliberación por los miembros del jurado calificador, el sustentante obtuvo la nota promedio de (15) Quince de la cual dan fe estampando su firma al pie del presente.

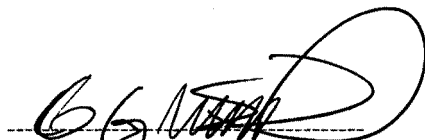
Siendo a las seis y cuarenticinco de la tarde concluyo el acto de sustentación de la tesis.



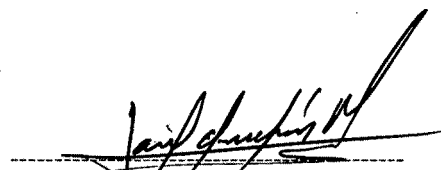
Mg. José Alarcón Guerrero
(Miembro-Secretario(e))




Mg. Serapio Romero Gavilán
(Miembro)



Dr. Victor Alegría Valeriano
(Miembro)



Dr. Saúl Chuchón Martínez
(Miembro-Asesor)



Dr. Segundo Tomás Castro Carranza
(Presidente)

DEDICATORIA

**Con gratitud a mis queridos
padres y mi hermano Yuri.**

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga *Alma Mater*, a la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Escuela de Formación Profesional de Biología en cuyas aulas me formé.

Al laboratorio de Microbiología Ambiental de la Escuela de Formación Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas en cuyos ambientes efectué la tesis, del mismo modo por los materiales y equipos facilitados para la realización del presente trabajo de investigación.

A los profesores, en especial del Área Académica de Microbiología y a todos los profesores del Departamento Académico de Ciencias Biológicas, quienes con sus valiosas enseñanzas contribuyeron a mi formación académica y humana.

Al Bigo. Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez, asesor del presente trabajo, por brindarme sus conocimientos y orientaciones para la realización y culminación del presente trabajo de investigación.

Actividad antibacteriana de hongos y actinomicetos endofíticos de *Baccharis salicifolia* "chila". Ayacucho 2009 - 2010.

Autor: Bach. Elmer Félix Gamboa Martínez.

Asesor: Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo aislar e identificar los hongos y actinomicetos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" y evaluar la actividad antibacteriana frente a diversas cepas bacterianas, se ha realizado entre los meses de marzo a agosto de 2010. Las hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca", fueron recolectadas del distrito de Quinoa del sector de las Pampas de Ayacucho, ubicada entre 3200 a 3300 m.s.n.m., provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho, entre los meses de marzo y abril, entre las 7:00 – 8:00 horas de la mañana. Las muestras colectadas estuvieron libres de cualquier tipo de lesión causados por patógenos o insectos y se depositaron en bolsas de polietileno para su transporte al Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, donde se procesaron, las mismas que fueron desinfectadas con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 3% según la técnica de Araujo y Col., (2002). Luego las hojas fueron cortadas en cuadrículas de un cm² aproximadamente y colocadas en los medios de cultivo y que fueron incubados a 25°C por 7 a 15 días, obteniéndose crecimiento de colonias de hongos los que fueron identificando mediante sus características macroscópicas y microscópicas. Para la actividad antimicrobiana se utilizaron bacterias patógenas enfrentadas con cepas fúngicas en block de gelosa. Concluyéndose que se aislaron 71 cepas fúngicas de los géneros de *Penicillium spp.* y *Alternaria spp.*, mostrando efecto antibacteriano el género de *Penicillium spp.* frente *Staphylococcus epidermidis* HRA 288, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, mientras el genero *Alternaria spp.* mostró efecto antibacteriano para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y a los actinomicetos no se logró aislar cuya especie no posea o caso contrario los medios utilizados no fueron adecuados. Palabra clave: Actividad antibacteriana, hongos y actinomicetos endofíticos y *Baccharis salicifolia* "chilca".

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Descripción botánica de la planta <i>Baccharis salicifolia</i> "chilca"	8
2.3. Microorganismos endofíticos	10
2.4. Hongos endofíticos (HE)	12
2.5. Importancia de los hongos endofíticos	12
2.6. Actinomicetos endofíticos (AE)	13
2.7. Efectos benéficos de los microorganismos endofíticos	14
2.8. Diversidad de microorganismos endofíticos	14
2.9. Descripción de los géneros de hongos endofíticos hallados en <i>Baccharis salicifolia</i> "chilca"	15
III MATERIALES Y MÉTODOS	27
IV RESULTADOS	33
V DISCUSIÓN	44
VI CONCLUSIONES	51
VII RECOMENDACIONES	52
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO	56

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos, actinomicetos y bacterias endofíticos son aquellos que viven en el interior de los tejidos de las plantas, sin causar daños visibles en las mismas; tales microorganismos promueven el crecimiento vegetal, confieren a su hospedero resistencia al estrés, alteraciones fisiológicas, además les protege contra herbívoros y organismos patógenos (Azevedo y Col.; 2000). Los microorganismos endofíticos ocupan el mismo ambiente con muchos fitopatógenos, favoreciendo el uso como agentes en el control biológico de patógenos (Areias de Silva, 2006).

El estudio de microorganismos endofíticos es de gran importancia debido a la falta de información para el estudio de la base biológica de las interacciones endófito – planta y también por ser potencialmente ventajoso en diversos aspectos, tales como: control de plagas, control de fitopatógenos, producción de metabolitos de interés farmacológico, promoviendo el crecimiento vegetal, vectores para la introducción de genes en plantas hospederas, fijación biológica de nitrógeno, evitando y reduciendo el uso de agroquímicos, etc. (Canon y Simmons, 2002).

Los hongos y actinomicetos endofíticos son reconocidos como los aislados de tejidos de plantas desinfectadas superficialmente o, de su interior y que no

causan síntomas visibles de enfermedad en la planta (Azevedo y Col., 2004; Areias de Silva 2006). Estos microorganismos son encontrados principalmente en los espacios intercelulares de los tejidos y, con menor frecuencia, intracelularmente y en tejidos vasculares, sin causar síntomas de enfermedad (Azevedo y Col., 2004).

El estudio de la comunidad endofítica sean hongos, actinomicetos y bacterias; ha aumentado sustancialmente en los últimos 20 años, se observó que esta comunidad presenta un importante papel en el desarrollo de la planta hospedera como es el chilca, ya que hoy en día se hace uso como una planta medicinal como por ejemplo es antirreumático, también se usan como analgésico, antiinflamatorio y antiespasmódico de las hojas soasadas, también reconocieron sus propiedades cicatrizantes, vulnerarias y contra luxaciones, etc.; viendo estos principios activos que presenta "chilca", y no habiendo trabajos realizados acerca de la población endofítica de *Baccharis salicifolia* "chilca", es necesario realizar estudios con el propósito de demostrar la existencia de hongos y actinomicetos endofíticos, de igual forma conocer en número de especies, la frecuencia y estudios de la capacidad antibacteriana que presenta estos microorganismos endofíticos.

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron:

- Aislar e identificar los hongos y actinomicetos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca"
- Evaluar la actividad antibacteriana de cepas de hongos y actinomicetos aislados de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" frente a diversas cepas bacterianas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Bacon y Hinton (2002), hongos y actinomicetos endofíticos se pueden tornar patógenos sobre ciertas condiciones e inclusive en función del genotipo de la planta hospedera. Estudios también señalan que los hongos y actinomicetos endofíticos interactúan con patógenos.

Bacon y Hinton (2002); Azevedo y Col., (2004), promueven el crecimiento en las plantas, aumentan la resistencia a enfermedades y constituyen a la fijación biológica de nitrógeno y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios.

Ordóñez y Vega, (2005), Zaragoza, (2003) en el estudio etnobotánica de la planta de productos naturales, comentan los beneficios de las siguientes especies de interés medicinal analizadas en este estudio: *Baccharis obtusifolia*, vértigo, reumatismo y micosis de la piel, *Borreria laevis* (Lam.) Grises, para el espanto, en aplicación directa de sus hojas maduras machacadas, *Piper barbatum*, en dermatitis, como desinfectante y cicatrizante, *Baccharis latifolia* como antiinflamatorio, cólico estomacal y cólico hepático, *Chuquiragua jussieui*, para resfriados, gripe, tos, dolor de huesos y *Bidens andicola*, contra la cefalea e

insolación. Los hongos en asociación endofítica con estas especies vegetales podrían jugar un rol importante en las propiedades medicinales de las mismas.

Pocasangre y Col. (2002), aislaron hongos endofíticos como agentes biológicos de control de fitonemátodos en banana, con diversos tratamientos manejados en el estudio de los hongos endofíticos como biocontroladores de *Radopholus similis* en fincas de banana en Brasil, los cuales son el *Trichoderma atroviride*, *Fusarium oxysporum*, llegando a la conclusión de que las plantas protegidas con hongos endofíticos representan mejor sanidad radical, expresada en mayor cantidad de raíz funcional y menor cantidad de raíz muerta.

Barrios (2006), en su trabajo de investigación acerca del estudio de hongos endofíticos con inductores de resistencia para el control de "sigatoka negra" (*Mycosphaerella fijiensis*) en plátano, en Costa Rica, señala alternativas contra la enfermedad "sigatoka negra" mediante el uso de hongos endofíticos que actúen como promotores de crecimiento e inductores de resistencia teniendo como resultado que la *Trichoderma atroviride* y *Fusarium oxysporum* revelan mayor éxito en la colonización en tejidos de la raíz y hoja.

Chávez (2007), de la misma forma, realiza un trabajo de investigación titulado: Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del "nemátodo barrenador" *Radopholus similis* en Costa Rica; como resultado de los estudios realizados, fue posible observar e identificar algunas de las estructuras reproductivas de los hongos endofíticos en los tejidos internos del sistema radical de las vitropiantas de banana siete días después de su inoculación. Asimismo, fue posible comprobar la presencia de colonias de Bacillus B21 en los tejidos internos de raíces de segundo y tercer orden. Esto comprueba la habilidad de colonización de los agentes biológicos evaluados. Aunque las bacterias demostraron ser mejores colonizadoras que los hongos en todos los

tratamientos evaluados en pruebas de compatibilidad, la presencia de los hongos fue más evidente en los estudios histológicos en comparación con las bacterias. Esto puede deberse a las características particulares de tamaño y forma de cada uno de los agentes evaluados.

Araujo y Col. (2002), realizaron un trabajo de investigación en Brasil acerca del aislamiento de actinomicetos endofíticos de raíces y hojas de "maíz" (*Zea mays* L.) de tal forma que los actinomicetos fueron aislados de la superficie esterilizada de las hojas y raíces del maíz. Un total de 53 cepas aisladas de hojas y de raíces. El género *Microbispora* fue el más frecuente seguido por los géneros *Streptomyces* y *Streptosporangium*. De estos actinomicetos aislados, el 43.4% mostraron actividad antimicrobiana contra una o más bacterias probadas.

Ramírez y Col. (2006), mediante una investigación referida a la actividad antagónica de hongos endofíticos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas; encontraron 22 especies de Ascomycota (19 géneros), 24 especies de Basidiomycota (18 géneros), 5 especies de hongos anamorfos (4 géneros) y 5 géneros de coelomycetes. Las plantas sometidas al estudio fueron *Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Piper barbatum*, *Borreria laevis*, *Chuquiragua jussieui* y *Bidens andicola*, las que fueron seleccionadas en base a dos principios: son nativas de la zona andina del Ecuador y poseen propiedades medicinales y por tal motivo utilizadas por la población local que las cultiva. Se evaluó además la interacción antagónica entre los aislados fúngicos y bacterias patógenas, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC Number, 25923), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, (ATCC Number, 9997), *Pseudomonas aeruginosa*, (ATCC Number, 27853), *Escherichia coli* (ATCC Number, 25922). La mayoría de las cepas fúngicas analizadas, muestran actividad antibacteriana, en contra de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

Pseudomonas aeruginosa y *Staphylococcus aureus*, sin embargo, la mayor actividad se detectó con *Mycelia sterilia* frente a *Klebsiella pneumoniae*.

Orozco y Col. (2005), aislaron diferentes microorganismos colonizadores de raíces de árboles "élite" de la especie *Alnus acuminata* var. *Acuminata* provenientes de la finca Cien Años de Soledad y de la Estación Experimental de San Pablo de la Universidad Nacional de Medellín localizadas en Rionegro (Antioquia). Los aislados correspondieron al actinomiceto Frankia y fueron denominados como F1, F2 y F3; los aislados de hongos micorrizógenos obtenidos de suelo rizosférico se denominaron como Mn1, Mn2 y Mn3.

Según las investigaciones del Instituto de Patología de las Plantas de la Universidad de Milán (Italia) aislaron actinomicetos endofíticos del género *Streptomyces* a partir de 28 especies de plantas herbáceas.

Yaojian y Col. (2001) trabajaron en la Universidad de Xiamen (China) en la actividad antitumoral y antifúngica de hongos endofíticos aislados a partir de tres plantas medicinales como el *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* y *Torreya grandis*, encontraron como endofíticos a los géneros *Pacilomyces*, *Tubercularia*, *Mucor trichoderma*, *Mortierella*, *Cladosporium* y 7 hongos aun no identificados.

Makowiecky (2006), en Brasil investigó la comunidad de hongos endofíticos como *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis* y *Xylaria*; asociada a la caña de azúcar convencional y genéticamente modificada.

Sayuri (2006), en la Universidad de Sao Paulo (Brasil) investigó la diversidad y el potencial biotecnológico de los hongos endofíticos del "cacao" *Theobroma cacao* L. como controlador biológico de *Crinipellis pemiciosa*; aisló cepas fúngicas pertenecientes a los géneros de *Fusarium*, *Gibberella*, *Lasiodiopodia*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* y *Verticillium*.

Chapaval (2006), trabajaron en el aislamiento de hongos endofíticos a partir de las hojas de la "hierba-mate" *Ilex paraguariensis*, nativas y cultivadas, obteniendo resultados de la existencia de una gran diversidad fúngica en hojas maduras en comparación de hojas jóvenes, del mismo modo demostraron que existen mayor diversidad de hongos endofíticos en las hojas de la "hierba-mate" nativa que en las que son cultivadas; entre los hongos endofíticos aislados destacan *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Dendrophoma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Verticillium* y 13 hongos aún no identificados.

Canon y Simmons (2002), en estudios realizados en palmas del género *Licuala*, de la región de Australia, demostraron la presencia de los géneros *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* y *Verticillium* en el tejido vegetal; en el estudio aislaron un mayor número de endófitos del ápice de los peciolo en comparación con los aislados de la base de los peciolo, lo cual sugiere que los endófitos en *Licuala* sp. entran a través de la hoja hasta el peciolo.

Arnold y Herre (2003), en la Isla de Barro Colorado en Panamá, estudiaron la colonización por endófitos de acuerdo al hábitat y a la edad de las hojas de *Theobroma cacao* (Malvaceae), cuya diferencia fue no significativa referente a la incidencia de endófitos de acuerdo al hábitat, pero se observó mayor frecuencia de estos en hojas maduras. Se aislaron endófitos pertenecientes a los géneros *Colletotrichum*, *Fusarium* y *Xylaria*.

Salgado y Cepero (2005), trabajaron con la microbiota endofítica de *Rosa hybrida* en Bogotá, Colombia; de 560 fragmentos de hojas sanas utilizadas, se recuperaron 92 endófitos, de los cuales 41 fueron denominados como micelio estéril, 31 fueron identificados hasta géneros y 20 no fueron identificados.

Cisneros (2011), en el trabajo de investigación titulado “Hongos y actinomicetos endofíticos de *Piper elongatum* “matico” y su efecto antimicrobiano” en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho– Perú, aisló 56 cepas constituidas por tres géneros, *Penicillium* que representó un 67.86%, *Alternaria* un 28.57% y *Aspergillus* el 3.57%; además de una cepa de actinomiceto aun no identificado.

2.2. Descripción botánica de la planta *Baccharis salicifolia* “chilca”

Origen de la planta

Según cronistas e historiadores la “chilca” fue utilizada desde tiempos remotos por las culturas prehispánicas, destacando entre ellas, Ancón, Tiahuanaco, Wari, Chimú, Chancay e Inca. Éstas emplearon las hojas de “chilca” para obtener de ellas el color amarillo y verde, que sirvió para teñir las fibras de sus textiles. Los historiadores cuentan que este arbusto crecía en abundancia en las quebradas de la sierra, los antiguos peruanos también usaron las cenizas de la “chilca” y se elaboró la llipta, polvo para chacchar coca (Salazar y Col.; 2007).

Taxonomía de la planta:

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub clase	: Asteridae
Orden	: Asterales
Familia	: Asteraceae
Genero	: <i>Baccharis</i>
Especie	: <i>Baccharis salicifolia</i> .
Nombre vulgar	: “Chilca”, “Chilca blanca”, “Chielea dulce” (Cronquist, A. 1988).

Hábitat

Esta especie de planta está distribuida en costa y sierra del Perú. Crece todo el año en terrenos húmedos, acequias y orillas de los ríos. Se le encuentra a nivel del mar y entre los 1 200 a 2 800 msnm. Pueden ser hallados en las regiones de Arequipa, Lima, Cuzco, Ayacucho, Junín, etc. (Salazar y Col.; 2007).

Descripción botánica

Baccharis salicifolia "chilca" es un arbusto dioico de 1,5 a 2,5 m de alto, ramosos y densamente hojoso. Hojas simples, alternas, cortamente pecioladas, lanceoladas, de 4 a 9 cm de largo por 0,7 a 1,5 cm de ancho, enteras o aserradas en la mitad superior del margen y de color verde intenso y brillante (Salazar y Col.; 2007). Inflorescencia en cabezuela o capítulos numerosos, sésiles, cortamente pedunculados ya sean en las axilas de las hojas superiores o a lo largo de las ramas terminales. Los capítulos femeninos con involucre cilíndrico y con brácteas dispuestas más o menos en cuatro series, las externas aovadas semiobtusas y las internas angostamente aovadas. Receptáculos cónicos, alveolado. Flores con ápice biselado y denticulado. Aquenios glabros con un disco anular en la parte superior y lateralmente con involucre cilíndrico-campanado con brácteas dispuestas en tres series, las externas aovadas y las internas elípticas. Receptáculo cónico, alveolado. Flores con corola tubular, limbo ensanchado y penta partida de color blanco, (Salazar y Col.; 2007; Cronquist, 1988).

Usos etnomédicos y antropológicos

Se usa como antirreumático, analgésico, antiinflamatorio y antiespasmódico mediante aplicación local de las hojas soasadas (Salazar y Col.; 2007). Los Incas reconocieron sus propiedades cicatrizantes y contra luxaciones, se aplica

en caliente contra todo el dolor causado por el frío y para este efecto se tuestan con canela y con ración de vino y se enjuaga las piernas de los gotosos.

