

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



***Hongos y actinomicetos endofíticos de *Piper elongatum****  
**“matico” y su efecto antimicrobiano. Ayacucho 2010-2011.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO EN LA  
ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. CISNEROS TINCO, Joel**

**AYACUCHO - PERÚ**

**2011**

*Con mucho amor a mis padres: José y  
Serafina, a mis hermanos, que me apoyaron de  
manera incondicional durante mis estudios  
universitarios.*

## 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 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, 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 Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez, asesor del presente trabajo, por brindarme sus conocimientos y orientaciones, así mismo mi gratitud a la Biga. Ruth Huamán De la Cruz, quien hizo posible el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación.

## ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	V
I INTRODUCCIÓN	1
II MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Origen y evolución de las endófitas	8
2.3. Ecología de las endófitas	10
2.4. Aislamiento e identificación de endófitas	11
2.5. Hongos y Actinomycetos endofíticos	12
2.6. Relación Planta-Microorganismo mutualista	14
2.7. Metabolito secundario e interacción planta-microbiota	16
2.8. Diversidad de Endófitas	18
2.9. Características Botánicas de <i>Piper elongatum</i> "matico"	19
2.9.1. Posición Taxonómica de <i>Piper elongatum</i> "matico"	19
2.9.2. Descripción botánica de <i>Piper elongatum</i> "matico"	19
2.10 Los hongos	22
2.10.1 Penicillium	24
2.10.2 Aspergillus	26
2.10.3 Alternaria	28
2.11 Actinomyceto	32
2.12 Antagonismo microbiano	34
III MATERIALES Y MÉTODOS	38
IV RESULTADOS	43
V DISCUSIÓN	52
VI CONCLUSIONES	59
VII RECOMENDACIONES	60
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	77

**Hongos y actinomicetos endofíticos de *Piper elongatum* “matico” y su efecto antimicrobiano. Ayacucho, 2010-2011.**

**Autor** : Cisneros Tinco, Joel

**Asesor** : Chuchón Martínez, Saúl Alonso

**RESUMEN**

El objetivo de la presente investigación, fue conocer los hongos y actinomicetos endofíticos de *Piper elongatum* “matico” y determinar su efecto antimicrobiano frente a bacterias patógenas, se ejecutó entre los meses de setiembre del 2010 a enero del 2011. Las hojas y tallos de *Piper elongatum* “matico” fueron recolectadas en los jardines de la ciudad de Huamanga en horas de la mañana, entre los meses de octubre y noviembre del 2010. Las mismas que fueron desinfectadas con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 3% según la técnica de Araújo y col. (2002). El proceso de sembrado consistió en la fragmentación de los órganos de la planta, para su posterior crecimiento en los medios de cultivo: Agar Sabouraud, Agar Almidón caseína-KNO<sub>3</sub>, Medio Jensen, Agar Agua y Agar Papa Dextrosa, que fueron incubadas a 28°C por 7 días para hongos, 28°C por 20 días para actinomicetos, en las cuales se obtuvieron crecimiento de las colonias de hongos y actinomicetos, que fueron identificados mediante observación de las 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 *Piper elongatum* “matico” se aislaron 56 cepas fúngicas de géneros: *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y una cepa de actinomiceto; y mostraron efecto antimicrobiano los géneros *Penicillium* y *Alternaria* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC – 6538 y del género *Aspergillus* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 y *Salmonella paratyphi* MOR.

**Palabras clave:** hongos endofíticos, actinomicetos endofíticos, *Piper elongatum*, actividad antimicrobiana.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine endophytic fungi and actinomycetes of *Piper elongatum* "shades" and determine the antimicrobial effect against pathogenic bacteria, was implemented between the months of September 2010 to January 2011. The leaves and stems of *Piper elongatum* "shades" were collected in the gardens of Huamanga in the morning hours between October and November 2010. They were disinfected with 70% alcohol and sodium hypochlorite 3% according to the technique de Araújo et al. (2002). The planting process was the fragmentation of the organs of the plant for further growth in culture media: Agar Sabouraud Agar Starch casein-KNO<sub>3</sub>, Middle Jensen, water agar and potato dextrose agar, which were incubated at 28 ° C 7 days (fungal), 28 ° C for 20 days (for actinomycetes), which were obtained colony growth of fungi and actinomycetes were identified through observations of the macroscopic and microscopic characteristics. For antimicrobial activity pathogenic bacteria were used fungal strains faced with agar block. Concluded that from *Piper elongatum* "shades" 56 strains were isolated fungal genera *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and a strain of actinomycetes, and as antimicrobial effect they had was between *Alternaria* and *Penicillium* genera *Staphylococcus aureus* ATCC - 6538 and *aspergillus* against *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 and *Salmonella paratyphi* MOR.

Keywords: endophytic fungi, endophytic actinomycetes, *Piper elongatum*, antimicrobial activity.

## I. INTRODUCCIÓN

Los hongos y actinomicetos endofíticos son aquellos que habitan en el interior de los tejidos de las plantas, sin causar daño aparente en ellas mismas (Azevedo y col., 2000). Tales microorganismos endofíticos promueven el crecimiento vegetal, confieren a su hospedero resistencia al estrés, alteraciones fisiológicas, además les protege contra herbívoros y organismos patogénicos (Neto y col., 2004). Los microorganismos endofíticos ocupan el mismo ambiente con muchos fitopatógenos, favoreciendo el uso como agentes en el control biológico de patógenos (Hallmann y col., 1997).

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.(Newmann y Reynolds, 2005).

Los hongos y actinomicetos endófitos 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 (Hallmann y col., 1997;

Sakiyama y col., 2001). 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 (Hurek y col., 1994; Bell y col., 1995). Hongos y actinomicetos endófitos se pueden tornar patógenos sobre ciertas condiciones, e inclusive en función del genotipo de la planta hospedera (Misaghi y Donndelinger, 1990). Estudios también señalan que los hongos y actinomicetos endófitos interactúan con patógenos (Huang, 1991; Bacon y Hilton, 1997; Sessitch y col., 2002), promueven el crecimiento en las plantas (Tsavkelova y col., 2007), aumentan la resistencia a enfermedades (Chanway, 1998), contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno (Jimenez-Salgado y col., 1997; Estrada y col., 2002) y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (Brooks y col., 1995; Berg y col., 2005; Tan y Zou, 2001; Long y col., 2003; Shiomi y col., 2006).

El estudio de la comunidad endofítica sean bacterias, hongos, actinomicetos; ha aumentado sustancialmente en los últimos 20 años, se observó que esta comunidad presenta un importante papel en el desarrollo de la planta hospedante como es el matico, ya que hoy en día se hace uso como una planta medicinal como por ejemplo la infusión acuosa con 15% de estas hojas frescas machacadas se aplica en las heridas menores y picaduras de insectos o mordida de sanguijuela; sirve como enjuague bucal, astringente, útil para áreas inflamadas de la piel, del mismo modo es usado para las hemorroides, trastornos reumáticos y para el tratamiento de las úlceras, etc.; viendo estos principios activos que presenta el matico, y no habiendo trabajos realizados acerca de la población endofítica habitada en el matico, es necesario realizar estudios con el propósito de demostrar la existencia de hongos y actinomicetos endofíticos aisladas a partir del matico, de igual forma conocer el número de

especies, diversidad, la frecuencia de hongos, actinomicetos endofíticos y seguir mediante estudios, la capacidad de la actividad antimicrobiana que presentan estos microorganismos endofíticos.

El objetivo general del trabajo de investigación consistió en: conocer los hongos y actinomicetos endofíticos de *Piper elongatum* "matico" y determinar el efecto antimicrobiano; siendo los objetivos específicos los siguientes:

- Aislar e identificar los hongos y actinomicetos endofíticos de *Piper elongatum* "matico".
- Determinar el efecto antimicrobiano de hongos y actinomicetos endofíticos de *Piper elongatum* "matico".

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Pocasangre y col. (2000), aislaron hongos endofíticos como agentes biológicos de control de fitonemátodos en banano, con diversos tratamientos manejados en el estudio de los hongos endofíticos como biocontroladores de *Radopholus similis* en fincas de banano en Brasil, los cuales son el *Trichoderma atroviride*, *Fusarium oxysporum*, llegando a la conclusión de que 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 (Costa Rica) fue acerca del estudio de Hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plátano, 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 raíz, 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.

Araújo 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 fueron aisladas de hojas y de raíces. El género *Microbispora* fue el más frecuente seguido por los géneros *Streptomyces* y *Streptosporangium*. Desde el actinomicetes aislados, el 43,4% mostró actividad antimicrobiana contra una o más bacterias probadas.

Ramírez y col. (2006), mediante una investigación referido a la actividad antagónica de hongos endofíticos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas, se aislaron los hongos endófitos asociados a *Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Piper barbatum*, *Borreria laevis*, *Chuquiragua jussieui* y *Bidens andicola*. Los taxa fúngicos más frecuentes fueron: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Phoma*, además de algunos representantes de los grupos: *Coelomycetes*, *Sinnematosos* y *Zygomycota*. La mayor dominancia fúngica correspondió a integrantes de los denominados *Mycelia sterilia*, siendo de particular interés como posibles endófitos. Se evaluó además la interacción antagónica de siete aislados fúngicos frente a bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. La mayoría de las cepas fúngicas estudiadas presentaron actividad, pero los resultados más prometedores se evidenciaron en un aislado de *Mycelia sterilia*.

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 bacteriales obtenidos correspondieron al actinomiceto

*Frankia* y se denominaron F1, F2 y F3; los aislados de hongos micorrizógenos obtenidos de suelo rizosférico se denominaron Mn1, Mn2, y Mn3). Se realizó un ensayo en la Estación experimental de San Pablo para evaluar la efectividad de los aislados nativos obtenidos frente a cepas conocidas de hongos endomicorrizógenos (*Entrophospora colombiana*, *Glomus manihotis*, *G. fistolosum* y *G. intrarradices*) en plántulas de aliso en suelo estéril y se empleó un diseño completamente aleatorizado con 37 tratamientos por seis repeticiones. Se midieron las variables biomasa seca de la parte aérea y de nódulos, % de infección en raíces y acumulación de N y de P.

Según los investigadores 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 (Sardi, 1992).

Yaojian Huang y col., 2001 trabajaron en la Universidad de Xiamen (China) en la actividad antitumoral y antifúngica en hongos endofíticos aislados a partir de tres plantas medicinales como el *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* y *Torreya grandis* encontrando así los géneros *Pacilomyces sp*, *Tubercularia sp*, *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* e *Xylaria*, asociada a la caña de azúcar convencional y genéticamente modificada.

Sayuri (2006), en la Universidad de Sao Paulo (Brasil) trabajó la diversidad y el potencial biotecnológico de los hongos endofíticos del cacao *Theobroma cacao* L. como controlador biológico de *Crinipellis pernicioso* aislando cepas fúngicas como *Fusarium*, *Gibberella*, *Lasiodiplotia*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Verticillium*.

Chapaval (2005), junto a colaboradores trabajó en Floresta 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 adultas que en las hojas jóvenes, del mismo modo existe gran diversidad de hongos endofíticos en las hojas de la hierba-mate nativas que las que son cultivadas, entre los hongos endofíticos aislados destacan el *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Dendrophoma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Verticillium* y 13 hongos aun no identificados.

El término endofíticos o endófitos deriva de dos palabras griegas: endon - dentro y phiton - planta, han causado controversia desde su creación en 1866 por De Bary (Baldani y col., 2002; Saikkonen y col., 2004). Así el concepto más reciente y corriente de los microorganismos endofíticos son aquellas que habitan en el interior de los tejidos vegetales de la planta hospedadora sin causar daños a la misma y tampoco forman estructuras externas visibles (Azevedo y col., 2000).

Según Araújo 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. Recientemente las bacterias diazotróficas endofíticas han sido aisladas de varias especies de gramíneas (Reis y col., 2000; Riggs y col., 2001) y gran diversidad de diazotróficos han sido encontrado colonizando plantas de maíz (Chelius y Triplett, 2001).

La productividad de la mayoría de las plantas cultivadas ha sido garantizada por la utilización de cantidades substanciales de fertilizantes nitrogenados. Pero el uso excesivo de estos fertilizantes presenta riesgos de contaminación ambiental y el aumento de costos de producción. Los cultivos adaptados a ambientes pobres en nitrógeno y capaces de asociar las bacterias diazotróficas, pueden presentar una alternativa ecológicamente viable para la producción de maíz en sistemas agrícolas con baja utilización de insumos. Las rizobacterias, que

pertenecen mayormente al grupo de *Pseudomonas* y *Bacillus*, son antagonistas de importantes patógenos de la raíz en muchos cultivos de importancia económica (Schroth y Hancock, 1982; Hallmann y Berg, 2006). Bajo condiciones de invernadero, su aplicación ha generado prometedores resultados en vegetales, frutas y plantas ornamentales. Por otra parte, poblaciones endofíticas, tanto de *Pseudomonas* como de *Bacillus*, aisladas de tejidos internos de banano, han evidenciado un gran potencial como agentes biológicos de control de *Radopholus similis* en condiciones de invernadero (Nuñez, 2006).

## **2.2. Origen y evolución de las endófitas**

Las primeras evidencias de asociación entre microorganismos endófitos y plantas, se originaron de observaciones en tejidos y hojas fosilizadas, lo que soporta la inferencia de que la asociación planta-endófito pudo haber ocurrido junto con la aparición de las primeras plantas en la tierra (Strobel, 2003; Huawei y col., 2006). Como resultado de esa larga asociación es posible que algunos de estos microorganismos endófitos hayan adquirido un sistema genético para transferir información desde la planta hospedera a ellos, o viceversa. Este posiblemente sería un mecanismo rápido y seguro de adaptación a diferentes ambientes y a la planta hospedera, a ejemplo de rutas bioquímicas que resultan en la producción de compuestos químicos y metabolitos secundarios en las plantas asociadas a los endófitos (Germaine y col., 2004; Tsavkelova y col., 2007).

El concepto de que los endófitos son microorganismos establecidos en los tejidos internos de la epidermis (Kloepper y col., 1992) es actualmente expresado como la asociación biológica en que los microorganismos colonizan tejidos internos vivos de las plantas, sin causar ningún efecto negativo inmediato o daño aparente a la planta (Bacon y White, 2000).

