

HONGOS ENDÓFITOS: FUENTE POTENCIAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS CON UTILIDAD EN AGRICULTURA Y MEDICINA

Rosa Elvira Sánchez-Fernández, Brenda Lorena Sánchez-Ortiz,
Yunueth Karina Monserrat Sandoval-Espinosa,
Álvaro Ulloa-Benítez, Beatriz Armendáriz-Guillén,
Marbella Claudia García-Méndez y Martha Lydia Macías-Rubalcava*

¹Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F. E-mail: *mamaciasr@gmail.com; mlmacias@unam.mx

RESUMEN

Los hongos endófitos habitan en las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad. La estrecha relación que existe entre el endófito y su planta hospedera se considera de gran importancia, ya que el hongo es capaz de producir metabolitos bioactivos, así como modificar los mecanismos de defensa de su hospedera, permitiendo e incrementando la sobrevivencia de ambos organismos. Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos endófitos para producir compuestos activos que le confieren protección a su hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros, constituyendo una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina. En este trabajo se describen diferentes aspectos relacionados con los hongos endófitos, abarcando su definición, descubrimiento, clasificación, interacción con su hospedera, papel ecológico, ejemplos de metabolitos secundarios bioactivos, así como estrategias metodológicas para su obtención. Por último, se presentan algunos resultados recientes, de estudios realizados en nuestro grupo de trabajo mostrando que los hongos endófitos son una fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos.

Palabras Clave: Actividad antimicrobiana, actividad fitotóxica, compuestos bioactivos, hongo endófito, interacción hongo-planta, metabolito secundario.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that live inside plant tissues without causing disease symptoms. In most cases, their relationship with the host plant is considered beneficial because the endophyte is able to produce bioactive metabolites that the host can use as defense mechanisms, and this allows survival of both organisms. Recent studies have demonstrated that the endophytic fungus confers protection to the host plant against attack by pathogens and herbivores. Since they have the ability to benefit the host plant, it is reasonable to think that the diverse bioactive compounds produced by the endophyte might exhibit potential applications in agriculture and medicine, and also serve as a source of inspiration for the discovery of new and more active molecules. In this paper, some aspects regarding endophytic fungi are described: definition, discovery, classification, interactions with their host plants, ecological role, selected examples of bioactive metabolites, host selection strategy, and methodological strategies for their isolation. Finally, we show some recent results of our research, which demonstrate that endophytic fungi are promising sources of new bioactive secondary metabolites.

Key Words: Antimicrobial activity, phytotoxic activity, bioactive compounds, endophytic fungus, fungus-plant interaction, secondary metabolite.

INTRODUCCIÓN

La palabra ‘endófito’ etimológicamente significa ‘dentro de la planta’ (*endon*: dentro, *phyton*: planta). En un principio, el término endófito se refería a cualquier organismo que colonizara el interior de los tejidos de las plantas, pero fue Wilson en 1995¹ quien restringió el término únicamente a microorganismos, refiriéndose sólo a bacterias y a hongos que no provocan daño aparente a la planta hospedera. Actualmente, este término se refiere a bacterias, hongos, algas e insectos²⁻⁵, en donde los hongos son los microorganismos que se han aislado con mayor frecuencia como endófitos⁶.

Los hongos endófitos se definen como microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño evidente. El ‘endofitismo’ se refiere a una asociación de costo-beneficio no obstructiva, asintomática y transitoria, definida por localización (no por función), y que se establece dentro de los tejidos vivos de la planta hospedera²⁻⁶. Los hongos endófitos se han encontrado en todas las plantas (pastos, algas, musgos y plantas vasculares), desde las que habitan en el ártico hasta los trópicos, así como en los campos agrícolas. De todos los ecosistemas del Planeta Tierra, los bosques templados y tropicales presentan una gran biodiversidad de plantas y éstas parecen albergar también una cantidad significativa de hongos endófitos^{7,8}.

DESCUBRIMIENTO E HISTORIA DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

El término ‘endófito’ lo propuso de Bary en 1866⁹ y los primeros registros de la presencia de hongos endófitos provienen del año 1898, en donde los investigadores formularon la hipótesis de que los cuadros toxicológicos observados en animales, se debían al consumo de semillas o partes aéreas de los pastos *Lolium temulentum*, *L. arvense*, *L. linicolum* y *L. remotum* (Poaceae) infectados con hongos Clavicipitáceos (familia del ergot)¹⁰. Sin embargo, no se dio continuidad a esta suposición hasta que Bacon en 1977, relacionó la presencia del hongo *Neotyphodium coenophialum* a la alta incidencia de una intoxicación del ganado denominada “síndrome de verano”, debida al consumo de pastos de la especie *Festuca arundinaceae* (Poaceae). En los años 80, Funk describió la resistencia al ataque de insectos en los pastos infectados con endófitos¹¹ y en 1988, Clay¹² propuso que varios hongos endófitos Clavicipitáceos son mutualistas que defienden a la hospedera del ataque de herbívoros. Posteriormente, varios investigadores de múltiples disciplinas como químicos, ecólogos, botánicos y micólogos se han dedicado al estudio de estos organismos⁸.

En la actualidad el interés por estos microorganismos ha aumentado enormemente debido a que son productores de metabolitos secundarios novedosos y con diversa actividad biológica.

CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Los hongos endófitos son un grupo muy diverso y polifilético que habitan en diversas partes de las plantas. La mayoría pertenecen al *phylum* Ascomycota, aunque también se han encontrado en los Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota¹³.

Históricamente los hongos endófitos se han clasificado en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, basados en su filogenia e historia de vida^{3,6,14,15}. Rodríguez y colaboradores² (2009) los clasifican tomando en cuenta su taxonomía, sus plantas hospederas, su evolución y sus funciones ecológicas. En esta clasificación se conservan los grupos Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, y este último se divide en tres clases (Cuadro I).

Los Clavicipitáceos son los endófitos que colonizan los pastos, mientras que los no Clavicipitáceos colonizan las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas^{2,8}. Existen diversos estudios relativos a los hongos endófitos de las zonas templadas, no obstante, la información sobre los endófitos de zonas tropicales aún representa un objeto potencial de estudio, ya que se tiene información muy limitada al respecto^{2,8}. Asimismo, se conoce relativamente poco de la naturaleza de la interacción entre las plantas leñosas y sus endófitos foliares, a pesar de su abundancia y gran diversidad, particularmente en regiones tropicales, donde se ha planteado que cada hoja representa un mosaico de diversas especies de hongos endófitos^{2,14}. Dreyfuss y colaboradores¹⁶ estimaron que debe haber aproximadamente 1.3 millones de especies de hongos endófitos por descubrir.

RELACIÓN HONGO ENDÓFITO-PLANTA HOSPEDERA

La relación entre los hongos endófitos y su planta hospedera puede ir desde el mutualismo hasta la patógenesis^{2,4,5}. En estas relaciones ambos organismos producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos. El hongo endófito produce factores de virulencia, como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos, mientras que la planta produce defensas, tanto mecánicas como bioquímicas³. En consecuencia, para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado, que depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, las cuales varían y son influenciadas por los factores ambientales y por la etapa de desarrollo de ambos organismos. Cuando los factores de virulencia del hongo y las defensas de la planta están en equilibrio se establece una relación endofítica y, por el contrario, cuando se presenta la senescencia del hospedero o se encuentra bajo estrés, el balance se torna a favor del hongo y éste se expresa como patógeno, presentándose los síntomas de enfermedad^{3,6}.

PAPEL ECOLÓGICO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Los hongos endófitos usualmente toman nutrientes y protección de su hospedera y algunos de ellos en retribución

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

*Transmisión de hongos endófitos en las plantas: vertical, a través de las semillas, y horizontal, se adquieren del medio ambiente.

Cuadro I. Grupos y clases de hongos endófitos.

pueden desempeñar un papel mutualista, ya que pueden beneficiarla al inducir su crecimiento, al aumentar su tolerancia al estrés y al producir metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural que le brindan protección y resistencia contra herbívoros y/o microorganismos fitopatógenos^{2,4,5,17}.

