

**UNIVERSIDAD DE TARAPACÁ**  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



**HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A**  
***Malesherbia auristipulata* Ricardi**

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERA AGRÓNOMA

ALUMNA: ALEXANDRA VIELMA OLAVE

PROFESORES GUÍA: GERMAN SEPÚLVEDA CHAVERA

ELIANA BELMONTE SCHWARZBAUM

ARICA – CHILE

2020

**UNIVERSIDAD DE TARAPACÁ**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



**HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A**  
***Malesherbia auristipulata* Ricardi**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERA AGRÓNOMA**

**ALUMNA: ALEXANDRA VIELMA OLAVE**

**PROFESORES GUÍA: GERMAN SEPÚLVEDA CHAVERA**

**ELIANA BELMONTE SCHWARZBAUM**

**ARICA – CHILE**

**2020**

## **DEDICATORIA**

Con amor para mi madre Marta Olave Casanova, mi padre  
René Vielma Núñez.

Agradecer por el apoyo a toda mi familia, padres, abuelos, abuelas por darme los ánimos, el cariño, las herramientas y los valores necesarios para perseverar y formarme como persona; a Juan Carlos Poblete y a mis pequeños, hermano y hermana, por respetar mis espacios de estudio, animarme y a veces exigirme.

## **AGRADECIMIENTO**

Un agradecimiento a la Universidad de Tarapacá y a los docentes que lo componen por los años de enseñanza brindados. En especial, al profesor Germán Sepúlveda Chavera y a la profesora Eliana Belmonte Schwarzbaum, quienes me ayudaron a darle forma a mi investigación. Me entregaron su tiempo, sus conocimientos, sus consejos, su comprensión y, también, me abrieron amablemente las puertas del laboratorio de fitopatología y me integraron en el gran equipo que lo conforman.

Agradecer especialmente a Mabel Arismendi por su amabilidad, buena recepción, por la paciencia, el humor que siempre se mantenía dentro del laboratorio, por enseñarme sus metodologías y compartir sus conocimientos.

De igual forma a la profesora Elizabeth Bastias por sus revisiones.

## RESUMEN

Los hongos endófitos son microorganismos que habitan en el interior de las plantas sin causar efectos negativos inmediatos. De esta relación se producen muchos beneficios que han sido estudiados en diferentes plantas, la mayoría de interés agrícola, pero también ecológico e industrial, entre otros. Los metabolitos que se extraen de los endófitos han mostrado tener actividad antipatógena, antimicrobiana, promotora del crecimiento de las plantas, inclusive, actividad anticancerígena. Con respecto a *Malesherbia auristipulata*, planta endémica andina en peligro crítico, existen antecedentes que indican efectos antibacterianos, analgésicos, antiinflamatorios y antioxidantes asociados a esta especie. Estos antecedentes justifican el desarrollo de un análisis sobre la existencia de microorganismos endófitos en esta planta y el posible rol que cumplirían en la relación planta-hospedero.

**Palabras clave:** endófitos, hongos endófitos, *Malesherbia auristipulata*, microorganismos, metabolitos.

## SUMMARY

Endophytic fungi are microorganisms that inhabit the interior of plants without causing immediate negative effects. This relationship produces many benefits that have been studied in different plants, the majority of agricultural interest, but also ecological and industrial, among others. The metabolites that are extracted from the endophytes have shown to have antipathogenic, antimicrobial, plant growth promoter, inclusive, anticancer activity. Concerning *Malesherbia auristipulata*, an Andean endemic plant in critical danger, research results indicate antibacterial, analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant effects associated with this species. These antecedents justify the development of an analysis on the existence of endophytic microorganisms in this plant and the possible role that they would play in the plant-host relationship.

**Key words:** endophytes, endophytic fungi, *Malesherbia auristipulata*, microorganisms, metabolites.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	11
ANTECEDENTES .....	13
Microorganismos.....	13
Relación entre microorganismos y plantas .....	13
Relaciones benéficas .....	14
Protocooperación.....	14
Simbiosis .....	14
Comensalismo .....	14
Relación neutra o relaciones neutras.....	14
Relaciones antagónicas .....	15
Competencia.....	15
Amensalismo .....	15
Depredación .....	15
Parasitismo .....	16
Microorganismos endófitos .....	16
Hongos endófitos.....	17
Endófitos Clavicipitáceos .....	18
Endófitos no Clavicipitáceos .....	18
Importancia y beneficios de microorganismos endófitos.....	20
Relación hongo endófito-planta hospedera.....	20
Control biológico .....	21
Crecimiento vegetal .....	22
Mecanismos de protección de cultivos.....	23
Actividad anticancerígena y antimicrobiana .....	24
Fitorremediación .....	24
Endófitos como vector de genes .....	25
Metabolitos.....	25
Colonización: infección y propagación .....	26
<i>Malesherbia auristipulata</i> .....	29

Morfología de <i>Malesherbia auristipulata</i> .....	31
Hábitat .....	31
Etnobotánica.....	36
Trascendencia de <i>Malesherbia auristipulata</i> .....	36
Métodos de laboratorio .....	37
Aislamiento y cultivo puro de bacterias y hongos .....	37
Cultivo puro.....	37
Recuento en placa.....	38
Observación microscópica de organismos .....	38
Materiales e instrumentos de laboratorio para aislamiento de endófitos .....	38
Recolección de muestras.....	39
Indicaciones para el trabajo en laboratorio .....	40
Procedimiento para medios de cultivo para hongos (APD y AA) y bacterias (MRZ y LB) .....	41
Rotulado .....	42
Observación e Identificación de poblaciones de hongos y o bacterias .....	43
Aislamiento y cultivo puro de hongos.....	43
Reaislamiento .....	45
Cultivo monospórico .....	45
Aislamiento de punta de hifa.....	46
Observación microscópica, descripción e identificación .....	46
CONCLUSIÓN .....	48
BIBLIOGRAFÍA .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Eje floral de <i>Malesherbia auristipulata</i> .....	31
<b>Figura 2.</b> Distribución geográfica de <i>Malesherbia auristipulata</i> indicada con puntos naranjas. Cada punto indica una colección de herbario.....	32
<b>Figura 3.</b> Ejemplar de <i>Malesherbia auristipulata</i> de no más de 2 metros de altura en ambiente árido pedregoso a 1830 msnm., en Cuesta El Águila protegido por el roquerío.....	33
<b>Figura 4.</b> Localización de la concentración general de la población de <i>Malesherbia auristipulata</i> entre diciembre y marzo en el sector Cuesta el Águila (línea roja fina continua). Se observan las instalaciones de la Empresa a cargo de las obras viales (lado superior derecho indicado con una flecha) .....	34
<b>Figura 5.</b> Comparación de las instalaciones durante 2019 y 2020 in situ en el hábitat de <i>Malesherbia auristipulata</i> . A. fotografía tomada en 2019. B fotografía tomada en 2020.....	35
<b>Figura 6.</b> Huella que evidencia el paso de maquinaria pesada que atraviesa la hondonada donde habita <i>Malesherbia auristipulata</i> .....	35
<b>Figura 7.</b> Localización de muestra de <i>Malesherbia auristipulata</i> recolectadas a 1830 msnm., en sector Cuesta El Águila .....	39
<b>Figura 8.</b> Tratamientos de desinfección realizados a las muestras de <i>M. auristipulata</i> . 2 minutos en alcohol al 95%, 2 minutos en hipoclorito de sodio al 2% y 2 minutos en alcohol al 70%. Al lado izquierdo el cronometro para tomar el tiempo.. .....	40
<b>Figura 9.</b> Placas con muestras de plantas en el proceso de extracción de endófitos. ....	41
<b>Figura 10.</b> Ejemplo de la disposición de muestra de raíz de <i>Malesherbia auristipulata</i> . Placa con material fúngico en crecimiento rotulada..	43
<b>Figura 11.</b> Placa Petri con aislamiento de endófitos y crecimiento fúngico en medio de cultivo PDA a temperatura ambiente.....	44
<b>Figura 12.</b> Morfología de colonias de algunos aislamientos inoculados en plantas de Vanilla.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Grupo y clases de hongos endófitos.....	19
<b>Tabla 2.</b> Características de la interacción de endófitos bacterianos frente a hongos con las raíces de las plantas. ....	27
<b>Tabla 3.</b> Ejemplo de códigos asignados por muestra.....	42
<b>Tabla 4.</b> Ejemplo rotulación de hongos en placa de Petri en aislamiento de hongos endófitos.....	44