Las bacterias, hongos y actinomicetos endófitos 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 (Hallmann y col., 1997; Sakiyama y col., 2001). 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 (Hurek y col., 1994; Bell y col., 1995). Hongos y actinomicetos endófitos se pueden tornar patógenos sobre ciertas condiciones, e inclusive en función del genotipo de la planta hospedera (Misaghi y Donndelinger, 1990). Estudios también señalan que los hongos y actinomicetos endófitos interactúan con patógenos (Huang, 1991; Bacon y Hilton, 1997; Sessitch y col., 2002), promueven el crecimiento en las plantas (Tsavkelova y col., 2007), aumentan la resistencia a enfermedades (Chanway, 1998), contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno (Jimenez-Salgado y col., 1997; Estrada y col., 2002) y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (Brooks y col., 1995; Berg y col., 2005; Tan y Zou, 2001; Long y col., 2003; Shiomi y col., 2006).

Recientemente, aislados de bacterias endófitas de *Populus* fueron caracterizadas por su uso potencial en proceso de fitorremediación (Moore y col., 2006), a ejemplo del uso de *Burkholderia cepacia* G4 que incrementa la tolerancia de las plantas al tolueno (Van Der Lelie, 2005) y de *Methylobacterium populum* sp nov. BJ001 como participante de la biodegradación de compuestos, tales como: 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (HMX) y octahidro-1,3,5-7-tetranitro-1,3,5-7-tetrazocine (RDX) (Van y col., 2004). Las discusiones sobre el origen de los microorganismos endófitos y la forma de penetración, además de los mecanismos de colonización, consideran la hipótesis de que se originaron de semillas, de la rizósfera, de filoplano o de material

utilizado para la propagación vegetativa (Reinhold-Hurek y col., 1998). La penetración en la planta puede ocurrir por los estomas, heridas, áreas de emergencia de raíces laterales, siendo que éstas endófitas pueden producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de los vegetales (McCully, 2002). Esta hipótesis fue derivada del análisis de datos que demuestran la presencia de enzimas celulíticas y pectinolíticas producidas por bacterias endofíticas, a ejemplo de *Azoarcus* sp. (Hurek y col., 1994), *Azospirillum irakense* (Khammas y Kaiser, 1991) y *Pseudomonas fluorescens* (Quadt-Hallmann y col., 1997). La colonización y la distribución de los microorganismos endófitos en la planta pueden ser influenciadas por la interacción con otros organismos asociados a la planta, a ejemplo de nematodos parásitos, o por características propias de su hospedero (Hirano y Hupper, 2002).

### **2.3. Ecología de las endófitas**

La planta es un hábitat dinámico en que diversos factores pueden influenciar la estructura y la composición de la comunidad microbiana. En cultivos *in vitro* de tomate, la colonización de los microorganismos endofíticos varían con las alteraciones de la densidad de inóculo, temperatura de cultivo y genotipo de hospedero (Pillay y Norwak, 1997). Las variaciones estacionales, el tipo de tejido vegetal (Mocali y col.2003), especie y cultivares de hospedero y la interacción con otros microorganismos benéficos (Araújo y col., 2002) también pueden influenciar el patrón de colonización.

La densidad poblacional de hongos y actinomicetos endófitos es menor que la de patogénicas y, por lo menos algunas de ellas, no inducen respuesta de hipersensibilidad y por eso no son reconocidas por la planta. Evolutivamente, los endófitos aparecen como intermediarios entre bacterias saprofitas y patogénicas de plantas. De modo general, la microbiota endófitas y la estructura dinámica es

influenciada por los factores bióticos y abióticos que también afectan al suelo y la planta hospedera (Hallman y col., 1997).

Las bacterias endófitas han sido aisladas de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas comerciales, en especies de árboles forestales (Brooks y col., 1994, Cankar y col., 2005), frutales (Whitesides y Spotts, 1991; Vega y col., 2005; Lacava y col., 2006), plantas herbáceas como caña de azúcar (Jacobs y col., 1985), soya (Kuklinsky-Sobral y col., 2004) y orquídeas (Tsavkelova y col., 2007).

#### **2.4. Aislamiento e identificación de endófitas**

La diversidad de hongos y actinomicetos endófitos representa apenas una pequeña fracción de la diversidad total existente en la naturaleza. Informaciones derivadas de estudios comparativos apuntan para el hecho de que apenas una pequeña fracción de los microorganismos en la naturaleza (entre 0,1 % a 10 %, dependiendo del hábitat) es cultivable mediante empleo de métodos microbiológicos convencionales (Ranjard y col., 2000; Green y Bohannan, 2006). Hasta hace pocos años, la mayoría de los métodos para el estudio de la diversidad microbiana eran realizados a través del crecimiento en medios de cultivos. Esos métodos generan informaciones sobre los grupos de microorganismos viables y cultivables dentro de la comunidad. Varias limitaciones están asociadas al cultivo de los microorganismos que pueden influir en la verdadera diversidad microbiana de la comunidad, entre las cuales la dificultad en desalojar bacterias unidas a partículas de suelo y biofilme, selección del medio de crecimiento, condiciones de crecimiento, tales como: temperatura, luz, pH, interacciones negativas entre las colonias de microorganismos y la presencia de microorganismos con tasa de crecimiento rápido (Kirt y col., 2004). El análisis de la diversidad y la estructura de comunidades pueden incluir la determinación de perfiles de la composición de lípidos extraídos de muestras

ambientales. El análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) consiste en la esterificación de los lípidos extraídos de muestras, seguida de separación e identificación por medio de cromatografía de gas. Los FAMEs son identificados por el tiempo de retención en la columna, comparativamente a los tiempos de retención de los patrones sometidos al mismo proceso. La cuantificación de cada compuesto es realizada con base en la determinación de las áreas de los picos correspondiente en el cromatograma (Totola y Chaer, 2002, Kirk y col., 2004).

## **2.5. Hongos y Actinomyces endofíticos**

Los hongos y actinomyces endofíticos son aquellos que habitan en el interior de los tejidos vegetales, sin causar daño aparente de las mismas, además de desempeñar funciones importantes en el proceso de adaptación de las plantas (Azevedo y col., 2000).

Estos hongos y actinomyces promueven el crecimiento vegetal, confieren a su hospedero resistencia al estrés y la interacción fisiológica, también los protege contra herbicidas y organismos patogénicos (Neto y col., 2004).

Los hongos y actinomyces endofíticos ocupan los mismos ambientes de muchos fitopatógenos favoreciendo su uso como agentes de control biológico de patógenos (Hallman y col., 1997).

La existencia de endofitos en plantas medicinales han sido constatada en innumerables especies, estando muchas veces envueltos en complejas relaciones de síntesis, acúmulo y degradación de metabolitos secundarios de interés económico (Neto y col., 2004).

El origen, forma de penetración, colonización y transmisión de los hongos y actinomyces endofíticos son muy discutidas. Éstas pueden ser provenientes de semillas, de la rizósfera, de plantas y de material propagado vegetativamente (McInroy y Klopper, 1995; Hallmann y col., 1997; Reinhold-Hurek y Hurek, 1998).

La penetración puede ocurrir por las estomas, áreas de emergencias laterales de raíces y pueden producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de vegetales, siendo éste un posible mecanismo de penetración (Quadt-Hallmann y col., 1997) (Shishido y col., 1999) (McCully, 2001).

El hecho que estos hongos y actinomicetos sean capaces de colonizar los tejidos internos de las plantas que confiere ventajas sobre otros microorganismos, pueden sobrevivir en un ambiente más uniforme a pesar de ser afectadas por la temperatura, potencial osmótico y radiación ultravioleta (Lodewyckx y col., 2002). Los hongos y actinomicetos endofíticos pueden otorgar a su hospedero características como: mayor resistencia a condiciones de estrés, alteraciones a las condiciones fisiológicas, suprimiendo el nitrógeno, producción de reguladores de crecimiento vegetal y otros componentes de interés biotecnológico (como enzimas y drogas de interés farmacéutico) (Hallmann y col., 1997; Kunoh, 2002; Coombs y col., 2004).

Estos hongos y actinomicetos pueden también ser modificadas genéticamente y reintroducirlas al hospedero, confiriendo características deseables al mismo (Andreote y col., 2004). Además, la manipulación genética de estos microorganismos endofíticos es mucho más fácil que la manipulación en plantas (Newman y Reynolds, 2005).

Por tanto es importante conocer la diversidad genética de estos microorganismos endofíticos, no solamente para comprender su papel de interacción con la planta hospedera, como también para la aplicación de la biotecnológica (Di cello y col., 1997). Innumerables técnicas han sido utilizadas para evaluar la diversidad genética, dentro de las cuales se destaca el análisis de restricción de ADNr 16S. Amplificado (ARDRA), secuenciamiento de ADNr 16S y fingerprinting de ADN genómico por BOX-PCR (Schloter y col., 2000).

## **2.6. Relación Planta-Microorganismo Mutualista (Hongos-endofíticos)**

Se conoce que la interacción microorganismo – planta puede ser mutualista, ya que una o ambas partes puede obtener beneficios. Es conocido además que estos microorganismos pueden tener ventajas competitivas con respecto a otros microorganismos, por ejemplo se ha comprobado que estos microorganismos pueden tener ventajas incluso sobre microorganismos rizosféricos (que viven en la superficie de las raíces) y los que viven en la superficie de las hojas, debido a que en el interior de la planta la disponibilidad de nutrientes es mayor, y es menor el número de microorganismos endofíticos, además en el interior de las plantas se encuentran más protegidos que en la superficie de esta y a cambio la planta obtiene metabolitos útiles en su desarrollo. (James, 2000)

El organismo huésped puede obtener varios beneficios de los endofíticos, a tal grado que muchas veces puede darse el caso que si una planta carece de estos puede llegar a enfermar y hasta morir. Por lo que se consideran de gran importancia para la conservación de bosques templados y selvas tropicales. Entre los beneficios puede mencionarse la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas, la resistencia a ambientes diversos y la resistencia a fitopatógenos, además es gracias a estas interacciones que podemos contar con diversos compuestos de uso biotecnológico con gran valor comercial. (James, 2000).

En los últimos años, los inconvenientes causados por el uso de químicos en la agricultura se han incrementado, lo que ha generado un gran interés en la búsqueda de sistemas de control alternativos (Benítez y col., 2004). Una de las estrategias presentadas es la utilización de microorganismos que puedan actuar como agentes de biocontrol donde los mecanismos empleados por estos son muchos y de variada naturaleza (Howell 2003).

Según Pocasangre (2004), la habilidad de un hongo para existir en un hábitat particular como el suelo o la superficie del órgano de una planta, esta particularmente determinado por las relaciones ecológicas con otros microorganismos. Estas interrelaciones a menudo son antagonistas naturales, donde uno o más de los organismos puede resultar perjudicado o tener una actividad reducida. Especies como: micorrizas, rizobacterias y hongos endofíticos, son los más utilizados para el control biológico de enfermedades, debido a su ubicuidad, facilidad para ser aislados y subcultivados, así como, un rápido crecimiento en un gran número de sustratos (Pocasangre y col., 2004; Pocasangre, 2000).

En ese sentido, se estudiarán los hongos endofíticos (HE), los cuales han sido definidos como microorganismos que colonizan los tejidos u órganos internos de una planta sin causar ningún tipo de daño a la misma (Latch, 1993; Carroll, 1990). La mayoría de estos hongos, son ascomicetos y están presentes en gran parte de su ciclo de vida dentro del tejido de la planta, donde pueden alterar la fisiología promoviendo el crecimiento e incrementando la resistencia al estrés causado por factores bióticos o abióticos (Pocasangre col., 2006;; Pocasangre 2003; Sikora 1992). Entre los géneros más conocidos de HE se encuentran: *Acremonium*, *Anthostomella*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Clypeopycni*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*, *Cryptocline*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Lasiodiplodia*, *Libertella*, *Nodiosporium*, *Phaeosphaeria*, *Phialophora*, *Phoma*, *Phomastospora*, *Phomopsis filiciana*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Verticillium* y *Xylaria* (Souza y col., 2004; Petrini y col., 1992).

Los HE son también conocidos por el desarrollo de relaciones planta-microorganismo mutualista donde actúan como antagonistas contra plagas y enfermedades (Harman y col., 2004). El éxito de la mayoría de estos hongos se debe a su alta capacidad de reproducción, habilidad para sobrevivir bajo

condiciones desfavorables, eficiencia en el uso de nutrientes, promoción de crecimiento e inducción de los mecanismos de defensa en las plantas (Pocasangre, 2004; Benítez y col., 2004).

## **2.7. Metabolito secundario e interacción planta - microbiota**

La producción de metabolitos secundarios puede estar influenciada por factores bióticos y abióticos que está íntimamente relacionada con la situación fisiológica del hospedero, la mayoría de los microorganismos endofíticos colonizan los espacios apoplásticos entre las células vegetales, donde se retiene el agua y los nutrientes necesarios para el crecimiento. Muchos factores ambientales como disponibilidad de agua, nutrientes y salinidad pueden alterar las condiciones internas de la planta, llevando a un cambio del ambiente alrededor del endófito. Esto alternadamente tiene que adaptarse para sobrevivir en las nuevas condiciones. Ese ajuste generalmente lleva a la producción de compuestos que van a actuar en el proceso de adaptación. Más allá de la producción de metabolitos secundarios que confieren a la planta protección contra enfermedades, plagas y herbívoros, los microorganismos endofíticos pueden también causar modificaciones morfológicas y fisiológicas en el hospedero y actuar como promotores efectivos de crecimiento vegetal. La mayor parte de bacterias han mostrado ser promotoras del crecimiento de bacterias que colonizan externamente las raíces del hospedero o la rizósfera. Entretanto estudios recientes han mostrado que las bacterias endofíticas también pueden aumentar el crecimiento vegetativo de diversos cultivos de interés dentro de ellas tenemos: papa, maíz, pepino, arroz y sandía. (Sharma y Nowak, 1998) sugieren que la promoción de crecimiento es un evento posterior a la inducción de resistencia promovida por los pelos endófitos que puede ser dependiente de colonización y de posterior sensibilización del hospedero. Así mismo las bacterias promotoras de crecimiento como *Bacillus polymyxa* o *Pseudomonas*

*fluorescens* para la inoculación de la semilla colonizan internamente las raíces, las células corticales, y tejidos vasculares del tallo del árbol. La colonización interna parece ser un pre requisito para que ocurra la promoción de crecimiento reforzando la utilización biotecnológica de microorganismos endofíticos. En papa, la bacteria endofítica *Pseudomonas sp* induce al aumento del sistema radicular y del tamaño del tallo. El aumento de peso seco de la planta, generalmente está asociado a la fijación de nitrógeno atmosférico por la bacteria. Entretanto fue verificado que un mutante incapaz de fijar nitrógeno atmosférico (nif) del endófito *Azoarsus sp* induce un mayor crecimiento de la planta hospedadora mostrando que la fijación de nitrógeno no estuvo envuelta en este proceso (Hurek y col., 1994).