Las hojas machacadas y aplicadas en heridas frescas logran secar y cicatrizarlas, además es utilizada como antihelmíntico. Se le emplea también contra tumores causados por golpes o caídas, en los que puede o no haber dolor; para curarlos se aplican sobre ellos las hojas machacadas y embebidas en alcohol. Por otra parte, se usa para tratar el salpullido y la varicela; en este caso se aplican baños con el agua de infusión del tallo y la flor, más un poco de carbonato (Salazar y Col.; 2007).

Principios activos y composición fitoquímica

Baccharis salicifolia "chilca" posee como principios activos siguientes: aminogrupos, taninos, flavonoides triterpenoides, alcaloides y esteroides, saponinas, (Salazar y Col.; 2007); así como catequinas, cardiotónicos y antraquinonas. *Baccharis salicifolia* "chilca" produce una resina en la que se han identificado los flavonoides acacetin, apigenin, crisin, éter-3-metilico de camferol y los éteres 3 y 4-metilicos, los éteres 3'-metilico, y 3'-4'-dimetilico de luteolin, penduletin pinocembrin, quercetin y sus éteres 3'-4'-dimetilico y 3-3'-4'-trimetilico (Salazar y Col.; 2007).

2.3. Microorganismos endofíticos

El término endofitismo o endofitos deriva de dos palabras griegas: *endon* – dentro y *phiton* – planta; este término ha causado controversia desde su creación en 1866 por De Barry (Saikkonen y Col., 2004). Así el concepto más reciente y común sobre los microorganismos endofíticos es que "son aquellos que habitan en el interior de los tejidos vegetales de la planta hospedera sin causar daños a la misma y tampoco forman estructuras externas visibles (Azevedo y Col., 2004).

Según Araujo y Col. (2002), los microorganismos endofíticos vienen siendo aislados de una extensa variedad de plantas, incluyendo muchos de interés económico, como el algodón, arroz, plátano, papa, cacao, caña de azúcar, cebolla, naranja, arveja, leguminosas, etc. Recientemente las bacterias diazotróficas endofíticas han sido aisladas de varias especies de gramíneas y gran diversidad de diazotrófos han sido encontrados colonizando plantas de maíz. Se sabe que los hongos, actinomicetos pueden vivir endofíticamente en diferentes partes de las plantas, como raíces, ramas, hojas, semillas, frutos, tubérculos y en mismas flores, colonizando los espacios intercelulares, vasos del xilema los mismos representan una colonización intracelular (Bacón y Hinton, 2002), en diversos cultivos de importancia agronómica como maíz, algodón, tomate, papa como también los cítricos y entre otros. Evidencias de microorganismos asociados a las plantas fueron detectadas en tejidos de follajes y ramas fosilizados, mostrando una evolución extremadamente especializada entre las partes de esta interacción. La principal ventajas que tiene los endófitos es en colonizar en las plantas y que los tejidos internos proporcionan un ambiente protegido de las adversidades del medio, tales como rayos ultravioleta (UV), y fluctuaciones de temperatura, bien como mayor disponibilidad de nutrientes, evitando la competencia con otros microorganismos, como la microbiota rizosférica, por lo tanto, el endofitismo puede ser visto como una forma de sobrevivencia de estos microorganismos. De esta íntima asociación se plantea la hipótesis de que los endófitos pueden exceder efectos benéficos en sus hospederos, como la provocación de crecimiento y/o control de fitopatógenos (Azevedo y Col., 2004; Chapaval, 2006).

2.4. Hongos endofíticos (HE)

Está ampliamente documentado que existen relaciones simbióticas entre hongos endofíticos y una amplia variedad de plantas. La colonización de HE puede generar beneficios para la planta hospedera, incluyendo la actividad antagonista y la inducción de resistencia contra patógenos, así como la estimulación de crecimiento mediante la secreción de fitohormonas y la movilización de nutrientes de la rizósfera hacia la planta (Gamboa, 2006). Según investigaciones recientes sobre poblaciones de HE presentes en tejidos internos en raíces de plátano, se ha determinado que *Trichoderma* y *Fusarium* son los géneros más abundantes y tienen un alto potencial como antagonistas de los nematodos; se han encontrado reducciones de hasta un 90% en la población final de *R. similis* en el sistema radical de plantas de plátano protegidas con HE de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*, además, se ha evidenciado un incremento en el peso y longitud radical, y en el peso foliar de dichas plantas, en comparación con plantas no protegidas (Pocasangre, 2002).

La diversidad de hongos endófitos asociados a especies vegetales está relacionada con la edad de las hojas, localidad (ambientes terrestres o ambientes acuáticos) y clima de la planta ya sea en zonas templadas o tropicales. Se han aislado endófitos de plantas en zonas templadas y zonas tropicales, ambientes terrestres (Arnold y Herre, 2003; Salgado y Cepero, 2005) y de ambientes marinos (MacArthur y McGee, 2000)

2.5. Importancia de los hongos endofíticos

Los hongos endofíticos son muy importante, porque en una relación mutualista donde la planta le ofrece albergue y nutrientes al hongo, éste le provee a la planta hospedera resistencia contra herbívoros, insectos, hongos patógenos, enfermedades y sequía (Salgado, 2002). Esta resistencia de la planta puede

relacionarse a la producción de toxinas y metabolitos secundarios por algunas especies endofíticas. Se ha demostrado que algunos de estos metabolitos secundarios (aminas, amidas, derivados de indol, esteroides y terpenoides, entre otros) tienen efectos antimicrobiales (Salgado y Cepero 2005; Ordoñez y Vega, 2005).

Los géneros de hongos endofíticos como *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Phoma* y *Phomopsis* son endófitos productores de taxanos, componentes de la droga anticáncer taxol (Canon y Simmons 2002). Otro endofito, *Gliocladium* sp., asociado a *Eucryphia cordifolia*, produce compuestos contra *Pythium ultimum* y *Verticillium dahliae*. Se ha comprobado que *Epichloë* en la hierba *Brachypodium sylvaticum* es capaz de producir metabolitos contra el herbívoro *Spodoptera frugiperda*, demostrado con un estudio en el que se utilizó un grupo control (no infectado) y uno experimental (infectado con el endofito) de *B. sylvaticum* (Canon y Simmons, 2002; Ordoñez y Vega, 2005).

2.6. Actinomicetos endofíticos (AE)

Los actinomicetos endofíticos forman parte de la gran cantidad de actinomicetos benéficos presentes en la planta como en la rizósfera, que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas y las protegen contra otros organismos del suelo que causan enfermedades (Azevedo y Col., 2004). Ecológicamente, a esta relación benéfica entre los actinomicetos y las plantas se le denomina "mutualismo", el cual se define como la condición en la que dos seres vivos de diversas especies viven juntos habitualmente, aunque no necesariamente, con beneficio recíproco para el hospedero y para el simbiote. La mayoría de estas asociaciones ocurre a nivel de la rizósfera; que es toda aquella porción de suelo que está fuertemente influenciada por las raíces de las plantas (Araujo y Col., 2002).

2.7. Efectos benéficos de los microorganismos endofíticos

Entre los efectos benéficos de los microorganismos endofíticos en las plantas, es que son estudiados y utilizados como fungicidas biológicos en la agricultura, además, son conocidos como estimuladores de crecimiento en las plantas; esto favorece la capacidad de absorción de agua y nutrientes, permitiendo que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas (Araujo y Col., 2002), por otro lado los endofíticos no son patógenos de plantas y el hombre (Azevedo y Col., 2004).

2.8. Diversidad de microorganismos endofíticos

Entre los microorganismos encontrados en las asociaciones endofíticas, las bacterias son las más frecuentes; (Araujo y Col., 2002), estudian la diversidad de bacterias endofíticas en asociación con la raíz y hojas de maíz y algodón en el estado de los Alabama, EUA; y obtuvieron aislados de 36 géneros, siendo de estas, el 70.5% pertenecientes a *Enterobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, y *Pseudomonas*. Por otro lado, estudiando plantas sanas de algodón (*Gossypium hirsutum*), Azevedo y Col., (2004), aislaron seis especies de bacterias, *Erwinia sp*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus sp.*, *Clavibacter sp.* y *Xanthomonas sp.* Azevedo y Col., (2004). Las bacterias, hongos y actinomicetos están indisolublemente asociadas a las plantas como patogénicas, epífitas, endófitas, simbióticas y antagónicas. Muchas forman asociaciones íntimas con las plantas y forman grupos diversos filogenéticamente representados por especies pertenecientes a los principales taxones. Las bacterias, hongos, actinomicetos asociados a las plantas típicamente intercambian señales con su hospedero y poseen diversos mecanismos para adaptación y colonización (Chávez, 2006). Aspectos importantes de la diversidad de bacterias, hongos, actinomicetos en el

ecosistema incluyen los diferentes procesos que estos realizan, la complejidad de la interacción y el número de niveles tróficos que los componen. La densidad poblacional de los endófitos es altamente variable, depende de la especie (bacterias, hongos, actinomicetos) y el genotipo de la planta hospedera, además del estado de desarrollo de la planta, la densidad del inóculo y las condiciones ambientales (Azevedo y Col., 2004). Estudios moleculares realizados recientemente han revelado una gran riqueza de filotipos de bacterias, hongos y con menor frecuencia de los actinomicetos endófitos asociados a diferentes especies de plantas.

2.9. Descripción de los géneros de hongos endofíticos hallados en *Baccharis salicifolia* "chilca":

Penicillium

Taxonomía

Reino : Fungí
Filo : Ascomycota
Clase : Euascomyceto
Orden : Eurotiales
Familia : Trichocomaceae
Genero : Penicillium (Okuda, 2002).

Morfología: Este género de hongos conocidos como mohos verdes o azules; de algunas especies se obtiene la penicilina. El micelio del hongo, conjunto de filamentos tubulares llamados hifas, crece en la superficie de frutas, pan, quesos y otros alimentos. La reproducción asexual se produce en Penicillium mediante unas células, los conidios, que se forman en el extremo de hifas especializadas, los conidióforos. Éstos son ramificados y en forma de abanico. Los órganos sexuales son gametangios arrollados en hélice. La penicilina fue descubierta por

Alexander Fleming en *Penicillium notatum*, pero en la actualidad se obtiene de cepas de *Penicillium chrysogenum* que dan mayor rendimiento. En los quesos azules, *Penicillium roqueforti* da sabor, y el color se debe a sus conidios. (Okuda, 2002; Salgado 2002).

Las especies de *Penicillium* spp. son reconocidas por su denso cepillar como las estructuras del espora-cojinete. Los conidióforos son simples o ramificados y son terminados por los racimos de fiálides en forma de botella. Las esporas (conidios) se producen en cadenas secas de las extremidades de los fiálides, con la espora más joven en la base de la cadena, y son casi siempre verdes. La ramificación es una característica importante para identificar especie del *Penicillium* spp. Algunos no son ramificados y llevan simplemente un racimo de fiálides en la tapa del estípote. Otros pueden tener un racimo de ramas, cada cojinete un racimo de fiálides. Un tercer tipo tiene ramas el llevar de una segunda pedido de ramas, llevando alternadamente un racimo de fiálides. Estos tres tipos de sistemas del cojinete de la espora (penicilli) se llaman monoverticillate, biverticillate y triverticillate respectivamente. (Okuda, 2002)

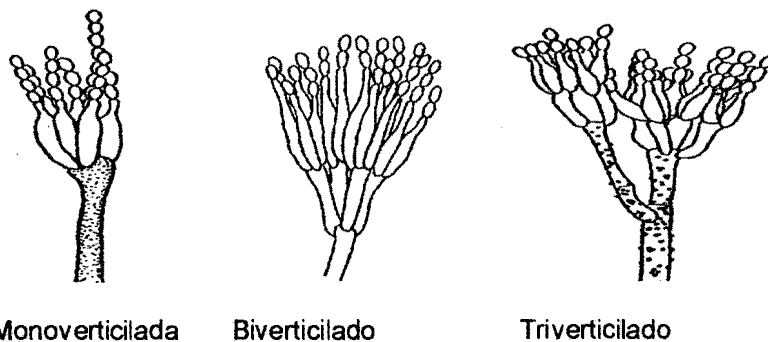


Figura 1. Aspecto morfológico de penicilios. (Okuda, 2002)

En la figura (1) se muestran esquemas de los tipos de conidióforos del género *Penicillium*, cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos. Si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado. Las ramificaciones de un pincel

poliverticilado son ramas, r mulas, métulas y fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fi lide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas, y en algunas especies se aprecia claramente con el microscopio óptico (Okuda, 2002). Los filamentos o hifas alcanzan un diámetro entre dos o tres micrómetros y tienen septos con un poro central que no es visible al microscopio óptico. Las paredes del estípite, las ramas o las métulas pueden ser lisas, rugosas o equinuladas. La pared de las fiálides es siempre lisa. Las fiálides pueden tener forma de ánfora o bien ser casi cilíndricas con la porción apical en forma de cono. El tamaño máximo de las fiálides es de 15 mm y la parte terminal no supera los 3 mm de largo. Los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos que en masa se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris. La pared de los conidios es lisa o rugosa según las especies (Salgado, 2002). El género *Penicillium* está subdividido en grupos o subgéneros de acuerdo a la morfología de los pinceles aunque también se tiene en cuenta la velocidad de crecimiento. La serie *Monoverticillata* o subgénero *Aspergilloides*, comprenden a todos los penicilios monoverticilados. En ellos el estípite suele tener mayor diámetro en la zona donde se implantan las fiálides, sin llegar a ser una vesícula como en el género *Aspergillus*. La serie *Triverticillata* o subgénero *Penicillium*, comprende a las especies que tienen tres, a veces cuatro, niveles de ramificaciones y son de crecimiento relativamente rápido sobre Czapek-Glicerol. Las especies con pinceles biverticilados, generalmente simétricos, cuyas colonias son de crecimiento lento sobre Czapek-Glicerol se agrupan en la serie *Biverticillata symmetrica*, o subgénero *Biverticillium*, pero a veces suele haber

algunos pinceles terverticilados. Las fiálides son delgadas, con el ápice alargado y alcanzan la misma longitud que las métulas. Si los pinceles son biverticilados o irregulares, a veces junto a monoverticilados, con las fiálides en forma de ánfora y más cortas que las métulas, se las reúne en el subgénero *Furcatum* que comprende especies de las series *Biverticillata asymmetrica* y *Divaricata*. Las colonias de este subgénero crecen relativamente rápido en Czapek-Glicerol (Salgado, 2002; Okuda, 2002).

Identificación: Es importante poder diferenciar los penicilios de los otros hongos que forman esporas en conidióforos ramificados. El más parecido es el género *Paecilomyces* que tiene fiálides con el ápice muy alargado, conidios elípticos y colonias de tonos pardos pero nunca verdes. El género *Geosmithia* se originó al separar de *Penicillium* las especies que forman colonias blancas a beige, esporas casi cilíndricas y fiálides rugosas y cilindroides que se estrechan súbitamente en el ápice. Las especies de *Gliocladium sp.* tienen fiálides con el extremo curvado y esporas mucosas que se aglomeran, mientras que los penicilios originan conidiosporas en fiálides con un eje de simetría. También las especies de *Trichoderma sp.* forman conidios mucosos que se reúnen en cabezuelas con tonos verdes. El género *Scopulariopsis* produce colonias pardas y esporas en anélides (Salazar y col., 2007; Okuda, 2002).

Cultivos: En los estudios taxonómicos las cepas son sembradas y observadas bajo condiciones de laboratorio normalizadas empleando medios como Czapek-Levadura, Malta-Glucosa o Czapek-Glicerol. Sin embargo hay variabilidad aunque mínima, según la fuente del agar, agua o extracto de levadura, así como con el volumen de medio vaciado en las placas (Okuda, 2000). La aparición de los cleistotecios o gimnotecios en el término de una a tres semanas y el aspecto de los ascosporos son los principales elementos para identificar a los

teleomorfos. Hay que considerar también los errores ocasionales por cambios imprevistos de la temperatura de incubación o de la composición del medio, por lo que las pruebas deben ser repetidas al menos una vez (Salgado 2002). Las colonias de *Penicillium* son circulares si no hay impedimento alguno para su crecimiento, con un borde neto muchas veces sin fructificación y mostrando el color del micelio. Éste es generalmente blanco, pero en algunas especies es amarillo, anaranjado, púrpura o pardo claro. La superficie de la colonia madura, o sea con sus conidios formados, puede ser: aterciopelada, ligeramente algodonosa o con pequeños haces (fascículos) de conidióforos. En unos pocos casos los haces miden varios milímetros (coremios) con el extremo constituido por las cadenas de esporas (Salgado 2002). Los medios como Malta-Sacarosa, Creatina-Sacarosa, Creatina-Diclorán y Sacarosa-Diclorán permiten aislar y diferenciar penicilios, incubando a 25°C durante una semana. El agregado de 0,5% de ácido acético glacial al medio favorece el aislamiento de *P. roqueforti*. Algunas especies son tolerantes a 100 mg de cicloheximida/mL de Malta-Glucosa, por ejemplo *P. glabrum*, *P. brevicompactum*, *P. griseofulvum*, *P. olsonii* y *P. aurantiogriseum*, los que crecen al 30-70% de la velocidad de crecimiento de los testigos (Salgado, 2002; Okuda, 2002).

Hábitat: Los penicilios, si hallan la actividad del agua y los nutrientes necesarios, crecen sobre los alimentos preparados o sus materias primas, ya sean de origen vegetal o animal, (Seifert y Giuseppin, 2002).

Composición: Presentan diversas propiedades químicas como micotoxina (ácido ciclopiazónico, ácido penicílico, cicloclorotina, citroviridina, citrinina, griseofulvina, ocratoxina A, patulina, penitrem); Ocratoxina A (Sacarosa-Diclorán); Patulina (lactona tóxica). Citrinina y ácido penicílico (La citrinina, Ácido penicílico, Cicloclorotina y eritroskirina), Citroviridina (Seifert y Frisvad, 2002).

Alternaria

Taxonomía

- Reino : Fungi
Filo : Ascomycota
Subdivisión : Pezizomycotina
Clase : Dothideomycetes
Orden : Pleosporas
Familia : Pleosporaceae
Género : Alternaria (Okuda, 2002).