## INTRODUCCIÓN

El 17 septiembre de 1683, Anton van Leeuwenhoek dejaba el primer registro de microorganismos, específicamente, bacterias observadas bajo un primitivo microscopio; el investigador los describió como “pequeños animálculos” y, a partir de sus hallazgos, se transformó en el padre de la microbiología experimental. Han pasado 300 años desde entonces y los avances científicos han sido el resultado de nuevos progresos técnicos, tal como la mejora de la calidad de los microscopios; situación que ha permitido descubrimientos del mundo microbiano (Montaño *et al.*, 2010).

Los microorganismos o “pequeños animálculos” son los seres más simples que habitan en la tierra; estos actúan y coexisten con el resto de los seres vivos en los distintos ecosistemas. Para ellos, las plantas presentan un hábitat ecológico complejo, espacial y temporalmente diverso en el que pueden desarrollarse. Las asociaciones simbióticas entre microorganismos y plantas son antiguas y fundamentales y, a lo largo de los años, se han descrito algunos ejemplos de simbiosis complejas y muy específicas entre estos dos grupos (Stone *et al.*, 2000).

Dentro de los microorganismos existen aquellos denominados endófitos, los cuales son un grupo intrincado de organismos asociados con diversos tejidos y órganos en las plantas. Con el paso del tiempo, se han convertido en objeto de creciente interés para micólogos, ecólogos y fitopatólogos, definidos más comúnmente como aquellos organismos cuyas “[...] infecciones son imperceptibles, los tejidos del hospedador infectados son al menos transitoriamente sintomáticos, y se puede demostrar que la colonización microbiana es interna [...]” (Stone *et al.*, 2000). En general, las infecciones endofíticas pasan desapercibidas, los tejidos infectados del hospedador son asintomáticos –transitoriamente– y, a su vez, se puede demostrar que la colonización microbiana es interna.

No es un secreto afirmar que los avances técnicos han propiciado muchos descubrimientos científicos, en principio, para resolver necesidades primarias. De ahí que se creen herramientas y mecanismos que permiten transformar la realidad y comenzar un proceso civilizador que hasta hoy no ha cesado en su evolución (Álvarez, 1990). Dentro de estas mejoras se ha permitido el estudio de los distintos tipos de microorganismos, entre ellos, los endófitos y su relación con las plantas.

*Malesherbia auristipulata* Ricardi (1965) es una planta xerófita, perenne, endémica de algunas quebradas de la precordillera de la región de Arica y

Parinacota, visualizada en la Cuesta el Águila en el sector de Quebrada de Cardones. En la actualidad, su estado de conservación es “en peligro crítico” y la causa principal es la pérdida de hábitat por actividad antrópica. Incluso, a la fecha, en el lugar donde se encuentra concentrada la población de *Malesherbia auristipulata* se ha instalado una empresa que realiza trabajos viales con maquinarias. Es vital su conservación, puesto que según la investigación de Erazo (2006), se han utilizado especies del género *Malesherbia* para tratar enfermedades respiratorias y en su estudio detalla efectos antibacterianos, analgésicos, antiinflamatorios y antioxidantes de la parte aérea de esta especie.

En el presente trabajo se revisa y evalúa la existencia de endófitos asociados a *Malesherbia auristipulata*, microorganismos que contribuyen en su proceso de adaptación y supervivencia en ambientes extremadamente inhóspitos, tal como el que habita. Este conocimiento puede tener valor ecológico, socioeconómico y cultural para la región y el país.

El aislamiento e identificación de microorganismos endófitos asociados a esta planta, explica parte de su estrategia de supervivencia en un ambiente exigente, así como su establecimiento y desarrollo. Este trabajo teoriza que la sobrevivencia de *M. auristipulata* depende de la presencia e interacción positiva de microorganismos endófitos asociados. Además, debido a que el sustrato en el que se establece es un suelo árido marginal (categoría IV – V en el sistema de clasificación de suelos) y con escasas y esporádicas precipitaciones estivales (SRK Consulting, 2009), deja entrever una mayor diversidad de microorganismos en las raíces que en el resto de la planta.

## **ANTECEDENTES**

### **Microorganismos**

El registro de los microbios se inició formalmente hace más de 300 años cuando Leeuwenhoek, comerciante holandés de tejidos, describía por primera vez los microorganismos que observó en muestras de agua de lluvia e infusiones bajo un primitivo microscopio que el mismo fabricó. Durante varias décadas, Leeuwenhoek comunicó sus descubrimientos a la Royal Society de Londres a través de una serie de cartas que se difundieron en las "Philosophical Transactions". La primera representación de las bacterias se encuentra en un dibujo reproducido en 1683 (Zuckerberg, 2001).

Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en la tierra, dado que colonizan todo ambiente (suelo, agua y aire) y tienen la capacidad de usar diferentes fuentes de energía. Participan en todos los ecosistemas y se encuentran en interacción continua con plantas y animales. Los microorganismos son clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta, en tanto que participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos. Podría decirse que gran parte de la actividad biológica esencial que permite la vida depende de los microorganismos (Montaño *et al.*, 2010). Otro de sus éxitos evolutivos radica en que pueden vivir solos o en asociación con otros seres vivos. En las plantas viven hongos y bacterias sin causar daño, por ejemplo, los hongos micorrícicos ubicados en las raíces del 97 % de éstas (Martínez y Martínez, 2004).

### **Relación entre microorganismos y plantas**

Los microorganismos forman parte fundamental del planeta y constituyen un componente esencial de las redes tróficas en los ecosistemas, en la medida que contribuyen a la regeneración de nutrientes e interactúan con una amplia gama de organismos (De la Cruz *et al.*, 2015). Por lo que las poblaciones microbianas pueden interactuar entre sí y con las plantas de manera beneficiosa, neutra o perjudicial. Las asociaciones pueden ordenarse evolutivamente y, de esta manera, cada categoría responde a patrones evolutivos distintos, lo que conlleva a mayor especificidad (Hilje, 1984). Desde que Hiltner (1904) lo definió, se han realizado grandes avances que reconocen el papel de los microorganismos rizosféricos en el crecimiento de las plantas (Bowen y Rovira, 1999).

## **Relaciones benéficas**

Los procesos benéficos ocurren cuando se establecen interacciones positivas entre los microorganismos al momento de colonizar, en el que hay un beneficio de por medio. Estos se clasifican en protocooperación o sinergismo, simbiosis o mutualismo y comensalismo (Gardner *et al.*, 1983). Así pues, existe una tendencia a alcanzar mayor especificidad en orden: comensalismo, protocooperación y mutualismo (Hilje, 1984).