La promoción de crecimiento por bacterias endofíticas y la rizósfera puede también ser el resultado de la reducción de la comunidad bacteriana dentro de la planta la cual puede ser inhibida por los pelos endofíticos, favoreciendo el desarrollo del hospedero. Otro mecanismo por el cual las bacterias endofíticas pueden estimular el crecimiento de la planta y la producción de IAA (ácido indol acético), que es un compuesto de hormonas vegetales denominados citocininas, innumerables estudios han demostrado que diferentes especies bacterianas asociadas a plantas presentan la capacidad de sintetizar compuestos análogos de hormonas vegetales dentro de ellas: *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum braziliense*, *Azorhizobium caulinodans*, *Bacillus polymyxa* y *Methylobacterium spp*. En cultivo de tejidos de *Ardisia crispa*, contaminada con una bacteria, metilitrófica fue observado un efecto semejante aquel que esta constatado con la aplicación de citocina mostrando que la bacteria endofítica sintetizando en la planta un compuesto con la misma función (Holland y Polacco, 1994). Estudios realizados por Stierle y col. (1993) despertaron más aún el interés de una microbiota endofítica relacionada con

plantas medicinales, una vez que los mismos consiguieron comprobar que un hongo endofítico o *Taxomyces andreane* de *Taxus brevifolia* son capaces de producir un complejo diterpenoide, taxol utilizado para combatir varios tipos de cáncer. En trabajos posteriores se comprobó que otros géneros de hongos endofíticos de otras especies de plantas también son capaces de producir taxol y otros compuestos de importancia biológica (Gao y col., 2003). Estos descubrimientos son notablemente importantes desde un punto de vista biotecnológico y ecológico, pues la única fuente de taxol era la extracción de las cortezas de la planta *Taxus brevifolia* donde eran necesarios cortezas de más de 1000 árboles, cada uno con 100 años de edad para obtener un 1 Kg de taxol, el hecho que llevó a la extinción de esta importante planta medicinal (Stinson y col., 2003).

Trabajos realizados en *Catharantus roseus* G. demostraron que la producción de tricostetina, compuesto activo contra bacterias Gram positivas, solamente es posible cuando hay un co - cultivo de callos de esta planta con hongos de especie *Trichoderma harzianum* (Kieran y col., 1997).

## **2.8. Diversidad de endófitas**

Las bacterias, hongos, actinomycetos están indisolublemente asociadas a las plantas como patogénicas, epifitas, 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, actinomycetos asociadas a las plantas típicamente intercambian señales con su hospedero y poseen diversos mecanismos para adaptación y colonización (Preston y col., 1998). Aspectos importantes de la diversidad de bacterias, hongos, actinomycetos 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 bacterias, hongos, actinomycetos endófitos es altamente variable, depende de la especie (bacteria, hongos, actinomycetos) y el genotipo de la planta hospedera, además del estado de desarrollo de la planta, la densidad del inoculo y las condiciones ambientales (Pillay y Norwak, 1998). Estudios moleculares recientes han revelado una gran riqueza de filotipos de bacterias, hongos y con menor frecuencia actinomycetos endófitos asociados a diferentes especies de plantas.

## **2.9. Características Botánicas de *Piper elongatum* “matico”**

### **2.9.1. Posición taxonómica**

Reino : Vegetal  
Clase : Dicotiledoneae  
Subclase : Archiclamydeae  
Orden : Piperales  
Familia : Piperaceae  
Género : Piper  
Especie : *Piper elongatum*

Sinonimia Vulgar: mocco mocco, cordoncillo, yerba del soldado, matico. (Villar y Villavicencio, 2003).

### **2.9.2. Descripción botánica**

Árbol delgado erecto de 4m de alto. Tallos verdes, glabros, los nudos hinchados. Hojas con corto peciolo, la superficie escabrosa, ovada, de 15x9 cm oblicuamente redondeada en la base, largamente atenuada en el ápice, glabra; nervadura secundaria mayor, levantada desde la mitad inferior de la vena medial. Flores aclamídeas, inflorescencia en espigas apretadas o amentos, erecta, hasta 4mm de grosor y 18 cm de largo, curvada. (Villar y Villavicencio, 2003).

Son comúnmente arbustos o árboles, aromáticos, más o menos leñosos, a veces trepadores o sub-trepadores con **tallos** elongados y usualmente con nudos engrosados, un solo prófalo lateral que aparece usualmente en los nudos floríferos, frecuentemente con la forma de una cobertura parecida a una tapa sobre el ápice del vástago. **Hojas** alternas, pecioladas, simples, enteras o lobuladas solo en la base, iguales en la base foliar o desiguales con un lado más corto en el pecíolo, a veces peltada unidas al pecíolo, variando en textura desde membranosas hasta gruesas coriáceas, de superficie lisa, rugosa o vetricosa en el haz hasta alveolada en el envés, mostrando a menudo, especialmente en el envés, puntos glandulares pálidos u oscuros o conspicuamente alados, más o menos vaginados, en la base diminutos puntos translucidos. Pecíolo con márgenes usualmente angostos o con trayecto hasta la base foliar. Inflorescencia pedunculada con una espiga solitaria, sencilla opuesta a la hoja, lineal-cilíndrica, erecta, ascendente, o péndula, recta o raramente recurvada o arqueada. **Flores** numerosas, usualmente agrupadas densamente o con menos frecuencia, mas aisladas y distantes, principalmente sésiles. **Fruto** con una semilla, carnosos o secos, globoso, piramidal invertido, cilíndrico o turbinado, redondo o anguloso, a veces comprimido lateralmente, trígono o cuadrangular, liso glabro, apilado-pulverulento o hispiduloso, especialmente hacia arriba y alrededor del ápice. (Villar y Villavicencio, 2003).

**2.9.3. Hábitat y distribución:** El matico es una planta oriunda de América del Sur crece entre 2600-2700msnm, prefiere los sitios húmedos, las orillas de los riachuelos y fangos.

**2.9.4. Ubicación en el Perú:** Habita en la sierra baja abrigada de los valles interandinos entre los 2600-2700msnm de los departamentos de Cajamarca, Cuzco, Junín, Lima.

La mayoría de los hongos presentan reproducción sexual y asexual. El estado sexual se denomina teleomorfo o meiospórico y el asexual anamorfo o mitospórico. Es relativamente común que un mismo hongo tenga dos nombres, el del estado anamorfo y el del estado teleomorfo, ya que suelen haberse descubierto y nombrado de forma independiente. En un grupo importante de hongos solamente se conoce la reproducción asexual, porque no se conocen las condiciones adecuadas para que se desarrolle la forma sexual o porque ésta se ha perdido a lo largo de la evolución. La reproducción asexual puede lograrse por fragmentación de las hifas, ya que cada fragmento puede producir una nueva colonia. Los hongos producen millones de esporas, cada una con la capacidad para desarrollar una nueva colonia. Las esporas sexuales se producen tras la fusión de los núcleos de dos hifas sexualmente compatibles o de dos levaduras y posterior meiosis. La morfología de las esporas sexuales es muy variada y tiene gran interés para la identificación fúngica, ya que presentan diferencias características. Los hongos del *Phylum Basidiomycota* producen basidiosporas en el exterior de una estructura denominada basidio, los *Ascomycota* producen ascosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada asco y los *Zygomycota* producen zigosporas. Las esporas asexuales generalmente se producen en hifas especializadas y se denominan de diferente forma según su morfología. Los *Zygomycota* producen esporangiosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada esporangio. Los *Ascomycota* y en menor grado los *Basidiomycota*, producen esporas asexuales denominadas conidios que se desarrollan a partir de una estructura denominada conidióforo. Según su tamaño se diferencian en macroconidios y microconidios (Carrillo, 2003).

### 2.10.1. *Penicillium*

**Morfología:** Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. En la figura 1 se esquematizan 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, rámulas, métulas y fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, 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 (Webster, 1986).

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 estípote, 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  $\mu\text{m}$  y la parte terminal no supera los 3  $\mu\text{m}$  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 (Webster 1986).

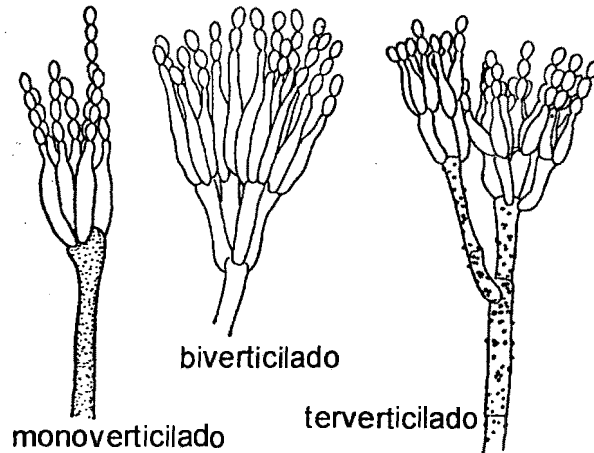


Figura 1: Aspectos morfológicos de Penicilios (Webster 1986).

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* (Bridge y col., 1992) o subgénero *Aspergilloides* (Pitt y Hocking, 1997), 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 *Terverticillata* 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 (Bridge y col., 1992, Pitt y Hocking, 1997).

Las cepas de *Penicillium* con reproducción sexuada corresponden a los géneros teleomórficos *Eupenicillium* que forma cleistotecios con pseudoparénquima constituido por células de pared engrosada, y *Talaromyces* que presenta los ascos rodeados de hifas entrelazadas formando la delgada pared del gimnotecio (Pitt y Hocking 1997). *Eupenicillium* y *Talaromyces* tienen además otros anamorfos en los géneros *Torulomyces* el primero y *Geosmithia*, *Merimbla* y *Paecilomyces* el segundo (Pitt y col., 2000).

**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* tienen fiálides con el extremo curvado y esporas mucosas que se aglomeran, mientras que los penicilios originan xerosporas en fiálides con un eje de simetría. También las especies de *Trichoderma* forman conidios mucosos que se reúnen en cabezuelas con tonos verdes. El género *Scopulariopsis* produce colonias pardas y esporas en anélides (Pitt y Hocking, 1997).

### 2.10.2. *Aspergillus*

**Morfología:** El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (fig.

2) y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato (Kozakiewicz, 1989).

En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos aspergilos hay células adyacentes a las fiáldes denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos (Kozakiewicz, 1989). Las características macro y micromorfológicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar los aspergilos en secciones o grupos. Peterson 2000 eliminó las secciones *Versicolores* y *Usti* e incluyó a las especies en la sección *Nidulantes*, además transfirió una parte de la sección *Wentii* a la *Cremeri* y la otra (*Petromyces*) a la *Flavi* en base a las relaciones filogenéticas surgidas de las secuencias de los fragmentos de ADN ribosomal.

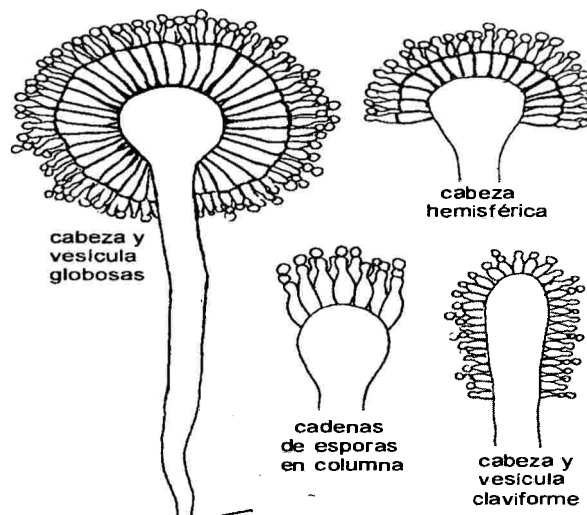


Figura 2: Conidióforos de *Aspergillus* (Kozakiewicz, 1989).

Los teleomorfos poseen meiosporos en ascos que pueden producirse en racimos desnudos o dentro de ascomas. Éstos tienen una pared formada por hifas sueltas, un plecténquima o un tejido estromático. Según Kozakiewicz (1989) la ornamentación superficial de las ascosporas que se observa con el microscopio

electrónico de barrido, es una de las características más fidedignas para la identificación de las especies. Con excepción de *A. fischerianus* (sección *Fumigati*) y especies de las secciones *Aspergilli* y *Nidulantes* que tienen respectivamente, teleomorfos en los géneros *Neosartorya*, *Eurotium* y *Emericella*, no se observan formas perfectas en las condiciones habituales de trabajo (Klich y Pitt, 1992).

**Identificación:** Tradicionalmente se hace en base a las características macro y micromorfológicas en diversos medios de cultivo incubados a distintas temperaturas (Klich y Pitt, 1992), debido a la necesidad de conocer el contaminante para orientar la búsqueda de micotoxinas en un producto. Se han desarrollado métodos inmunológicos rápidos para la identificación de los hongos contaminantes de granos y otros productos vegetales (Banks y col., 1992) y técnicas moleculares en base al polimorfismo del ADN nuclear y mitocondrial, el polimorfismo de tramos de fragmentos amplificados (AFLP), el polimorfismo de tramos de fragmentos de restricción (RFLP) y el polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD) para estudios a nivel intra- e inter-específico (Geiser y col., 2000, Scott y Straus 2000, Voetz y Rath, 2002).

### 2.10.3. *Alternaria*

#### **Morfología e Identificación**

Los conidios de *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 (Webster,

1986). La especie predominante en Argentina es *A. alternata* (Chulze y col., 1994). Es común observar en los hongos una plasticidad morfológica. Cuando las especies de *Alternaria* crecen en medios ricos y en la obscuridad 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 (Andersen y col., 2001). El examen directo de los cultivos sobre Papa-Zanahoria permite diferenciar grupos de especies según los tipos de esporulación (Simmons y Roberts 1993) lo que fue corroborado por el análisis molecular y químico (Roberts y col., 2000; Andersen y col., 2001).

La figura 3 muestra conidióforo y conidios de *A. dauci* (Ellis, 1971), con 5 a 11 septos transversales y 1 a varios longitudinales u oblicuos.

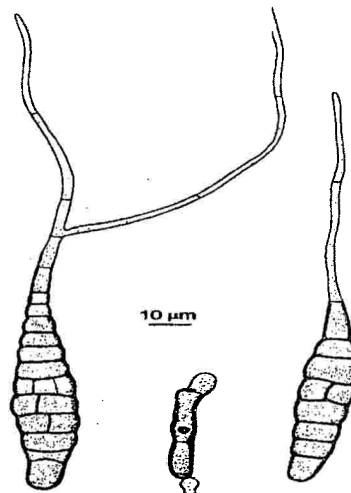


Figura 3: *Alternaria dauci* (Ellis, 1971).

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 (Andersen y col., 2001). 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 (Roberts y col., 2000). La figura 4 muestra conidios de *A. tenuissima* (Ellis, 1971).