Un hongo endófito puede producir metabolitos secundarios que inhiben a un patógeno en particular o a otros hongos endófitos. Sin embargo, puede no inhibir a otros organismos de su mismo entorno¹⁵. Algunos hongos endófitos inducen los efectos alelopáticos de su hospedera a través de la producción de metabolitos secundarios o aleloquímicos, es decir, influyen sobre el crecimiento y desarrollo de otras especies que crecen a su alrededor y que usualmente son competidores por el espacio y nutrientes^{4,5}. Incluso se ha visto que ciertos hongos endófitos producen los precursores o los metabolitos secundarios con actividad biológica, cuya síntesis se le había atribuido a la planta^{4,18,19}. Esto se ha observado principalmente en las interacciones entre los hongos endófitos y los pastos, sin embargo, en plantas leñosas (árboles o arbustos) se ha comprobado en escasas ocasiones^{3,14,18}.

Se ha observado que los hongos endófitos pueden contribuir a la protección de su hospedera contra factores bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (estrés salino, térmico, presencia de metales, etc.), por medio de tres mecanismos:

- 1) Directos: por medio de enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno, producidos directamente por el hongo endófito.
- 2) Indirectos: consisten en la inducción o incremento de la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos a su planta hospedera.
- 3) Ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y predación^{14,17}.

Un ejemplo de mecanismo de defensa directo contra los patógenos de la hospedera es la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) del hongo endófito *Muscodor yucatanensis*, aislado de *Bursera simaruba* (Burseraceae). Los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y del micelio de *M. yucatanensis* y, principalmente, la mezcla de VOCs que produce, son letales para los fitopatógenos *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*. Algunos de los VOCs identificados son: octano, 2-pentilfurano, cariofileno, aromadendreno, derivados del naftaleno, entre otros^{20,21}.

El segundo mecanismo de protección a las hospederas es evidenciado en la investigación realizada por Waller y colaboradores (2005)²², en donde demostraron que la resistencia en la cebada (*Hordeum vulgare*, Poaceae) al ataque de microorganismos patógenos es debida a la colonización de las raíces por el endófito *Piriformospora indica*. En las plantas

inoculadas con el endófito e infectadas con los patógenos *Fusarium culmorum* KF 350 y *Cochliobolus sativus* fue menor la pérdida de la biomasa y la severidad de la enfermedad causada por estos microorganismos. Los efectos positivos observados están relacionados con la inducción de niveles más altos del antioxidante ascorbato, presente en las raíces y mediado por acción del endófito *P. indica*. Este antioxidante puede proteger a la hospedera de la muerte celular^{22,23}.

El último mecanismo de protección está bien ilustrado con una cepa no patógena de *Fusarium oxysporum*, denominada Fo47, la cual inhibe al patógeno *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y reduce los síntomas de la pudrición de la raíz en el tomate (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae). La inoculación en plantas de tomate de una carga de esporas 50 veces mayor que la del patógeno, asegura que las esporas de *F. oxysporum* Fo47 compitan con *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* por la misma fuente de carbono, lo que reduce la disponibilidad de nutrientes para este último microorganismo. Estas cepas de *Fusarium* presentan estrategias similares de colonización. En consecuencia, *F. oxysporum* Fo47 puede ocupar y reducir el número de sitios adecuados para la fijación de esporas y la colonización del patógeno *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, por lo que resulta en un menor número de lesiones sintomáticas²⁴.

Los mecanismos de protección hacia las hospederas pueden actuar de manera simultánea bajo diversas condiciones de estrés²³.

Los hongos endófitos, además de interactuar con su hospedera, interactúan entre ellos dentro de la planta. Estas interacciones interespecíficas (entre distintas especies de hongos) están regidas por: a) mecanismos físicos o directos, como son las interacciones entre hifas, la interferencia hifal (micoparasitismo) y el contacto de micelio, y b) mecanismos químicos o indirectos, los cuales se dan por la producción de compuestos solubles, algunos metabolitos primarios, metabolitos secundarios, enzimas o por compuestos volátiles efectivos a distancia que limitan el crecimiento de las hifas del competidor^{14,15,18,25-28}. Estos mecanismos han sido evidenciados en algunas interacciones en cultivos *in vitro* donde los hongos antagonistas producen metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas o muestran una clara interferencia. En la actualidad, son escasos los estudios que establecen cuál es el modo de acción y cuáles son los compuestos antimicrobianos implicados en las interacciones interespecíficas dentro de las comunidades fúngicas en la naturaleza^{25,29-32}. Por lo tanto, el estudio químico y biológico de estas interacciones conduce al descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos estructuralmente diversos y novedosos, por lo que este recurso constituye una fuente prometedora de moléculas potencialmente útiles para su uso en la agricultura, la medicina y la industria. Además, mediante estos estudios es posible seleccionar especies útiles como agentes de control biológico^{4,5,21,31,32}.

METABOLITOS SECUNDARIOS DERIVADOS DE HONGOS ENDÓFITOS Y SU APLICACIÓN EN AGROQUÍMICA Y FARMACIA

Los metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos poseen una gran diversidad química y algunos de ellos presentan esqueletos base no reportados en otras fuentes naturales. Así por ejemplo, los alcaloides lolina y sus derivados, que comprenden una familia de compuestos pirrolizidínicos, presentan un núcleo base de 2-oxa-6-azatriciclo[4.2.1.0^{3,7}] nonano; los indoloditerpénicos tipo lolitrem, que consisten en sistemas heterocíclicos de 8 anillos fusionados; los indoloditerpénicos paspalitrem, de 7 anillos y los alcaloides del ergot tipo ergoclavina y ergopeptina constituyen metabolitos secundarios biológicamente activos, exclusivos de hongos endófitos Clavicipitáceos^{3-6,19,33}.

También se han encontrado muchos compuestos novedosos que presentan núcleos heterocíclicos complejos, producidos por hongos de diferentes ambientes, como los alcaloides espiroquinazolínicos, los alcaloides isoindólicos fusionados con un macrociclo como son las quetoglobosinas y las citocalasinas. Además, se han aislado diversos anhidropéptidos pirazodiónicos, ciclopéptidos y lipociclopéptidos con actividad biológica^{3-6,19,33}.

En la literatura se encuentra reportado un número considerable de compuestos de origen policétido, incluyendo aquéllos que se encuentran ampliamente distribuidos en todos los taxones de hongos, como los que han sido aislados exclusivamente de hongos endófitos. Muchos consisten en macrólidos, así como en diversos compuestos aromáticos como bencenos, naftalenos, antracenos, piranos, furanos, benzofuranos, cromanos, xantanos, oxepanos y dépsidos^{3-6,19,33}.

Los hongos endófitos también producen metabolitos secundarios con estructuras terpénicas novedosas y exclusivas. Los chokoles A-K son compuestos que presentan un esqueleto monoterpénico de ciclofarnesano. El guanacastano tiene un esqueleto base tricíclico de los compuestos denominados guanacastepenos, ambos compuestos son exclusivos de hongos endófitos. Del mismo modo, se han aislado compuestos con estructuras comunes, pero reportadas únicamente en endófitos, por ejemplo tricotecenos, eudesmanos, calamenos, fusiococanos y diterpenos tipo sordarina. Los esteroides que más se han reportado son los de esqueleto de ergostano^{3-6,19,33}.