### **Protocooperación**

La protocooperación, también conocida como sinergismo, es la asociación facultativa entre dos especies, en el que ambas se benefician. Cabe aclarar que no es una relación obligatoria dependiente, por lo tanto, se habla de una cooperación (Sánchez, 2007). Un caso ilustrativo es el de los peces limpiadores o casos donde microorganismos eliminan compuestos tóxicos que favorecen a sus asociados, los cuales hacen uso de estos como fuente de carbono. Esta interacción es común en el suelo y raíces vegetales e influyen en su productividad en el sistema agrícola (Ramadan *et al.*, 2016).

### **Simbiosis**

La simbiosis o mutualismo hace referencia a la asociación entre individuos de dos o más especies, en el que ambas partes obtienen beneficios, ya sea de manera temporal o permanente. Cada uno se convierte en indispensable para la vida del otro (Hilje, 1984). Este tipo de vínculo es muy evolucionado y estable (Ingraham y Ingraham, 1998).

### **Comensalismo**

Cuando existe una relación entre individuos de dos o más especies y donde, al menos uno de los asociados se beneficia y, sin embargo, la otra parte no es perjudicada de manera adversa. Esta es una relación unidireccional, continua o transitoria y siempre facultativa. La asociación tiende a ser duradera y estable debido a una evolución extensiva (Hilje, 1984; Brewer, 1979).

### **Relación neutra o relaciones neutras**

El neutralismo hace referencia a la conexión entre dos o más individuos que interactúan; en este proceso ninguna de las partes recibe beneficio ni se perjudica. No existe acción recíproca, por ejemplo, una población de plantas epífitas y una de roedores que interactúan en el mismo hábitat, pero estos no

se benefician ni perjudican (Campos, 2003). Este tipo de interacción no suele ocurrir, pero, es más probable que se presente entre poblaciones microbianas con capacidades metabólicas distintas que en grupos con capacidades metabólicas similares. El neutralismo ocurre entre poblaciones microbianas que están distantes en el espacio (Atlas y Bartha, 2002).

### **Relaciones antagónicas**

Hace referencia a las relaciones entre individuos que implica un daño a una de las partes. Estos se encuentran clasificados en amensalismo, depredación, parasitismo y competencia (Sánchez, 2007).

### **Competencia**

Este surge cuando, dos o más poblaciones, utilizan un mismo recurso para su existencia, lo cual tiende a producir separaciones ecológicas de poblaciones estrechamente relacionadas, conocido como principio de exclusión competitiva (Campos, 2003).

### **Amensalismo**

Cuando una población microbiana produce una sustancia inhibidora (toxinas) para las otras poblaciones, sin obtener ventaja de la situación o verse afectada por ella misma. Un caso ilustrativo es que bajo un árbol de ciprés no hay desarrollo de vida vegetal, lo cual no produce efectos negativos o positivos para el árbol (Campos, 2003).

Cuando se siembra una muestra de suelo en agar nutritivo, bacterias, actinomicetos y hongos generan una o más colonias, las cuales, a su vez, ocasionan zonas claras sin crecimiento o halo de inhibición. Esta evidencia indica la síntesis de un metabolito por parte de esa población o colonia, lo que evita el crecimiento de otros en baja concentración (Sánchez, 2007).

### **Depredación**

Interacción generalmente de corta duración entre individuos de dos o más especies (depredador-presa), en el que una de las partes es devorada por completo o parcialmente. Una de las interrelaciones microbianas comunes en el suelo, rizosfera, rizoplaneo y hojas de las plantas, usada mucho en el control biológico de plagas y enfermedades agrícolas. Las bacterias son susceptibles al ataque de predadores como protozoarios que afectan de manera negativa a sus poblaciones (Sánchez, 2007).

## Parasitismo

Relación de dos o más individuos, en el que uno de ellos se beneficia (parásito) a costa de otro (huésped). Es importante aclarar que el parásito depende física o metabólicamente del huésped viéndose éste afectado, pero que solo rara vez muere (parasitosis). Existen grupos microbianos que tienen parásitos que viven sobre o dentro de sus células, como es el caso de los bacteriófagos, distribuidos en el suelo y la rizosfera de plantas (Sánchez, 2007).

## Microorganismos endófitos

Endófitos, palabra que etimológicamente significa “dentro de la planta”, proviene del prefijo griego endon-dentro y phyton-vegetal. Aunque el uso de este término es variable, en general, es empleado para referirse a microorganismos que residen en los tejidos internos de una planta sin causar efectos inmediatos o negativos (Schutz y Boyle, 2006; Hergholi *et al.*, 2013). De forma específica, es definido como aquellos organismos cuyas “[...] infecciones pasan desapercibidas, los tejidos del hospedador infectado son al menos transitoriamente asintomáticos, y se puede demostrar que la colonización microbiana es interna [...]” (Stone *et al.*, 2000). La definición de endófito indica y se describe como un “estado momentáneo”, por lo que ésta incluye a aquellos con estrategia de ciclo de vida distinto (estrategia de sobrevivencia) (Schulz y Boyle, 2006).

El primero en proponer el concepto endófito fue Anton de Bary (1866), aunque fue hasta 1898, cuando se registró por primera vez hongos endófitos luego de observar cuadros toxicológicos en animales por el consumo de semillas o partes aéreas de *Lolium arvense*, *L. temulentum*, *L. linicolum* y *L. remotum* (*Poaceae*) infectados con hongos Clavicipitáceos (Guerin, 1898). No fue hasta 1977 en que Bacon asoció la presencia del hongo *Neotyphodium coenophialum* a la intoxicación de ganado, llamada “síndrome de verano”, debido al consumo de *Festuca arundinaceae* (*Poaceae*).

Incluso el concepto puede incluir fitopatógenos en alguna etapa de desarrollo, por lo que algunos autores han agregado ciertos puntos a la definición. Kloepper y colaboradores (1992), definió a los colonizadores endófitos sin vincularlos al concepto fitopatógeno; en contraste, Petrini (1991), debido a nuevos hallazgos, concluyó que el dictamen planteado de endófitos ya no era sostenible y propuso que la definición se ampliara con lo propuesto por Carroll (1986). Este último investigador restringió el uso a aquellos organismos que causan infecciones asintomáticas dentro de los tejidos

vegetales y, de esta manera, excluyó a hongos fitopatógenos y mutualistas como los de tipo micorrícicos. En este sentido, Petrini (1991) indicó lo siguiente:

[...] Que la definición de Carroll se amplíe para incluir a todos los organismos que habitan los órganos de las plantas que, en algún momento de su vida, pueden colonizar los tejidos internos de las plantas sin causar un daño aparente a su huésped.

De acuerdo con la delimitación, estos se encuentran principalmente en espacios intercelulares de los tejidos y, con menor frecuencia, intracelularmente y en tejidos vasculares, sin causar alteraciones (Hurek *et al.*, 1994). MacCulley (2002), indicó que los organismos endófitos ingresan dentro de la planta por los estomas, heridas o áreas de emergencia de raíces laterales.

Con todo lo anterior –y al existir discrepancias con el término–, en la actualidad son varios los autores que utilizan la definición de endófitos como aquellas bacterias y hongos que pueden ser detectados en un momento particular dentro de los tejidos de plantas aparentemente saludables (Schulz y Boyle, 2006).