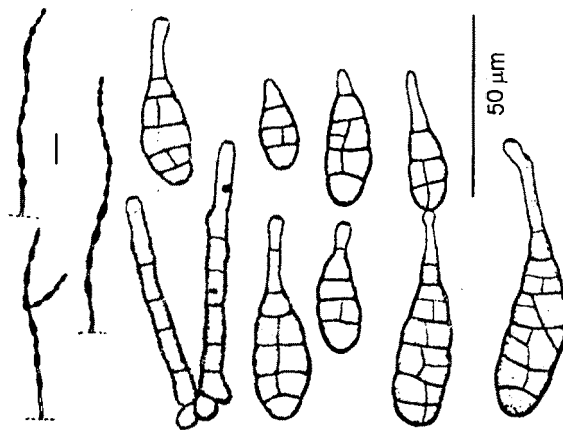


Figura 4: *Alternaria tenuissima* (Ellis, 1971).

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 (Andersen y col., 2001). Las cadenas aparecen en los cultivos como manojos densos y aislados (Roberts y col., 2000). La figura 5 muestra conidios de *A. alternata* (Ellis, 1971) con 1 a 9 septos transversales y varios longitudinales u oblicuos.

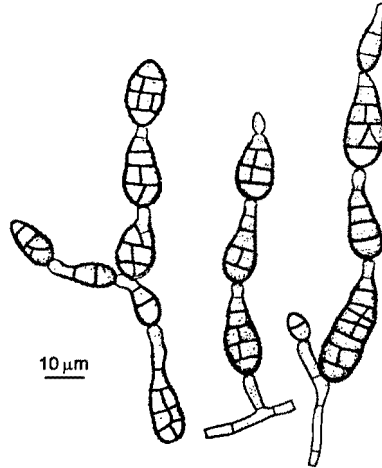


Figura 5: *Alternaria alternata* (Ellis, 1971).

*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 (Andersen y col., 2001). La figura 6 muestra el aspecto general de esporulación de *A. arborescens* (Andersen y col., 2002).

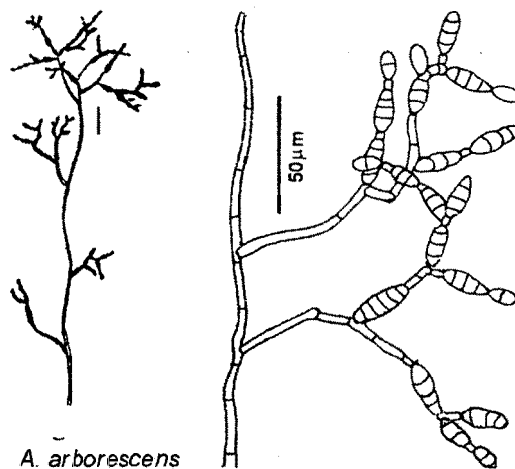


Figura 6: *Alternaria arborescens* (Andersen y col., 2002).

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 (Roberts y col., 2000). La figura 7 muestra el aspecto de la esporulación de *A. infectoria* (Andersen y col., 2002, Ellis, 1971).

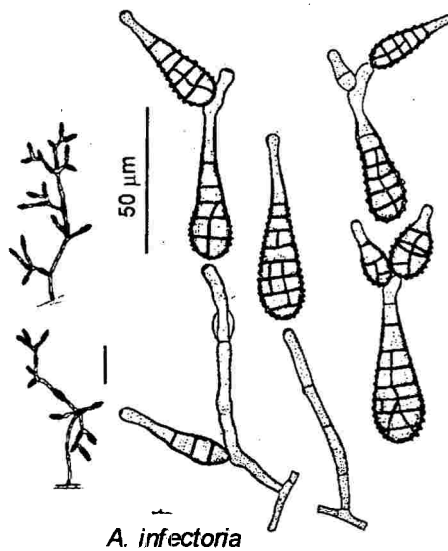


Figura 7: *Alternaria infectoria* (Andersen y col., 2002, Ellis, 1971).

### 2.11. Actinomycetos

Los Actinomycetos son bacterias gram positivas, que generalmente en algún momento de su ciclo de crecimiento desarrollan células filamentosas, ramificadas que fragmentan en elementos cocoides y/o bacilares. Pueden ocurrir formas en "V", "Y", y "T". Los filamentos de 1mm ó menos de diámetro, varían en longitud y grado de ramificación dependiendo de la cepa.

Quimiorganótrofos, los carbohidratos son fermentados con producción de ácido, pero no de gas. Los productos finales de la fermentación de la glucosa pueden incluir ácido acético, fórmico, láctico y succínico, pero no ácido propiónico.

**Mecanismos de acción** No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Fernández, 2001).

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática), e inducción de resistencia (Méndez y Mondino, 1999).

#### a. **Antibiosis**

Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.). La antibiosis es el mecanismo de antagonismo entre microorganismos más estudiado. Es deseable que la antibiosis no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista. Esto se debe a que, al igual que cuando se usan fungicidas sintéticos, existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico (Méndez y Mondino, 1999).

b. **Competencia** Otro de los posibles mecanismos de acción antagónica es la competencia. Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia

más común es por nutrientes, oxígeno o espacio (Méndez y Mondino, 1999; Fernández, 2001).

La competencia por espacio también ha sido reportada; Wilson y colaboradores mencionan que las levaduras son efectivas colonizadoras de la superficie de plantas y destaca la producción de materiales extracelulares (en especial polisacáridos) que restringen el espacio para la colonización por otros microorganismos (Méndez y Mondino, 1999; Fernández, 2001).

### **c. Interacción directa con el patógeno**

Existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos. Ellas son el parasitismo y la predación:

**Parasitismo** El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas,  $\beta$ -1-3-glucanasas y proteasas que rompen las estructuras de los hongos parasitados (Méndez y Mondino 1999; Fernández, 2001).

### **Predación**

En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol. Los reportes más conocidos citan la presencia de amebas en suelos supresores de enfermedades las cuales se alimentan de las hifas de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento (Fernández, 2001).

### **d. Inducción de resistencia**

Las plantas como otros seres vivos del planeta han pasado por un proceso evolutivo desde su aparición sobre la tierra lo que les llevó a desarrollar

mecanismos de defensa muy poderosos contra sus invasores. De esta forma se acostumbra a postular que la resistencia es la regla mientras que la susceptibilidad es la excepción. Si elegimos una planta cualquiera y comparamos el inmenso número de microorganismos que existe en su entorno sobre la tierra con el limitado número de microorganismos patógenos de ella debemos concluir que esto es así. Las plantas presentan entonces mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia. Todos ellos gobernados genéticamente. Se puede inducir resistencia mediante el uso de diferentes inductores como bajas dosis de luz ultravioleta, compuestos naturales de las plantas como quitosano (producto de la deacetilación de la quitina) y también mediante el uso de microorganismos antagonistas. Se ha demostrado que levaduras utilizadas para el biocontrol de patógenos de postcosecha además de competir por espacio y nutrientes son capaces de inducir resistencia en la planta. Tal es el caso de *Pichia guillermondii* (US-7), la cual ha mostrado ser inductora de la producción de fitoalexinas en frutos cítricos (Méndez y Mondino 1999; Fernández, 2001).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación**

El trabajo de investigación, se realizó en el laboratorio de Microbiología Ambiental del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho a 2760 m.s.n.m.

#### **3.2. Tipo de investigación: No experimental**

##### **3.2.1. Diseño: Descriptivo**

#### **3.3. Recolección de datos**

##### **3.3.1. Muestra biológica**

Se colectaron entre 10 – 15 hojas y tallos de *Piper elongatum* “matico”, entre las 7:00 – 8:00 am. por 4 repeticiones, de Nazarenas y Totorilla (lado Este), de San Juan Bautista, Carmen Alto (lado Sur), de Santa Ana, Andamarca, Emadi (lado Oeste) y de la Ciudad Universitaria, A.A.H.H. Covadonga (lado Norte); Ayacucho, en los meses Octubre – Noviembre de 2010 a una altitud de 2760 m.s.n.m.

- Se verificaron que las hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" debían estar aparentemente sanas y sin manchas o cualquier tipo de lesión causada por patógenos o insectos.
- Las hojas y tallos muestreadas se depositaron en bolsas nuevas de polietileno previamente identificadas.
- Se transportaron en condiciones ambientales para su procesamiento en el laboratorio (Araujo y col., 2002).

### 3.3. 2. Desinfección

- Se lavaron las hojas y tallos con agua corriente para retirar los residuos externos.
- Se sumergieron en etanol al 70% por 1 minuto, luego
- En hipoclorito de sodio (3% de cloro activo) por 2 minutos, luego
- En etanol al 70% por 30 segundos.
- Se enjuagaron 6 - 7 veces con agua destilada estéril, de donde se tomó
- Una asada y se sembró en una placa con agar nutritivo por estrías, se incubó a 37 °C por 24 horas, como un control de esterilidad del medio (Pereira y col., 1993) (Araujo y col., 2002).

### 3.3.3. Aislamiento

- Se cortaron las hojas de *Piper elongatum* "matico" previamente desinfectado en trozos de 0,5 x 0.5 cm.
- Se cortaron los tallos *Piper elongatum* "matico" en rodajas aprox. de 1mm de diámetro, previamente desinfectados.
- Se colocaron 6 trozos de la hoja y 2 rodajas del tallo en placas estériles conteniendo los siguientes medios de cultivo: agar sabouraud, agar almidón caseína- KNO<sub>3</sub>, medio Jensen, agar papa dextrosa y agar agua.

- Se incubaron a 28°C por 7 días (para hongos), 28°C por 20 días (para actinomicetos).
- Se aislaron los hongos endofíticos en medios de cultivo en como: agar sabouraud, agar almidón caseína- KNO<sub>3</sub>, medio Jensen, agar papa dextrosa y agar agua (Araujo y col., 2002).

### **3.7. Caracterización e Identificación**

#### **a) Características macroscópicas**

- Las colonias que crecieron fueron observadas y agrupadas según sus características culturales que presentaron cada uno de los géneros.

#### **b) Características microscópicas**

- La identificación de los hongos se hizo en base a los caracteres morfológicos microscópicos y a los caracteres macromorfológicos del desarrollo, entre otras técnicas incluye la de observación con lupa, con estereoscopio, con microscopio de bajo aumento "*in vivo*" (directas, por coloraciones vitales, cultivo en lámina).

### **3.8. Actividad antimicrobiana**

#### **a) Preparación del inóculo**

- A partir de una colonia grande con crecimiento que presenta esporas, se dispuso de placas del mismo tipo, marca, tamaño y forma para hacer los test.
- Las placas para el test deberán contener 15 ml (medidos) de medio de cultivo (SAB por ejemplo).
- Con un asa de siembra se transfirieron repetidas veces las esporas en un tubo conteniendo 2 ml de solución salina fisiológica estéril.
- Se ajustó la turbidez del inóculo con solución salina fisiológica hasta alcanzar la turbidez del tubo N° 0.5 de la escala de MacFarland (Sacsquispe y Velásquez, 2002).

- Se incubó a 28°C por 7 días (crecimiento uniforme), listo para obtener los blocks. (Araujo, y col., 2002).

#### **b) Test antimicrobiano en bloques de gelosa**

- Se dispuso de placas del mismo tipo, marca, tamaño y forma para hacer los test.
- Las placas para el test contenían 15 ml (medidos) de medio de cultivo.
- Se sembró el inóculo de esporas en las placas con medios específicos, luego se diseminó por toda la superficie del medio con hisopo.
- El inóculo de esporas se preparó a partir de un cultivo joven, luego se cosechó las células o esporas (según el caso) y se disolvió en solución fisiológica estéril, hasta una turbidez de 0.5 de la escala de Me Farland.
- Los blocks de gelosa se obtuvieron de una placa conteniendo el microorganismo (actinomiceto u hongo) crecido en forma de tapete: se cortaron usando un sacabocado y ese bloque se colocó sobre la placa conteniendo el microorganismo con quien se desea enfrentar.
- Se incubó por 48 horas a 37 °C, luego se observó los halos de inhibición, se medirá el diámetro de los halos. Se calculará el diámetro promedio (Araujo y col., 2002).

#### **c) Efecto antimicrobiano**

- Se sumergió un hisopo estéril en suspensión de células a partir de las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Enterobacter sp. MOR*, *Shiguella sp. MOR*, *Salmonella paratyphi MOR* y *Staphylococcus aureus* ATCC - 6538 en un tubo conteniendo 2 ml de agua destilada estéril comparando con el tubo Nº 0.5 de la escala de MacFarland, presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

- Se inoculó la superficie seca de la placa de agar Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo.
- Antes de colocar los bloques se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.
- Se colocaron los bloques sobre la superficie del agar Mueller Hinton con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada block para asegurar el contacto completo con la superficie del agar.
- Se incubaron las placas en posición invertida a 37°C por 48 horas finalmente se procedió a medir los halos de inhibición (Sacsquispe y Velásquez, 2002).

#### **IV. RESULTADOS**

**Cuadro N° 01:** Frecuencia de géneros de hongos endofíticos de *Piper elongatum* "matico". Ayacucho, 2010-2011.

N°	CEPA	N°	FRECUENCIA(%)
1	Penicillium	38	67.86
2	Alternaria	16	28.57
3	Aspergillus	2	3.57
	TOTAL	56	100

**Cuadro N° 02:** Número de colonias y género de hongos aislados a partir de las hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" en función al número de muestreo N°1. Ayacucho, 2010-2011.

MEDIO	PARTES DE LA PLANTA		N° DE COLONIA	COD.	CARACTERÍSTICA CULTURAL	GÉNERO
	TALLO	HOJA				
	(T)	(H)				
AS	•		3	1ST3	Blanco algodonoso transparente, inverso negro	Alternaria
MA		•	3	1AH3	Verde central pulverulento con borde blanco, inverso blanco	Penicillium
MJ		•	1	1JH1	Blanco algodonoso transparente	Alternaria
AH <sub>2</sub> O		•	1	10H1	Blanco transparente, algodonoso , inverso blanco transparente	Aspergillus
APD		•	1	1PH1	Plomo, verde, negro con centros redondeados, pulverulentos	Alternaria
TOTAL			9			

AS = Agar Sabouraud

MJ = Medio Jensen

MA = Agar almidón caseína KNO<sub>3</sub>

AH<sub>2</sub>O = Agar agua

APD = Agar papa dextrosa

**Cuadro N°03:** Número de colonias y género de hongos y actinomicetos aislados a partir de las hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" en función al número de muestreo N°2. Ayacucho, 2010-2011.