Asociada a la diversidad estructural de los metabolitos secundarios biosintetizados por los hongos endófitos, sobreviene su pluralidad funcional y su aplicación^{3-6,19,34}. Un claro ejemplo de la importancia de estos compuestos como fuente potencial de fármacos está representado por el taxol, un diterpeno aislado del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*, Taxaceae)³³, que se utiliza en el tratamiento de cáncer de ovario y de mama, además de otras aplicaciones en enfermedades proliferativas de los tejidos⁴. Su elevado costo

lo hace disponible sólo a ciertos sectores de la población³⁵. A principios de los años 90, Stierle y colaboradores (1993)³⁶ sugirieron que los tejidos vegetales de *T. brevifolia* podrían albergar microorganismos endófitos que sintetizaran taxol. Posteriormente, Strobel y colaboradores (1993)³⁷ aislaron de esta especie vegetal el hongo endófito *Taxomyces andreanae* que tiene la capacidad de sintetizar taxol. En estudios posteriores, se encontraron otras especies de microorganismos aislados de coníferas capaces de producir taxol, como *Pestalotiopsis microspora*^{38,39}, *Periconia* sp., *Fusarium solani*, *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp.⁴⁰⁻⁴²

Por otro lado, debido a la compleja interacción que se establece entre los hongos endófitos y su planta hospedera, entre distintas especies de hongos endófitos, y otras especies invasoras como otros hongos, oomicetos y bacterias, se ha puesto atención no sólo en el papel ecológico que pueden desempeñar los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos en dichas interacciones, sino en las aplicaciones de estos compuestos para el desarrollo de agroquímicos como nematocidas, fungicidas, insecticidas y herbicidas^{4,6}. Así por ejemplo, el estudio biodirigido del extracto orgánico del hongo endófito *Phomopsis phaseoli*, aislado de un árbol tropical no identificado que crece en la Guyana Francesa, permitió el aislamiento del ácido 3-hidroxi- β -ionolónico, un compuesto con actividad nematocida contra *Meloidogyne incognita*⁴³.

Por otra parte se aislaron dos policétidos de la familia de los dépsidos, la uredinina A y el 4-[(2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoil)oxi]-2-hidroxi-3,6-dimetilbenzoato de 3-hidroxi-2,5-dimetilfenilo, del hongo *Cladosporium uredinicola*, un endófito de la guayaba (*Psidium guajava*, Rosaceae). Ambos dépsidos presentan actividad herbicida inhibiendo el flujo de electrones del agua al metilviológeno, actuando como inhibidores de la reacción de Hill en tilacoides de espinaca⁴⁴.

Edenia gomezpompae, un endófito de las hojas de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae), produce varios compuestos con potencial antifúngico, incluyendo las preusomerinas EG₁, EG₂ y EG₃ y las palmarumicinas CP₂, CP₁₇ y CP₁₈. Las preusomerinas inhiben significativamente el crecimiento de varios endófitos de su misma planta hospedera, así como el de diversos microorganismos fitopatógenos de importancia económica, como *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp, *A. solani*, *P. capsici* y *P. parasitica*^{25,45,46}.

La investigación sobre endófitos de pastos han demostrado que pueden defender a su hospedera del ataque de herbívoros por medio de compuestos con actividad insecticida y antialimentaria. Existen estudios que han demostrado que los alcaloides tipo lolina son efectivos contra los áfidos *Rhopalosiphum padi*⁴⁷, los heterópteros *Oncopeltus fasciatus*⁴⁸, el coleóptero *Popillia japonica*⁴⁹ y el lepidóptero *Spodoptera*

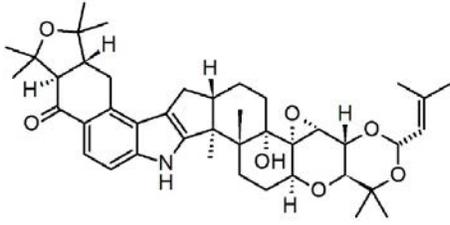
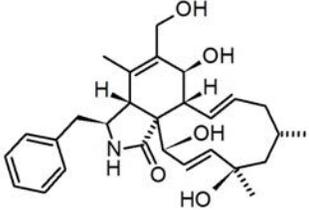
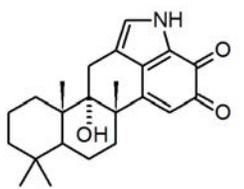
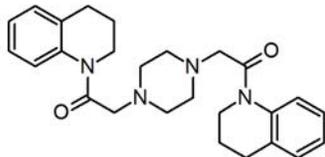
*frugiperda*⁵⁰. Debido a su baja toxicidad en los mamíferos, se están desarrollando métodos sintéticos para su venta como insecticidas comerciales⁵¹.

Diversos compuestos aislados de hongos endófitos presentan actividad antibacteriana, contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y micobacterias. Por citar un ejemplo, en el estudio realizado por Zhao y colaboradores (2012)⁵², se reportaron dos compuestos con esa actividad, obtenidos del endófito *Gliomastix murorum* Ppf8, aislado de *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Trilliaceae): un esteroide ergosta-5,7,22-trien-3-ol y un benzofurano el 2,3-dihidro-5-hidroxi- α,α -dimetil-2-benzofuranometanol. Ambos compuestos presentaron valores de CI₅₀ entre 55.65 a 145.36 μ g/mL contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas lachrymans*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus haemolyticus*⁵². Por otra parte, en un estudio realizado por Rukachaisirikul en 2008⁵³, se reportó una amida novedosa, la fomoenamida, que presenta actividad antifúngica contra *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Ra. Este compuesto se obtuvo del endófito *Phomopsis longicolla* aislado a partir del árbol *Garcinia dulcis* (Clusiaceae).

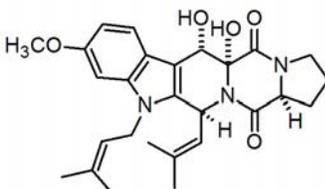
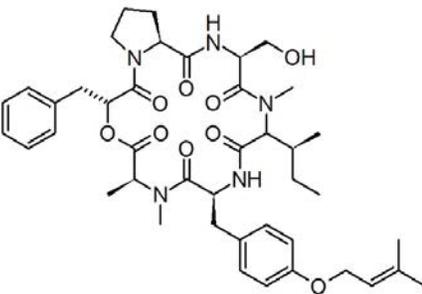
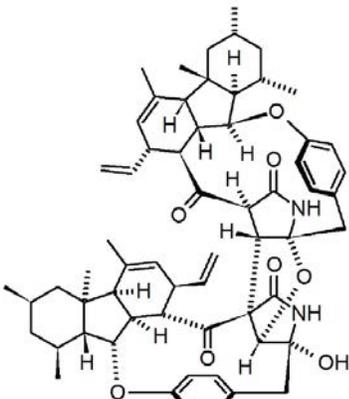
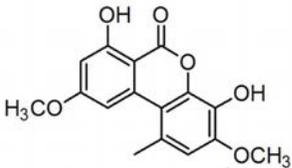
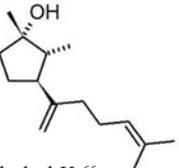
Cabe destacar que los estudios sobre hongos endófitos también aportan conocimientos sobre metabolitos secundarios aislados de hongos de diferentes fuentes, reportados con funciones biológicas distintas. Para citar un ejemplo, la fumigaclavina C es un alcaloide tipo clavina que fue originalmente aislado y reportado por Cole y colaboradores en 1977⁵⁴ como una micotoxina alimentaria de *Aspergillus fumigatus*. Posteriormente, Pinheiro y colaboradores en 2012⁵⁵ reportaron la actividad antimicrobiana de este compuesto, obtenido a partir del extracto acetofílico de una especie endófito no identificada de *Aspergillus* aislado de la planta medicinal *Bauhinia guianensis* (Fabaceae). La fumigaclavina C es activo contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis*.

En el Cuadro II se presentan ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos.