Incluso, se ha propuesto también que los microorganismos asociados a planta constituyen un segundo genoma vegetal. Lo anterior, debido a que el microbioma se encuentra fuertemente influenciado por el genoma de la planta y puede considerarse como una extensión para formar un segundo genoma o colectivamente para formar un pangenoma (Turner *et al.*, 2013).

La diversidad y densidad poblacional de los endófitos depende de diversos factores abióticos y bióticos (Perez *et al.*, 2010).

### **Hongos endófitos**

Los hongos endófitos son los microorganismos más frecuentes (Staniek *et al.*, 2008). Estos, al igual que las bacterias endófitas, colonizan los tejidos de las raíces inter e intracelularmente y, a menudo, sistémicamente (Schulz y Boyle, 2006). Además, son de gran diversidad y polifiléticos; aunque en su mayoría pertenecen al phylum Ascomycota, se han descubierto en Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota (Huang *et al.*, 2001).

En *Lolium temulentum* L., de 80 a 100 % de los granos presentan una especie de hongo, siempre situado en los restos de la *nucellus* (nucela), fuera de la capa de aleurona del endospermo (Freeman, 1904). Recientes estudios

indicarían que cada planta estudiada alberga por lo menos uno o más endófitos (Kusari *et al.*, 2012).

Un hito en la historia de la investigación de endófitos, fue el descubrimiento del hongo endofítico *Neotyphodium coenophialum* como organismo causante de la “toxicosis de *Festuca*”; un síndrome que padece el ganado alimentado con *Festuca arundinacea* (Bacon *et al.*, 1977). Más tarde se descubrió que estas plantas infectadas contenían varios alcaloides tóxicos y que las especies de *Neotyphodium* podrían ser beneficiosas para sus plantas hospedantes, al defenderlas de ciertos herbívoros, lo que aumenta su tolerancia a los factores de estrés bióticos y abióticos (Schardl *et al.*, 2004).

Se ha observado que la composición de especies endófitas es muy diferente entre la zona templada y el trópico (Rodrigues y Petrini, 1997). Uno de los taxones endófitos más comunes en los trópicos corresponde a la familia Xylariaceae, la cual también es frecuente en zonas templadas, pero como descomponedores de madera, mas no como endófitos (Rodrigues y Samuels, 1990).

Estos hongos se han clasificado en dos grupos principales basados en diferencias evolutivas, taxonomía, plantas hospedantes y funciones ecológicas: Clavicipitáceo que pueden infectar solo a algunas especies de gramíneas; y no Clavicipitáceo que se encuentran en los tejidos asintomáticos de briófitas, helechos, gimnospermas y angiospermas (Rodríguez *et al.*, 2009).

### **Endófitos Clavicipitáceos**

Los endófitos Clavicipitáceos comprenden un número pequeño de especies filogenéticamente relacionadas, exigentes en cultivo y se encuentran limitados a algunos pastos de estación fría y cálida (Bischoff y White, 2005). Se ubican dentro de los brotes de las plantas, lo cual forma infecciones intercelulares sistémicas. Clay y Schardl (2002), identificaron tres tipos de endófitos Clavicipitáceos que abarcan desde especies sintomáticas y fitopatógenas, es decir, del Tipo I, endófitos de interacción mixta del tipo II y asintomáticos tipo III. Estos últimos (tipo III) son de mayor interés, puesto que son los que se desarrollan al interior de la planta sin manifestar síntomas.

### **Endófitos no Clavicipitáceos**

Los endófitos no Clavicipitáceos son muy diversos y representan un ensamblaje polifilético de hongos principalmente ascomicetos con una variedad de funciones ecológicas y, a menudo, poco definidas o desconocidas. Arnold y Lutzoni (2007) señalaron que se han recuperado endófitos no

Clavicipitáceos de todas las especies de plantas terrestres, tanto en los trópicos hasta la tundra.

Cada vez se hacen más evidente los roles ecológicos, su diversidad, las aplicaciones potenciales, incluso, la capacidad de muchos hongos para cambiar entre estilos de vida endofíticos y de vida libre. Poco a poco, esto ha incentivado el entusiasmo entre los expertos en el área: científicos, ecólogos, fisiólogos, micólogos, etc. (Selosse *et al.*, 2008; Vasiliauskas *et al.*, 2007).

Basado en las características y su importancia ecológica, estos representan al menos tres grupos o clases funcionales diferentes. En la siguiente Tabla 1 se exponen las respectivas categorías.

Tabla 1. Grupo y clases de hongos endofitos.

Criterio	Clavicipitáceos		No Clavicipitáceos		
	Clase 1		Clase 2	Clase 3	Clase 4
Rango de Hospederos	Reducido		Extenso	Extenso	Extenso
Tejidos que colonizan	Tallos 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 metabolitos secundarios	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros

\*Transmisión de hongos endofitos en las plantas a través de las semillas, y horizontal, se adquieren del medio ambiente.

Fuente: Sánchez *et al.*, 2013.

## **Importancia y beneficios de microorganismos endófitos**

En primera instancia, hay que aclarar que los endófitos de las plantas evitan que los microorganismos fitopatógenos colonicen al hospedero vegetal, al ejercer una actividad protectora (Arnold *et al.*, 2003). Además, traen consigo ciertas ventajas: estimular el crecimiento de las plantas; aumentar la resistencia a enfermedades; mejoran la capacidad de las plantas para resistir el estrés ambiental y contribuyen a reciclar los nutrientes. Por lo tanto, se ha demostrado que la relación de endófitos y planta es muy beneficiosa (Sturz y Nowak, 2000).

Igualmente, se ha llegado a mencionar el potencial que poseen estos organismos endófitos y su batería de enzimas y metabolitos secundarios (Singh *et al.*, 2011), puesto que sus derivados se pueden usar en aplicaciones biotecnológicas (Tomita, 2003). Además, tienen gran importancia para la industria farmacéutica por sus actividades antimicrobianas, anticancerígenas y antivirales (Selim *et al.*, 2012) y en la industria de los combustibles (Singh *et al.*, 2011).

Aunque la simbiosis es facultativa para las plantas (es decir, que las plantas pueden vivir sin el endófito), la asociación gramínea-endófito es considerada de tipo simbiótico-mutualista (Siegel *et al.*, 1987; Clay y Scharndl, 2002). Por un lado, los endófitos se benefician de la asociación al obtener nutrición y dispersión, pero su supervivencia y multiplicación depende fuertemente de la aptitud ecológica de la planta hospedante (Siegel *et al.*, 1987).

Los endófitos Clavicipitáceo de clase 1 (Tabla 1) con frecuencia aumentan la biomasa vegetal, confieren tolerancia a la sequía y producen sustancias químicas que son tóxicas para los animales y disminuyen la herbivoría (Clay, 1988). Sin embargo, los beneficios conferidos por estos hongos parecen depender de la especie huésped, el genotipo del huésped y las condiciones ambientales (Saikkonen *et al.*, 1999; Faeth y Sullivan, 2003; Faeth *et al.*, 2006).

Un aspecto único de los endófitos no Clavicipitáceo de clase 2 (Tabla 1), es su capacidad para conferir tolerancia al estrés específico del hábitat a las plantas hospedantes (Rodríguez *et al.*, 2008).

## **Relación hongo endófito-planta hospedera**

La relación entre los hongos endófitos y su planta hospedera puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis (Rodríguez *et al.*, 2009; Strobel *et*

al., 2004). Los organismos producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos. En ese sentido, mientras la planta produce defensas mecánicas y bioquímicas, el endófito genera factores de virulencia como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos (Schulz y Boyle, 2005).