MEDIO	PARTES DE LA PLANTA		N°DE COLONIA	COD.	CARACTERÍSTICA CULTURAL	GÉNERO
	TALLO	HOJA				
	(T)	(H)				
AS		•	4	2SH4	Color verde oscuro parte central, bordes blancos	Penicillium
MA		•	2	2AH2a	Blanco-plomizo algodonoso, inverso pardo oscuro	Alternaria
		•	2	2AH2b	Borde blanco, centro verdoso, pulverulento	Penicillium
MJ		•	3	2JH1	Plomo algodonoso, inverso de color negro	Alternaria
MJ		•	1	2JH1A	Colonias blancas, de aspecto duro	Actinomiceto (sin identificar)
AH <sub>2</sub> O	•		3	2OT3	Verde oscuro, pulverulento	Penicillium
APD	•		1	2PT1	Blanco transparente, algodonoso , inverso blanco transparente	Aspergillus
TOTAL			15			

**Cuadro N°04:** Número de colonias y género de hongos aislados a partir de las hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" en función al número de muestreo N°3. Ayacucho, 2010-2011.

MEDIO	PARTES DE LA PLANTA		N° DE COLONIA	COD.	CARACTERÍSTICA CULTURAL	GÉNERO
	TALLO	HOJA				
	(T)	(H)				
AS		•	3	3SH3	Borde blanco y con centro de color verde, pulverulento, inverso color blanco	Penicillium
MA		•	2	3AH2	Borde blanco y con centro de color verde, pulverulento, inverso color blanco	Penicillium
MJ		•	2	3JH2	Borde blanco y con centro de color verde, pulverulento, inverso color blanco	Penicillium
AH <sub>2</sub> O	•		2	3OT2	Colonias verde pulverulentas	Penicillium
APD		•	3	3PH3	Borde blanco y con centro de color verde, pulverulento, inverso color blanco	Penicillium
	•		1	3PT1	Borde blanco y con centro de color verde, pulverulento, inverso color blanco	Penicillium
TOTAL			13			

**Cuadro N°05:** Número de colonias y género de hongos aislados a partir de las hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" en función al número de muestreo N°4. Ayacucho, 2010-2011.

MEDIO	PARTES DE LA PLANTA		N° DE COLONIA	CÓDIGO	CARACTERÍSTICA CULTURAL	GÉNERO
	TALLO (T)	HOJA (H)				
AS		•	2	4SH2a	Verde algodonoso con blanco, inverso de color blanco	Penicillium
	•		1	4ST1b	Verde pulverulento, con borde blanco, inverso de color blanco	Penicillium
MA		•	1	4AH1a	Plomo algodonoso, inverso de color negro	Alternaria
	•		2	4AT2b	Verde pulverulento, bordes blancos, inverso de color blanco	Penicillium
MJ		•	1	4JH1	Verde oscuro aterciopelado	Penicillium
AH <sub>2</sub> O		•	4	4OH4a	Colonias transparentes con puntos negros en el centro	Alternaria
	•		1	4OT1b	Colonias transparentes con puntos negros en el centro	Alternaria
APD		•	1	4PH1a	Verde pulverulento, bordes blancos, inverso de color amarillo	Penicillium
		•	1	4PH1b	Verde pulverulento, bordes blancos, inverso de color naranja	Penicillium
	•		2	4PH2c	Verde pulverulento, con borde blanco, inverso de color blanco	Penicillium
		•	3	4PH3d	Verde pulverulento, con borde blanco, inverso de color blanco	Penicillium
TOTAL			19			

**Cuadro Nº 06:** Porcentaje de aislamientos fúngicos de cada órgano sembrado de la planta de *Piper elongatum* "matico" Ayacucho, 2010-2011.

Muestra	Órganos de la planta	Nº total de colonias	Nº de colonias por órgano	Frecuencia (%)	Total
M1	Hoja	9	6	66.67	100
	Tallo		3	33.33	
M2	Hoja	15	11	73.33	100
	Tallo		4	26.67	
M3	Hoja	13	10	76.92	100
	Tallo		3	23.08	
M4	Hoja	19	13	68.42	100
	Tallo		6	31.58	
TOTAL		56	56		

**Cuadro N° 07:** Medidas de los halos de inhibición de crecimiento en mm de bacterias patógenas frente a cepas de hongos endofíticos aisladas de hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico". Ayacucho, 2010-2011.

Géneros	Códigos	Promedio de halos formados (mm)					
		1	2	3	4	5	6
Penicillium	3JH2	-	-	-	-	-	23
Alternaria	2JH1	-	-	-	-	-	-
Penicillium	3OT2	-	-	-	-	-	-
Alternaria	1TH3	-	-	-	-	-	-
Aspergillus	2PT1	-	-	23	-	16	-
Alternaria	2AH2a	-	-	-	-	-	-
Penicillium	3SH3a	-	-	-	-	-	-
Penicillium	2AH2b	-	-	-	-	-	-
Alternaria	1PH1	-	-	-	-	-	41
Penicillium	4AT2b	-	-	-	-	-	38
Penicillium	4PH7a	-	-	-	-	-	-
Alternaria	4AH3a	-	-	-	-	-	-
Penicillium	2OT2	-	-	-	-	-	-
Penicillium	4JH1	-	-	-	-	-	-
Penicillium	4SH1a	-	-	-	-	-	-
Penicillium	3AH2	-	-	-	-	-	-
Penicillium	4PH7c	-	-	-	-	-	-
Penicillium	4PH7d	-	-	-	-	-	-
Penicillium	4AH3c	-	-	-	-	-	10
Penicillium	3PH3b	-	-	-	-	-	21
Penicillium	3PT1	-	-	-	-	-	10
Penicillium	3PH3a	-	-	-	-	-	-
Penicillium	4PH7b	-	-	-	-	-	-
Penicillium	2SH43	-	-	-	-	-	-

1 = *Escherichia coli* ATCC 25922  
 3 = *Enterococcus faecalis* ATCC 6057  
 5 = *Salmonella paratyphi* MOR

2 = *Enterobacter sp* MOR  
 4 = *Shigella sp* MOR  
 6 = *Staphylococcus aureus* ATCC-538

**Cuadro N° 08:** Número de cepas de hongos endofíticos aisladas de hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" en función al tipo de medio de cultivo utilizado Ayacucho, 2010-2011.

Medio		Cepa	N° colonias	%
Agar Sabouraud	M1	Alternaria	3	5.36
	M2	Penicillium	4	7.14
	M3	Penicillium	3	5.36
	M4	Penicillium	3	5.36
MedioAACK	M1	Penicillium	3	5.36
	M2	Alternaria/Penicillium	4	7.14
	M3	Penicillium	2	3.57
	M4	Alternaria/Penicillium	4	7.14
Medio Jensen	M1	Alternaria	1	1.79
	M2	Alternaria	3	5.36
	M3	Penicillium	2	3.57
	M4	Penicillium	1	1.79
AgarAgua	M1	Aspergillus	1	1.79
	M2	Penicillium	2	3.57
	M3	Penicillium	2	3.57
	M4	Alternaria	5	8.91
Agar Papa Dextrosa	M1	Alternaria	1	1.79
	M2	Aspergillus	1	1.79
	M3	Penicillium	4	7.14
	M4	Penicillium	7	12.5
TOTAL			56	100

## V. DISCUSIÓN

En el cuadro N°1 representa el total del número de colonias aisladas a partir de las hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" en la que se pudo aislar 56 colonias incluidas por los tres géneros, de tal forma que el mayor porcentaje representa el género *Penicillium* con un 67.86%, el género *Alternaria* destaca con un 28.57% y por último el género *Aspergillus* representa sólo el 3.57% del total de las colonias de hongos aislados.

Rivera (2006), publicó su trabajo de investigación del aislamiento e identificación de hongos endofíticos productores de taxol a partir de muestras mexicanas y europeas en la que logró la obtención de 30 cepas diferentes de hongos, 22 de las muestras de *Taxus globosa* y 8 de las de *Taxus baccata*. Sólo una de las muestras utilizadas presentó el producto de amplificación del tamaño esperado. Un paso posterior de confirmación por HPLC de la producción de taxol por la cepa A1D8 es, sin embargo, necesario para tener la certeza de contar con el microorganismo apropiado. El porcentaje de microorganismos productores de taxol (1/30) es más bajo que el obtenido por Zhou y colaboradores (12/38) (2), pero permitirá continuar con el proyecto de estudio de la ruta de biosíntesis de taxol por hongos.

Las bacterias, hongos, actinomycetos están indisolublemente asociadas a las plantas como patogénicas, epifitas, 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 asociadas a las plantas típicamente intercambian señales con su hospedero y poseen diversos mecanismos para adaptación y colonización (Preston col., 1998). 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.

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

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

Sayuri (2006), en la Universidad de Sao Paulo (Brasil) trabajó la diversidad y el potencial biotecnológico de los hongos endofíticos del cacao *Theobroma cacao L.* como controlador biológico de *Crinipellis pernicioso* aislando cepas fúngicas como *Fusarium*, *Gibberella*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Verticillium*.

Chapaval (2005), junto a colaboradores trabajó en Floresta 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 adultas que en las hojas jóvenes, del mismo modo existe gran diversidad de hongos endofíticos en las hojas de la hierba-mate nativas que las que son cultivadas, entre los hongos endofíticos aislados

destacan el *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Dendrophoma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Verticillium* y 13 hongos aun no identificados.

En el cuadro N°2 observamos el número de colonias y la diversidad de géneros aislados a partir de las hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" con crecimientos de las colonias reconocidas por sus características culturales de las cuales en la primera muestra se puede observar que se obtuvo un 55.56% de *Alternaria*, 33.33% de *Penicillium* y el 11.11% de *Aspergillus*, obtenidas un total de 9 colonias aisladas.

En el cuadro N°3 nos muestra que fueron aisladas 15 colonias a partir de hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" entre los cuales destaca con un 60% el género *Penicillium*, un 33.33% está el género *Alternaria* y un 6.67% se encuentra el género *Aspergillus*.

En el cuadro N°4 como se puede observar, se aisló 13 colonias de hongos a partir de hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" representando en un 100% del género *Penicillium*.

En el cuadro N°5 muestra el total de 19 colonias aisladas, el 68.42% representa el género *Penicillium* y un 31.58% se encuentra el género *Alternaria*.

Podemos afirmar también que cepas fúngicas endofíticas como el *Aspergillus* y *Alternaria* fueron encontradas en plantas medicinales como en el *Piper barbatum*, *Baccharis obtusifolia* (Ramirez y col., 2006), de la misma forma según Chapaval encontró hongos endofíticos del género *Penicillium* y *Aspergillus* a partir de las hojas la hierba-mate *Ilex paraguariensis* nativas y cultivadas.

Araújo 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 fueron aisladas,

31 de ellos de hojas y 22 de raíces. El género *Microbispora* fue el más frecuente seguido por los géneros *Streptomyces* y *Streptosporangium*. Desde el actinomicetes aislados, el 43,4% mostró actividad antimicrobiana contra una o más bacterias probadas.

En el cuadro N°6 señala el porcentaje de aislamientos fúngicos de cada órgano sembrado de la planta de *Piper elongatum* "matico", teniendo como resultado en los cuatro muestreos un elevado porcentaje de cepas fúngicas que crecen a partir de las hojas de la planta (*Piper elongatum* "matico"), órgano de la planta con mayor crecimiento de hongos endofíticos a diferencia del tallo.

Un fenómeno que aparece registrado tanto para zonas tropicales como templadas, es el de la especificidad de endosimbiontes por tejidos vegetales particulares. Esto ha sido postulado para hongos xilariáceos en tejidos vegetales aéreos de árboles tropicales aunque en algunos casos la infección aparentemente solo se verifica luego de la caída del órgano al suelo. En un estudio con el árbol tropical *Gynoxis oleifolia* (*Asteraceae*), se observó que algunas especies de endófitos eran exclusivas de la raíz, mientras que otras especies de hongos habitan la corteza y las hojas (Carroll y Petrini, 1983). Aunque en dicho estudio no se encontró preferencia del hongo por sectores específicos de la hoja, en estudios realizados con palmas tropicales se ha observado especificidad de algunos taxones endosimbiontes por tejidos foliares particulares. De otro lado, esta preferencia de endosimbiontes por tejidos vegetales no es universal para las plantas tropicales; en Puerto Rico, en orquídeas epífitas del género *Lepanthes*, no se presentaron diferencias significativas entre los hongos endófitos de raíces y tallos.

Una consecuencia de la discriminación fúngica por los tejidos vegetales es que se evita el hacinamiento, ya que las comunidades de hongos endófitos de plantas tropicales se caracterizan por poseer una gran cantidad de especies e

individuos y un patrón de distribución altamente agregado a una escala muy fina (Carroll y Petrini, 1983). La especificidad de tejidos permitiría una mejor repartición del recurso disponible, disminuyendo así la competencia entre los endosimbiontes. En realidad se sabe muy poco acerca de la distribución de los hongos endófitos en los tejidos de un mismo órgano. Por ejemplo, es posible encontrar diferentes especies en cada uno de los tejidos de una hoja: parénquima, haces vasculares, dermis, etc. Esta preferencia por tejidos vegetales también podría interpretarse como la capacidad de cada especie de usar ciertos sustratos específicos. El uso diferencial de sustratos por parte de hongos endófitos ha sido comprobado, siendo tal repartición bioquímica de recursos una estrategia viable para poder coexistir en un mismo órgano (Carroll y Petrini, 1983).

En el cuadro N°7 se observa la medida de la formación de los halos de inhibición frente a cepas patógenas, como se ve cuatro cepas aisladas de hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" del género *Penicillium* (3JH1) con 23mm, *Alternaria* (1PH1) con 41mm, *Penicillium* (4AT2b) con 38mm y *Penicillium* (3PH3b) con 21mm muestran una capacidad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* ATCC – 6538; de la misma forma la cepa *Aspergillus* (2PT1) presenta una capacidad inhibitoria frente a *Salmonella paratyphi* MOR con una formación del halo de 16 mm y también frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 con 23mm.

Se documenta además, el potencial de estos organismos como gentes controladores de patógeno (Carroll, 1988). Este fenómeno de biocontrol se presentó debido a que los endofíticos pueden establecer una relación mutualista con la planta desde su interior, mediante la cual le confieren protección contra factores bióticos y abióticos adversos (Carroll 1990) (Schulz y Boyle 2006).

Según Ramirez y col. (2006), en su 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-Ecuador publicó acerca de la evaluación de la interacción antagónica entre los aislados fúngicos y bacterias patógenas, las cepas con las que se evaluó la interacción fueron: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC, 25923), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, (ATCC, 9997), *Pseudomonas aeruginosa*, (ATCC, 27853), *Escherichia coli* (ATCC, 25922).

Los resultados de la interacción antagónica de algunas de las cepas de hongos aislados que mostraron actividad frente a bacterias patógenas fue que la mayoría de las cepas fúngicas endofíticas 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* (Ramírez y col., 2006).