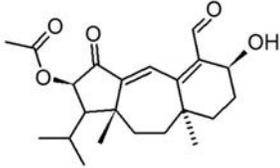
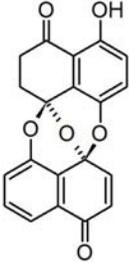
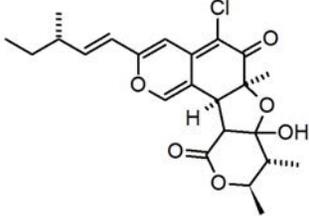
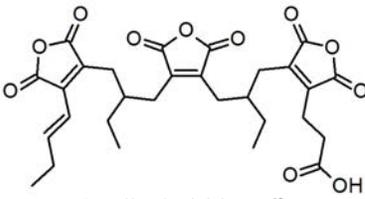
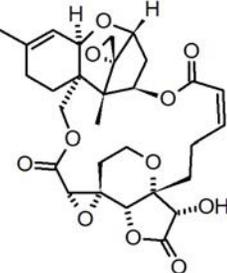
Una de las grandes ventajas que representa la disponibilidad de un sinnúmero de microorganismos endófitos capaces de sintetizar un fármaco o un agroquímico potencial, es evitar la necesidad de cultivar o coleccionar especies vegetales silvestres, así como reducir el costo de producción de los principios activos⁵⁶. De la misma forma, se ha propuesto que estos metabolitos podrían ser utilizados para desarrollar agroquímicos de origen natural, que serían menos perjudiciales para el hombre y para el medio ambiente que los compuestos químicos sintéticos que actualmente se utilizan en la agricultura, ya que los productos naturales pueden interactuar con blancos moleculares específicos, afectar procesos fisiológicos particulares y presentar menores índices de bioacumulación⁴.

| Hongo endófito / planta hospedera | Metabolito secundario / Núcleo base | Actividad biológica |
|---|--|--|
| <p><i>Neotyphodium lolii</i> (Clavicipitaceae). Endófito de <i>Lolium perenne</i> (Poaceae).</p> |  <p>Lolitrem B⁵⁷ Alcaloide indolterpénico.</p> | <p>Neurotóxico. Inhibidor de los canales de calcio activados por potasio.</p> |
| <p><i>Endothia gyrosa</i> IFB-E023 (Cryphonectriaceae). Endófito de <i>Vatica mangachapo</i> (Dipterocarpaceae).</p> |  <p>Citocalasina Z10⁵⁸ Alcaloide policétido isoindólico.</p> | <p>Citotóxico. En líneas celulares de leucemia K562.</p> |
| <p><i>Mycoleptodiscus</i> sp. (Magnaporthaceae). Endófito de <i>Desmotes incomparabilis</i> (Rutaceae).</p> |  <p>Micoeptodiscina B⁵⁹ Alcaloide indolterpénico.</p> | <p>Citotóxico. En líneas celulares de fibroblastos humanos IMR-90.</p> |
| <p><i>Penicillium</i> sp. (Trichocomaceae). Endófito de <i>Mauritia flexuosa</i> (Arecaceae).</p> |  <p>Glandicolina B⁶⁰ Alcaloide α-carbolínic.</p> | <p>Antimicrobiano. Contra <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Micrococcus luteus</i> y <i>E. coli</i>.</p> |
| <p><i>Aspergillus niger</i> IFB-E003 (Trichocomaceae). Endófito de <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae).</p> |  <p>Aspernigerina⁶¹ Alcaloide piperazínico.</p> | <p>Citotóxico. En líneas celulares de los carcinomas nasofaríngeo epidermoide, cervical Hela y colorectal SW1116.</p> |

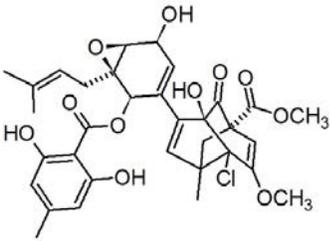
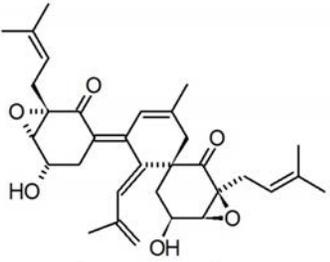
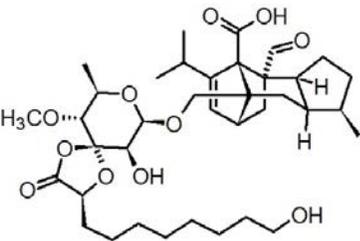
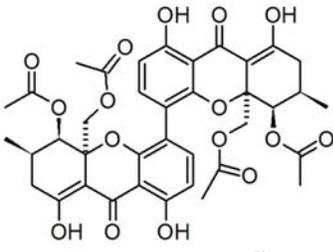
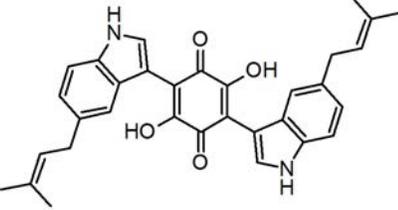
Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos.

| Hongo endófito / planta hospedera | Metabolito secundario / Núcleo base | Actividad biológica |
|--|--|---|
| <p><i>Aspergillus tamarii</i> (Trichocomaceae). Endófito de <i>Ficus carica</i> (Moraceae).</p> |  <p>Fumitremorgina B.⁶² Alcaloide indolil dicitopiperazínico.</p> | <p>Antifúngico. Activo contra los fitopatógenos <i>Fusarium graminearum</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Phytophthora capsici</i>, <i>Phytophthora oryzae</i>.</p> |
| <p><i>Pullularia</i> sp. BCC 8613 (Dothioraceae). Endófito de <i>Calophyllum</i> sp. (Calophyllaceae).</p> |  <p>Pulularina A.⁶³ Depsipéptido.</p> | <p>Antiplasmódico. Contra <i>Plasmodium falciparum</i> K1. Antiviral. Contra el virus del herpes simple (HSV-1).</p> |
| <p><i>Neonectria ramulariae</i> Wollenw KS-246 (Nectriaceae). Endófito de un árbol no identificado.</p> |  <p>Bispirrocidina.⁶⁴ Alcaloide dímero de la pirrocidina.</p> | <p>Inhibidor enzimático. Actúa sobre la prolilpolipeptidasa.</p> |
| <p><i>Cephalosporium</i> sp. IFB-E001 (Incertae sedis). Endófito de <i>Trachelospermum jasminoides</i> (Apocynaceae).</p> |  <p>Grafislactona A.⁶⁵ Benzocromeno policétido.</p> | <p>Antioxidante. Inhibe la peroxidación del ácido linoleico.</p> |
| <p><i>Epichloë festucae</i> (Clavicipitaceae). Endófito de varias especies de pastos (Poaceae).</p> |  <p>Chokol K.⁶⁶ Sesquiterpeno (2,6-ciclofarnesano, esqueleto reportado sólo en endófitos).</p> | <p>Atractor de insectos. Atractor de la mosca <i>Botanophila</i> para la propagación de esporas.</p> |

Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

| Hongo endófito / planta hospedera | Metabolito secundario / Núcleo base | Actividad biológica |
|--|---|--|
| <p>Hongo CR115 no identificado. Endófito de <i>Daphnopsis americana</i> (Thymelaeaceae).</p> |  <p>Guanacastepeno.⁶⁷ Diterpeno (guanacastano, esqueleto reportado sólo en endófitos).</p> | <p>Antibacterial. Contra <i>S. aureus</i> y <i>Enterococcus faecium</i>.</p> |
| <p><i>E. gomezpompae</i> (Pleosporaceae). Endófito de <i>C. acuminata</i> (Verbenaceae).</p> |  <p>Preusomerina EG₁.²⁵ Bisnaphthoespirocetal.</p> | <p>Antifúngico. Contra <i>P. capsici</i>, <i>P. parasitica</i>, <i>F. oxysporum</i> y <i>A. solani</i>.</p> |
| <p><i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae). Endófito de <i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae).</p> |  <p>Quetomugilina D.⁶⁸ Isocromano policétido.</p> | <p>Antifúngico. Activo contra <i>Mucor miehei</i>. Tóxico para <i>Artemia salina</i>.</p> |
| <p><i>Dwyaangam colodena</i> (Orbiliaceae). Endófito de <i>Picea rubens</i> (Pinaceae).</p> |  <p>Cordianhidrido B.⁶⁹ Anhídrido derivado de ácidos grasos.</p> | <p>Insecticida. Contra el lepidóptero <i>Choristoneura fumiferana</i>.</p> |
| <p><i>Myrothecium roridum</i> IFB-E091 (incertae sedis). Endófito de raíces de <i>Artemisia annua</i> (Asteraceae).</p> |  <p>Roritoxina E.⁶⁰ Macrólido tipo tricoteceno.</p> | <p>Citotóxico. En líneas celulares de carcinoma gástrico SGC-7901 y hepatocarcinoma SMMC-7721.</p> |

Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

| Hongo endófito / planta hospedera | Metabolito secundario / Núcleo base | Actividad biológica |
|---|--|--|
| <p><i>Pestalotiopsis fici</i> (Amphisphaeriaceae). Endófito de un árbol no identificado colectado en Hangzhou, República Popular China.</p> |  <p>Cloropupukeananina.⁷⁰ Dímero policétido prenilado.</p> | <p>Antiviral. Inhibe la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (HIV-1).</p> |
| <p><i>Pestalotiopsis fici</i> (Amphisphaeriaceae). Endófito de un árbol no identificado colectado en Hangzhou, República Popular China.</p> |  <p>Pestalofona C.⁴² Dímero policétido prenilado.</p> | <p>Antifúngico. Contra <i>Candida albicans</i>, <i>Geotrichum</i> <i>candidum</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i>.</p> |
| <p><i>Morinia logiappendiculata</i> (Amphisphaeriaceae). Endófito de <i>Santolina rosmarinifolia</i> (Asteraceae), <i>Helichrysum stoechas</i> (Asteraceae), <i>Thymus mastichina</i> (Lamiaceae) y <i>Calluna vulgarisin</i> (Ericaceae).</p> |  <p>Moriniafungina.⁷¹ Diterpeno tipo sordiarina.</p> | <p>Antifúngico. Contra <i>Cryptococcus neoformans</i>, <i>C. albicans</i>, <i>C. glabrata</i>, <i>C. parapsilosis</i>, <i>C. krusei</i> y <i>C. lusitaniae</i>.</p> |
| <p><i>Phoma</i> sp. (Incertae sedis). Endófito de <i>Costus</i> sp. (Costaceae).</p> |  <p>Formaxantona A.⁷² Dímero de xantona policétida.</p> | <p>Antifúngico. Contra <i>Phytophthora infestans</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Pyricularia oryzae</i> y <i>Ustilago violacea</i>.</p> |
| <p><i>Chaetomium</i> sp. (Chaetomiaceae). Endófito de <i>Salvia officinalis</i> (Lamiaceae).</p> |  <p>Cocliodinol.⁵⁶ Alcaloide indólico.</p> | <p>Citotóxico. Contra líneas celulares de linfoma murino t L5178Y.</p> |

Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

ESTRATEGIAS DE SELECCIÓN DE HOSPEDERAS ÚTILES PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS

Los antecedentes y consideraciones anteriores, aunados a la gran diversidad de especies vegetales existentes a nivel mundial, así como a la capacidad que tienen algunos hongos endófitos de mejorar los mecanismos de resistencia de su hospedera y de protegerla del ataque de posibles enemigos, han permitido establecer estrategias de selección de plantas hospederas que incrementen la posibilidad de aislar hongos endófitos capaces de producir metabolitos secundarios bioactivos. Estos criterios incluyen^{4,73}:

1. Plantas sin síntomas de enfermedad que crecen rodeadas de otras plantas infectadas por diversos patógenos o atacadas por herbívoros (criterio ecológico), las cuales pueden estar colonizadas por endófitos productores de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas e insecticidas.
2. Plantas que crecen en áreas de alta biodiversidad y que, por lo tanto, pueden alojar endófitos igualmente biodiversos.
3. Plantas que tienen antecedentes etnobotánicos, que se relacionan con algún uso específico o aplicaciones relacionadas a los intereses de la investigación, como son las plantas con uso en la medicina tradicional (criterio etnomédico).
4. Plantas con estrategias especiales para su supervivencia o que crecen en ambientes únicos.
5. Plantas endémicas que poseen una longevidad inusual, o que han ocupado extensiones de tierra poco convencionales.

ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS

Para el descubrimiento de metabolitos secundarios de microorganismos endófitos, se ha aplicado en repetidas ocasiones la estrategia metodológica que se indica a continuación: en primer lugar, se realiza la selección de las hospederas, de acuerdo con los criterios mencionados y se lleva a cabo el aislamiento de los hongos endófitos^{34,73,75,76}. La caracterización taxonómica de los endófitos puros se lleva a cabo mediante el análisis detallado de sus características macro y microscópicas, así como mediante el empleo de técnicas moleculares modernas⁷⁷. A continuación se realiza la preselección de los microorganismos, mediante un criterio ecológico, principalmente con base en las interacciones planta-microorganismo^{4,17,78} y microorganismo-microorganismo^{21,25,79,80}. En múltiples ocasiones, la observación de este tipo de interacciones ha constituido un punto de partida para la preselección de especies fúngicas como una fuente valiosa de principios bioactivos^{21,25,81}.

En segundo lugar, es necesario realizar cultivos en pequeña escala, con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de crecimiento de los organismos fúngicos objeto de estudio.

Posteriormente, se preparan los extractos del medio de cultivo y del micelio^{21,25}. A continuación, se realizan pruebas biológicas preliminares, las cuales consisten en la determinación del efecto biológico de los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y del micelio, mediante la utilización de bioensayos sencillos y de fácil implementación. Entre los más utilizados para detectar posibles agroquímicos se encuentran los ensayos de germinación y de crecimiento radicular de diversas especies de semillas^{21,25,82} y el ensayo para detectar inhibidores y promotores del crecimiento de plantas, mediante el empleo de *Lemna minor* (Araceae)⁸³. La determinación del potencial antifúngico se realiza mediante la medición del efecto de los extractos sobre el crecimiento de diversos microorganismos fitopatógenos de importancia económica^{21,25}, mientras que para evidenciar el efecto insecticida y nematocida se utilizan bioensayos sobre diferentes artrópodos y nematodos para observar actividad tóxica, ovicida, y/o repelente⁸⁴.

Por otra parte, para encontrar metabolitos secundarios con aplicación terapéutica, existen ensayos para evidenciar actividad antimicrobiana, empleando métodos comunes como el de difusión en disco, el de dilución en agar y la prueba de inhibición sobre el crecimiento radial de microorganismos patógenos para los humanos^{21,25,85-87}. Sobre diferentes líneas celulares tumorales, para comprobar acción anticancerígena⁸⁸. Para comprobar actividad antiinflamatoria se realizan pruebas sobre diferentes líneas celulares y la prueba de enema en oreja de ratón⁸⁹. Para demostrar actividad antidiabética se trabaja con ratones^{90,91} y, por último, mediante la infección de células por virus y el método de difusión en pozo con una suspensión de células virales, se logra observar la actividad antiviral⁹². Cabe destacar que estas pruebas son sólo una muestra representativa de los principales bioensayos utilizados y de la actividad biológica puesta en evidencia.

Estas evaluaciones preliminares permiten detectar extractos naturales apropiados para la obtención de agentes terapéuticos o agroquímicos^{4,5}. En general, los extractos que demuestran respuestas positivas en los ensayos de fitoinhibición o como inhibidores del crecimiento de microorganismos, se consideran candidatos adecuados para la realización de otras pruebas biológicas dirigidas a un blanco de acción específico en la fisiología o en el metabolismo vegetal o de los microorganismos, respectivamente^{17,44}.

Una vez seleccionados los extractos activos se aíslan los principios bioactivos mediante estudios químicos biodirigidos. Este proceso permite la obtención de los metabolitos secundarios con actividad biológica^{21,25,72}. Los compuestos naturales activos puros se identifican y, por último, éstos son sometidos a ensayos biológicos adicionales con la finalidad de explorar de manera más detallada su posible aplicación como fármacos o agroquímicos comerciales^{13,25,44,74}. En el caso particular de los agroquímicos potenciales, se realizan

pruebas de invernadero sobre especies vegetales cultivables o sobre malezas para determinar la actividad de tipo pre y postemergente⁸⁷.

Finalmente, es necesario determinar la toxicidad de los compuestos bioactivos y para ello se han desarrollado pruebas preliminares sobre los crustáceos *Artemia salina* y *Daphnia magna*^{93,94}, así como la muerte celular de macrófagos, utilizando líneas celulares⁹⁵. Posteriormente, es necesario verificar la toxicidad en mamíferos, en cuyo caso se trabaja inicialmente con ratones y cobayos, para posteriormente dar inicio a las pruebas clínicas en pacientes y personas sanas^{96,97}.