No obstante, para lograr la coexistencia, dependiendo de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, se instaura entre ellos una relación de antagonismo balanceado. La defensa de las plantas obedecerá a los factores ambientales y, asimismo, está mediada 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. En contraste, 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 así los síntomas de enfermedad (Schulz y Boyle, 2005).

### **Control biológico**

Los endófitos foliares pueden reducir la herbivoría al producir alcaloides tóxicos para insectos y vertebrados (Schardl, 2001). Es así como se determinó que *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Rhodotorula rubra*, *Epicoccum nigrum*, *Cryptococcus sp.*, *Penicillium sp.* y *Fusarium graminearum*, actuaron como protectores de plantas contra herbívoros (Larran et al., 2002; Geris et al., 2003). Así mismo, en orquídeas se demostró el rol que cumplen los endófitos en la protección de la planta frente a ataques de fitopatógenos por síntesis de metabolitos secundarios o gracias al mejoramiento nutricional, debido a la disponibilidad de nutrientes (Bayman y Tupac, 2006; Schulz, 2006).

Los hongos endófitos pueden actuar como insecticidas, dado es el caso de *Acremonium coenophialum* contra pulgones (*Schizaphis graminum* y *Rhopalosiphum padi*) y chinche del algodóncillo (*Oncopeltus fasciatus*) (Johnson et al., 1985). El hongo *Claviceps purpurea* posee una importante actividad insecticida contra *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) con una tasa de mortalidad del 90 % (Shi et al., 2013).

El extracto de *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*), *A. oryzae*, *A. tamarii* y *A. versicolor* aplicado tópicamente sobre larvas de *Spodoptera litura* mostró actividad insecticida; *A. versicolor* evidenció la máxima actividad insecticida (43,3 %) (Abraham et al., 2015).

## Crecimiento vegetal

Diversos estudios detallan la protección y relación que existe entre el huésped y su hospedero. De esta forma, Waller y colaboradores (2005), indicaron un aumento de tolerancia al estrés salino y resistencia a enfermedades en plantas, debido a la existencia de endófitos en la raíz. La rizósfera es el ambiente más fácilmente influenciado y existe un flujo de diversos compuestos orgánicos y productos de fotosíntesis que son exudados por la raíz (Barea y Azcón, 1982).

Para mantener o mejorar el desempeño ecofisiológico y supervivencia de las plantas, la aplicación de hongos endófitos a las raíces se considera una estrategia beneficiosa en diferentes especies de árboles y arbustos. En ambientes extremos con condiciones de estrés ambiental (estrés hídrico) se han manifestado los beneficios en términos de supervivencia y crecimiento a la vegetación que se asocia a ellos (Gamboa *et al.*, 2003). Un ejemplo es la Antártida, que posee bajas temperaturas y un marcado déficit hídrico y nutricional, donde sin embargo, se desarrolla *Dechampsia Antártica* (Pasto antártico) y *Collobantus quitense* (Clavel antártico) (Chwedorzewska, 2009). Por esto mismo, se podría esperar que endófitos asociados a raíces de plantas antárticas puedan beneficiar a otras especies expuestas a condiciones estresantes y que formen asociaciones con ellos.

Así, los endófitos promueven el crecimiento vegetal al estimular el desarrollo de las plantas (Hallmann *et al.*, 1997).

Al respecto, Bacon (1993) aseguró que estos microorganismos aumentan la retención de agua y reciclan nutrientes en las plantas, pero además, producen un retraso en la floración y mayor retención de hojas. Gracias a esto las plantas fijan más carbono.

Los endófitos pueden promover activa o pasivamente el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos. Lo anterior, en la medida de que los metabolitos endofíticos brindan una variedad de aptitud para las plantas al aumentar la resistencia a estrés biótico y abiótico, además de mejorar su crecimiento. Muchos endófitos tienen la capacidad de solubilizar el fosfato, mejorar la absorción de fósforo (P), fijación de nitrógeno, producción de sideróforos y hormonas vegetales, tal como auxina, etileno, abscisinas, giberelinas y ácido indolacético (IAA); elementos imprescindibles para la regulación del crecimiento de las plantas (Goodman *et al.*, 1968; Barraquio *et al.*, 1997; Firáková *et al.*, 2007).

El endófito fúngico, *Cladosporium sphaerospermum* de la planta *Glycine máx.* (L) Merr. (Soja) produce GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> (ácido giberélico; fitohormona que regula el crecimiento de las plantas). De forma general, se encarga de inducir el crecimiento de plantas de arroz y soja (Hamayun *et al.*, 2009).

Las asociaciones endofíticas pueden proteger la nitrogenasa del daño inducido por el oxígeno, dado que proporcionan grandes cantidades de carbono orgánico a las bacterias y las protegen de la competencia de otras rizobacterias (Danhorn y Fuqua, 2007), como por ejemplo *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

### **Mecanismos de protección de cultivos**

Los hongos endófitos pueden inducir resistencia a enfermedades. Los mecanismos de resistencia inducida por endófitos se encuentran relacionados con el estado nutricional del hospedador y por el aumento de la aptitud de las plantas; este proceso, sin duda, mejora su tolerancia al estrés abiótico (Aguilar y Barea, 1996). De esta forma, *Cryptosporiopsis cf. quercina* y *Colletotrichum* sp., son eficaces contra fitopatógenos como *Rhizoctonia cerealis*, *Phytophthora capsici*, *Pyricularia oryzae* y *Gaeumannomyces graminis* (Lu *et al.*, 2000).

La producción de compuestos orgánicos volátiles que produce el hongo *Muscodor yucatanensis*, aislado de *Bursera simaruba*, corresponde a un mecanismo de defensa directa. El extracto de compuestos volátiles del micelio de *M. yucatanensis* y derivados del medio de cultivo, son mortales para *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* y *P. parasitica* (Rubalcava *et al.*, 2010).

Los beneficios que tienen los endófitos se pueden clasificar como directos e indirectos. Los mecanismos directos (Novak, 1998) se vinculan con la planta, tal como promoción del crecimiento vegetal, la cual ayuda a la tolerancia contra tensiones causadas por estrés ambiental; entre ellas: giberelinas, auxinas, citoquinas, ácido abscísico, etileno, producción de ácidos orgánicos, fijación de nitrógeno, entre otros (Verna *et al.*, 2001). En contraste, los beneficios indirectos incluyen: acción antagónica, inhibidora o el control biológico de fitopatógenos; inducción de resistencia sistémica de la planta a hongos, bacterias, virus patógenos como agentes de bioprotección, producción de antibióticos; liberación de enzimas como quitinasa y glucanasas (Sessitsch y Clément, 2010). No obstante, algunos compuestos pueden entrecruzarse entre directos e indirectos, lo que les permite actuar de ambas

formas: mejorar y nutrir a la planta al mismo tiempo que controla fitopatógenos (Glick, 2014).

### **Actividad anticancerígena y antimicrobiana**

El taxol, es un diterpenoide altamente funcional usado como fármaco contra el cáncer. Este se aisló por primera vez de la corteza del tejo occidental, *Taxus brevifolia*. Durante la división celular, el taxol previene la despolimerización de la tubulina. Cabe mencionar, que la producción de taxol de diferentes géneros de endófitos por fermentación es un método más económico (Page *et al.*, 1999; Wani *et al.*, 1971). Este fármaco, se ha encontrado en muchos géneros de hongos endofíticos (*Alternaria*, *Fusarium*, *Monochaetia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Pithomyces* y *Taxomyces*) (Strobel *et al.*, 1996). El hongo endófito *Aspergillus terreus* mostró un efecto citotóxico contra la línea celular de cáncer HepG2 (Suja *et al.*, 2014).