Para el estudio etnobotánico de la «Planta de Productos Naturales», comentan los beneficios de las siguientes especies de interés medicinal analizadas en este estudio: *Baccharis obtusifolia* Kunth, vértigo, reumatismo y micosis de la piel, *Borreria laevis* Grises, para el espanto, en aplicación directa de sus hojas maduras machacadas, *Piper barbatum* Kunth, en dermatitis, como desinfectante y cicatrizante, *Baccharis latifolia* como antiinflamatorio, cólico estomacal y cólico hepático, *Chuquiragua jussieui* J.F. Gmel, para resfriados, gripe, tos, dolor de huesos y *Bidens andicola* Kunth, contra la cefalea e insolación (Ramírez y col., 2006).

Los principales taxa aislados fueron: *Mycelia sterilia* (micelios sin fructificaciones), *Alternaria*, algunos representantes de los coelomycetes y algunos hongos ambientales comunes (*Acremonium*, *Epicoccum*, *Fusarium*,

*Phoma*), estos últimos se encuentran comúnmente en el aire como epífitos o en asociación con diversos sustratos (Ramírez y col., 2006).

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. Resulta de interés considerar que dentro de los beneficios medicinales de algunas de las 6 vegetales analizados, se mezcla su acción analgésica, antiinflamatoria y antimicrobiana, donde los endófitos fúngicos podrían contribuir en sus efectos benéficos en la farmacopea popular (Ramírez y col., 2006).

En el cuadro N°8 muestra el número de cepas de hongos endofíticos aisladas de hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" en función al tipo de medio de cultivo en el que se usó cinco tipos de medios de cultivo: agar papa dextrosa, agar sabouraud, agar agua, medio Jensen y medio AACK utilizado, el medio de cultivo que presentó mayor crecimiento de hongos fue el agar papa dextrosa el que representa un 12.5%, seguido del agar agua con un 8.91%, agar sabouraud con un 7.14% y de menor porcentaje el resto de los medios de cultivo.

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 fotosintatos, 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. Nuestros estudios indican que los hongos endófitos no afectan la tasa fotosintética de sus hospederos naturales en el estadio de plántula, aunque recientemente se reporta el efecto negativo de los endófitos en plantas tropicales de interés comercial (Gamboa, 2006).

## VI. CONCLUSIONES

1. A partir de las hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" se aislaron 56 cepas de hongos la cual 38 pertenecen al género *Penicillium*, 16 al género *Alternaria*, 2 al género *Aspergillus* y una cepa de actinomiceto.
2. Seis cepas aisladas de hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" del género *Penicillium* (3JH1), *Alternaria* (1PH1), *Penicillium* (4AT2b), *Penicillium* (3PH3b), *Penicillium* (4AH3c), *Penicillium* (3PT1), mostraron una capacidad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* ATCC – 6538, y el género *Aspergillus* (2PT1) presentó una capacidad inhibitoria frente a *Salmonella paratyphi* MOR y también frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 6057.
3. El actinomiceto endofítico (sin identificación) no tuvo efecto antimicrobiano contra bacterias patógenas trabajadas.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Seleccionar a los hongos y actinomicetos endofíticos específicos, debido a la existencia de hongos ambientales o bacterias como contaminantes, para ello se debe trabajar con bastante esterilidad, para así tener aislamientos mucho más eficaces y realizar trabajos como potenciales productoras de nuevos metabolitos de importancia farmacológica.
2. Realizar este tipo de trabajos de investigación de forma más avanzada con distintas especies de plantas medicinales, ya sean de nuestra región o fuera.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Agrios, G.** 1998. Fitopatología. Sexta Edición. Editorial Limusa. México.
2. **Andreote, D., Gullo, M., Lima, S., Maccheroni, W., Azevedo, L. y Araújo, L.** 2004. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. *Journal of Microbiology*, Vol. 42, p. 169 - 173.
3. **Andersen, B., Thrane, U.** 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *A. alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 685- 689.
4. **Araújo, W., Sousa, A., Azevedo, J., Marcon, J., Kuklinsky, J. y Teixeira, P.** 2002. Manual: Isolamento de Microrganismos endofíticos. Universidad de Sao Paulo. Primera Edición. Brasil.
5. **Arif, M., Grant, M., Fung, W., Chau, W., Strobel, G., Ford, E., Worapong, J. y Harper., K.** 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* 60:179 - 183.
6. **Azevedo, L., Maccheroni, W., Pereira, O. y Araujo, L.** 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants.
7. **Azevedo, L.** 1998. Microorganismos endofíticos: Ecología Microbiana primera edición, Jaguariuna: EMBRAPA/CNPNA, p. 117 - 137.
8. **Bacon, C., White, J.** 2000. Microbial Endhopytes. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
9. **Baldani, J., Reis, V., Baldani, D. y Dobereiner, J.** 2002. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. *Functional Plant Biology*, v.29, p.417 - 423.

29. Coombs, T., Michelsen, P. y Franco, M. 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* in wheat Biological control, v. 29, p. 359 - 366.
30. Di cello, F., Bevivino, A., Chiarini, L., Fani, R., Pàffetti, D. y Tabacchioni, S. 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages Applied and Environmental Microbiology, v 63, p. 4485 - 4493.
31. Dworkin, M. 1996. Social and developmental biology of the myxobacteria. Microbiological Reviews 60: 70-102.
32. Ellis. M. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew.
33. Estrada, P., Mavingui, P., Cournoyer, B., Fontaine, F., Balandreau, J., Caballeromellado, J. 2002. A N<sub>2</sub>-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. Canadian Journal of Microbiology. V 48, P. 285–294.
34. Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 62 p. 96-100.
- Flechter A, 1984. Physical and chemical Parameters of Microbial Growth. Advances in Biochemical Engineering Vol. 30, 7-60.
35. Flores, F., Vargas, R., Maldonado, Z., Flores, M. y Pérez, G. 2008. Relaxant and antispasmodic effect in isolated Guinea pig ileum treated with extracts of *Xylaria* sp. An endophytic fungus of the mexican yew, *Taxus globosa*. Pharmacologyonline 2: 134 - 145.
36. Fuentes, E., Jiménez, T., Abarca, R. y Caballero, J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indole - acetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars in México. Plant and Soil. 154:145 - 150.
37. Gamboa, G. 2006 Hongos endófitos tropicales: conocimientos actuales y perspectivas; Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Colombia.

- 38. Gao, P., Rush, D., Pfund, P., Huang, T., Bauer, M. y Morozowich W.** 2003. Development of a supersaturable SEDDS (S-SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability. *J Pharm Sci* 92:2386. EE.UU.
- 39. Geiser, D.** 2000. Molecular and analytical tools for characterizing *Aspergillus* and *Penicillium* species at the intra and interspecific levels. pp. 381-394 en: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*. Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia.
- 40. Germaine, K., Keogh, E., Garcia-Cabellos, G., Borremans, B., Van Der Lelie, D., Barac T., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Porteous Moore, F., Moore, E., Campbelcolin, D., Ryan D., Owling, D.** 2004. Colonisation of poplar trees by *gfp* expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiology Ecology*. V 48, 109–118.
- 41. Green, J., Bohannan, B.** 2006. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Microbial ecology*, V. 21 n. 9, 501-507.
- 42. Jacobs, M., Bugbee, W., Gabrielson, D.** 1985. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Canadian Journal of Botany*. v.63, p. 1262-1265.
- 43. James, E.** 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65: 197 – 209.
- 44. Jiménez-Salgado, T., Fuentes-Ramírez, L., Tapia-Hernández, A., Mascarua-Esparza, M., Martínez-Romero, E., Caballero-Mellado, J.** 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 63:3676-3683.
- 45. Hallmann, J. y Berg, G.** 2006. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. *Microbial*

- root endophytes. Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag. p. 15-32. (Soil Biology vol. 9).
46. **Hallmann, J., Quadt, A., Mahaffee, F. y Kloepper, W.** 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:8995-914.
  47. **Harman, G., Howell, R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M.** 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 2, 43-56.
  48. **Hernández, L. y Escalona, A.** 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR (en línea). *La ciencia y el hombre. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana* 16(1) México.
  49. **Hirano, S., y Hupper.** 2000. Bacteria in the leaf Ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, Ice nucleus and Epiphytic Microbiology and Molecular Biology Review. v.64, p 624-653.
  50. **Howell, C.** 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases, Vol 87.
  51. **Holland, A. y Polacco, C.** 1994. PPFMs and other covert contamination: there more to plant physiology than just plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:197 - 209.
  52. **Huawei, Z., Youg, Ch. y Ren X.T.** 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*. 23, 753-771.
  53. **Hurek, T., Reinhold, B., Van Montagu, M. y Kellenberger, E.** 1994. Root colonization and systematic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal Bacteriology*. 176:1913 - 1923.
  54. **Huang, J.**1991. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annual Review of Phytopathology*. v. 24, p.141-157.

55. **Khammas, K., Kaiser, P.** 1991. Characterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. *Plant Soil*. v.137, p 75-79.
56. **Kieran, M., Macloughlin, F. y Malone, M.** 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of biotechnology* 59: 39 - 52.
57. **Kirk, J., Beaudette, L., Hart, M., Moutoglīs, P., Kliromonos, J., Lee, H., Trevors, J.** 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, v. 58, p. 169-188.
58. **Klich, M., Pitt, J.** 1992. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, Australia.
59. **Kozakiewicz, Z.** 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
60. **Kuklinsky, J.** 2004. A Comunidade Bacteriana endofítica e epifítica de Soja (*Glycine max*) e Estudo da Interacao Endófitos - Planta. Tesis doctoral. Universidad de Sao Paulo. Brasil.
61. **Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W., Mendes, R., Geraldi, I., Pizzirani-Kleiner, A., Azevedo, J.** 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*. 6:1244-1251.
62. **Kunoh, H.** 2002. Endophytic Actinomycetes: attractive biocontrol agents. *Journal of Genetics and Plant Pathology*, v. 68, p. 249 - 252.
63. **Kloepper, J., Schippers, B., Bakker, P.** 1992. Proposed limination of the term endorhizosphere. *Phytopathology*. 82:726–727.
64. **Lacava, T., Dini, A., Araujo, W., Azevedo, J.** 2006. Caracterização da comunidade de bactérias endofíticas de cítricos por isolamento, PCR

- especifica e DGGE. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 41, p. 637-542.
65. **Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, B., Taghavi, S., Mezgeay, M. y Van Der Leite, D.** 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 21:583 - 606.
66. **Lugtenberg, J. y Dekkers C.** 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology* 1(1):9 - 13.
67. **Long, H., Furuya, N., Kurose, D., Takeshita, M., Takanami, Y.** 2003. Isolation of endophytic bacteria from *Solanum* sp. and their antibacterial activity against plant pathogenic bacteria. *Journal of the Faculty of Agriculture. Kyushu Univ.*, V. 48, P. 21-28.
68. **Madigan, T., Martinko, J., Parker, J.** 2003. **Brock-Biology of Microorganisms.** Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
69. **Makowiecky, R.** 2006. Comunidade de fungos endofíticos associada a caña de açúcar convencional e genéticamente modificada. *Universidade de Sao Paulo. Brasil.*
70. **Méndez, S. y Mondino, P.** 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional. Noviembre de 1999, Año 7, nº 26.*
71. **Misaghi, I., y Donndelinger, C.** 1990. Endophytic bacteria in symptom-free Cotton plants. *Phytopathology.* v.80, p. 808-811.
72. **McCully, E.** 2001. Niches of bacterial endophytes in crop plants: plant biologists new. *Australian Journal of plant physiology* v. 28, p. 989 - 990.
73. **McInroy, A. y Kloepper, W.** 1995. Population dynamics of endophytic bacteria in field-crow sweet corn and cotton. *Canadian Journal Microbiology*, 41: 895- 90.
74. **Moore, F., Barac, T., Borremans, B., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Van Der Lelie, D., Campbel, C., Moore, E.** 2006. Endophytic bacterial diversity

- in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Systematic and Applied Microbiology*. V. 29, p. 539–556.
75. **Mocali, S., Bertelli, E., Di C., Mengoni, A., Sfalanga, A., Villani, F., Caciotti, A., Tegli, S.** 2003. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Research in Microbiology*. v.154, p. 105–114.
76. **Navarro, F., Santos, T., Rocha, F., Bremm, L., Jkoski, M., Ribeiro, G. y Kozłowski, A.** 1998. Efeito do digluconato de clorexidina *Plantago major* e placebo sobre placa dental e gengivite: Uma comparacao clínica da eficacia de colutorio. *Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis*; 1: 24 - 7.
77. **Neto, P., Azevedo, L. y Caetano G.** 2004. Microorganismos endofíticos em plantas: Status atual e perspectivas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y aromatic*, V.3, P. 69 - 72, 2004.
78. **Newman, A. y Reynolds, C.** 2005. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology*, v.23, p.6 - 8.
79. **Núñez, T.** 2006. Estudio de poblaciones de bacterias endofíticas de la rizósfera del banano para el biocontrol del nematodo barredor *Radopholus similis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, FONTAGRO/BIOVERSITY/CATIE. 62p.
80. **Orozco, F., Medina, M. y Sarria, P.** 2008. Aislamiento y evaluación de micrororganismos endofitos de aliso *Alnus acuminata* var. *Acuminata*. Universidad Nacional de Antioquia, Facultad de Ciencia Agrarias. Colombia.
81. **Pan, J., Rademan, S., Kunert, K. y Hastings, W.** 1997. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp.

- Cubense race 4 by endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. Journal of phytopathology. v 145, p. 479 - 486.
82. **Paterson, R., Bridge, P.** 1994. Biochemical Techniques for Filamentous Fungi. CAB International, Wallingford. pp. 60, 89.
83. **Phaff, H.** 1981. Microorganismos industriales. Investigación y Ciencia 62: 22-37.
84. **Plachcinska, J., Kusmierek J., Kosmider M., Bienkiewicz M. y Liniecki J,** 1984. Influence of Medicinal herbs on the immune system. I-Induction of endogenous interferon. Fitoterapia Vol. LV, Nº 6 pág. 346 - 348
85. **Pereira, O., Azevedo, L., y Petrini, O.** 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*. Micología, 885:362 - 364.
86. **Pérez, R.** 1995. Sideróforos: un factor a considerer cuando se evalúa la habilidad competitiva de Rhizobios para nodular alfalfa. XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Cruz-Bolivia.
87. **Petrini, O., Sieber, T., Toti, L., Viret, O.** 1992. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. Natural Toxins, Vol. 1, 185-196.
88. **Pillay, V. y Norwalk J.** 1997. Inoculum, density, temperature, and genotype effect on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum L.*), seeding inoculated with a *Pseudomonas* bacterium. Canadian Journal of Microbiology, v 43, p.354-361.
89. **Pitt, J., Hocking, A.** 1997. Fungi and Food Spoilage. 2º ed. Blackie Academic & Professional, London.
90. **Pitt, J.** 2000. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. pp. 9-49 en: Integration of Modern Taxonomic Methods for

*Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Samson RA, Pitt JI, editores.  
Harwood Academic Publishers, Australia.