Morfología: La Alternaria es un hongo ascomiceto esto es, del filo de las Ascomycotas. Las diferentes especies de este género son uno de los mayores patógenos de plantas. Son conocidas comúnmente como alérgenos en los humanos, y, dentro de casa, pueden causar rinitis alérgica o reacciones de hipersensibilidad que, en ocasiones, pueden producir ataques de asma. Sus esporas son las causantes de la alergia, y, al igual que los pólenes, son transportadas por el aire hasta la nariz o bronquios del alérgico, causando la rinitis o asma (Okuda, 2002). Existen esporas de Alternaria todo el año y, por lo tanto, causan patología alérgica perenne; aunque varíe la intensidad según las estaciones, suele haber más en primavera y verano. Son una especie omnipresente en el ambiente y parte fundamental en la flora de hongos en cualquier sitio. Son agentes activos en la descomposición. Sus esporas están en suspensión en el aire, sobre el suelo, sobre los objetos y en el agua, tanto fuera, como dentro de casa. Las esporas se pueden distribuir de una en una, o en largas cadenas, y pueden crecer en colonias visibles, de color negro o gris. El género Alternaria contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos. Como saprobias pueden deteriorar

alimentos y forrajes, produciendo compuestos biológicamente activos tal como micotoxinas. Como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados. Es necesaria una identificación precisa de las especies porque cada nombre entraña un conjunto de características (preferencias para el crecimiento, patogenicidad, producción de metabolitos secundarios) que permiten predecir el comportamiento del hongo (Okuda, 2002).

Cultivos: Las características del crecimiento constituyen uno de los criterios para la clasificación. En Czapek-Levadura *A. alternata* y *A. infectoria* producen colonias de tamaño similar (56 - 63 mm de diámetro en 1 semana a 27°C), chatas y ligeramente algodonosas. El micelio aéreo es gris verdoso con reverso negro parduzco. Muchas cepas de *A. infectoria* forman escasos conidios, tienen un micelio algodonoso y el reverso de la colonia es oscuro en el centro rodeado de un anillo anaranjado pálido (Okuda, 2002). *A. alternata* forma colonias algodonosas, elevadas, con micelio gris verdoso y esporos negro parduzco. *A. infectoria* tiene colonias pardas aceituna a negro parduzco, chatas y algodonosas, a veces con fascículos y esporulación moderada mostrando el micelio gris y con frecuencia un pigmento soluble verde amarillento. Otras especies casi no presentan esporulación sobre este medio (Salgado, 2002). *A. alternata* y *A. infectoria* producen colonias indistinguibles, de color pardo grisáceo a pardo oliva, 7 - 12 mm de diámetro en 1 semana a 27°C, con micelio poco denso. En Malta-Diclorán, las colonias tienen un diámetro de 40 - 45 mm en iguales condiciones. *A. alternata* muestra un color negro verdoso en anillos concéntricos, la colonia aterciopelada tiene largas cadenas no ramificadas de conidios lisos. *A. infectoria* tiene colonias fasciculadas, de color gris verdoso, con cadenas siempre ramificadas de conidios rugosos y con frecuencia forman estructuras teleomórficas inmaduras (Okuda, 2002).

Las diferencias entre *A. longipes*, *A. alternata* y *A. gaisen* son mayores a 33°C, pues la primera no crece y la segunda alcanza un diámetro de colonia un 40% mayor que la última. A 20°C *A. gaisen* tiene colonias de color aceituna amarillento en Sacarosa-Dicloran, mientras que *A. alternata* muestra colonias verde oscuro y *A. longipes* un color amarillo paja (Okuda, 2002). *A. arborescens* forma colonias verde aceituna oscuro y *A. infectoria* de color blanco mientras que *A. tenuissima* suele presentar varios tonos de verde (Salgado, 2002).

Pero el medio de cultivo conveniente para separar las especies de *Alternaria sp.* en grupos con características macro y micromorfológicas similares es Papa-Zanahoria, si la incubación se hace a 25°C con luz fluorescente durante 8 hs seguida de 16 hs en la oscuridad (Okuda, 2002).

Identificación: Los conidios del género *Alternaria* tienen septos transversales y longitudinales y se los conoce como dictiosporas, además son pardos y picudos. Nacen por la brotación apical de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar en este último caso a una cadena que suele ramificarse si una espora produce más de un brote. La especie *A. infectoria* tiene un estado perfecto que pertenece al género *Pleospora*. Éste forma pseudotecios sobre el tallo de cereales o hierbas con ascas bitunicadas cilíndricas en los lóculos del estroma, dentro de las cuales hay 8 ascosporas provistas de septos transversales y longitudinales (Okuda, 2002). La especie predominante en Argentina es *A. alternata* (Salgado, 2002). Es común observar en los hongos una plasticidad morfológica. Cuando las especies de *Alternaria sp.* crecen en medios ricos y en la oscuridad bajo condiciones ambientales no controladas, se forma un exceso de micelio aéreo que afecta al desarrollo tridimensional de la esporulación. Al hacer las preparaciones húmedas se destruyen las estructuras y como resultado solo se observan conidios (Okuda, 2002). El examen directo de

los cultivos sobre Papa- Zanahoria permite diferenciar grupos de especies según los tipos de esporulación lo que fue corroborado por el análisis molecular y químico (Okuda, 2002; Salgado, 2002). La capacidad de los “primers” para detectar especies en extractos de tejidos vegetales infectados (semillas o raíces) tiene una sensibilidad de 0,5 - 1 ng de ADN del patógeno en un material con 10-20 ng de ADN vegetal. A las cepas se las solía dividir en tres secciones según formaran o no cadenas de dictiosporas, y si tales cadenas eran cortas o largas pero luego se tomó en cuenta el aspecto de los conidióforos y se las reunió en otras tres secciones que abarcan seis grupos de especies en base a la morfología sobre Papa-Zanahoria, a 25°C con alternancia día-noche (Okuda, 2002). Una sección comprende especies fitopatógenas que forman conidios solitarios con grandes picos, rara vez en cadenas de 2 o 3 conidios, como por ejemplo *A. dauci* que se transmite a través de las semillas de zanahoria. La Figura 2 muestra conidióforo y conidios de *A. dauci* (Salgado, 2002), con 5 a 11 septos transversales y 1 a varios longitudinales u oblicuos.

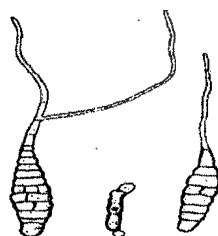


Figura 2. *Alternaria dauci* (Salgado, 2002),

Otra sección reúne a las especies que producen conidios en cadenas no ramificadas, por ejemplo *A. gaisen* con esporas ovoides gruesas en cadenas relativamente cortas (Okuda, 2002). El grupo *A. tenuissima* tiene cadenas rectas relativamente largas de esporas nacidas sobre cortos conidióforos primarios, pero ocasionalmente hay una ramificación corta sobre un conidióforo secundario nacido en la base de la cadena desde una célula intercalar del conidio. En cultivo

las cadenas tienen una posición erguida, vertical. La Figura 2.1 muestra conidios de *A. tenuissima* (Salgado, 2002).

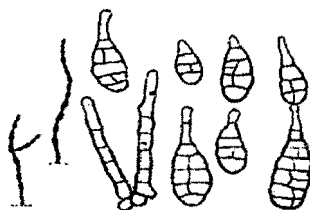


Figura 2.1: *Alternaria tenuissima* (Salgado, 2002).

La tercera sección comprende a los grupos de especies cuyas cadenas están ramificadas de manera diversa y abarca especies toxigénicas y otras que no lo son. El grupo *A. alternata* produce cadenas de 10 o más conidios muy ramificadas a partir de conidióforos cortos. La ramificación de los conidios surge de conidióforos secundarios desde células conidiales basales o apicales, en relación 1:1, dando un aspecto abierto (Okuda, 2002). Las cadenas aparecen en los cultivos como manojos densos y aislados (Okuda, 2002). La Figura 2.2 muestra conidios de *A. alternata* (Salgado, 2002) con 1 a 9 septos transversales y varios longitudinales u oblicuos.

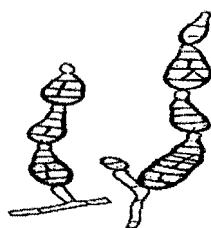


Figura 2.2: *Alternaria alternata* (Okuda, 2002)

A. arborescens (= *A. alternata* f.sp. *lycopersici*) posee largos conidióforos primarios con conidios en cadenas ramificadas. La ramificación ocurre predominantemente desde el ápice conidial y el conidio primario puede alcanzar hasta dos veces el tamaño de conidio siguiente llevando un corto conidióforo secundario geniculado con varios lóculos. La proliferación apical predomina resultando un aspecto relativamente compacto y complejo (Okuda, 2002). La

Figura 2.3 muestra el aspecto general de esporulación de *A. arborescens* (Okuda, 2002).

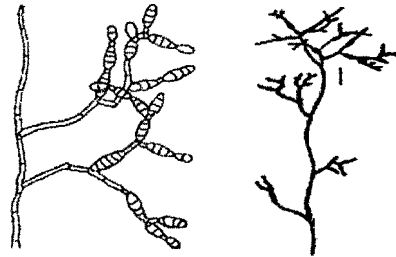


Figura 2.3: *Alternaria arborescens* (Okuda, 2002).

El grupo *A. infectoria*, se caracteriza por los largos conidióforos secundarios apicales, con varios lóculos conidiógenos, lo que resulta en una ramificación abierta. Los conidióforos primarios son cortos y se producen en manojos dando al cultivo un aspecto granular. La forma de los conidios, el color y la superficie de la colonia varía dentro de este grupo de especies. Las colonias tienen un aspecto granular. La Figura 2.4 muestra el aspecto de la esporulación de *A. infectoria* (Okuda, 2002; Salgado, 2002).

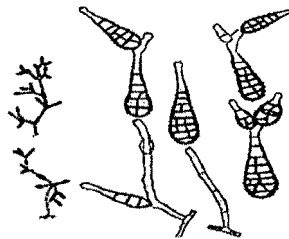


Figura 2.4: *Alternaria infectoria* (Okuda, 2002; Salgado 2002).

Hábitat: Los hongos presentes sobre las plantas antes de la cosecha son llamados "hongos del campo" e incluyen especies de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Verticillium*. Después de la cosecha, estos hongos pueden mantenerse sobre frutas y hortalizas causando lesiones que alteran su aspecto. También persisten en los granos de cereales almacenados, si están suficientemente secos para impedir el crecimiento de *Aspergillus* y *Penicillium* (Okuda, 2002). *Alternaria* es, después de las especies de

Cladosporium sp., el moho cuyos esporos se encuentran suspendidos en el aire con mayor frecuencia. En los cultivos de cereales, las hojas y los granos son colonizados por especies de *Alternaria sp.* y puede haber una penetración sub-epidérmica si toleran las aplicaciones de los fungicidas, por lo que suelen ser aisladas de la mayoría de los granos en el momento de la cosecha. El género *Alternaria* compete espacialmente con los otros hongos sobre la superficie vegetal y es antagonista de *Cladosporium*, *Epicoccum* y *Fusarium* (Okuda, 2002). La esporulación de *Alternaria* es óptima a 27°C pero es inhibida por debajo de 15°C o por sobre 33°C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35°C. La actividad de agua mínima para el desarrollo es 0,88 y la óptima casi 1,00. El crecimiento se reduce a la mitad en una atmósfera con más de 15% CO₂ o con 2,8% O₂ (Okuda, 2002).

Composición química: Las especies de *Alternaria sp.* son capaces de producir una variedad de compuestos diferentes, algunos de los cuales son tóxicos para los mamíferos y aves (micotoxinas) y otros para las plantas (fitotoxinas) como la tentoxina un tetrapéptido cíclico (Salgado, 2002). Alternariol y alternariol – metileter, ácido tenuazónico, alternariol, alternariol monometil-éter y altertoxina I mientras, ácido tenuazónico y altertoxina I (Okuda, 2002)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga durante los meses de marzo a agosto del 2010.

3.2. Tipo de investigación

Básica

Diseño: descriptivo

3.3. Muestra biológica

Estuvo constituida por 3 Kg de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca", las que fueron colectadas entre los meses de marzo y abril de 2010; habiéndose realizado tres muestreos, en cada caso se obtuvo un kilogramo de hojas como muestra.

3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.4.1. Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas, según el protocolo descrito por Araujo y Col. (2002), con la ayuda de unas tijeras desinfectadas, entre las 7:00 – 8:00 am.; para lo cual se siguieron los siguientes pasos:

Se ubicaron las plantas de *Baccharis salicifolia* "chilca", cuyas características básicas fueron: aparentemente sanas, vigorosas, adultas y sin mucha presencia de otros vegetales en su entorno.

- Una vez identificadas la planta, se verificaron que las hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" debían estar aparentemente sanas y sin manchas o cualquier tipo de lesión causada por patógenos o insectos.
- Las hojas elegidas fueron cortadas en la base con sumo cuidado y depositadas en bolsas de polietileno y rotuladas
- Luego del rotulado, las bolsas fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.4.2. Desinfección y preparación para el aislamiento

Teniendo en cuenta la recomendación que el tiempo máximo que debe transcurrir desde el momento del muestreo y su respectivo procesamiento no debe exceder las dos horas, una vez llegados al laboratorio estas fueron procesadas de siguiente manera (Araujo y Col., 2002).

- Las muestras de *Baccharis salicifolia* "chilca", fueron lavadas con agua corriente de grifo con la finalidad de eliminar los materiales extraños adheridos y fueron sumergidas en una solución de etanol al 70%, contenida en placa de Petri estéril, por espacio de un minuto.
- Seguidamente, transcurrido el tiempo, las hojas fueron traspasadas a otra placa de Petri estéril conteniendo hipoclorito de sodio al 3% (cloro activo), en las que permanecieron sumergidas por espacio de dos minutos.

Luego de la desinfección en la solución de hipoclorito de sodio, las hojas fueron colocadas en otra placa de Petri conteniendo una solución de etanol al 70% por un espacio de 30 segundos

Completado el proceso de desinfección, las hojas fueron enjuagadas por 6 a 7 veces con agua destilada estéril a fin de retirar el exceso de desinfectante.

Se tomó una asada del agua del último enjuague y se procedió a sembrar, por agotamiento en superficie, en una placa de Petri conteniendo agar nutritivo, la cual se incubó a 37 °C por 24 a 48 horas con la finalidad de descartar la presencia de microorganismos (control de esterilidad).

3.4.3. Obtención de fragmentos de tejidos vegetales

Después del último enjuague, las hojas fueron transferidas a otra placa de Petri estéril, conteniendo papel filtro con la finalidad de que el exceso de agua sea absorbido.

Las hojas, luego, fueron colocadas sobre otra placa de Petri estéril y con la ayuda de un bisturí y estíleles se procedió a cortar los bordes de la hoja, las que fueron eliminadas y la parte que quedó fue cortada en cuadrículas de un cm² aproximadamente.

3.4.4. Colocación de fragmentos de tejido vegetal al medio de cultivo para el aislamiento de hongos y actinomicetos endofíticos

Con la ayuda de una pinza, los fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" fueron colocadas, en posición horizontal siete fragmentos, uniformemente espaciadas, sobre medios de cultivo sólidos contenidos en placas de Petri; los medios de cultivo utilizados fueron: agar papa dextrosa, agar Sabouraud, agar almidón caseína KNO₃ y agar agua.

- Luego, las placas de Petri fueron incubadas, en posición invertida, a 25°C por 15 días, hasta obtener crecimiento de colonias de hongos y/o actinomicetos en los bordes y/o ápices de los fragmentos de hojas.

Una vez obtenidos los crecimientos, éstos fueron repicados en otras placas de Petri conteniendo medios de cultivo, en cada caso a un tipo medio de cultivo según al original; las que fueron incubadas a 25 °C por 10 días.

En algunos casos fue necesario realizar el repique varias veces hasta obtener colonias puras; estas sirvieron a su vez para anotar sus características culturales.

- Una vez purificadas las colonias de hongos, éstas fueron transferidas en viales conteniendo agar Sabouraud, obteniéndose de este modo el cepario correspondiente (Araujo y Col., 2002).

3.4.5. Prueba de identificación

Todas las colonias de hongos, crecidas en medios de cultivo sólidos, fueron observadas y agrupadas según sus características culturales que presentaron.

Por otro lado, para determinar sus características microscópicas se desarrolló la técnica del microcultivo. Las estructuras observadas han sido comparadas con las estructuras descritas en la literatura (Araujo y Col., 2002).

3.4.6. Actividad antibacteriana

La prueba de la actividad antimicrobiana de cepas de hongos endofíticos de *Baccharis salicifolia* "chilca", fue realizada a través de técnicas de bloks de gelosa, descrita por Araujo y Col. (2002).

a) Preparación del inóculo de esporas de hongos endofíticos

- Las cepas de hongos endofíticas fueron sembradas en tubos de ensayo de 16 x 150 mm conteniendo agar Sabouraud en posición inclinada; las que fueron incubadas a 25 °C por 15 días.
- Luego del tiempo de incubación se obtuvo el crecimiento de hongos y produjeron suficiente cantidad de esporas, se procedió a su cosecha con la

ayuda de una torunda estéril embebida en solución salina fisiológica (SSF) estéril.

- Las esporas fueron transferidas a un tubo de ensayo 13 x 100 mm conteniendo 2 ml de solución salina fisiológica (SSF) hasta obtener una turbidez concordante con el tubo N° 0.5 de la escala de McFarland.

b) Obtención de blocks de gelosa

- Se dispuso de placas de Petri del mismo tipo, marca y tamaño; a cada placa se vertió exactamente 15 ml de agar Sabouraud.
- Con la ayuda de una torunda estéril, en cada placa de Petri, se sembraron la suspensión de esporas, mediante estrías con líneas en tres direcciones, con la finalidad de cubrir toda la superficie del medio con esporas de las cepas de hongos endofíticos y así garantizar un crecimiento en tapete.
- Una vez cultivadas, las placas de Petri fueron incubadas a 25 °C por 15 días.
- Una vez obtenido el crecimiento en tapete (luego de 15 días) se obtuvieron discos de los mismos (blocks de gelosa) con la ayuda de un sacabocado, obteniéndose discos de 4 mm de diámetro.

c. Obtención de inóculos de cepas bacterianas

- Las cepas bacterianas con las que se enfrentaron los hongos endofíticos de *Baccharis salicifolia* "chilca" fueron: *Staphylococcus epidermidis* HRA 288, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* ATCC 2225, *Enterobacter* sp. HRA 811.
- En primer término, cada cepa bacteriana fue cultivada en caldo nutritivo contenido en tubos de ensayo de 13 x 100 ml, para su rejuvenecimiento, incubándose a 37 °C por 24 horas. Luego fueron transferidas a otros tubos

de prueba conteniendo agar nutritivo en posición inclinada para obtener una masa celular joven, para lo cual fue incubada a 37 °C por 48 horas.