Hongos endófitos como *Phaeosphaeria avenaria*, *Leptosphaeria sp.*, *Fusarium sp.*, *Phoma chrysanthemicola*, *Cladosporium sp.*, *Cylindrocarpon sp.*, *Saussurea involucreta*, *Fusarium solani*, *Cordyceps memorabilis*, *Phomopsis longicolla* y *Dothideomycetes*, presentan actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas humanas, tales como *Micrococcus luteus*, *Enterococcus shirae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* y *Salmonella typhi* (Lv *et al.*, 2010; Tayung *et al.*, 2011; Erazo *et al.*, 2006).

### **Fitorremediación**

La fitorremediación, es la eliminación asistida por plantas de xenobióticos y metales pesados del suelo (Ma *et al.*, 2011); este proceso dependerá de la tolerancia de los microorganismos y, a su vez, la planta obedecerá a la acumulación de contaminantes mientras produce gran cantidad de biomasa.

Un estudio llevado a cabo en *Festuca arundinacea* Schreber. y *F. pratensis* Huds., infectados con los hongos endofíticos *Neotyphodium coenophialum* y *N. uncinatum*, y plantas no infectadas, demostró que, al ser cultivadas en suelo contaminado con petróleo, las plantas infectadas con endófitos producían más biomasa en brotes y raíces en comparación con las plantas no infectadas (Soleimani *et al.*, 2010).

## **Endófitos como vector de genes**

Al respecto, Gamboa (2006) destacó el siguiente planteamiento:

Los hongos en comparación a las plantas huéspedes, son más manipulables genéticamente, por lo que Clay (comunicación personal) sugiere que en lugar de transformar la planta se pueden transformar sus endófitos, inocularlos y obtener la expresión en la planta. Algunos cultivos tropicales importantes carecen de sistemas de transformación genética, por lo que esta ruta podría ser una alternativa viable. Sin embargo, todavía no existe evidencia de transmisión vertical de endófitos en plantas tropicales.

## **Metabolitos**

Los endófitos son una fuente rica de metabolitos secundarios con importancia múltiple (Strobel y Daisy, 2003). Investigaciones recientes (Huang *et al.*, 2001; Erazo *et al.*, 2006; Kusari *et al.*, 2012; Barrales y De la Rosa, 2014) demuestran la gran capacidad que tienen los hongos endófitos para producir compuestos activos, los cuales confieren protección también al ataque de patógenos herbívoros y de microbios. Esto constituye así una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura (Sánchez *et al.*, 2013). Es justo decir, que muchos endófitos tienen el potencial de sintetizar varios metabolitos bioactivos que pueden usarse directa o indirectamente como agentes terapéuticos contra numerosas enfermedades (Strobel *et al.*, 2004).

Las sustancias producidas por hongos endófitos tienen su origen en diferentes vías biosintéticas; entre ellas: isoprenoides, policétidos y aminoácidos. Estas pertenecen a diversos grupos estructurales como terpenoides, esteroides, xantonas, quinonas, fenoles, isocoumarinas, benzopiranonas, tetralonas, citocalasinas y enniatinas (Schulz *et al.*, 2002). Estas moléculas bioactivas representan un depósito químico para el descubrimiento de nuevos compuestos para su uso en las industrias farmacéutica y agroquímica, como es el caso de los antibióticos, antioxidantes, inmunomoduladores, anticancerígenos y antiparasitarios.

En general, los microorganismos poseen gran potencial genético y metabólico. De ahí que indagaciones recientes han reconocido la contribución de estos en la evolución y mantenimiento de todos los demás seres vivos (Guerrero y Berlanga, 2009). En comparación con otros microorganismos

endofíticos, los hongos endófitos producen una gran cantidad de metabolitos secundarios (Zhang *et al.*, 2006).

Los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* han sido ampliamente estudiados por la producción y emisión de su diversa gama de productos metabólicos secundarios, los cuales incluyen antibióticos como las fenazinas, el 2,4-diacetilfloroglucinol, compuestos orgánicos volátiles antifúngicos como el ácido cianhídrico, el dimetildisulfuro o la dimetilhexadecilamina (Hernández *et al.*, 2015).

Ocasionalmente, se han descubierto endófitos que producen metabolitos secundarios de la planta huésped con valor o potencial terapéutico; algunos ejemplos incluyen paclitaxel entendido como taxol (Stierle *et al.*, 1993; Barrales y De la Rosa, 2014), podofilotoxina (Eyberger *et al.*, 2006), azadiractina (Kusari *et al.*, 2012), entre otros.

### **Colonización: infección y propagación**

A pesar del planteamiento de que las bacterias son procariontas y los hongos eucariotas, ambos entes comparten muchos atributos de sus asociaciones con plantas hospedadoras. Un caso ilustrativo se fundamenta en que ambos colonizan los tejidos de las raíces inter e intracelularmente y, a menudo, sistémicamente (Hallmann *et al.*, 1997; Hinton y Bacon, 1995). En la Tabla 2, se observa la diferencia entre la interacción que tienen las bacterias y hongos endófitos con las plantas, específicamente, en raíces y las características de cada interacción.

Tabla 2. Características de la interacción de endófitos bacterianos frente a hongos con las raíces de las plantas.

<b>Criterios</b>	<b>Bacterias</b>	<b>Hongos</b>
Espectro del huésped	Amplía, depende del hábitat, anfitrión, temporada.	Amplía, depende del hábitat, anfitrión, temporada.
Modo y lugar de infección	Pasivo ocurre a través de heridas y otras aberturas de tejido; por el contrario sucede con enzimas y vectores, por ejemplo, insectos.	Activo: a través de estomas, pared celular o heridas.
Fuente nutricional durante la primera etapa de la infección	Exudados del hospedador, células muertas de la corteza y restos vegetales.	Material de almacenamiento en las esporas, células de la corteza muerta, restos vegetales, exudados del hospedador.
Fuente nutricional durante la colonización, por ejemplo: durante una condición de "estado estable"	Componentes del simplasto y apoplasto.	Componentes del simplasto y apoplasto.
Crecimiento en raíz	Densidad de colonización inter e/o intracelularmente lentas y bajas.	Inter e/o intracelular, a menudo extensa.
Crecimiento desde las raíces hasta el brote	Sí	A veces
crecimiento sistémico en raíces	Posible	Posible
tejido colonizado	Principalmente tejido intercelular, también vascular.	Generalmente no dentro del tejido vascular.
Estructuras especializadas para el acceso a los nutrientes	Nódulos, glándulas.	A veces
Estado fisiológico	Pocos datos disponibles.	Antagonismos equilibrados, interacción activa
Resultado de la interacción	Comensalismo, mutualismo o patogenicidad latente.	Comensalismo, mutualismo o patogenicidad latente.
Beneficios para el simbionte microbiano	Un suministro confiable de nutrientes y protección contra el estrés ambiental, transferencia pasiva y propagación entre huéspedes a través de vectores, por ejemplo, insectos.	Un suministro confiable de nutrientes y protección contra el estrés ambiental; ventajas para la reproducción y colonización en la senescencia del hospedador.