91. Pocasangre, L., Donaldo, R., Felde, Z. 2000. Hongos Endofíticos como agentes biológicos de control de Fitonemátodos en banano, In Riveros S.A., 250-254pp.
92. Pocasangre, E., Felde, A., Cañizares, C., Riveros, S., Rosales, E. y Sikora, R. 2004. Manejo alternativo de fitonemátodos en banano y plátano. In Memorias, XVI reunión internacional de ACORBAT, Oaxaca, MX. p. 106 - 112.
93. Preston, G., Haubold, B., Rainey, P. 1998. Bacterial genomics and adaptation to life plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbioses. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, p. 589-597.
94. Quadt, A., Hallmann, J. y Kloepper, W. 1997. Bacterial endophytes in cotton: localization and interaction with other plant-associated bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:254 - 259.
95. Quadt-Hallmann, A., Benhamou, N., Kloepper, J. 1997. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.577-582.
96. Quispel. 1992, A search for signals in endophytic microorganism, pp 471-491. In Verma, D.P.S. (ed).
97. Ramírez, R., Yandry, J., Delgado, E., Rodolfi, M., Solveig, T. 2006. Actividad antagónica de Hongos Endófitos de Plantas Medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. Universidad Técnica particular de Loja. Boletín Micológico Vol. 21 : 49 – 53. Ecuador.
98. Ranjard, L., Poly, F., Nazaret, S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environmental. *Research Microbiology*, v. 151, p. 167-177.

99. **Reinhold–Hurek, y Hurek.** 1998. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus spp.* And other diazotrophs: Identification, Localization and perspectives to study their function. *Critical Reviews in plant Sciences* 17:29 - 54.
100. **Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K., De-Ley, J.** 1993. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 43:574-584.
101. **Reis, M., Olivares, L. y Dobereiner, J.** 2000. Improved methodology for isolation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 17:13 - 18.
102. **Riggs, J., Chelius, K., Iniguez, L.; Kaeppler, M. y Triplett, W.** 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aus. J. Plant Physiol.,* 28:829 - 836.
103. **Rivera-Rosas, P., Paola, I., Martínez, Gonzales, Araceli, Tomasini.** 2006. Aislamiento e Identificación de Hongos endofíticos productores de Taxol a partir de muestras Mexicanas y Europeas. Mexico.
104. **Roberts, R.** 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research* 104: 151-160.
105. **Sacsaquispe, E., y Velásquez, J.** 2002. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. Instituto Nacional de Salud.
106. **Sagrera, F.** 1991. *Enciclopedia de Medicina Natural.* Plantas medicinales. Séptima edición. Editorial Osiris. Buenos Aires, Argentina.

107. **Saikkonen, K., Wali, P., Helander, M., y Faeth, S.** 2004. Evolution of endophyte – plant symbioses. *Trends in Plant Science, Oxford*, v.9, 275 - 280.
108. **Sakiyama, C., Paula, E., Pereira, P., Borges, A., Silva D.** 2001. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries, *Letter in Applied Microbiology*. 333. p. 117-121.
109. **Salerno, I., Gianinazzi, S., Gianinazzi, V.** 2000. Effects on growth and comparison of root tissue colonization patterns of *Eucalyptus viminalis* by pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* *New Phytopathology*, 146: 317 - 324.
110. **Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Borgonovi, M., Merli, S.**1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from Surface-sterilized. Roots. University of Milan, Italy. v. 58, pág.2691 – 2693.
111. **Sayuri, C.** 2006. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau *Theobroma cacao*. Universidad de Sao Paulo. Brasil.
112. **Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U., Wilhelm, E.** 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*. V. 39 , p. 23-32.
113. **Schroth, N. y Hancock, G.** 1982. Disease-Suppressive Soil and Root-Colonizing Bacteria California.
114. **Schlöter, M., Leubhn, M., Heulin, T. y Hallmann, A.** 2000. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *Fems Microbiology Reviews*, v. 24.p. 647 -660.
115. **Shulz, B. y Boyle, C.** 2006. What are endophytes? In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. *Microbial root endophytes*. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 1-13. (Soil Biology Vol. 9).

116. **Shiomi, H., Alves, S. H., Soares, I., Vieira, F., Wagner, B.** 2006. Bioprospecting Endophytic Bacteria for Biological Control of Coffee leaf rust. *Sci. Agric.* v.63, n.1, p.32-39.
117. **Schippers, B., Bakker, W. y Bakker, M.** 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology* 25:339 - 358.
118. **Sharma, K. y Nowak, J.** 1998. Endophyte enhancement of transplant performance in tomato, cucumber and sweet pepper. *Estados Unidos*.
119. **Stierle, A., Strobel, G. y Stierle, D.** 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 260:214-216.
120. **Stinson, M., Ezra, D., Hess, M., Sears, J. y Strobel, G.** 2003. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds, *Plant Science*, 165: 913 - 922.
121. **Straus, N., Scott J.** 2000. A review of current methods in DNA fingerprinting. pp. 209-224 en: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*. Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia.
122. **Shishido, M., Brenil, C. y Chanway, P.** 1999. Endophytic colonization of spruce by plant growth - promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. v.29, p. 191 - 196.
123. **Souza, A., Souza, A., Filho, A., Pinheiro, B., Sarquis, M., Pereira, J.** 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, Vol. 34, No.2, 185-195.
124. **Strobel, Gary A.** 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*. V. 5, p. 535-544.

125. **Tan, R.X. y Zou, X.W.** 2001. Endophytes: A Rich source functional de metabolites. *Nature Products*. V. 18, p. 448 -459.
126. **Tótola, M., Chaer, G.** 2002. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. *Tópicos em Ciências do solo*, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Viçosa, v 2, p. 25-32.
127. **Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Botina, S., Netrusov, A.** 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*. V. 162, p. 69-76.
128. **Van, A.** 2004. Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. Associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides/nigra* DN34). *Applied Environmental Microbiology*. V. 70, p. 508–517.
129. **Van Der Lelie, D., Barac, T., Taghavi, S., Vangronsveld, J.** 2005. Response to Newman. New uses of endophytic bacteria to improve phytoremediation. *TRENDS in Biotechnology*. V. 23, N. 1. 8-12.
130. **Vega, F., Pava, R., Posada, F, Buyer, J.** 2005. Endophytic bacteria in *coffea arábica* L., *Journal Basic of Microbiology*. 45, 5, p. 371-380.
131. **Villar, M., Villavicencio, O.** 2003. EsSalud Loreto Instituto de Medicina Tradicional - IMET EsSalud.
132. **Voetz, M., Rath, F.** 2002. Identification and quantification of ochratoxin synthesizing fungi on cereals using real time PCR. p. 22. Abstracts. American Society of Brewing Chemists, Annual Meeting, Tucson.
133. **Webster, J.** 1986. Introduction to Fungi. 2º ed. Cambridge University Press.
134. **Weller, M.** 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26:379-407.

135. **Wichtl, M.** 1989. Teedrogen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; pp. 466 -469.
136. **Whitesides, S., Spotts, R.** 1991. Frequency, distribution, and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. *Phytopathology*. V. 81, p. 453–457.
137. **Yaojian H., Jianfeng W., Guiling L., Zhonghui Z., Wenjin S.** 2001. Antitumorand antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortune* and *Torreya Grandis*. University Xiamen. China.
138. **Zinniel, K., Lambrecht, P., Harris, B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, A., Arunakumari, A., Barletta, G. y Vidaver, K.** 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p. 2198 - 2208.

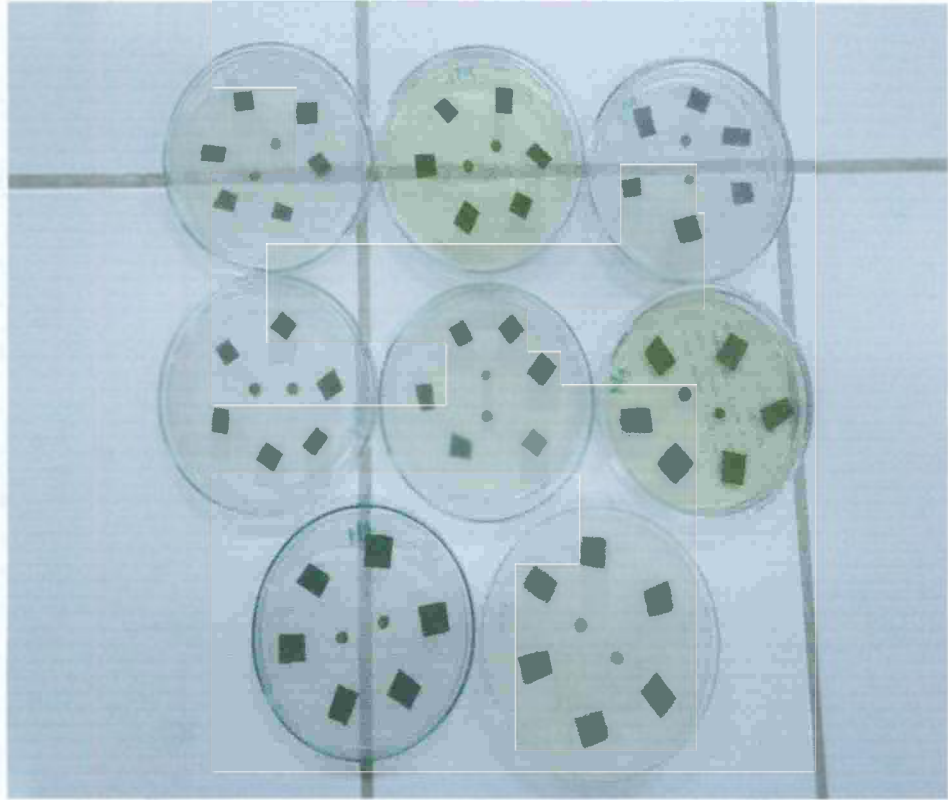
## ANEXO

Anexo N° 1



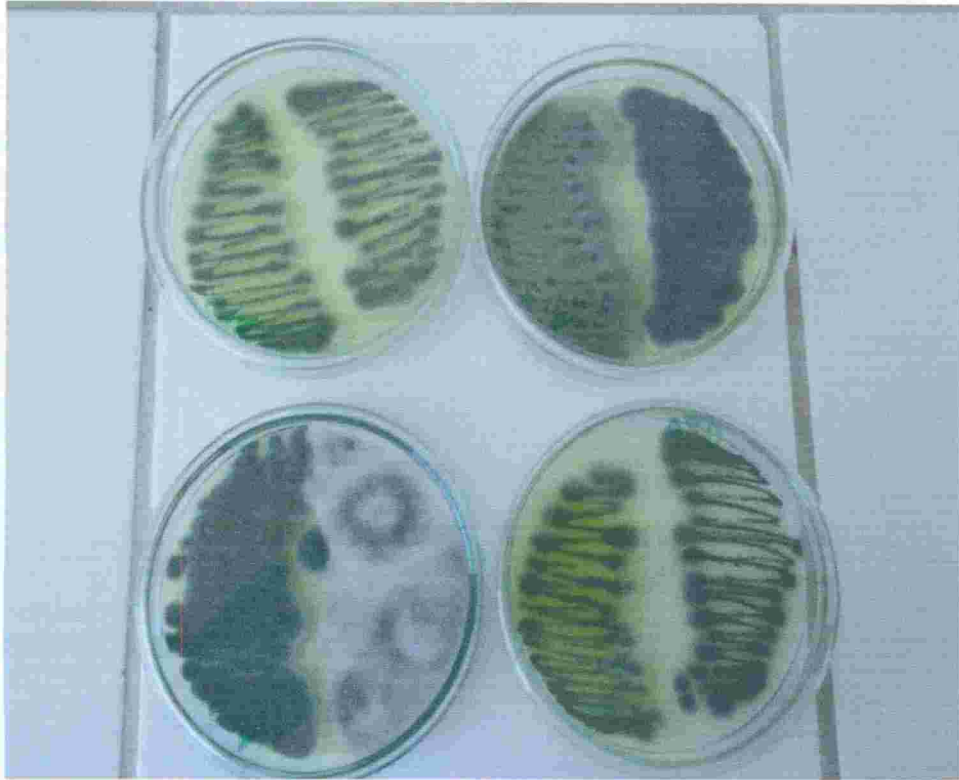
Fotografía N° 1: Hojas e inflorescencia de *Piperelongatum* "matico". Ayacucho, 2010-2011.

## Anexo N°2



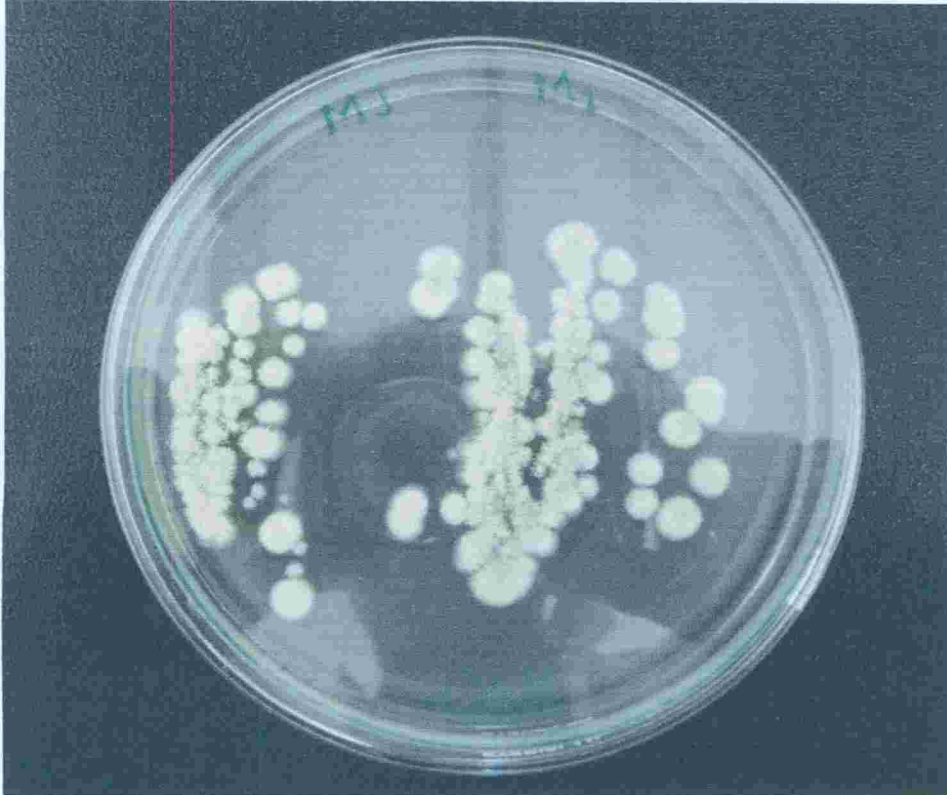
Fotografía N° 2: Técnica del sembrado de las hojas y tallos de *Piper elongatum* “matico”. Ayacucho, 2010-2011.