- Luego de la obtención de la biomasa bacteriana, éstas fueron transferidas a un tubo de prueba de 13 x 100 ml 2 ml de solución salina fisiológica (SSF), con la ayuda de una asa de Kolle, hasta alcanzar una turbidez de concordante con el tubo Nº 0.5 de la escala de McFarland.
- La suspensión de células bacterianas fueron cultivadas en placas de Petri conteniendo agar Mueller Hinton, con la ayuda de una torunda estéril realizando estrías tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo.
- Seguidamente se dejó secar la superficie del medio de cultivo a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos hasta para que el exceso de humedad superficial fue absorbido.
- En seguida, con la ayuda de una pinza estéril, se colocaron los blocks de gelosa, conteniendo el crecimiento de hongos endofíticos de *Baccharis salicifolia* "chilca", sobre la superficie del Agar Mueller Hinton en forma espaciada de manera uniforme, presionando suavemente cada blocks para asegurar el contacto completo.
- Se incubaron las placas de Petri, en posición invertida, a 37°C por 24 a 48 horas, hasta la obtención de halos de inhibición los que fueron medidos con una regla para expresarlos en mm.

3.5. Análisis estadístico

Los resultados fueron tabulados y se presentan en cuadros y gráficos los que fueron sometidos a las pruebas de análisis de varianza mediante la prueba de Tukey utilizando el programa estadístico SPSS versión 21.

IV. RESULTADOS

Cuadro N° 01. Número de colonias de hongos endofíticos según medio de cultivo y número de muestreo. Ayacucho, 2009–2010.

Medio de cultivo		I	II	III	Total	Frecuencia (%)
AACK	M.1	2	2	3	20	28,2
	M.2	2	3	2		
	M.3	2	3	1		
AS	M.1	2	2	2	17	23,9
	M.2	2	2	1		
	M.3	1	3	2		
APD	M.1	1	2	3	21	29,6
	M.2	2	3	2		
	M.3	4	1	3		
AA	M.1	1	1	2	13	18,3
	M.2	1	2	1		
	M.3	2	2	1		
TOTAL		22	26	23	71	100

AAC-K = Agar Almidón Caseína KNO₃

AS = Agar Sabouraud

APD = Agar Papa Dextrosa

AA = Agar Agua

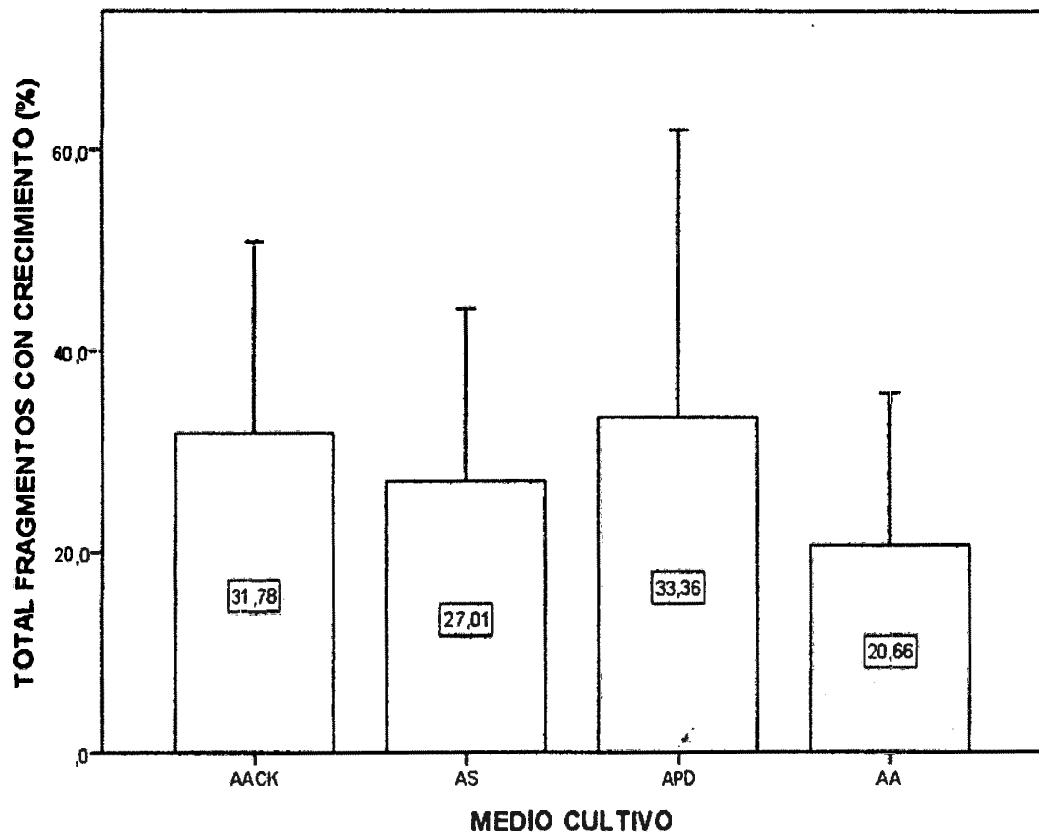
M.1, M.2, M.3 = Número de repeticiones de cada muestra por medio de cultivo.

I, II, III = Número de muestreo durante la ejecución del trabajo.

CUADRO N° 02. Descriptivos estadísticos del número de fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" según medio de cultivo. Ayacucho, 2009 -2010.

Medios de cultivo	N°	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite Inferior	Límite superior		
AACK	9	31,778	9,5333	3,1778	24,450	39,106	14,3	42,9
AS	9	27,011	8,5932	2,8644	20,406	33,616	14,3	42,9
APD	9	33,356	14,2792	4,7597	22,380	44,332	14,3	57,1
AA	9	20,656	7,5368	2,5123	14,862	26,449	14,3	28,6
Total	36	28,200	11,0619	1,8437	24,457	31,943	14,3	57,1

AAC-K = Agar Almidón Caselina KNO₃ AS = Agar Sabouraud APD = Agar Papa Dextrosa AA = Agar Agua



Gráfica N° 01. Porcentajes de fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" según medio de cultivo. Ayacucho, 2009 -2010

AACK = Agar Almidón Caseína KNO₃
 APD = Agar Papa Dextrosa

AS = Agar Sabouraud
 AA = Agar Agua

Cuadro N° 03. Frecuencia de géneros de hongos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca". Ayacucho, 2009 - 2010.

N°	CEPA	N°	Frecuencia(%)
1	Alternaria	46	64,79
2	Penicillium	25	35,21
TOTAL		71	100

Cuadro N° 04. Diámetro de halos de inhibición de hongos endofíticos de *Penicillium spp.* aislados de *Baccharis salicifolia* "chilca" frente *Staphylococcus epidermidis* HRA 288. Ayacucho, 2009- 2010.

Código	Diámetro (mm)			Frecuencia (%)
	I	II	III	
IaP1	12	9	11	10,67
IaP2	13	11	13	12,33
IIaP4	13	9	11	11,00
IcP6	10	12	13	11,67
IIaP7	9	10	8	9,00
IIcP8	11	11	12	11,33
IIbP11	10	11	12	11,00
IIcP11	10	13	10	11,00
IIaP17	12	11	13	12,00
IIIcP13	9	9	11	9,67
IIIcP18	8	10	10	9,33
IIIaP20	13	13	11	12,33

I, I, III = repeticiones

Cuadro N° 05.- Diámetro de halos de inhibición de hongos endofíticos de *Penicillium spp.* aislados de *Baccharis salicifolia* "chilca" frente a *Bacillus subtilis*. Ayacucho, 2009 - 2010.

Código	Diámetro (mm)			Frecuencia (%)
	I	II	III	
IaP1	7	11	8	8,67
IaP2	9	10	10	9,67
IIaP4	9	12	10	10,33
IcP6	11	11	12	11,33
IIaP7	12	12	11	11,67
IICP8	9	10	10	9,67
IIbP11	10	12	14	12,00
IIcP11	11	12	13	12,00
IIaP17	10	9	9	9,33
IIIdP13	7	9	11	9,00
IIICP18	10	12	11	11,00
IIaP20	8	10	10	9,33

I, II, III = repeticiones

Cuadro N° 06.- Diámetro de halos de inhibición de hongos endofíticos de *Penicillium spp.* aislados de *Baccharis salicifolia* "chilca" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Ayacucho, 2009 - 2010.

Código	Diámetro (mm)			Frecuencia (%)
	I	II	III	
IaP1	21	19	20	20,00
IaP2	19	18	18	18,33
IIaP4	19	19	18	18,67
IcP6	18	22	19	19,67
IIaP7	22	20	20	20,67
IIcP8	23	24	20	22,33
IIbP11	20	22	22	21,33
IIcP11	20	19	22	20,33
IIaP17	23	17	21	20,33
IIIcP13	19	18	20	19,00
IIIcP18	22	22	20	21,33
IIIaP20	19	20	20	19,67

I, II y III = repeticiones

Cuadro N° 07.- Diámetro de halos de inhibición de hongos endofíticos de *Alternaria spp.* aislados de *Baccharis salicifolia* "chilca" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Ayacucho, 2009 - 2010.

Código	Diámetro (mm)			Frecuencia (%)
	I	II	III	
IcA1	22	22	21	21,67
IbA2	22	22	20	21,33
IcA2	25	23	24	24,00
IdA2	21	22	22	21,67
IbA4	24	22	23	23,00
IIdA5	24	23	24	23,67
IbA6	15	18	17	16,67
IbA8	22	21	23	22,00
IIdA8	19	17	18	18,00
IlaA10	20	21	22	21,00
IlaA11	19	19	20	19,33
IlcA12	19	21	20	20,00
IIlaA15	21	19	22	20,66
IIbA17	19	23	19	20,33
IIlcA21	18	17	19	18,00
IIlcA14	20	19	22	20,33

I, II y III = repeticiones

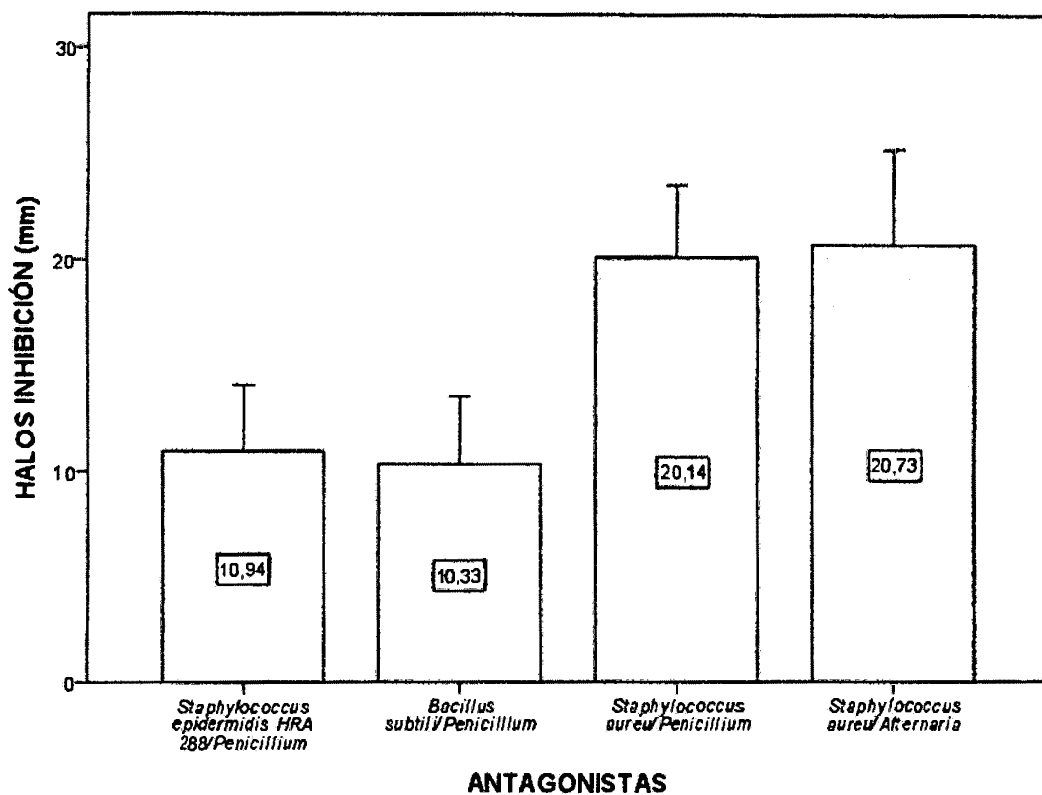
Cuadro N° 08. Prueba de Tukey de los promedios de los valores de halos de inhibición (mm) de hongos frente a bacterias. Ayacucho, 2009 - 2010.

HSD de Tukey

ANTAGONISTAS	N°	Subconjunto para alfa =0.05	
		1	2
<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Penicillium</i>	36	10,33	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> HRA 288/ <i>Penicillium</i>	36	10,94	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/ <i>Penicillium</i>	36		20,14
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/ <i>Alternaria</i>	48		20,73
Sig.		,456	,487

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 38,400.
- b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados



Gráfica N° 02.- Valores de los promedios de halos de inhibición de crecimiento de hongos endofíticos aislados frente a bacterias. Ayacucho, 2009 - 2010.

V. DISCUSIÓN

En el cuadro N° 01 se representa el número total de fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" que mostraron crecimientos de colonias de hongos endofíticos según el tipo de medio de cultivo, habiéndose utilizado cuatro medios de cultivo: agar almidón caseína KNO₃, agar Sabouraud, agar papa dextrosa y agar agua. Los valores obtenidos son el resultado de tres repeticiones y de tres muestreos, en cada repetición fueron utilizados tres placas de Petri por tipo de medio de cultivo, cada uno con siete fragmentos de hojas, haciendo un total de 84 fragmentos colocados en 12 placas de Petri por cada muestreo; en las cuales se obtuvieron, del primer muestreo un total de 22 colonias de hongos que representa un 26,2% de fragmentos que mostraron crecimiento de endofíticos, del segundo muestreo se obtuvieron un total de 26 colonias de hongos endofíticos y en el tercer muestreo 23 colonias que representan 31% y 27,4% de fragmentos que mostraron crecimiento de endofíticos, respectivamente. De un total de 252 fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" se obtuvieron crecimientos de hongos endofíticos en 71 de ellos, que representa un 28,2%. Estos resultados fueron sometidos a análisis de varianza (Cuadros N° 02) habiéndose concluido de que no existen diferencias significativas entre los valores promedios de fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" que

mostraron crecimiento de hongos endofíticos según el tipo de medio de cultivo utilizado y tampoco por el muestreo.

Hasta la actualidad se han investigado un gran número de plantas buscando la presencia de microorganismos endofíticos, en todos ellos fueron encontrados estos microorganismos; así, Malavé (2006) realizó el catastro de hongos endofíticos miceliales cultivables en hojas de la "Hierba marina" *Thalassia testudinum* en la playa Buyé, Cabo Rojo, Puerto Rico y procesó 864 fragmentos de hojas y logró aislar hongos de 66 de ellos con una tasa de presencia de estos endofíticos en un 7,64%. Los datos obtenidos por Malavé (2006) son menores a los reportados en la presente investigación que fue del 28,2% de fragmentos que mostraron crecimiento; sin embargo, Malavé (2006) reporta una mayor diversidad de hongos, específicamente ocho géneros.

El cuadro N° 03 muestra los valores de la frecuencia de géneros de hongos endofíticos aislados de fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca"; de 71 cepas aisladas éstos fueron identificadas como pertenecientes al género *Alternarias spp* 64,79% (46) y un 35,21% (25) pertenecientes al género *Penicillium spp*.

Un gran número de especies de endofíticos pueden ser aislados de tejidos sanos de una única planta; algunos factores interfieren cualitativa y cuantitativamente en la biodiversidad de la microbiota de los endofíticos, entre estos la edad de la planta, el tejido u órgano de la planta; la presencia de endofíticos ya fue constatada en innumerables plantas medicinales, entre ellas "tejo del pacífico", "copaiba" y "eucalipto" (Peixoto y Col., 2004).

Los hongos son microorganismos con gran capacidad de influir el destino y la disponibilidad de los nutrientes en un ecosistema, por lo que es viable pensar que su presencia tenga repercusiones fisiológicas en el hospedero; por ejemplo,

las especies de endófitos pueden afectar diferencialmente la tasa de uso de fotosíntesis, ya que las especies varían en sus requerimientos y preferencias nutritivas, esto podría afectar al hospedero al inducir agotamiento de ciertos productos y/o acumulación de otros, de acuerdo con la presencia y/o dominancia de ciertos endófitos (Gamboa, 2006).

Los hongos, actinomicetos y las bacterias están indisolublemente asociadas a las plantas como patogénicas, epifitas, endofíticas, simbióticas y antagónicas; muchas forman asociaciones íntimas con las plantas y forman grupos diversos filogenéticamente representados por especies pertenecientes a los principales taxones. Los microorganismos asociados a las plantas intercambian señales con su hospedero y poseen diversos mecanismos para su adaptación y colonización. Aspectos importantes de la diversidad de endofíticos en el ecosistema incluyen los diferentes procesos que estos realizan, la complejidad de la interacción y el número de niveles tróficos que los componen (Pérez y Col., 2005).

Chapaval (2006) realizó el aislamiento de hongos endofíticos a partir de las hojas de la "hierba-mate" *Ilex paraguariensis* nativas y cultivadas, obteniendo resultados de la existencia de una gran diversidad fúngica en hojas adultas que en las jóvenes, del mismo modo existe gran diversidad de hongos endofíticos en las hojas de la hierba- mate nativa que en las que son cultivadas; entre los hongos endofíticos aislados destacan los géneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Dendrophoma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Verticillium* y 13 hongos a un no identificados.

Por otro lado, Ramírez y Col. (2006), en Ecuador, aislaron cepas fúngicas endofíticas, entre ellas a los géneros *Aspergillus* y *Alternaria* a partir de plantas medicinales de las especies *Piper barbatum* y *Baccharis obtusifolia*.

Malavé (2006) realizó el catastro de hongos endofíticos miceliales cultivables en hojas de la "Hierba marina" *Thalassia testudinum* en la playa Buyé, Cabo Rojo, Puerto Rico, habiendo reportado el aislamiento de ocho cepas de hongos, entre ellas al *Penicillium sp.* De igual manera Peixoto y Col. (2006) informan que el "maíz" *Zea mays* posee como hongos endofíticos a más de 22 especies de hongos, entre ellos a *Penicillium spp.* Por otro lado, Pérez y Col. (2005) en la investigación titulada "Hongos asociados a eucalipto, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid, en México, y reportan haber aislado hasta nueve especies de hongos endofíticos diferentes, entre ellos, a *Alternaria sp.* y *Penicillium sp.*, indicando además que la especie *Alternaria sp.* fue la que se encontró en mayor frecuencia.

Los resultados obtenidos por los investigadores citados en los párrafos anteriores corroboran que especies de los géneros *Alternaria* y *Penicillium* fueron aislados como endofíticos en otras plantas, coincidiendo con los aislamientos obtenidos en el presente trabajo de investigación.