Beneficios potenciales para el simbionte vegetal	Induce resistencia, crecimiento mejorado (fijación de N, fitohormonas), síntesis de metabolitos antagonistas de patógenos vegetales y parásitos.	Induce resistencia, crecimiento mejorado (fitohormonas, mejor acceso a minerales y nutrientes), síntesis de metabolitos antagonistas para depredadores y antagonistas.
Reproducción	Usualmente transferencia pasiva y propagación entre hosts a través de vectores; insectos, pero también pseudomonas activas.	Activa y pasiva después de la senescencia del hospedador, a veces con vectores.

Fuente: Schulz y Boyle, 2006.

En general, los hongos endófitos, a través de la producción de esporas externas, se transmiten de planta a planta horizontalmente y se dispersan por aire; de esta forma, logran infectar otras plantas. Sin embargo, existe una forma de dispersión menos frecuente que ocurre mediante semillas infectadas, es decir, de generación a generación las plantas transmiten sus endófitos verticalmente (Selosse y Schardl, 2007). Por otra parte, las especies asexuales son transmitidas verticalmente mediante la colonización de las estructuras propagativas, tallos, tubérculos, rizomas, hojas o brotes (Schardl *et al.*, 2004).

La transmisión de endófitos Clavicipitáceos (Clase 1), es principalmente vertical y las plantas maternas son las encargadas de transmitir los hongos a la descendencia a través de infecciones de semillas (Saikkonen *et al.*, 2002). Por lo general, las plantas colonizadas albergan un aislado-genotipo fúngico dominante (Wille *et al.*, 1999). En contraste, los endófitos Clavicipitáceos de tipo III se transmiten verticalmente a través de semillas, pero muchos retienen un micelio epífilo donde se forman los conidios, lo que sugiere la posibilidad de transmisión horizontal (Rodríguez *et al.*, 2009). Tadych y colaboradores (2007), probaron que las conidias epífitas se liberan de los conidióforos solo en el agua, lo que indica que pueden esparcirse entre plantas a través de la lluvia o el rocío.

Con respecto a los no Clavicipitáceos, las tres clases tienen amplio rango de hospedadores (Tabla 1). Los de clase 2 pueden crecer en tejidos superficiales y subterráneos. Por el contrario, los endófitos de tipo 3 y 4 se limitan a los tejidos superficiales y las raíces, respectivamente. Cabe mencionar que la colonización de los tejidos del huésped también es diferente. Así pues, los endófitos de clase 3 forman infecciones muy localizadas, mientras que los de clase 2 y 4 son capaces de una colonización extensa de tejidos.

En general, la diversidad de endófitos clase 2 en plantas individuales es muy limitada en comparación con la de clase 3, en que la diversidad puede ser extremadamente alta. Sin embargo, la diversidad de clase 4 no se ha estudiado en profundidad. La diferencia en la biodiversidad vegetal de la segunda y tercera clase de endófitos puede reflejar la diversidad en la colonización del hospedador y los métodos de propagación. Aunque los miembros de estos dos tipos se extienden horizontalmente, el segundo tipo de endófitos también pasa a través de las semillas o rizomas (Rodríguez *et al.*, 2009).

### ***Malesherbia auristipulata***

El género *Malesherbia*, endémico de Sudamérica, fue propuesto por Ruiz y Pavón (Beltrán *et al.*, 2018), e incluido inicialmente como Malesherbiaceae. Actualmente, es el único miembro dentro de Passifloraceae. Su distribución contempla regiones áridas y semiáridas como Perú, Chile y Argentina. Varios años después que Ruiz y Pavón presentaran la descripción del género, se realizaron nuevas recolecciones de *Malesherbia* en lugares cercanos a los puertos como Valparaíso, Coquimbo y Copiapó, para su posterior descripción (Bull, 2020).

No se puede ignorar a Gay (1846), naturalista francés, quien fue comisionado para explorar Chile. Su publicación contenía ocho especies y tres de ellas descritas por él. Posterior a esto, Rodolfo Philippi (Rodríguez y Marticorena, 2019) descubrió y describió 15 especies más; después Karl Friedrich Reiche (1898), como se citó en Bull (2020), al observar la cantidad de plantas descritas del género *Malesherbia*, reordenó la nomenclatura del grupo. De esta manera, proporcionó a Chile un total de 18 especies. Unos años más tarde, Werdermann describiría el material de Berlín y tres nuevas especies endémicas de *Malesherbia* en el “norte amplio”, en el que se incluyen

las regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá y Antofagasta. Es justo decir que estas especies comparten similitudes a los taxones peruanos.

Sin embargo, Ricardi reordenó el grupo y ofreció la referencia taxonómica más influyente al respecto y, desde luego, fue el encargado de describir a *Malesherbia auristipulata* (Ricardi, 1965; Ricardi, 1967). En contraste, Gengler-Nowak (2002) desarrolló un estudio filogenético y biogeográfico del género y, asimismo, clasificó el subgénero. Además, dirigió un estudio fenético detallado sobre los taxones anuales, en el que afirmó el siguiente planteamiento:

El género *Malesherbia*, vive en una variedad de hábitats áridos en el desierto costero del Pacífico y los Andes adyacentes de Perú, Chile y la vecina Argentina. Los taxones con distribuciones en Perú y Chile son raros; por esta razón, el género proporciona un excelente estudio de caso para la biogeografía de esta región del oeste de Sudamérica [...]. La mayoría de las especies modernas parecen haber evolucionado en respuesta a las fluctuaciones climáticas del *Pleistoceno*.

En septiembre de 2019, en el 16° Proceso de Clasificación de Especies Silvestres liderado por el Ministerio del Medio Ambiente, se evaluaron 101 especies de animales, hongos o líquenes y plantas; dentro de esta última categoría pertenece *Malesherbia auristipulata*. Luego de evaluar varios puntos en la reunión, se reclasificó la especie en la categoría “en peligro crítico” (CR), según los criterios UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) versión 3.1. Uno de los puntos corresponde a que el número de individuos registrados es menor a 100 siendo el umbral 250. En este sentido, existe una disminución continua estimada a partir de la destrucción del hábitat por trabajos viales, extracción de áridos y la estructura poblacional con 90 % de los individuos maduros en una subpoblación (Ministerio del Medio Ambiente, 2019).

### **Morfología de *Malesherbia auristipulata***

Es un arbusto leñoso, de 40-80 cm de alto, ramificado desde la base, hirsuto, glanduloso y vellosidades en sus hojas. Hojas sésiles oblongas o lanceoladas de 3,5–4,5 de largo y 8–12 mm de ancho, algunas con tallos axilares desarrollados. Además, posee margen de la hoja con lóbulos dentados; tallos foliosos con ramas terminadas en racimos de flores; inflorescencia en racimo simple terminal; flores numerosas, persistentes, axilares, caedizas cuando maduran los frutos; sépalos rojos, casi lineales, erectos, de 7–9 mm de largo; y pétalos rojos, oblongo-lineales del mismo tamaño que los sépalos (Figura 1) (Ricardi, 1967).



Figura 1. Eje floral de *Malesherbia auristipulata*. Fuente: elaboración propia, 2019.