En este contexto, se muestran a continuación los resultados obtenidos a nivel de extractos orgánicos de hongos endófitos con potencial antagonico, aislados de las hojas de plantas seleccionadas bajo un criterio ecológico, y colectadas en una zona de alta biodiversidad como lo es la 'Reserva Ecológica de la Biósfera Sierra de Huautla' (REBIOSH), ubicada en Morelos, México. Esta investigación se realiza actualmente en nuestro grupo de trabajo y está enfocada principalmente en la obtención de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico y antimicrobiano con posible aplicación sobre el control de malezas, hongos verdaderos y oomicetos fitopatógenos.

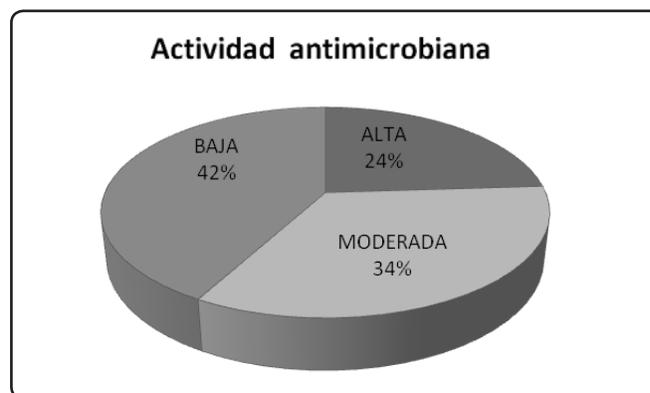
Para lograr este objetivo, se aislaron hongos endófitos^{73,76} de las hojas sanas de 11 plantas pertenecientes a las familias Burseraceae, Celastraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Labiatae y Piperaceae, obteniendo un total de 4310 aislamientos de hongos endófitos, de los cuales se han conseguido 183 morfotipos puros a la fecha, que poseen potencial antagonico sobre el crecimiento de otras poblaciones de hongos endófitos que emergían al mismo tiempo durante las etapas de aislamiento y purificación. Estos resultados muestran claramente que las plantas en estudio se encuentran colonizadas por un amplio número de hongos endófitos, y confirman que el criterio de selección empleado, es decir, plantas que crecen en áreas de gran diversidad biológica y que no presentan ningún daño por patógenos o herbívoros, constituyen una buena estrategia para aislar una gran cantidad y diversidad de endófitos^{4,74}.

Con el propósito de obtener los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos y comprobar que poseen potencial antimicrobiano y fitotóxico, de los 183 endófitos puros, se eligieron 75 para su cultivo, los cuales inhibieron significativamente el crecimiento de otros endófitos en las interacciones antagonicas observadas durante la etapa de purificación. Los hongos seleccionados se cultivaron en pequeña escala bajo diferentes condiciones, utilizando como medio de crecimiento, caldo papa dextrosa (1 L), incubando en condiciones estáticas y en agitación (15 días a 200 rpm), en medios sólidos empleando agar papa dextrosa (10 cajas de Petri de 10 cm) y en medio a base de arroz (300 g), incubado

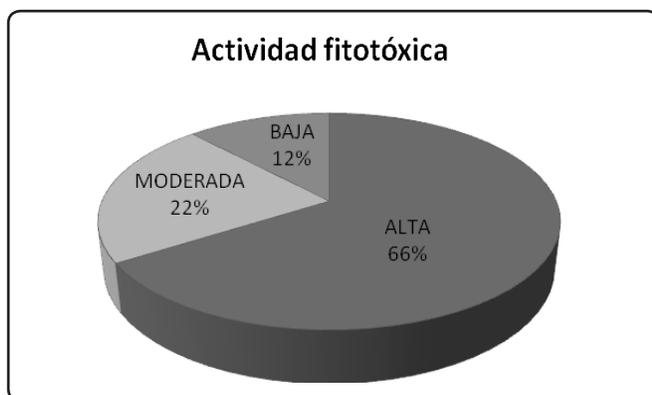
estáticamente por un periodo de 30 días, con fotoperiodo de luz artificial-obscuridad 12:12 h, a temperatura ambiente. Transcurrido el periodo de incubación, se obtuvieron los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio para los cultivos en medio líquido y de medio-micelio para los cultivos en medio sólido y arroz. El potencial antimicrobiano y fitotóxico, de los extractos orgánicos obtenidos se determinó cuantitativamente sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos y sobre la longitud de la raíz de plantas modelo, utilizando el método de dilución en agar^{21,25,98,99}.

De los de 75 endófitos cultivados en pequeña escala, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos con los mayores rendimientos. En la Gráfica 1 se muestra el potencial antimicrobiano de 36 extractos orgánicos sobre el crecimiento de cinco microorganismos fitopatógenos con importancia económica, dos hongos verdaderos (*Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*) y sobre tres oomicetos (*Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora capsici*). El efecto de inhibición provocado por cada uno de los extractos fúngicos evaluados sobre el crecimiento de los microorganismos de prueba, se agrupan en alto, moderado y bajo, según su actividad antimicrobiana mostrada, donde bajo corresponde a inhibiciones del 1-24%, moderado del 25-50% y alto del 51-100%, de acuerdo con los intervalos establecidos en nuestro grupo de trabajo. El 42% tuvo actividad baja, el 34% presentó actividad moderada y el 24% exhibió actividad alta.

Estos resultados demuestran que los metabolitos secundarios biosintetizados por más del 50% de los hongos endófitos evaluados, poseen actividad antimicrobiana de moderada a alta. Por lo que son considerados como candidatos idóneos en la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural, con actividad antimicrobiana, útiles en la agricultura moderna y que además posiblemente tengan un papel en la protección de su hospedera contra patógenos y herbívoros.



Gráfica 1. Potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos de hongos endófitos sobre el crecimiento de cinco microorganismos fitopatógenos con importancia económica.



Gráfica 2. Potencial fitotóxico de los extractos orgánicos de hongos endófitos sobre la longitud de la raíz de dos plantas de prueba.

Con respecto a la actividad fitotóxica en la Gráfica 2 se muestra el efecto inhibitorio de 70 extractos orgánicos sobre la longitud de la raíz de las semillas de dos plantas modelo, *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) y *Solanum lycopersicum* (Solanaceae). De nueva cuenta, el porcentaje de inhibición provocado por cada uno de los extractos orgánicos evaluados sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba se agrupan en alto, moderado y bajo, según su actividad fitotóxica mostrada, donde bajo corresponde a inhibiciones del 1-24%, moderado del 25-50% y alto del 51-100%, de acuerdo con los intervalos establecidos en nuestro grupo de trabajo. El 12% de los extractos evaluados tuvo actividad fitotóxica baja, el 22% presentó actividad moderada y el 60% mostró actividad alta. Estos datos demuestran que la mayoría de los hongos endófitos aislados de plantas de la REBIOSH son excelentes productores de compuestos con actividad fitotóxica, útiles para el desarrollo de agentes herbicidas alternativos a los usados hoy en día. Por otra parte, es posible que estos compuestos también contribuyan en la defensa de su planta hospedera, protegiéndola de la invasión de algunas plantas o malezas que habitan en su comunidad y a su vez pueden ser necesarios para su sobrevivencia dentro de su planta hospedera.

En el presente trabajo se pone en evidencia que los hongos endófitos representan candidatos idóneos, para la investigación y obtención de compuestos bioactivos.

CONCLUSIONES

Desde el descubrimiento de los hongos endófitos como productores de metabolitos secundarios tóxicos contra herbívoros, comenzó un amplio estudio que agrupa a investigadores de diversas áreas con el fin de conocer varios aspectos de los endófitos, entre ellos la producción de metabolitos bioactivos útiles para la humanidad.

Con los ejemplos proporcionados podemos demostrar la importancia del estudio de los hongos endófitos y su potencial para la obtención de compuestos bioactivos. Sin embargo, falta todavía mucha investigación que nos proporcione información sobre la toxicidad y seguridad de los metabolitos secundarios para que puedan ser utilizados como agentes agroquímicos o como fármacos. Asimismo, es necesario realizar estudios sobre el papel que estos metabolitos puedan tener en la naturaleza y en la protección hacia su hospedera.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a través del Instituto de Química, por el apoyo para la realización de los estudios sobre hongos endófitos de plantas de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero otorgado a través del proyecto 81017.