Por otro lado, Araujo y Col., (2002) indican que realizaron un trabajo de investigación en Brasil acerca del aislamiento de actinomicetos endofíticos de raíces y hojas de "maíz" (*Zea mays* L.) habiendo aislado actinomicetos de los géneros *Microbispora*, *Streptomyces* y *Streptosporangium*. Sin embargo, en la presente investigación no se logró aislar ninguna cepa de actinomicetos, cuya razón podría ser que *Baccharis salicifolia* "chilca" no posee como endofíticos especies de actinomicetos o caso contrario los medios de cultivo utilizados no permitieron su crecimiento.

Los Cuadros Nº 4, 5, 6 y 7 muestran el diámetro de halos (mm) de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus epidemidis* HRA 288, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente al hongos endofíticos de los

Alternaria spp. y *Penicillium spp.* aislados de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca". Cada prueba del estudio del efecto antibacteriano fue repetida por tres veces, la actividad inhibitoria por parte del hongo se consideró positiva cuando se verificó la presencia de halos sin crecimiento bacteriano; en los diferentes casos se obtuvieron halos desde 7 a 24 mm de diámetro.

Ramírez y Col. (2006) mencionan que se ha descrito en la literatura que los metabolitos secundarios fúngicos tienen una acción protectora contra los insectos herbívoros en gramíneas y coníferas (entre otras) y un buen número de ellos son potenciales antimicrobianos; del mismo modo, Picco y Rodolfi (2004) resultan de interés considerar que dentro de los beneficios medicinales de plantas, se mezcla su acción analgésica, antiinflamatoria y antimicrobiana, donde los endófitos fúngicos podrían contribuir en sus efectos benéficos en la farmacopea popular.

En el Cuadro N° 08 se muestran los descriptivos estadísticos de diámetros de halos de inhibición de cepas bacterianas frente a hongos endofíticos aislados de *Baccharis salicifolia* "chilca", cuyo resultados nos indican que existe diferencias significativas ($\alpha=0,000$) el tamaño de los halos de inhibición entre grupos de tratamiento; presentándose un menor efecto antibacteriano de cepas de *Penicillium spp.* frente a *Bacillus subtilis* con un valor promedio de 10,33 mm de diámetro de halo de inhibición, seguido por el efecto de cepas de *Penicillium spp.* frente a *Staphylococcus epidermidis* HRA 288 con 10,94 mm de diámetro de halo como promedio; las cepas de *Alternaria spp.* mostraron un mayor efecto antagónico frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, con un valor promedio de 20,73 mm, antecedido por las cepas de *Penicillium spp.* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con un valor promedio de 20,14 mm.

De esta forma mostrándonos que hay diferencia significativa entre grupos y que las interacciones entre *Penicillium spp.* frente a *Bacillus subtilis* y *Penicillium spp.* frente a *Staphylococcus epidermidis* HRA 288 mostraron un menor efecto antagónico formando parte de un grupo diferente al de las interacciones de *Alternaria spp.* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Penicillium spp.* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, que mostraron un mayor efecto antagónico, perteneciendo a otro grupo. Situación que se evidencia en el gráfico N°2.

Según Ramírez y col. (2006), en el trabajo de investigación titulado “Actividad antagónica de hongos endofíticos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas” realizado en la Universidad Técnica Particular de Loja, en el que evaluaron el efecto antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus subsp.aureus* (ATCC, 25923), *Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae*, (ATCC, 9997), *Pseudomonas aeruginosa*, (ATCC, 27853) y, *Escherichia coli* (ATCC, 25922) con cepas fúngicas endofíticas aisladas de *Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Piper barbatum*, *Borreira laevis*, *Chuquiquiragua jussieui* y *Bidens andicola*, pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Nigrospora* y *Phoma*, entre los principales géneros, indican que, la mayoría de las cepas fúngicas estudiadas presentaron actividad antagónica. Areias da Silva (2006) en el trabajo de investigación titulado “Evaluación de la actividad antimicrobiana de hongos y actino-bacterias endofíticos aislados de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist “rabo de raposa”; en la Universidad Federal de Pernambuco, Brasil, aisló 53 cepas de hongos, 126 bacterias y cuatro actinomicetes, la actividad antimicrobiana fue evaluada por el método de Block de gelosa contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*,

Malassezia furfur y *Malassezia sympodialis*, mostrando la mayoría efectos antimicrobianos con halos de inhibición que varían entre 10 mm y 30 mm.

Los trabajos de Areias de Silva (2006) y Ramírez y Col. (2006) corroboran los resultados obtenidos en esta investigación, habiéndose demostrado los efectos inhibitorios de cepas de hongos endofíticos contra *Staphylococcus* y *Bacillus subtilis*.

VI. CONCLUSIONES

1. A partir de las hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" se aislaron 71 colonias de hongos endofíticos, de las cuales 46 (64,79%) pertenecen al género *Alternaria* y 25 (35,21%) al género *Penicillium*.
2. De las 46 cepas de hongos endofíticos del género *Alternaria* aislados, 24 (52,2%) mostraron efecto antagónico contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y; de las 25 cepas de *Penicillium* spp. 12 (48%) mostraron efecto antagónico contra *Staphylococcus epidermidis* HRA 288, *Bacillus subtilis* y/o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
3. Los hongos endofíticos *Alternaria* spp. y *Penicillium* spp. aislados de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" mostraron inhibición de crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* HRA 288, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con halos de 7 a 24 mm de diámetro.
4. En el presente trabajo de investigación no se logró aislar ninguna cepa de actinomicetos, cuya razón podría ser que *Baccharis salicifolia* "chilca" no posee como endofíticos especies de actinomicetos o en caso contrario los medios de cultivo utilizado no permitieron su crecimiento.

VII. RECOMENDACIONES

Continuar con el presente trabajo de investigación, determinando específicamente llegar a identificar las especies de hongos endofíticos y realizar las actividades antibacterianas de hongos y actinomicetos frente a bacteria patógenas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Araújo, W., Sousa, A., Azevedo, J., Kuklinsky, J. y Teixeira, P. 2002.** Manual de aislamiento de microorganismos endofíticos. Universidad de Sao Paulo - Brasil.
2. **Areias de Silva, R. 2006.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de hongos y actino-bacterias endofíticos aislados de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist "rabo de raposa"; en la Universidad Federal de Pernambuco, Brasil.
3. **Arnold A. y Herre, E. 2003.** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proc Natl Acad Sci USA.
4. **Azevedo, L., Maccheroni, W., Pereira, O. y Araujo, L. 2000.** Endophytic microorganisms: a review and insect control and recent advances on tropical plants. Electronic journal of Biotechnology. Vol. 3 N° 1: pp 40-65.
5. **Bacon, C. y Hinton, D. 2002.** Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavenis* and related species. Biological Control. New York.
6. **Barrios, M. 2006.** Estudio de Hongos Endofíticos como inductores de Resistencia para el control de Sigatoka Negra (*Micosphaerella fijiensis*) en plátano. Universidad del Tolima. Costa Rica.
7. **Canon, P. y Simmons, C. 2002.** Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve. Guayana. Vol. 94 N° 2: p. 202.
8. **Cisneros, J. 2011.** Hongos y Actinomycetos endofíticos de *Piper elongatum* "matico" y su efecto antimicrobiano. Tesis para optar el título profesional de Biólogo-UNSCH. Ayacucho, 2010 – 2011.
9. **Chapaval, I. 2006.** Fungos endofíticos en folhas de Erva mate *Ilex paraguariensis*. Eng. Agrônoma. Floresta, Colombia. Vol 23 N° 45: pp. 109 – 124.
10. **Chávez, P. 2006.** Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Rodopholus similis*. Universidad de Tolima. Costa Rica.
11. **Cronquist, A. 1988.** The evolution and classification of flowering plants. 2ª edición. New York Botanical Garden, Bronx.
12. **Gamboa, G. 2006.** Hongos endofíticos tropicales: conocimientos actuales y perspectivas; Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Colombia.

13. **MacArthur, D. y McGee, P. 2000.** A Comparison of the Endophytic Fungi from Leaves of *Banksia integrifolia* at Three Sites on the East Coast of Australia. *Australasian Mycologist*. Australia. Vol. 2 N° 19:pp. 80 –83.
14. **Malavé, S. 2006.** Catastro de hongos endofíticos micelales cultivables en hojas de la hierba marina *Thalassia testudinum* en playas Buyé, Cabo Rojo, Puerto Rico.
15. **Makowiecky, R. 2006.** Comunidade de fungos endofíticos asociada a caña de azúcar convencional e genéticamente modificada. Universidad de Sao Paulo. Brasil.
16. **Ordoñez, P. y Vega, M. 2005.** Estudio fitoquímico de especies vegetales nativas utilizadas en la medicina tradicional de la Provincia de Loja. Ecuador.
17. **Orozco, F., Medina, M. y Sarria, P. 2005.** Aislamiento y evaluación de microorganismos endofíticos de *Alnus acuminata* “alisos o lambrá” var. *Acuminata* Universidad Nacional de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Colombia.
18. **Okuda, T. 2000.** Media and incubation effects on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. Vol. 4. N° 7: p 83–99.
19. **Pérez, O., Yáñez, M., Alvarado, D., Cibrián, D. y García, S. 2005.** Hongos asociados a eucalipto, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid. Universidad de Autónoma Chapingo. México. Vol. 39, N° 3, pp. 311-318.
20. **Peixoto, P., Azevedo, J. y Araujo, W. 2006.** Interacción con plantas y potencial biotecnológico de microorganismos endofíticos. Universidad de Mogidas Cruzes, Sao Paulo Brasil.
21. **Picco, A. y Rodolfi, M. 2004.** Endophytism in grasses with reference to an experience in Northern Italy. In: Ragazzi A., Moricca S., Dellavalle I. (eds.) *Endophytism in Forest Trees*. Italia.
22. **Pocasangre, L. 2002.** Mejoramiento biológico de vitroplantas de banano mediante la utilización de hongos endofíticos para el control del nematodo barrenador *Radopholus similis*. In Riveros, AS. Turrialba (Costa Rica).
23. **Ramírez, R., Yandry, J., Delgado, E., Rodolfi, M. y Solveig, T. 2006.** Actividad antagónica de hongos endofíticos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador.

24. **Salazar, W.; Cárdenas, J.; Pacheco, L. 2007.** Estudio taxonómico y fotoquímico de plantas medicinales nativas del Perú. Lima, Perú. CONCYTEC.
25. **Salgado, C. y Cepero, M. 2005.** Aislamiento de hongos endofitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia.
26. **Salgado, Y. 2002.** Introducción a la micología aplicada. Edit. Universidad de Antioquia, Medellín.
27. **Saikkonen, K.; Faeth, S.; Helander, M. y Sullivan, T. 2004.** Fungal endophytes: A continuum of interactions wit host planta. Harwood Academic Publishers, Australia.
28. **Sayuri, C. 2006.** Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacao *Theobroma cacao*. Universidad de San Paulo. Brasil.
29. **Seifert, K. y Frisvad J. 2002.** Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia.
30. **Seifert, K. y Giuseppin S. 2000.** Cycloheximide tolerance as a taxonomic character in *Penicillium*. pp. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia.
31. **Yaojian, H., Jianfeng, W., Guiling, L., Zhonghui, Z. y Wenjin, S. 2001.** Antitumorand antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortune* and *Torreya Grandis*. University Xiamen. China.
32. **Zaragoza, T. 2003.** Bioactividad de aceites esenciales y extractos de plantas medicinales y aromáticas de la región sur del Ecuador. Actividad antagónica de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. Loja y Zamora – Chinchipe Ecuador.

ANEXOS

ANEXO N°01

Número de colonias de hongos endofíticos de las hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" en función al medio de cultivo utilizado.

Medio	Nº de muestra	Genero de cepas	Nº de colonias	%
AACK	M.1	Alternaria / Penicillium	7	9,86
	M.2	Alternaria / Penicillium	7	9,86
	M.3	Alternaria / Penicillium	6	8,45
AS	M.1	Alternaria / Penicillium	6	8,45
	M.2	Alternaria / Penicillium	5	7,04
	M.3	Alternaria / Penicillium	6	8,45
APD	M.1	Alternaria / Penicillium	6	8,45
	M.2	Alternaria / Penicillium	7	9,86
	M.3	Alternaria / Penicillium	8	11,28
AA	M.1	Alternaria / Penicillium	4	5,64
	M.2	Alternaria	4	5,64
	M.3	Alternaria / Penicillium	5	7,04
TOTAL			71	100

AACK = Agar Almidón Caseína KNO₃
 APD = Agar Papa Dextrosa

AS = Agar Sabouraud
 AA = Agar Agua

ANEXON°02

Número de colonias, géneros y características culturales de hongos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" según medio de cultivo, primer muestreo.

Medio	Código	N° de colonias	Género	Características culturales
AACK	laA5 laA6 laA8 laA9	4	Alternaria	Blanco algodonoso ligeramente transparente, y la por la inversa coloración negruzca
	laP1 * laP2 *	2	Penicillium	Verde petróleo pulverulento con borde central blanco, inverso blanquecino.
AS	lbA1 lbA2 * lbA3 lbA4 *	4	Alternaria	Blanco algodonoso transparente con centros redondeados pulverulentos
	lbP9	1	Penicillium	Verde oscuro redondeado pulverulento
APD	lcA1 * lcA2 * lcA3 lcA4	4	Alternaria	Colonias blancos con presencia de puntos algodonosos
	lcP5 lcP6 *	2	Penicillium	Verde pulverulento, borde blanco, inverso color amarillo rojizo
AA	ldA1 ldA2*	2	Alternaria	Colonias transparentes con puntos negros en el centro
	ldP3 ldP4 ldP10	3	Penicillium	Colonias verde pulverulentos notorios
TOTAL		22		

ANEXON°03

Número de colonias, géneros y características culturales de hongos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" según medio de cultivo, segundo muestreo.

Medio	Código	N° de colonias	Géneros	Características culturales
AACK	IIaA10 * IIaA11 * IIaA12 IIaA13	4	Alternaria	Blanco plomizo algodonoso, inverso pardo oscuro
	IIaP3 IIaP4 * IIaP7 * IIaP17 *	4	Penicillium	Borde blanquecino pulverulento, con centro verdoso
AS	IIbA5 IIbA6 * IIbA7 IIbA8 * IIbA13	5	Alternaria	Blanco algodonoso transparente , inverso marrón negruzco
	IIbP10 IIbP11 *	2	Penicillium	Borde blanco, centro color verde pulverulento, inverso color blanquecino
APD	IIcA9 IIcA10 IIcA11 IIcA12 *	4	Alternaria	Plomo verde, centro redondeado pulverulento
	IIcP7 IIcP8 *	2	Penicillium	Borde blanco y con centro de color verde, pulverulento, inverso color blanco
AA	IIdA5 * IIdA6 IIdA7 IIdA8 *	4	Alternaria	Colonias transparentes con puntos negros en el centro
	IIdP11 *	1	Penicillium	Colonias verde petróleo pulverulento
TOTAL		26		

ANEXO N°04

Número de colonias, géneros y características culturales de hongos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" según medio de cultivo, tercer muestreo.

Medio	Código	Nº de colonias	Género	Características culturales
AACK	IIIaA14 IIIaA15 * IIIaA16	3	Alternaria	Plomo algodonoso, inverso color marrón negruzco
	IIIaP18 IIIaP19 IIIaP20 *	3	Penicillium	Verde pulverulento, bordes blancos, inverso de color blanco
AS	IIIbA14 IIIbA15 IIIbA16 IIIbA17 *	4	Alternaria	Blanco algodonoso, inverso color marrón
	IIIbP12	1	Penicillium	Verde algodonoso con blanco, inverso de color blanco
APD	IIIcA13 IIIcA14 * IIIcA15 IIIcA16 IIIcA19 IIIcA20 IIIcA21 *	7	Alternaria	Plomo, verde, marrón con centros redondeados, pulverulento
	IIIcP17 IIIcP18 *	2	Penicillium	Verde pulverulento, bordes blancos, inverso de color naranja
AA	IIIdA9	1	Alternaria	Blanco transparente con puntos negruzcos
	IIIdP12 IIIdP13 *	2	Penicillium	Verde oscuros, pulverulento
TOTAL		23		

ANEXON°05

Halos de inhibición de crecimiento de bacterias según géneros de hongos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca".

Genero	Código	Primera repetición (mm)						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
Penicillium	IaP1	12	---	---	7	---	21	---
Penicillium	IaP2	13	---	---	9	---	19	---
Alternaria	IcA1	---	---	---	---	---	22	---
Alternaria	IbA2	---	---	---	---	---	22	---
Alternaria	IcA2	---	---	---	---	---	25	---
Alternaria	IdA2	---	---	---	---	---	21	---
Penicillium	IlaP4	13	---	---	9	---	19	---
Alternaria	IbA4	---	---	---	---	---	24	---
Alternaria	IIdA5	---	---	---	---	---	24	---
Alternaria	IlbA6	---	---	---	---	---	15	---
Penicillium	IcP6	10	---	---	11	---	18	---
Penicillium	IlaP7	9	---	---	12	---	22	---
Alternaria	IlbA8	---	---	---	---	---	22	---
Penicillium	IcP8	11	---	---	9	---	23	---
Alternaria	IIdA8	---	---	---	---	---	19	---
Alternaria	IlaA10	---	---	---	---	---	20	---
Alternaria	IlaA11	---	---	---	---	---	19	---
Penicillium	IlbP11	10	---	---	10	---	20	---
Alternaria	IlcA12	---	---	---	---	---	19	---
Penicillium	IIdP11	10	---	---	11	---	20	---
Penicillium	IlaP17	12	---	---	10	---	23	---
Alternaria	IllaA15	---	---	---	---	---	21	---
Penicillium	IIdP13	9	---	---	7	---	19	---
Alternaria	IllbA17	---	---	---	---	---	19	---
Penicillium	IllcP18	8	---	---	10	---	22	---
Alternaria	IllcA21	---	---	---	---	---	18	---
Alternaria	IllcA14	---	---	---	---	---	20	---
Penicillium	IllaP20	13	---	---	8	---	19	---

I = *Staphylococcus epidermidis* HRA 288

II = *Escherichia coli* ATCC 35218

III = *Escherichia coli* ATCC 25822

IV = *Bacillus subtilis*

V = *Micrococcus luteus* ATCC 2225

VI = *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

VII = *Enterobacter sp* HRA 811

ANEXON°06

Halos de inhibición de crecimiento de bacterias según genero de hongos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca".