### Anexo N° 3



Fotografía N° 3: Crecimiento de colonias de hongos a partir de hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico". Ayacucho, 2010-2011.

#### Anexo N°4



Fotografía N° 4: Crecimiento de colonias del Actinomyceto endofítico aislado a partir de hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico". Ayacucho, 2010-2011.

## Anexo 5



Fotografía N° 5: Cepas fúngicas con un crecimiento en forma de tapete según la técnica de Araujo. Ayacucho, 2010-2011.

## Anexo N° 6



Fotografía N° 6: Formación de halos de inhibición de los hongos endofíticos frente a bacterias patógenas. Ayacucho, 2010-2011.

Anexo N° 7



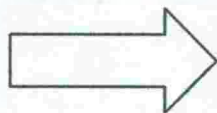
Hojas y tallos de *Piper elongatum*  
"matico"



Desinfección con alcohol al 70%  
y lejía al 3%



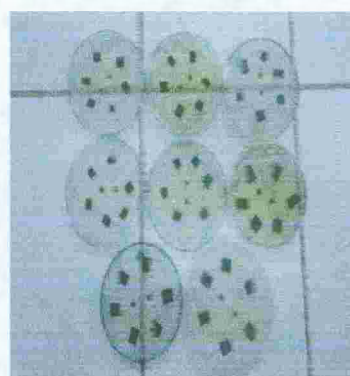
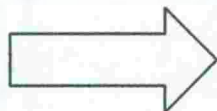
Trozado de la hoja y tallo



Sembrado de las hojas y tallos  
lavados en medios específicos



Colocación de las hojas y tallos  
en las placas



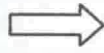
Medios de cultivos específicos

Flujograma del proceso de desinfección y cultivo de hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho, 2010-2011.

## ANEXON°8



Cepario



Cultivo joven

(En tapete)



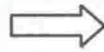
Inóculo de esporas

(Escala de Mc Farland 0.5)

### Preparación del Inóculo de esporas



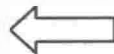
Cepas de bacterias ATCC



Preparación de la suspensión de bacterias



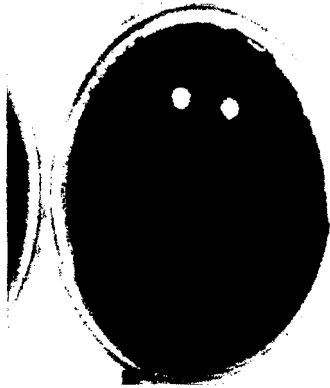
Agar Nutritivo+ Bacterias ATCC



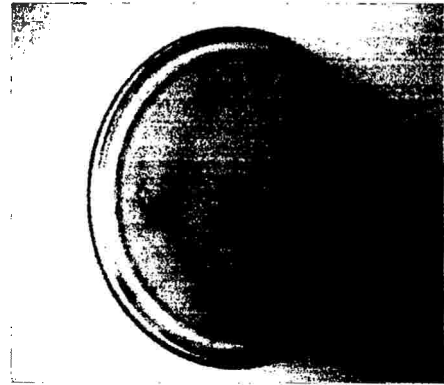
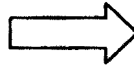
Siembra de las bacterias ATCC

### Preparación del Inóculo de bacterias ATCC

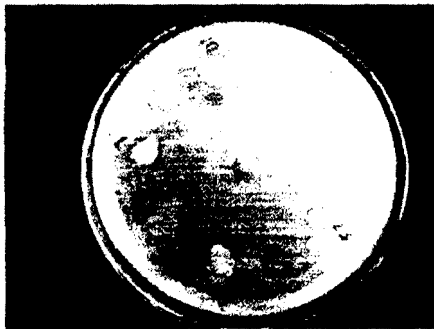
Continuación del Anexo N° 8:



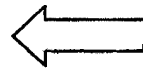
Crecimiento de Hongos en tapete



Colocación de los Block de gelosa



Formación de halos

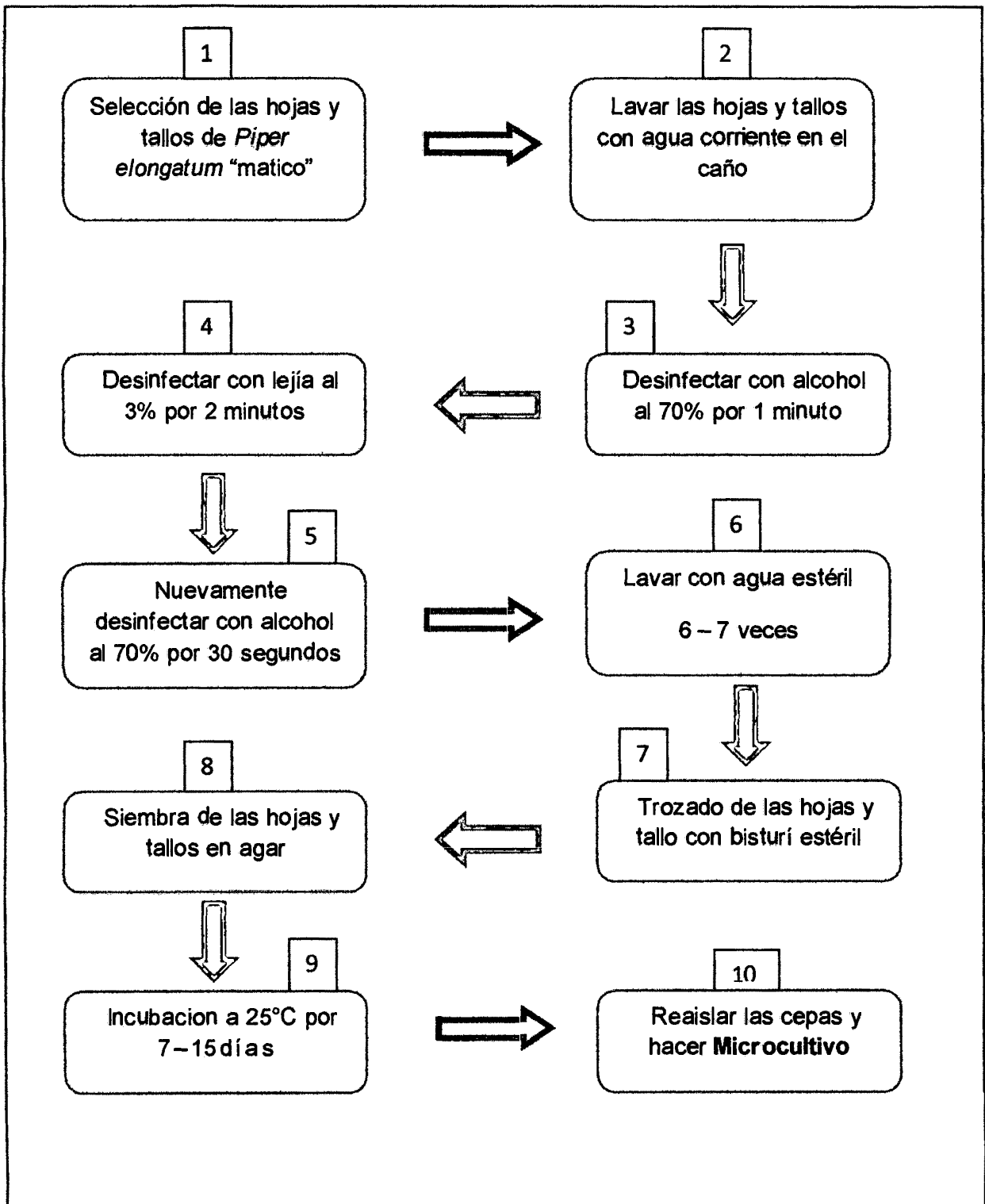


Incubación de las placas a  
37°C por 48 horas

## Prueba de actividad Antimicrobiana

Flujograma de la actividad antimicrobiana de hongos endofíticos aislados de hojas y tallos de *Piper elongatum* "matico" en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho, 2010-201

### AnexoN°9



Flujograma del aislamiento e identificación de hongos y actinomycetos endofíticos de *Piperelongatum* "matico" en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho, 2010-2011.

**MATRIZ DE CONSISTENCIA**

Titulo	Problema	Objetivos	Marco Teórico	Variable	Metodología
<p>Hongos y Actinomicetos endofíticos de <i>Piper elongatum</i> "matico" y su efecto antimicrobiano. Ayacucho, 2010-2011.</p>	<p>¿Cuáles son los hongos y actinomicetos endofíticos de <i>Piper elongatum</i> "matico" y cuál es el efecto antimicrobiano ?</p>	<p><b><u>Objetivo General</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Conocer los hongos y actinomicetos endofíticos de <i>Piper elongatum</i> "matico" y determinar el efecto antimicrobiano.</li> </ul> <p><b><u>Objetivos específicos</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Aislar los hongos y actinomicetos endofíticos de <i>Piper elongatum</i> "matico".</li> <li>✓ Identificar las especies de hongos y actinomicetos endofíticos aisladas de <i>Piper elongatum</i> "matico".</li> <li>✓ Determinar el efecto antimicrobiano de hongos y actinomicetos endofíticos de <i>Piper elongatum</i> "matico".</li> </ul>	<p>Los endofíticos eran considerados como cualquier microorganismo que, en por lo menos una fase de su ciclo de vida, colonizan el interior de tejidos vegetales aéreos sin causar daño aparente a la planta hospedante. En este concepto, fueron excluidas las bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos micorrizicos y microorganismos que colonizar el interior de la raíz. En una definición amplia, los microorganismos endofíticos pueden ser considerados, como microorganismos que son aislados de tejidos vegetales desinfectándolos superficialmente, y que no causan daño aparente en la planta.</p>	<p><b><u>VARIABLES EN ESTUDIO:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Plantas de matico según su procedencia.</li> <li>✓ Número de especies de hongos y actinomicetos.</li> <li>✓ Diversidad de especies de hongos y actinomicetos.</li> <li>✓ Capacidad del efecto antimicrobiano.</li> <li>✓ Número de días de incubación.</li> </ul>	<p><b>Muestra biológica</b></p> <p>Se colectaron entre 10 – 15 hojas y tallos de <i>Piper elongatum</i> "matico", entre las 7:00 – 8:00 am por 4 muestreos, en el lado Este (E) comprende: Distrito Nazarenas, Totorilla; por el Lado Sur (S) comprende: Distrito de San Juan Bautista, Carmen Alto; por el Lado Oeste (O) comprende Santa Ana, Andamarca, Emadi; y por el Lado Norte (N) comprende la Ciudad Universitaria, A.A.H.H. Covadonga - Ayacucho, en los meses Octubre – Noviembre de 2010 a una altitud de 2760 m.s.n.m.</p>

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D. Nº 220-2011-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las 4:10 pm de la tarde del día 18 de Agosto del dos mil once, en el auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas, reunidos para asistir al acto de Sustentación de Tesis, bajo la presidencia del Dr. Víctor Alegría Valeriano en sus condición de Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas, como Secretario la Docente Blga Ruth Huamán De la Cruz, a mérito del memorando Nº 593-2011-UNSCH-FCB, al mismo tiempo actuando como miembro de este acto, y con la asistencia de los miembros del jurado calificador el Dr. Saúl Chuchón Martínez (Asesor), Mg. Marta Romero Viacava (miembro), Mg. Romero Gavilán, Serapio (miembro) para administrar la Sustentación de Tesis titulado: "Hongos y actinomicetos endofíticos de *Piper elongatum* "matico" y sus efecto antimicrobiano. Ayacucho 2010-2011." Presentado por el bachiller Joel Cisneros Tinco, quien pretende optar el título profesional de Biólogo, con mención en la especialidad de Microbiología.

El Decano inicia el acto de Sustentación de Tesis, solicitando al Secretario Docente(e) dar la lectura de la Documentación existente en mesa, luego invite al sustentante a exponer el trabajo de Investigación en un tiempo no mayor de cuarenta y cinco minutos. Concluida la exposición el Decano pasa a la segunda etapa donde los miembros del jurado previa invitación del presidente de este acto para participar en la observación al informe y exposición, así como las preguntas, aclaraciones que consideren conveniente para realizar las calificaciones respectivas.

Culminada esta etapa el Decano invitó al sustentante y público asistente para que abandonen el Auditorium, a fin de que el jurado delibere y/o emita la evaluación correspondiente, el cual es como sigue:

JURADO CALIFICADOR	EXPOSICIÓN	Rpta. Preg.	PROMEDIO
Dr. Saúl Chuchón Martínez	17	16	17
Mg. Marta Romero Viacava	17	16	17
Mg. Serapio Romero Gavilán	16	15	16
Blga. Ruth Huamán De la Cruz	17	17	17

**PROMEDIO: 17**

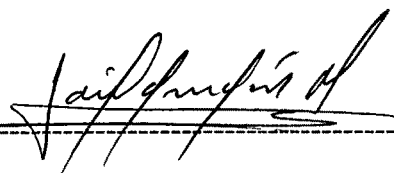
De la evaluación realizada el sustentante obtiene la calificación promedio de DIECISIETE- de la cual dan fé los miembros del jurado calificador estampando su firma al pie de la presente. Culmina el acto de sustentación siendo las Seis y Quince minutos.



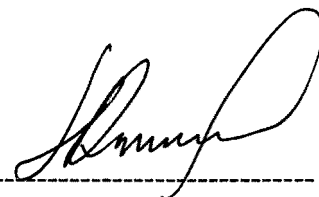
Dr. Víctor H. Alegría Valeriano  
(Presidente)



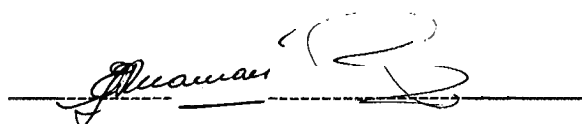
Mg. Marta Romero Viacava  
(Miembro)



Dr. Saúl Chuchón Martínez  
(Asesor)



Mg. Serapio Romero Gavilán  
(Miembro)



Blga. Ruth Huamán De la Cruz  
(Miembro - Sec. Docente)