REFERENCIAS

- Wilson, D. Endophyte the evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**, 274-276 (1995).
- Rodríguez, R., White, J., Arnold, A.E. & Redman, R. Fungal endophytes: Diversity and ecological roles. *New. Phytol.* **182**, 314-330 (2009).
- Schulz, B. & Boyle, C. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* **109**, 661-686 (2005).
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* **67**, 257-268 (2004).
- Tan, R.X. & Zou, W.X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 448-459 (2001).
- Kusari, S., Hertweck, C. & Spiteller, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chem. & Biol.* **19**, 792-798 (2012).
- Mittermeier, R.A., Meyers, N. Robles-Gil, P. & Mittermeier, C.G. in Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered ecoregions (ed. CEMEX, México, 1999).
- Arnold, E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* **21**, 51-66 (2007).
- de Bary, A. in Morphologie und physiologie der pilze, flechten, und myxomyceten. Hofmeister's handbook of physiological botany (Leipzig, Germany, Engelmann, 1866).
- Guerin, M.P. Structure particuliere du fruit de quelques graminees. *Bot.* **12**, 365-374 (1898).
- Funk, C.R., Halisky, P.M., Ahmad, S. & Hurley, R.H. in How endophytes modify turfgrass performance and response to insect pests in turfgrass breeding and evaluation trials (ed. Lemaire, E.) 137-145 (Avignon, France 1985).
- Clay, K. Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**, 10-16 (1988).
- Rosa, L.H. *et al.* in Drug Development. A case study based insight into modern strategies (ed. Rundfeldt, C.) 1-18 (Intech, Croatia, 2011).
- Herre, E.A. *et al.* Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology* **88**, 550-558 (2007).

15. Arnold, A.E. *et al.* Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS* **100**, 15649-15654 (2003).
16. Dreyfuss, M.M. & Chapela, I.H. in *The discovery of natural products with therapeutic potential* (ed. Gullo, V.P.) 49-80 (Butterworth-Heinemann, London, UK, 1994).
17. Gao, F.K., Dai, C.C. & Liu, X.Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.* **4(13)**, 1346-1351 (2010).
18. Herre, E.A. *et al.* In *Biotic interactions in the tropics: Their role in the maintenance of species diversity*. (ed. Burslem, D.F.R.P., Pinard, M.A. & Hartey, S.E.) 226-227 (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2005).
19. Zhao, J. *et al.* in *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 567-576 (ed. Méndez-Vilas, A., 2010).
20. González, M.C. *et al.* *Muscodyrucatanensis*, a new endophytic ascomycete from Mexican chakah, *Bursera simaruba*. *Mycotaxon* **110 (1)**, 363-372 (2009).
21. Macías-Rubalcava, M.L. *et al.* Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodyrucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *J. Chem. Ecol.* **36**, 1122-1131 (2010).
22. Waller, F. *et al.* The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS* **102**, 13386-13391 (2005).
23. Kageyama, S.A., Mandyam, K.G. & Jumpponen, A. in *mycorrhiza: State of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*. (ed. Varma, A.) 29-57 (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2008).
24. Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Lugtenberg, B.J.J. & Bloemberg, G.V. Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**, 710-721 (2005).
25. Macías-Rubalcava, M.L. *et al.* Naftoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochem.* **69**, 1185-1196 (2008).
26. Body, L. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microb. Ecol.* **31(3)**, 185-194 (2000).
27. Tuininga, A.R. in: *The Fungal Community: It's organization and role in the ecosystem* (ed. Dighton, J., White, J. & Oudemans, J.) 265-283 (CRC Press, E.U., 2005).
28. Widden, P. in *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. (ed. Wicklow, D. T. & Sönderström, B.) 135-147 (Springer-Verlang, Alemania, 1997).
29. Rotheray, T.D., Chancellor, M., Jones, T.H. & Boddy, L. Grazing by collembola affects the outcome of interspecific mycelial interactions of cord-forming basidiomycetes. *Fungal Ecol.* **4(1)**, 42-55 (2011).
30. Hynes, J., Müller, C.T., Jones, T.H. & Boddy, L. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholomafasciculare* and *Resinicium bicolor*. *J. Chem. Ecol.* **33**, 43-57 (2007).
31. Yuen, T.K., Hyde, K.D. & Hodgkiss, I.J. Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microb. Ecol.* **37**, 257-262 (1999).
32. Shearer, C.A. Fungal competition. *Can. J. of Bot.* **73 (S1)**, 1259-1264 (1995).
33. Wani, M., Taylor, H., Wall, M., Coggon, P. & McPhail, A. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93(9)**, 2325-2327 (1971).
34. Gunatilaka, A.A.L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J. Nat. Prod.* **69**, 509-526 (2006).
35. Nicolaou, K.C. Total synthesis of taxol. *Nature* **367**, 630-634 (1994).
36. Stierle, A., Strobel, G.A. & Stierle, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. *Science* **260**, 214-216 (1993).
37. Strobel, G.A., Stierle, A., Stierle, D. & Hess, W.M. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with pacific yew. *Mycotaxon* **47**, 71-78(1993).
38. Stribel, G. *et al.* Taxol from *Pestalotiopsis microspore*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiol.* **142**, 435-440(1996).
39. Li, J.Y. *et al.* Endophytic taxol producing fungi from bald cypress *Taxodium distichum*. *Microbiology* **142**, 2223-2226 (1996).
40. Kim, S.U., Strobel, G.A. & Ford, E. Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* and *Taxus cuspidata* in Korea. *Agr. Chem. Biotechnol.* **42**, 97-99 (1999).
41. Sun, D.F., Ran, X.Q. & Wang, J.F. Isolation and identification of Taxol producing endophytic fungus from *Podocarpus*. *Acta Microbiol.* **48**, 589-595(2008).
42. Liu, L., Liu, S., Chen, X., Guo, L. & Che, Y. Pestalofones A-E, bioactive cyclohexanone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Bioorg. Med. Chem.* **17(2)**, 606-613 (2009).
43. Schwarz, M. *et al.* 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle endophytic fungi. *Phytochem.* **65**, 2239-2245 (2004).
44. Medeiros, L.S. *et al.* Evaluation of herbicidal potential of depsides from *Cladosporium uredinicola*, an endophytic fungus found in *Guava* fruit. *J. Braz. Chem. Soc.* **23(8)**, 1551-1557 (2012).
45. González, M.C. *et al.* A new endophytic ascomycete from El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico. *Mycotaxon.* **101**, 251-260 (2007).
46. Meléndez González, C. Potencial aleloquímico del endófito *Edenia gomezpompae* sobre diferentes comunidades de hongos endófitos de plantas tropicales. Tesis de Licenciatura (Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2008) 113 págs.
47. Siegel, D.A. *et al.* Meridional variations of springtime phytoplankton community in the Sargasso Sea. *J. Mar. Res.* **48**, 379-412 (1990).
48. Yates, S.G., Fenster, J.C. & Bartelt, R.J. Assay Of tall Fescue seed extracts, fractions and alkaloids using the large milkweed bug. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 354-357 (1989).
49. Patterson, C.G., Potter, D.A. & Fannin, F.F. Feeding deterrence of alkaloids from endophyte- infected grasses to Japanese beetle grubs. *Entomol. Exp. Appl.* **61**, 285-289 (1991).
50. Riedel, W.E., Kieckhefer, R.E., Petroski, R.J. & Powell, R.G. Naturally occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: Insect feeding behavior modification and toxicity. *J. Entomol. Sci.* **26(1)**, 122-129 (1991).
51. Hovey, M.T., Eklund, E.J., Pike, R.D., Mainkar, A.A. & Scheerer, J.R. Synthesis of (±)-acetylornoroline via stereoselective