Genero	Código	Segunda repetición (mm)						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
Penicillium	IaP1	9	---	---	11	---	19	---
Penicillium	IaP2	11	---	---	10	---	18	---
Alternaria	IcA1	---	---	---	---	---	22	---
Alternaria	IbA2	---	---	---	---	---	22	---
Alternaria	IcA2	---	---	---	---	---	23	---
Alternaria	IdA2	---	---	---	---	---	22	---
Penicillium	IlaP4	9	---	---	12	---	19	---
Alternaria	IbA4	---	---	---	---	---	22	---
Alternaria	IIdA5	---	---	---	---	---	23	---
Alternaria	IlbA6	---	---	---	---	---	18	---
Penicillium	IcP6	12	---	---	11	---	22	---
Penicillium	IlaP7	10	---	---	12	---	20	---
Alternaria	IlbA8	---	---	---	---	---	21	---
Penicillium	IICP8	11	---	---	10	---	24	---
Alternaria	IIdA8	---	---	---	---	---	17	---
Alternaria	IlaA10	---	---	---	---	---	21	---
Alternaria	IlaA11	---	---	---	---	---	19	---
Penicillium	IlbP11	11	---	---	12	---	22	---
Alternaria	IICa12	---	---	---	---	---	21	---
Penicillium	IIdP11	13	---	---	12	---	19	---
Penicillium	IlaP17	11	---	---	9	---	17	---
Alternaria	IIIaA15	---	---	---	---	---	19	---
Penicillium	IIIIdP13	9	---	---	9	---	18	---
Alternaria	IIIbA17	---	---	---	---	---	23	---
Penicillium	IIIcP18	10	---	---	12	---	22	---
Alternaria	IIIcA21	---	---	---	---	---	17	---
Alternaria	IIIcA14	---	---	---	---	---	19	---
Penicillium	IIIaP20	13	---	---	10	---	20	---

I = *Staphylococcus epidermidis* HRA 288 V = *Micrococcus luteus* ATCC 2225
 II = *Escherichia coli* ATCC 35218 VI = *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
 III = *Escherichia coli* ATCC 25822 VII = *Enterobacter* sp HRA 811
 IV = *Bacillus subtilis*

ANEXON°07

Halos de inhibición de crecimiento de bacterias según genero de hongos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca"

Genero	Código	Tercera repetición (mm)						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
Penicillium	IaP1	11	---	---	8	---	20	---
Penicillium	IaP2	13	---	---	10	---	18	---
Alternaria	IcA1	---	---	---	---	---	21	---
Alternaria	IbA2	---	---	---	---	---	20	---
Alternaria	IcA2	---	---	---	---	---	24	---
Alternaria	IdA2	---	---	---	---	---	22	---
Penicillium	IlaP4	11	---	---	10	---	18	---
Alternaria	IbA4	---	---	---	---	---	23	---
Alternaria	IIdA5	---	---	---	---	---	24	---
Alternaria	IlbA6	---	---	---	---	---	17	---
Penicillium	IcP6	13	---	---	12	---	19	---
Penicillium	IlaP7	8	---	---	11	---	20	---
Alternaria	IlbA8	---	---	---	---	---	23	---
Penicillium	IicP8	12	---	---	10	---	20	---
Alternaria	IIdA8	---	---	---	---	---	18	---
Alternaria	IlaA10	---	---	---	---	---	22	---
Alternaria	IlaA11	---	---	---	---	---	20	---
Penicillium	IibP11	12	---	---	14	---	22	---
Alternaria	IicA12	---	---	---	---	---	20	---
Penicillium	IIdP11	10	---	---	13	---	22	---
Penicillium	IlaP17	13	---	---	9	---	21	---
Alternaria	IIIaA15	---	---	---	---	---	22	---
Penicillium	IIIIdP13	11	---	---	11	---	20	---
Alternaria	IIIbA17	---	---	---	---	---	19	---
Penicillium	IIIcP18	10	---	---	11	---	20	---
Alternaria	IIIcA21	---	---	---	---	---	19	---
Alternaria	IIIcA14	---	---	---	---	---	22	---
Penicillium	IIIaP20	11	---	---	10	---	20	---

I = *Staphylococcus epidermidis* HRA 288 V = *Micrococcus luteus* ATCC 2225
 II = *Escherichia coli* ATCC 35218 VI = *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
 III = *Escherichia coli* ATCC 25822 VII = *Enterobacter* sp HRA 811
 IV = *Bacillus subtilis*

ANEXON°08

Análisis de varianza del número de fragmentos que mostraron crecimiento de colonias de hongos endofíticos según el tipo de medio de cultivo.

Total fragmentos con crecimiento(%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	879,411	3	293,137	2,756	,058
Intra-grupos	3403,409	32	106,357		
Total	4282,820	35			

ANEXON°09

Análisis de varianza de diámetros de halos de inhibición de cepas bacterianas frente a hongos endofíticos de *Baccharis salicifolia* "chilca".

	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3765,685	3	1255,228	380,316	,000
Intra-grupos	501,674	152	3,300		
Total	4267,359	155			

ANEXO N° 10

Descriptivos estadísticos de diámetros de halos de inhibición (mm) de hongos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" frente a cepas bacterianas.

	N°	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> HRA 288/ <i>Penicillium</i>	36	10,94	1,530	,255	10,43	11,40	8	13
<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Penicillium</i>	36	10,33	1,586	,264	9,80	10,87	7	14
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/ <i>Penicillium</i>	36	20,14	1,693	,282	19,57	20,71	17	24
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/ <i>Alternaria</i>	48	20,73	2,219	,320	20,08	21,37	15	25
Total	156	15,94	5,247	,420	15,11	16,77	7	25

ANEXON°11



Hojas e inflorescencia de *Baccharis salicifolia* "chilca".

ANEXON°12



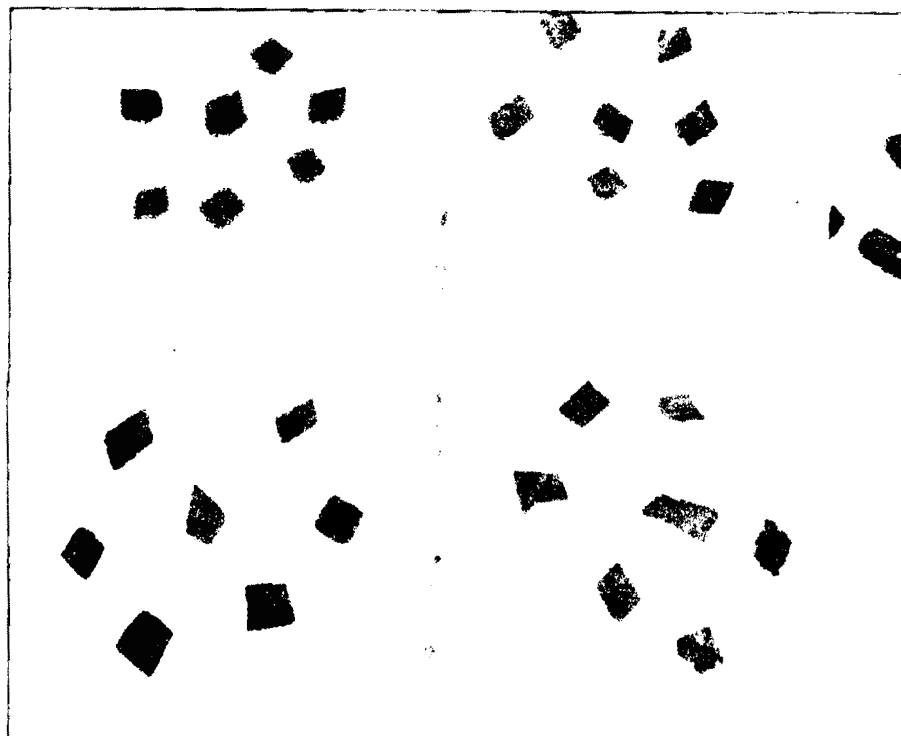
Hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca".

ANEXO Nº 13



Hojas de baccharis salicifolia "chilca" para el proceso de desinfección.

ANEXON°14



Fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" colocadas sobre medios de cultivo.

ANEXON°15



Crecimiento de colonias de hongos endofíticos en fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca"

ANEXO N° 16



Hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca"



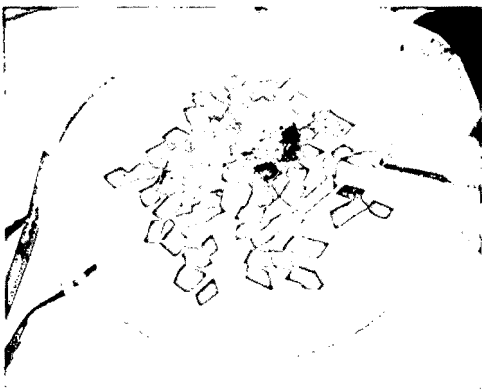
Desinfección con alcohol al 70% y lejía al 3%



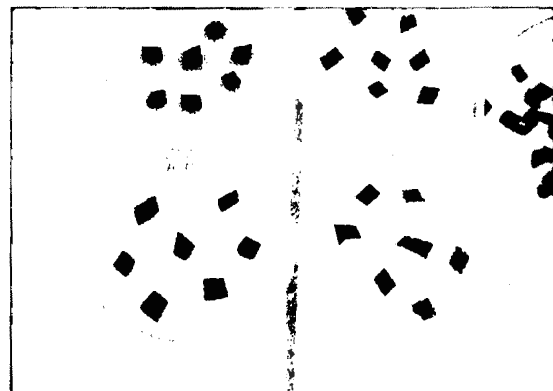
Lavado de las hojas con agua destilada estéril por 6 a 7 veces.



Sembrado del último lavado de agua en Agar nutritivo - control de calidad



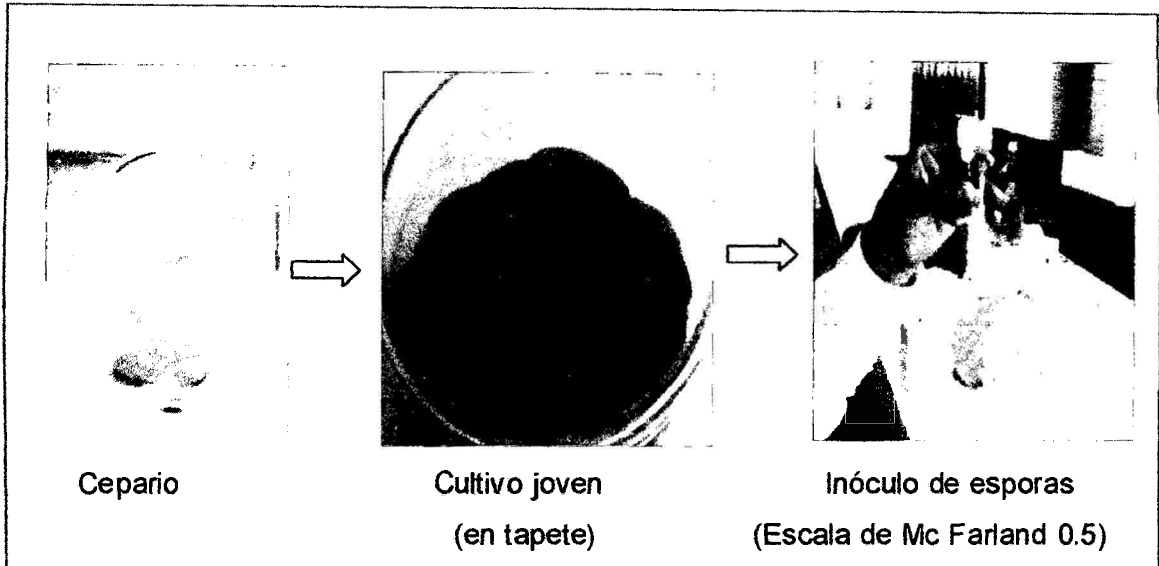
Trozados de las hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca"



Sembrado de los trozos de las hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca"

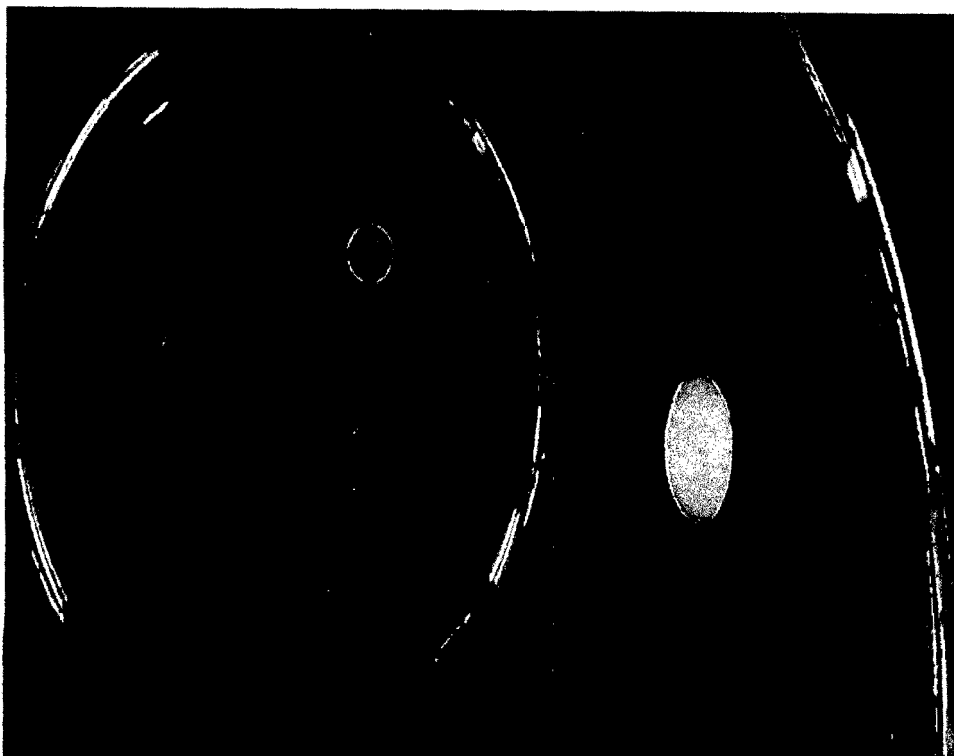
Flujograma del proceso de desinfección y cultivo de las hojas en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Escuela de Formación Profesional de Biología.

ANEXO N°17



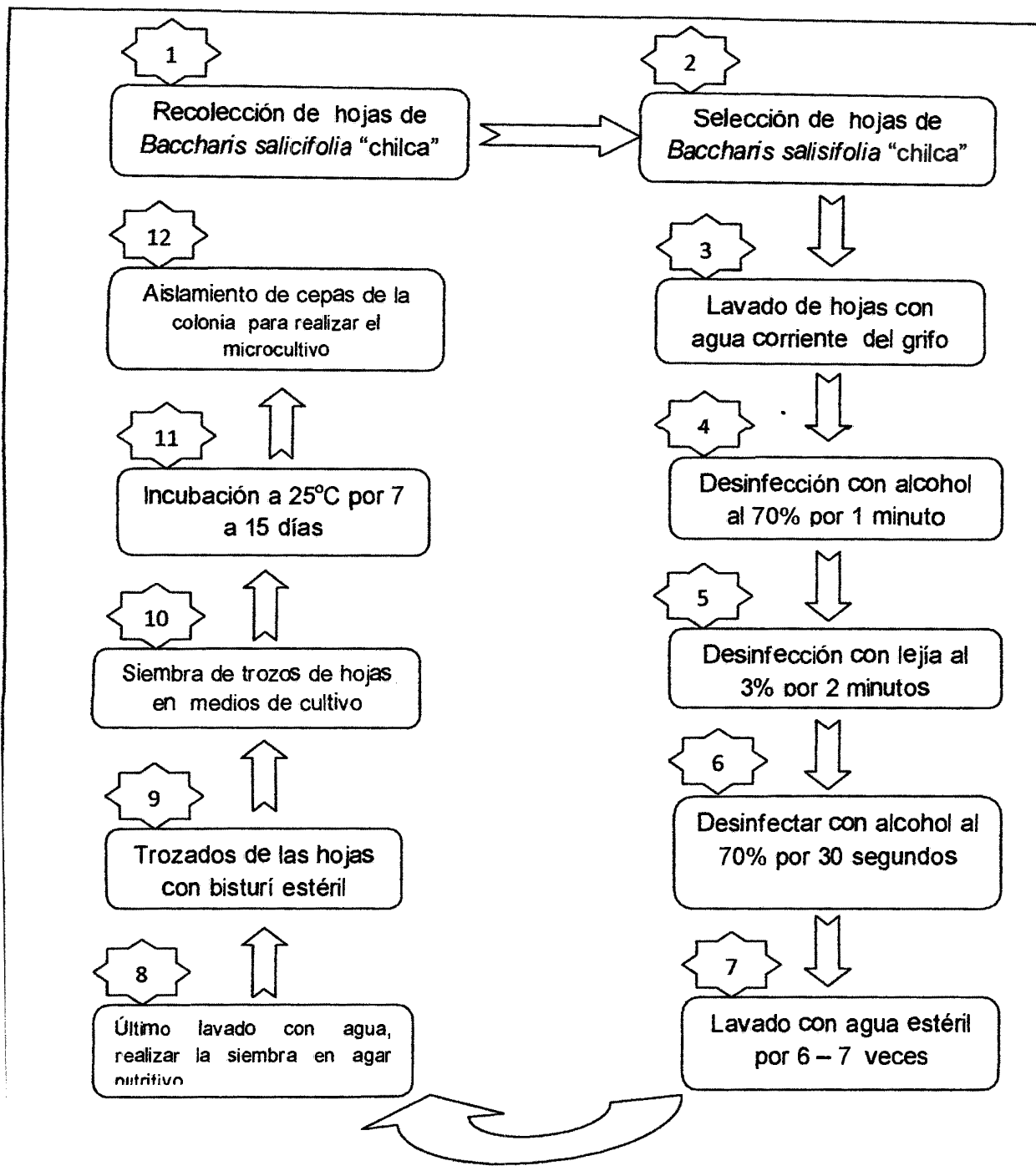
Flujograma de preparación de inóculo de esporas de hongos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca"

ANEXON°18



Halos de inhibición de hongos endofíticos frente a bacterias patógenas.

ANEXO N° 19



Flujograma del aislamiento e identificación de hongos y actinomicetos endofíticos de *Baccharis salicifolia* "chilca".



EL JEFE DEL "HERBARIUM HUAMANGENSIS" DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Biología, Sr. **Elmer Félix, GÁMBOA MARTÍNEZ**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1 988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GENERO	:	Baccharis
ESPECIE	:	<i>Baccharis salicifolia R. & P.</i>
SINONIMIA	:	Baccharis glutinosa Pers
"	:	Baccharis lanceolata Kunth.
N.V.	:	"chilca", "chilca blanca"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 08 de Abril del 2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Bach. Elmer Félix Gámboa Martínez
JEFE

ANEXO N° 21

Matriz de consistencia

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	VARIABLES	METODOLOGIA
Actividad antibacteriana de hongos y actinomicetos endofíticos de <i>Baccharis salicifolia</i> "Chilca". Ayacucho 2009 - 2010.	¿Cuál es el efecto antimicrobiano de hongos y actinomicetos endofíticos de <i>Baccharis salicifolia</i> "Chilca"?	-Aislar e identificar los hongos y actinomicetos endofíticos de hojas de <i>Baccharis salicifolia</i> "Chilca" procedente de la comunidad de Quinua. -Evaluar la actividad antimicrobiana de cepas de hongos y actinomicetos aislados de hojas de <i>Baccharis salicifolia</i> "Chilca" frente a diversas cepas microbianas.	-Antecedentes -Descripción de la planta <i>Baccharis salicifolia</i> "Chilca". -Microorganismos endofíticos -Endofitismo como fenómeno biológico. -Hongos endofíticos (HE). -Importancia de hongos endofíticos -Actinomicetos endofíticos (AE). -Efectos benéficos de los microorganismos endofíticos -Diversidad de microorganismos endofíticos. -Interacción planta y microorganismo: <i>Baccharis salicifolia</i> "Chilca" (Muestra biológica) -Descripción de los géneros de hongos endofíticos hallados en <i>Baccharis salicifolia</i> "Chilca" - Penicillium - Alternaria	-Efecto antimicrobiano de hongos y actinomicetos endofíticos de <i>Baccharis salicifolia</i> "Chilca" -Número de cepas de hongos y actinomicetos endofíticos aislados de <i>Baccharis salicifolia</i> "Chilca"	-Tipo de investigación: Básica -Procedimiento de colecta de muestra -Aislamiento de hongos y actinomicetos endofíticos. Método de aislamiento del tejido vegetal. -Desinfección y preparación para el aislamiento. -Obtención de fragmentos de tejidos vegetales. -Inoculación de fragmentos de tejido vegetal al medio de cultivo. -Identificación para Hongos: -Microcultivo: (para hongos) -Actinomicetos: (Observación de estructuras reproductivas en fresco). -Observación microscópica: -Técnica para la determinación de actividad antibacteriana de cepas de hongos y actinomicetos aislados: Técnica de difusión de blocks de gelosa Test antibacteriano con blocks de gelosa:

Actividad antibacteriana de hongos y actinomicetos endofíticos de *Baccharis salicifolia* "chilca". Ayacucho 2009 –2010.

Elmer Félix Gamboa Martínez, Saúl Alonso Chuchon Martínez
Escuela de Formación Profesional de Biología, "UNSCH"

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo aislar e identificar los hongos y actinomicetos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" y evaluar la actividad antibacteriana frente a diversas cepas bacterianas, se ejecutó entre los meses de marzo a agosto de 2010. Las hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca", fueron recolectadas del distrito de Quinua del sector de las Pampas de Ayacucho, ubicada entre 3200 a 3300 m.s.n.m., provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho, entre los meses de marzo y abril, entre las 7:00 – 8:00 horas de la mañana. Las muestras colectadas estuvieron libres de cualquier tipo de lesión causados por patógenos o insectos y se depositaron en bolsas de polietileno para su transporte al Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, donde se procesaron estas muestras, las mismas que fueron desinfectadas con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 3% según la técnica de Araujo y col., (2002). Luego las hojas fueron cortadas en cuadrículas de un cm² aproximadamente y colocadas en los medios de cultivo: Agar Almidón Caseína KNO₃, Agar Sabouraud, Agar Papa Dextrosa y Agar Agua, que fueron incubados a 25°C por 7 a 15 días, obteniéndose crecimiento de colonias de hongos los que fueron identificando mediante sus características macroscópicas y microscópicas. Para la actividad antimicrobiana se utilizaron bacterias patógenas enfrentadas con cepas fúngicas en block de gelosa. Concluyéndose que a partir de *Baccharis salicifolia* "chilca" se aislaron 71 cepas fúngicas de los géneros de *Penicillium* spp. y *Alternaria* spp., mostrando efecto antibacteriano el género de *Penicillium* spp. frente *Staphylococcus epidermidis* HRA 288, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, mientras el género *Alternaria* spp. mostró efecto antibacteriano para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Palabra clave: Actividad antibacteriana, hongos endofíticos, actinomicetos endofíticos y *Baccharis*.

SUMMARY

The present investigation had as objective to isolate and to identify the mushrooms and actinomicetos endofíticos of leaves of *Baccharis salicifolia* "chilca" and to evaluate the antibacterial activity in front of diverse bacterial stumps, it was executed among the months of March to August of 2010. The leaves of *Baccharis salicifolia* "chilca", they were gathered of the district of Quinua of the sector of the Pampas of Ayacucho, located among 3200 to 3300 m.s.n.m., county of Huamanga of the department of Ayacucho, between the months of March and April, among 7:00 o'clock - 8:00 hours of the morning. The collected samples were free of any lesion type caused by patógenos or insects and they were deposited in polyethylene bags for their transport to the Laboratory of Environmental Microbiology of the Ability of Biological Sciences of the National University of San Cristóbal of Huamanga, where these samples were processed, the same ones that were disinfected with alcohol to 70% and hipoclorito of sodium to 3% according to the technique of Araujo and cabbage., (2002). Then the leaves were cut in you square approximately of a cm² and placed in the cultivation means: Agar Starch Casein KNO₃, Agar Sabouraud, Agar Pope Dextrosa and Agar Dilute that were incubated at 25°C by 7 to 15 days, being obtained growth of colonies of mushrooms those that were identifying by means of their macroscopic and microscopic characteristics. For the activity antimicrobiana bacterias patógenas were used faced with stumps fúngicas in gelosa block. Being concluded that starting from *Baccharis salicifolia* "chilca" 71 stumps fúngicas of the goods of *Penicillium* spp were isolated. and it would Alternate spp., showing antibacterial effect the gender of *Penicillium* spp. front *Staphylococcus epidermidis* HRA 288, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, while the gender would Alternate spp. it showed antibacterial effect for *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Key word: Antibacterial activity, mushrooms endofíticos, actinomicetos endofíticos and *Baccharis*.

INTRODUCCIÓN

Los hongos, actinomicetos y bacterias endofíticos son aquellos que viven en el interior de los tejidos de las plantas, sin causar daños visibles en las mismas; tales microorganismos promueven el crecimiento vegetal, confieren a su hospedero resistencia al estrés, alteraciones fisiológicas, además les protege contra herbívoros y organismos patógenos (Azevedo y Col.; 2000). Los microorganismos endofíticos ocupan el mismo ambiente con muchos fitopatógenos, favoreciendo el uso como agentes en el control biológico de patógenos (Arcías de Silva, 2006).

El estudio de la comunidad endofítica sean hongos, actinomicetos y bacterias; ha aumentado sustancialmente en los últimos 20 años, se observó que esta comunidad presenta un importante papel en el desarrollo de la planta hospedera como es el chilca, ya que hoy en día se hace uso como una planta medicinal como por ejemplo es antirreumático, también se usan como analgésico, antiinflamatorio y antiespasmódico de las hojas soasadas, también reconocieron sus propiedades cicatrizantes, vulnerarias y contra luxaciones, etc.; viendo estos principios activos que presenta “chilca”, y no habiendo trabajos realizados acerca de la población endofítica de *Baccharis salicifolia* “chilca”, es necesario realizar estudios con el propósito de demostrar la existencia de hongos y actinomicetos endofíticos, de igual forma conocer en número de especies, la frecuencia y estudios de la capacidad

antibacteriana que presenta estos microorganismos endofíticos.

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron:

Aislar e identificar los hongos y actinomicetos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* “chilca”

Evaluar la actividad antibacteriana de cepas de hongos y actinomicetos aislados de hojas de *Baccharis salicifolia* “chilca” frente a diversas cepas bacterianas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del trabajo de investigación.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga durante los meses de marzo a agosto del 2010.

Tipo de investigación

Básica - descriptivo

Muestra biológica

Estuvo constituida por 3 Kg de hojas de *Baccharis salicifolia* “chilca”, las que fueron colectadas entre los meses de marzo y abril de 2010; habiéndose realizado tres muestreos, en cada caso se obtuvo un kilogramo de hojas como muestra.

Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas, según el protocolo descrito por Araujo y Col. (2002), con la ayuda de unas tijeras desinfectadas, entre las 7:00 – 8:00 am.; para lo cual se siguieron los siguientes pasos:

Se ubicaron las plantas de *Baccharis salicifolia* “chilca”, cuyas características

básicas fueron: aparentemente sanas, vigorosas, adultas y sin mucha presencia de otros vegetales en su entorno.

Una vez identificadas la planta, se verificaron que las hojas de *Baccharis salicifolia* “chilca” debían estar aparentemente sanas y sin manchas o cualquier tipo de lesión causada por patógenos o insectos.

Las hojas elegidas fueron cortadas en la base con sumo cuidado y depositadas en bolsas de polietileno y rotuladas

Luego del rotulado, las bolsas fueron transportadas al Laboratorio.

Desinfección y preparación para el aislamiento

Teniendo en cuenta la recomendación que el tiempo máximo que debe transcurrir desde el momento del muestreo y su respectivo procesamiento no debe exceder las dos horas, una vez llegados al laboratorio estas fueron procesadas de siguiente manera (Araujo y Col., 2002)

Las muestras de *Baccharis salicifolia* “chilca”, fueron lavadas con agua corriente de grifo con la finalidad de eliminar los materiales extraños adheridos y fueron sumergidas en una solución de etanol al 70%, contenida en placa de Petri estéril, por espacio de un minuto.

Seguidamente, transcurrido el tiempo, las hojas fueron traspasadas a otra placa de Petri estéril conteniendo hipoclorito de sodio al 3% (cloro activo), en las que permanecieron sumergidas por espacio de dos minutos.

Luego de la desinfección en la solución de hipoclorito de sodio, las hojas fueron colocadas en otra placa de Petri conteniendo

una solución de etanol al 70% por un espacio de 30 segundos

Completado el proceso de desinfección, las hojas fueron enjuagadas por 6 a 7 veces con agua destilada estéril a fin de retirar el exceso de desinfectante.

Se tomó una asada del agua del último enjuague y se procedió a sembrar, por agotamiento en superficie, en una placa de Petri conteniendo agar nutritivo, la cual se incubó a 37°C por 24 a 48 horas con la finalidad de descartar la presencia de microorganismos (control de esterilidad).

Obtención de fragmentos de tejidos vegetales

Después del último enjuague, las hojas fueron transferidas a otra placa de Petri estéril, conteniendo papel filtro con la finalidad de que el exceso de agua sea absorbido.

Las hojas, luego, fueron colocadas sobre otra placa de Petri estéril y con la ayuda de un bisturí y estíleles se procedió a cortar los bordes de la hoja, las que fueron eliminadas y la parte que quedó fue cortada en cuadrículas de un cm² aproximadamente.

Colocación de fragmentos de tejido vegetal al medio de cultivo para el aislamiento de hongos y actinomicetos endofíticos

Con la ayuda de una pinza, los fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* “chilca” fueron colocadas, en posición horizontal siete fragmentos, uniformemente espaciadas, sobre medios de cultivo sólidos contenidos en placas de Petri; los medios de cultivo utilizados fueron: agar papa dextrosa, agar

Sabouraud, agar almidón caseína KNO₃ y agar agua.

Luego, las placas de Petri fueron incubadas, en posición invertida, a 25°C por 15 días, hasta obtener crecimiento de colonias de hongos y/o actinomicetos en los bordes y/o ápices de los fragmentos de hojas.

Una vez obtenidos los crecimientos, éstos fueron repicados en otras placas de Petri conteniendo medios de cultivo, en cada caso a un tipo medio de cultivo según al original; las que fueron incubadas a 25 °C por 10 días. En algunos casos fue necesario realizar el repique varias veces hasta obtener colonias puras; estas sirvieron a su vez para anotar sus características culturales.

Una vez purificadas las colonias de hongos, éstas fueron transferidas en viales conteniendo agar Sabouraud, obteniéndose de este modo el cepario correspondiente (Araujo y Col., 2002).

Prueba de identificación

Todas las colonias de hongos, crecidas en medios de cultivo sólidos, fueron observadas y agrupadas según sus características culturales que presentaron.

Por otro lado, para determinar sus características microscópicas se desarrolló la técnica del microcultivo. Las estructuras observadas han sido comparadas con las estructuras descritas en la literatura (Araujo y Col., 2002).

Actividad antibacteriana

La prueba de la actividad antimicrobiana de cepas de hongos endofíticos de *Baccharis salicifolia* "chilca", fue realizada a través de técnicas de bloks de gelsa, descrita por Araujo y Col. (2002).

a) Preparación del inóculo de esporas de hongos endofíticos

Las cepas de hongos endofíticas fueron sembradas en tubos de ensayo de 16 x 150 mm conteniendo agar Sabouraud en posición inclinada; las que fueron incubadas a 25 °C por 15 días.

Luego del tiempo de incubación se obtuvo el crecimiento de hongos y produjeron suficiente cantidad de esporas, se procedió a su cosecha con la ayuda de una torunda estéril embebida en solución salina fisiológica (SSF) estéril.

Las esporas fueron transferidas a un tubo de ensayo 13 x 100 mm conteniendo 2 ml de solución salina fisiológica (SSF) hasta obtener una turbidez concordante con el tubo N° 0.5 de la escala de McFarland.

b) Obtención de blocks de gelsa

Se dispuso de placas de Petri del mismo tipo, marca y tamaño; a cada placa se vertió exactamente 15 ml de agar Sabouraud.

Con la ayuda de una torunda estéril, en cada placa de Petri, se sembraron la suspensión de esporas, mediante estrías con líneas en tres direcciones, con la finalidad de cubrir toda la superficie del medio con esporas de las cepas de hongos endofíticos y así garantizar un crecimiento en tapete.

Una vez cultivadas, las placas de Petri fueron incubadas a 25 °C por 15 días.

Una vez obtenido el crecimiento en tapete (luego de 15 días) se obtuvieron discos de los mismos (blocks de gelsa) con la ayuda de un sacabocado, obteniéndose discos de 4 mm de diámetro.

c. Obtención de inóculos de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas con las que se enfrentaron los hongos endofíticos de *Baccharis salicifolia* "chilca" fueron: *Staphylococcus epidermidis* HRA 288, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* ATCC 2225, *Enterobacter sp.* HRA 811.

En primer término, cada cepa bacteriana fue cultivada en caldo nutritivo contenido en tubos de ensayo de 13 x 100 ml, para su rejuvenecimiento, incubándose a 37 °C por 24 horas. Luego fueron transferidas a otros tubos de prueba conteniendo agar nutritivo en posición inclinada para obtener una masa celular joven, para lo cual fue incubada a 37 °C por 48 horas.

Luego de la obtención de la biomasa bacteriana, éstas fueron transferidas a un tubo de prueba de 13 x 100 ml 2 ml de solución salina fisiológica (SSF), con la ayuda de una asa de Kolle, hasta alcanzar una turbidez de concordante con el tubo N° 0.5 de la escala de McFarland.

La suspensión de células bacterianas fueron cultivadas en placas de Petri conteniendo agar Mueller Hinton, con la ayuda de una torunda estéril realizando estrias tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo.

Seguidamente se dejó secar la superficie del medio de cultivo a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos hasta para que el exceso de humedad superficial fue absorbido.

En seguida, con la ayuda de una pinza estéril, se colocaron los blocks de gelosa,

conteniendo el crecimiento de hongos endofíticos de *Baccharis salicifolia* "chilca", sobre la superficie del Agar Mueller Hinton en forma espaciada de manera uniforme, presionando suavemente cada blocks para asegurar el contacto completo.

Se incubaron las placas de Petri, en posición invertida, a 37°C por 24 a 48 horas, hasta la obtención de halos de inhibición los que fueron medidos con una regla para expresarlos en mm.

3.4. Análisis estadístico

Los resultados fueron tabulados y se presentan en cuadros y gráficos los que fueron sometidos a las pruebas de análisis de varianza mediante la prueba de Tukey utilizando el programa estadístico SPSS versión 21.

RESULTADOS

Cuadro N° 01. Número de colonias de hongos endofíticos según medio de cultivo y número de muestreo. Ayacucho, 2009 – 2010.

Medio de cultivo		I	II	III	TOTAL	Frecuencia (%)
AACK	M1	2	2	3	20	28.2
	M2	2	3	2		
	M3	2	3	1		
AS	M1	2	2	2	17	23.9
	M2	2	2	1		
	M3	1	3	2		
APD	M1	1	2	3	21	29.6
	M2	2	3	2		
	M3	4	1	3		
AA	M1	1	1	2	13	18.3
	M2	1	2	1		
	M3	2	2	1		
TOTAL		22	26	23	71	100

AAC-K = Agar Almidón Caseína KNO₃

AS = Agar Sabouraud

APD = Agar Papa Dextrosa AA = Agar Agua

M.1, M.2, M.3 = Número de repeticiones de cada muestra por medio de cultivo.

I, II, III = Número de muestreo durante la ejecución del trabajo.

Cuadro N° 02. Descriptivos estadísticos del número de fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" según medio de cultivo.

Medios de Cultivos	N°	Media	Desviación típica	Error Típico
AACK	9	31.778	9.5333	3.1778
AS	9	27.011	8.5932	2.8644
APD	9	33.356	14.2798	4.7597
AA	9	20.656	7.5368	2.5123
TOTAL	36	28.2	11.0619	1.8437

Intervalo de Confianza para la Media al 95%		mínimo	máximo
Limite Interior	Limite Superior		
24.45	39.106	14.3	42.9
20.406	33.616	14.3	42.9
22.38	44.332	14.3	57.1
14.862	26.449	14.3	28.6
24.457	31.943	14.3	57.1

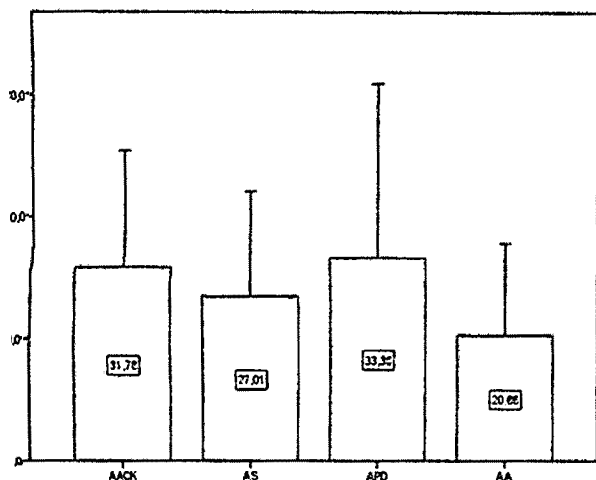
Ayacucho, 2009 -2010.