- tethered aminohydroxylation. *Org. Lett.* **13**(5), 1246-1249 (2011).
52. Zhao, J. et al. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Gliomastix murorum* Ppf8 associated with the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Journal of Medicinal Plants Research* **6**(11), 2100-2104 (2012).
53. Rukachaisirikul, V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J. & Kirtikara, K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochem.* **69**(3), 783-787 (2008).
54. Cole, R.J. et al. Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J. Agric. Food Chem.* **25**, 826-830 (1977).
55. Pinheiro, E.A. et al. Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. *Nat. Prod. Res.* (2012). In press DOI: 10.1080/14786419.2012.750316.
56. Debbab, A. et al. Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. Isolated from *Salvia officinalis* growing in Morocco. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**(2), 229-234 (2009).
57. Imlach, W.L., Finch, S.C., Dunlop, J. & Dalziel, J.E. Structural determinants of lolitrems for inhibition of BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Eur. J. Pharmacol.* **605**(1-3), 36-45 (2009).
58. Xu, S. et al. Cytotoxic Cytochalasin Metabolites of Endophytic *Endothia gyrosa*. *Chem. Biodivers.* **6**(5), 739-745 (2009).
59. Ortega, H.E. et al. Mycoleptodiscins A and B, Cytotoxic Alkaloids from the Endophytic Fungus *Mycoleptodiscus* sp. F0194. *J. Nat. Prod.* (2013). In press DOI: 10.1021/np300792t.
60. Ferreira Koolen, H.H. et al. An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. an endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L.f. *Quím. Nova.* **35**(4), 771-774 (2012).
61. Shen, L. et al. Structure and Total Synthesis of Aspernigerin: A Novel Cytotoxic Endophyte Metabolite. *Chem. Eur. J.* **12**(16), 4393-4396 (2006).
62. Zhang, H., Ma, Y., Liu, R. & Zhou, F. Endophytic fungus *Aspergillus tamarii* from *Ficus carica* L., a new source of indolyl diketopiperazines. *Biochem. Sys. Ecol.* **45**, 31-33 (2012).
63. Isaka, M., Berkaew, P., Intereya, K., Komwijit, S. & Sathitkunanon, T. Antiplasmodial and antiviral cyclohexadepsipeptides from the endophytic fungus *Pullularia* sp. *Tetrahedron* **63**(29), 6855-6860 (2007).
64. Shiono, Y. et al. A dimeric pyrrocidine from *Neonectria ramulariae* is an inhibitor of prolyl oligopeptidase. *Phytochem. Lett.* **5**(1), 91-95(2012).
65. Song, Y.C., Huang, W.Y., Sun, C., Wang, F.W. & Tan, R.X. Characterization of graphis lactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(3), 506-509 (2005).
66. Bultman, T.L. & Leuchtman, A. Biology of the *Epichloë-Botanophila* interaction: An intriguing association between fungi and insects. *Fungal Biol. Rev.* **22**(3-4), 131-138 (2008).
67. Hughes, C.C., Kennedy-Smith, J.J. & Trauner, D. Synthetic Studies toward the Guanacastepenes. *Org. Lett.* **5**(22), 4113-4115 (2003).
68. Qin, J.C. et al. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**(6), 1572-1574 (2009).
69. Sumarah, M.W. et al. Secondary metabolites from anti-insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens*. *Phytochemistry* **71**, 760-765 (2010).
70. Liu, L. et al. Chloropupukeanin, the First Chlorinated Pupukeanane Derivative, and Its Precursors from *Pestalotiopsis fici*. *Org. Lett.* **10**(7), 1397-1400 (2008).
71. Basilio, A. et al. The discovery of moriniafungin, a novel sordarin derivative produced by *Morinia pestalozzioides*. *Bioorg. Med. Chem.* **14**(2), 560-566 (2006).
72. Elsaesser, B. et al. X-ray structure determination, absolute configuration and biological activity of phomoxanthone A. *Eur. J. Org. Chem.* **21**, 4563-4570 (2005).
73. Strobel, G. & Daisy, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**(4), 491-502 (2003).
74. Yu, H. et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microb. Res.* **165**, 437-449(2010).
75. Gamboa, M.A., Laureano, S. & Bayman, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathol.* **156**, 41-45 (2002).
76. Rodriguez, K.F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe Oleracea*. *Mycol.* **86**, 376-385(1994).
77. Ko Ko, T.W., Stephenson, S.L., Bahkali, A.H. & Hyde, K.D. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? *Fungal Divers.* **50**, 113-120 (2011).
78. Montesinos, E. et al. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int. Microbiol.* **5**, 169-175 (2010).
79. Mejía, L.C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biolog. Cont.* **46**, 4-14 (2008).
80. Waqas, M. et al. Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. *Molecules* **17**, 10754-10773 (2012).
81. Rubini, M.R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci.* **1**, 24-33 (2005).
82. Bhagobaty, R.K. & Joshi, S.R. Promotion of seed germination of Green gram and Chick pea by *Penicillium verruculosum* RS7PF, a root endophytic fungus of *Potentilla fulgens* L. *Adv. Biotech.* **8**(12), 7-15 (2009).
83. Neilan, B.A., Pomatia, F., Nettinga, A.G. & Calamarib, D. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquat. Toxicol.* **67**(4), 387-396 (2004).
84. Mann, R.S & Kaufman, P.E. Natural Product Pesticides: Their Development, Delivery and use against Insect Vectors. *Rev. in Org. Chem.* **9**, 185-202 (2012).
85. Homan, A.M. et al. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. *Phytochem.* **69**, 1049-1056 (2008).
86. Rhoden, S.A., Garcia, A., Bongiorno, V.A., Azevedo, J.L. & Pamphile, J.A. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Trichilia elegans* a. Juss. *JAPS* **2**(8), 57-59 (2012).
87. Rosa, L.H. et al. Antifungal activity of extracts from endophytic

- fungi associated with *Smallanthus* maintained *in vitro* as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. *Can. J. Microbiol.* **58**, 1202–1211 (2012).
88. Zhu, J.W. *et al.* Elucidation of Strict Structural Requirements of Brefeldin A as an inducer of differentiations and apoptosis. *Biorg. Med. Chem.* **8**, 455-463 (2000).
89. Weber, D. *et al.* Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *J. Antibiot.* **57(9)**, 559-563 (2004).
90. Dompeipen, E.J., Srikandace, Y., Suharso, W.P., Cahyana, H. & Simanjuntak, P. Potential endophytic microbes selection for antidiabetic bioactive compounds production. *Asian J. of Biochem.* **6**, 465-471 (2011).
91. Mata, R. *et al.* Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochem.* **68(15)**, 2087-2095 (2007).
92. Schmeda-Hirschmann, G., Hormozabal, E., Astudillo, L., Rodríguez, J. & Theoduloz, C. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). *World J. Microbiol. Biotech.* **21(1)**, 27-32 (2005).
93. Mayorga, P., Pérez, K. R., Cruz, S.M. & Cáceres, A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. *Braz. of Pharmacog.* **20**, 897-903 (2010).
94. Morettia, A., Muléa, G., Ritienib, A. & Logriecoa, A. Further data on the production of beauvericin, enniatins and fusaproliferin and toxicity to *Artemia salina* by *Fusarium* species of *Gibberella fujikuroi* species complex. *Int. J. of Food Microbiol.* **118(2)**, 158-163 (2007).
95. Guimaraes, D.O. *et al.* Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *Immunol. Med. Microbiol.* **52**, 134-144 (2008).
96. DiMasi, J.A., Hansen, R.W. & Grabowski, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. of Health Econ.* **22**, 151-185 (2003).
97. Baskin-Bey, E.S. *et al.* Clinical trial of the pan-caspase inhibitor, IDN-6556, in human liver preservation injury. *Am. J. of Trans.* **7**, 218-225 (2007).
98. Sánchez Fernández, R.E. Determinación del potencial alelopático de los extractos del medio de cultivo y del micelio de un hongo endófito aislado de *Lonchocarpus castilloi* (Fabaceae). Tesis de Licenciatura (Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2010) 87 págs.
99. Armendáriz Guillén, B. Hongos endófitos productores de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico y antifúngico. Tesis de Licenciatura (Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2013) 106 págs.