AAC-K = Agar Almidón Caseína KNO₃

AS = Agar Sabouraud

APD = Agar papa Dextrosa A = Agar Agua

Cuadro N° 01. Porcentajes de fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" según medio de cultivo. Ayacucho, 2009 -2010



AACK = Agar Almidón Caseína KNO₃

AS = Agar Sabouraud

APD = Agar Papa Dextrosa AA = Agar Agua

Cuadro N° 03. Frecuencia de géneros de hongos endofíticos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca". Ayacucho, 2009 - 2010.

CEPA	NP	Frecuencia (%)
Aspergillus	46	64,79
Penicillium	25	35,21
TOTAL	71	100

Cuadro N° 04. Diámetro de halos de inhibición de hongos endofíticos de *Penicillium spp.* aislados de *Baccharis salicifolia* "chilca" frente *Staphylococcus epidermidis* HRA 288. Ayacucho, 2009 - 2010.

Código	Diámetro (mm)			Frecuencia (%)
	I	II	III	
IaP1	12	9	11	10,67
IaP2	13	11	13	12,33
IlaP4	13	9	11	11,00
IcP6	10	12	13	11,67
IlaP7	9	10	8	9,00
IicP8	11	11	12	11,33
IibP11	10	11	12	11,00
IIdP11	10	13	10	11,00
IlaP17	12	11	13	12,00
IIdP13	9	9	11	9,67
IicP18	8	10	10	9,33
IlaP20	13	13	11	12,33

I, I, III = repeticiones

Cuadro N° 05.- Diámetro de halos de inhibición de hongos endofíticos de *Penicillium spp.* aislados de *Baccharis salicifolia* "chilca" frente a *Bacillus subtilis*. Ayacucho, 2009 - 2010.

Código	Diámetro (mm)			Frecuencia (%)
	I	II	III	
IaP1	7	11	8	8,67
IaP2	9	10	10	9,67
IlaP4	9	12	10	10,33
IcP6	11	11	12	11,33
IlaP7	12	12	11	11,67
IicP8	9	10	10	9,67
IibP11	10	12	14	12,00
IIdP11	11	12	13	12,00
IlaP17	10	9	9	9,33
IIdP13	7	9	11	9,00
IicP18	10	12	11	11,00
IlaP20	8	10	10	9,33

I, II, III = repeticiones

Cuadro N° 06.- Diámetro de halos de inhibición de hongos endofíticos de *Penicillium spp.* aislados de *Baccharis salicifolia* "chilca" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 538. Ayacucho, 2009- 2010.

Código	Diámetro (mm)			Frecuencia (%)
	I	II	III	
IaP1	21	19	20	20,00
IaP2	19	18	18	18,33
IlaP4	19	19	18	18,67
IcP6	18	22	19	19,67
IlaP7	22	20	20	20,67
IicP8	23	24	20	22,33
IibP11	20	22	22	21,33
IldP11	20	19	22	20,33
IlaP17	23	17	21	20,33
IldP13	19	18	20	19,00
IicP18	22	22	20	21,33
IlaP20	19	20	20	19,67

II y III = repeticiones

Cuadro N° 07.- Diámetro de halos de inhibición de hongos endofíticos de *Alternaria spp.* aislados de *Baccharis salicifolia* "chilca" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 538. Ayacucho, 2009 - 2010.

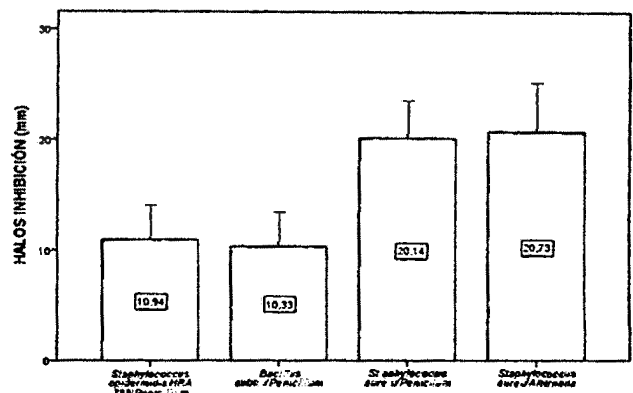
Código	Diámetro (mm)			Frecuencia (%)
	I	II	III	
A1	22	22	21	21,67
A2	22	22	20	21,33
A2	25	23	24	24,00
IA2	21	22	22	21,67
IA4	24	22	23	23,00
IA5	24	23	24	23,67
IA6	15	18	17	16,67
IA8	22	21	23	22,00
IA8	19	17	18	18,00
A10	20	21	22	21,00
A11	19	19	20	19,33
A12	19	21	20	20,00
A15	21	19	22	20,66
A17	19	23	19	20,33
A21	18	17	19	18,00
A14	20	19	22	20,33

y III = repeticiones

Cuadro N° 08. Prueba de Tukey de los promedios de los diámetros de halos de inhibición (mm) de hongos frente a bacterias. Ayacucho, 2009- 2010.

ANTAGONISTAS	N°	Subconjunto para alfa =0.05	
		1	2
<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Penicillium</i>	36	10,33	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> HRA 288/ <i>Penicillium</i>	36	10,94	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/ <i>Penicillium</i>	36		20,14
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/ <i>Alternaria</i>	48		20,73
Sig.		456	487

Gráfico N° 02.- Valores de los promedios de halos de inhibición de crecimiento de hongos endofíticos aislados



frente a bacterias. Ayacucho, 2009 - 2010.

DISCUSIÓN

En el Cuadro N° 01 se representa el número total de fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" que mostraron crecimientos de colonias de hongos endofíticos según el tipo de medio de cultivo, habiéndose utilizado cuatro medios de cultivo: agar almidón caseína KNO₃, agar Sabouraud, agar papa dextrosa y agar agua. Los valores obtenidos son el resultado de tres repeticiones y de tres muestreos, en cada repetición fueron utilizados tres placas de Petri por tipo de medio de cultivo, cada uno con siete fragmentos de hojas, haciendo un total de 84 fragmentos colocados en 12 placas de Petri por cada muestreo; en las cuales se obtuvieron, del primer muestreo un total de 22 colonias de hongos que representa un 26,2% de fragmentos que mostraron crecimiento de endofíticos, del segundo muestreo se obtuvieron un total de 26 colonias de hongos endofíticos y en el tercer muestreo 23 colonias que

representan 31% y 27,4% de fragmentos que mostraron crecimiento de endofíticos, respectivamente. De un total de 52 fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" se obtuvieron crecimientos de hongos endofíticos en 71 de los, que representa un 28,2%.

Estos resultados fueron sometidos a análisis de varianza (Cuadro N° 02) habiéndose concluido de que no existen diferencias significativas entre los valores promedios de fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca" que mostraron crecimiento de hongos endofíticos según el tipo de medio de cultivo utilizado y tampoco por el muestreo.

Hasta la actualidad se han investigado un gran número de plantas buscando la presencia de microorganismos endofíticos, en todos ellos fueron encontrados estos microorganismos; así, Malavé (2006) realizó el catastro de hongos endofíticos miceliales cultivables en hojas de la "herba marina" *Thalassia testudinum* en la playa Buyé, San Juan Rojo, Puerto Rico y procesó 864 fragmentos de hojas para aislar hongos de 66 de ellos con una tasa de presencia de estos endofíticos en un 7,64%. Los datos reportados por Malavé (2006) son menores a los reportados en la presente investigación que fue del 28,2% de fragmentos que mostraron crecimiento; sin embargo, Malavé (2006) reporta una mayor diversidad de hongos, específicamente ocho géneros.

El Cuadro N° 03 muestra los valores de la frecuencia de cultivos de hongos endofíticos aislados de fragmentos de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca"; de 71 cepas de éstos fueron identificadas como pertenecientes al género *Alternarias spp* 64,79% (46) y un 35,21% (25) pertenecientes al género *Penicillium spp*.

Un gran número de especies de endofíticos pueden ser aislados de tejidos sanos de una única planta; algunos factores interfieren cualitativa y cuantitativamente en la diversidad de la microbiota de los endofíticos, entre ellos la edad de la planta, el tejido u órgano de la planta; la presencia de endofíticos ya fue constatada en innumerables

plantas medicinales, entre ellas "tejo del pacífico", "copaiba" y "eucalipto" (Peixoto y Col., 2004).

Los hongos son microorganismos con gran capacidad de influir el destino y la disponibilidad de los nutrientes en un ecosistema, por lo que es viable pensar que su presencia tenga repercusiones fisiológicas en el hospedero; por ejemplo, las especies de endófitos pueden afectar diferencialmente la tasa de uso de fotosíntesis, ya que las especies varían en sus requerimientos y preferencias nutritivas, esto podría afectar al hospedero al inducir agotamiento de ciertos productos y/o acumulación de otros, de acuerdo con la presencia y/o dominancia de ciertos endófitos (Gamboa, 2006).

Los hongos, actinomicetos y las bacterias están indisolublemente asociadas a las plantas como patógenas, epifitas, endofíticas, simbióticas y antagónicas; muchas forman asociaciones íntimas con las plantas y forman grupos diversos filogenéticamente representados por especies pertenecientes a los principales taxones. Los microorganismos asociados a las plantas intercambian señales con su hospedero y poseen diversos mecanismos para su adaptación y colonización. Aspectos importantes de la diversidad de endofíticos en el ecosistema incluyen los diferentes procesos que estos realizan, la complejidad de la interacción y el número de niveles tróficos que los componen (Pérez y Col., 2005).

Chapaval (2006) realizó el aislamiento de hongos endofíticos a partir de las hojas de la "hierba-mate" *Ilex paraguariensis* nativas y cultivadas, obteniendo resultados de la existencia de una gran diversidad fúngica en hojas adultas que en las jóvenes, del mismo modo existe gran diversidad de hongos endofíticos en las hojas de la hierba-mate nativa que en las que son cultivadas; entre los hongos endofíticos aislados destacan los géneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Dendrophoma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Verticillium* y 13 hongos a un no identificados.

Por otro lado, Ramírez y Col. (2006), en Ecuador, aislaron cepas fúngicas endofíticas, entre ellas a los géneros *Aspergillus* y *Alternaria* a partir de plantas medicinales de las especies *Piper barbatana* y *Baccharis obtusifolia*.

Salawé (2006) realizó el catastro de hongos endofíticos miceliales cultivables en hojas de la "Hierba marina" *Halimolobos testudinum* en la playa Buyé, Cabo Rojo, Puerto Rico, habiendo reportado el aislamiento de ocho cepas de hongos, entre ellas al *Penicillium* sp. De igual manera Ixoto y Col. (2006) informan que el "maíz" *Zea mays* posee como hongos endofíticos a más de 22 especies de hongos, entre ellos a *Penicillium* spp. Por otro lado, Pérez y Col. (2005) en la investigación titulada "Hongos asociados al eucalipto, *Eucalyptus grandis* Hill: Maird, en México, y reportan haber aislado hasta nueve especies de hongos endofíticos diferentes, entre ellos, a *Alternaria* sp. y *Penicillium* sp., indicando además que la especie *Alternaria* es la que se encontró en mayor frecuencia.

Los resultados obtenidos por los investigadores citados en los párrafos anteriores corroboran que especies de los géneros *Alternaria* y *Penicillium* fueron aislados como hongos endofíticos en otras plantas, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación.

Por otro lado, Araujo y Col., (2002) indican que realizaron un trabajo de investigación en Brasil acerca del aislamiento de actinomicetos endofíticos de raíces y hojas de "maíz" (*Zea mays* L.) habiendo aislado actinomicetos de los géneros *Microbispora*, *Streptomyces* y *Streptosporangium*. Sin embargo, en la presente investigación no se logró aislar una cepa de actinomicetos, cuya razón podría ser que *Baccharis salicifolia* "chilca" no posee como endofíticos géneros de actinomicetos o caso contrario los medios de cultivo utilizados no permitieron su crecimiento.

Los cuadros N° 4, 5, 6 y 7 muestran el diámetro de halos de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus* HRA 288, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente a los hongos endofíticos de los

Alternaria spp. y *Penicillium* spp. aislados de hojas de *Baccharis salicifolia* "chilca". Cada prueba del estudio del efecto antibacteriano fue repetida por tres veces, la actividad inhibitoria por parte del hongo se consideró positiva cuando se verificó la presencia de halos sin crecimiento bacteriano; en los diferentes casos se obtuvieron halos desde 7 a 24 mm de diámetro.

Ramírez y Col. (2006) mencionan que se ha descrito en la literatura que los metabolitos secundarios fúngicos tienen una acción protectora contra los insectos herbívoros en gramíneas y coníferas (entre otras) y un buen número de ellos son potenciales antimicrobianos; del mismo modo, Picco y Rodolfi (2004) resultan de interés considerar que dentro de los beneficios medicinales de plantas, se mezcla su acción analgésica, antiinflamatoria y antimicrobiana, donde los endofitos fúngicos podrían contribuir en sus efectos benéficos en la farmacopea popular.

En el Cuadro N° 08 se muestran los descriptivos estadísticos de diámetros de halos de inhibición de cepas bacterianas frente a hongos endofíticos aislados de *Baccharis salicifolia* "chilca", cuyos resultados nos indican que existe diferencias significativas ($\alpha=0,000$) el tamaño de los halos de inhibición entre grupos de tratamiento; presentándose un menor efecto antibacteriano de cepas de *Penicillium* spp. frente a *Bacillus subtilis* con un valor promedio de 10,33 mm de diámetro de halo de inhibición, seguido por el efecto cepas de *Penicillium* spp. frente a *Staphylococcus epidermidis* HRA 288 con 10,94 mm de diámetro de halo como promedio; las cepas de *Alternaria* spp. mostraron un mayor efecto antagónico frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, con un valor promedio de 20,73 mm, antecedido por las cepas de *Penicillium* spp. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con un valor promedio de 20.14 mm.

De esta forma mostrándonos que hay diferencia significativa entre grupos y que las interacciones entre *Penicillium* spp. frente a *Bacillus subtilis* y *Penicillium* spp. frente a *Staphylococcus epidermidis* HRA 288 mostraron

un menor efecto antagónico formando parte de un grupo diferente al de las interacciones de *Alternaria spp.* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Penicillium spp.* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, que mostraron el mayor efecto antagónico, perteneciendo a otro grupo. Situación que se evidencia en el Gráfico N° 2.

Según Ramírez y col. (2006), en el trabajo de investigación titulado “Actividad antagónica de hongos endofíticos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas” realizado en la Universidad Técnica Particular de Loja, en el que evaluaron el efecto antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC, 25923), *Clostridium pneumoniae subsp. Pneumoniae*, (ATCC, 9997), *Aspergillus aeruginosa*, (ATCC, 27853) y *Escherichia coli* (ATCC, 25922) con cepas fúngicas endofíticas aisladas de *Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Piper nigrum*, *Borreira laevis*, *Chuquiquiragua jussieui* y *Passiflora andicola*, pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Epicoecum*, *Fusarium*, *Nigrospora* y *Phoma*, los principales géneros, indican que, la mayoría de las cepas fúngicas estudiadas presentaron actividad antagónica.

Areias de Silva (2006) en el trabajo de investigación titulado “Evaluación de la actividad antimicrobiana de hongos y actino-bacterias endofíticas aislados de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist “rabo de raposa”; en la Universidad Federal de Pernambuco, Brasil, aisló 53 cepas de hongos, 126 bacterias y cuatro actinomicetos, la actividad antimicrobiana fue evaluada por el método de agar de gelosa contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Malassezia furfur* y *Malassezia restricta*, mostrando la mayoría efectos antimicrobianos en forma de halos de inhibición que varían entre 10 mm y 30 mm.

Los trabajos de Areias de Silva (2006) y Ramírez y Col. (2006) corroboran los resultados obtenidos en esta investigación, habiéndose demostrado los efectos antagónicos de cepas de hongos endofíticos contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

CONCLUSIONES

1. A partir de las hojas de *Baccharis salicifolia* “chilca” se aislaron 71 colonias de hongos endofíticos, de las cuales 46 (64,79%) pertenecen al género *Alternaria* y 25 (35,21%) al género *Penicillium*.
2. De las 46 cepas de hongos endofíticos del género *Alternaria* aislados, 24 (52,2%) mostraron efecto antagónico contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y; de las 25 cepas de *Penicillium spp.* 12 (48%) mostraron efecto antagónico contra *Staphylococcus epidermidis* HRA 288, *Bacillus subtilis* y/o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
3. Los hongos endofíticos *Alternaria spp.* y *Penicillium spp.* aislados de hojas de *Baccharis salicifolia* “chilca” mostraron inhibición de crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* HRA 288, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 con halos de 7 a 24 mm de diámetro.
4. En el presente trabajo de investigación no se logró aislar ninguna cepa de actinomicetos, cuya razón podría ser que *Baccharis salicifolia* “chilca” no posee como endofíticos de especies de actinomicetos o caso contrario los medios de cultivo utilizado no permitieron su crecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Araújo, W., Sousa, A., Azevedo, J., Kuklinsky, J. y Teixeira, P. 2002. Manual de aislamiento de microorganismos endofíticos. Universidad de Sao Paulo - Brasil.
2. Azevedo, L., Maccheroni, W., Pereira, O. y Araujo, L. 2000. Endophytic microorganisms: a review and insect control and recent advances on tropical plants. Electronic journal of Biotechnology. Vol 3 N° 1: pp 40-65
3. Areias de Silva, R. 2006. Evaluación de la actividad antimicrobiana de hongos y actino-bacterias endofíticas aislados de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist “rabo de raposa”.

raposa”; en la Universidad Federal de Pernambuco, Brasil.

Malavé, S. 2006. Catastro de hongos endofíticos micelales cultivables en hojas de la hierba marina *Thalassia testudinum* en playas Buyé, Cabo Rojo, Puerto Rico.

Peixoto, P., Azevedo, J. y Araujo, W. 2006. Interacción con plantas y potencial biotecnológico de microorganismos endofíticos. Universidad de Mogidas Cruzes, Sao Paulo Brasil.

Gamboa, G. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimientos actuales y perspectivas; Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Colombia.

Pérez, O., Yáñez, M., Alvarado, D., Cibrián, D. y García, S. 2005. Hongos asociados a eucalipto,

Eucalyptus grandis Hill: Maid. Universidad de Autónoma Chapingo. México. Vol. 39, N° 3, pp. 311-318.

8. **Chapaval, I.** 2006. Fungos endofíticos en folhas de Erva mate *Ilex paraguariensis*. Eng. Agronoma. Floresta, Colombia. Vol 23 N° 45: pp. 109 – 124.
9. **Ramírez, R., Yandry, J., Delgado, E., Rodolfi, M. y Solveig, T.** 2006. Actividad antagónica de hongos endofíticos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador.
10. **Picco, A. y Rodolfi, M.** 2004. Endophytism in grasses with reference to an experience in Northern Italy. In: Ragazzi A., Moricca S., Dellavalle I. (eds.) Endophytism in Forest Trees. Italia.