### **Hábitat**

Se encuentra en la región de Arica y Parinacota, en quebradas y hondonadas pedregosas hasta alrededor de 2500 msnm., específicamente, por el sector de Cuesta El Águila, quebrada de Cardones. En la Figura 2, se detalla la distribución de *Malesherbia auristipulata* representada por los lugares de colecta realizados por Bull-Hereñu (2020), indicado con puntos anaranjados. A lo largo de los años se han descubierto especímenes en distintos puntos, como en el camino al portezuelo de Chapiquiña: el 17 de febrero de 1960, V. Behn s.n. Camino a Putre a unos kilómetros del oriente de planta Quiborax, en el lecho de quebrada si se camina desde puente hacia el

poniente. Asimismo, el 14 de agosto de 2016, Bull-Hereñu y S. en Cuesta El Águila; el 12 de marzo de 1998 Belmonte por la región Arica, llano al pie de la cuesta de El Águila y, por otra parte, el 3 de mayo de 1972 Ricardi, Weldt y Quezada (Bull, 2020).

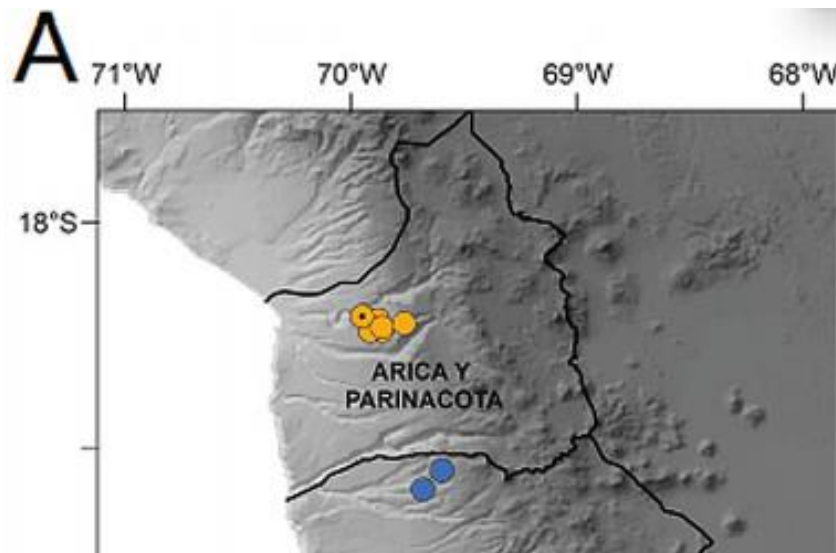


Figura 2. Distribución geográfica de *Malesherbia auristipulata* indicada con puntos naranjas. Cada punto indica una colección de herbario. Fuente: Bull, 2020.

La Dirección Meteorológica de Chile SRK Consulting (2009), clasificó el área de estudio de la población de *Malesherbia auristipulata* en la región de Arica y Parinacota con un clima Desértico Marginal de Altura (BWH), el cual predomina en las zonas próximas a la cordillera por sobre los 2000 m de altura. Esta zona se caracteriza por una masa de aire inestable que, debido a los efectos de la altura, produce nubosidad de desarrollo vertical que, a su vez, origina precipitaciones durante casi todos los veranos. A pesar de no ser tan abundantes como para eliminar la característica desértica, se crean condiciones para la existencia de una incipiente vegetación estacional. Las temperaturas muestran un régimen relativamente frío con un promedio no superior a los 10° C. Además, la planta se halla bajo exposición solar directa, sin protección a excepción de los roqueríos cercanos en los que crece (Figura 3). La relación que existe entre la planta y las rocas es concreta, las rocas van a proveer un ambiente especial para su protección y desarrollo. Estas actúan como captadores y retenedores de humedad, por lo que la planta adquiere un microclima perfecto de sombra, humedad, regulando temperatura, además disminuyen las pérdidas de agua por evaporación y protegen y controlan la erosión.



Figura 3. Ejemplar de *Malesherbia auristipulata* de no más de 2 metros de altura en ambiente árido pedregoso a 1830 msnm., en Cuesta El Águila protegido por el roquerío. Fuente: elaboración propia, 2019.

Una importante característica del clima de la zona norte de Chile es la variación interanual que presentan las precipitaciones. Los registros de precipitación advierten periodos de uno a más años secos. La duración e intensidad de los lapsos tiende a variar en el espacio geográfico y posee una fuerte influencia sobre la vegetación (Dillon y Rundel, 1990; Muñoz *et al.*, 2001).

En la Figura 4, se observa a través de la plataforma de Google Earth, el lugar donde se concentra la población de *Malesherbia auristipulata* en el sector de Cuesta El Águila, Quebrada de Cardones. En ella además se aprecia la intervención humana con instalaciones y maquinaria a diciembre del año 2019, fecha en que fue actualizada la imagen del programa Google Earth Pro.

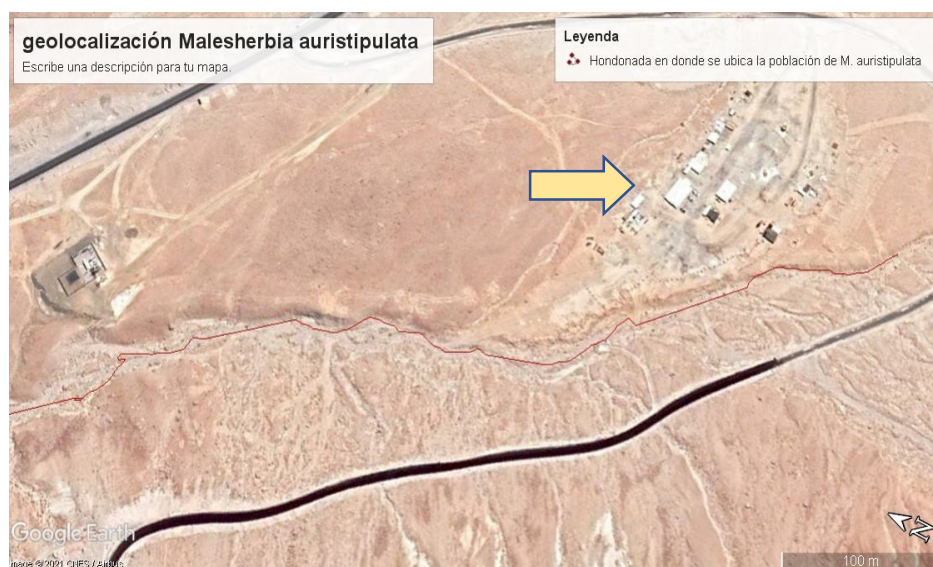


Figura 4. Localización de la concentración general de la población de *Malesherbia auristipulata* entre diciembre y marzo en el sector Cuesta el Águila (línea roja fina continua). Se observan las instalaciones de la Empresa a cargo de las obras viales (lado superior derecho indicado con una flecha). Fuente: elaboración propia, 2020.

Durante el año 2019 y 2020 se han estado realizando obras de construcción de caminos para la conectividad terrestre, trabajos en la Ruta Internacional 11-CH que buscan reponer 31 kilómetros de la ruta destruidos por efecto de las lluvias de verano de los últimos años. Se contemplan dos tramos, el primero desde el kilómetro 170 al 191 actualmente en ejecución. El segundo tramo, comprende desde el kilómetro 60 al 70 y que además cuenta con la reposición de tres puentes en el sector El Águila - Cuesta Cardones (Intendencia región de Arica y Parinacota, 2019). Durante el año 2020 se ha estado realizando todo el segundo tramo (Belmonte, comunicación personal).

La población de *Malesherbia auristipulata* que se desarrolla en la hondonada que se observa en las Figuras 3 y 4, están siendo objeto de una fuerte intervención antrópica por parte de la Empresa constructora, la que se ha agudizado entre los años 2019 y 2020 (Figura 5 A y B; Figura 6). Además, los trabajos en ruta no han continuado, lo que se extenderán al menos durante todo 2021 y 2022.

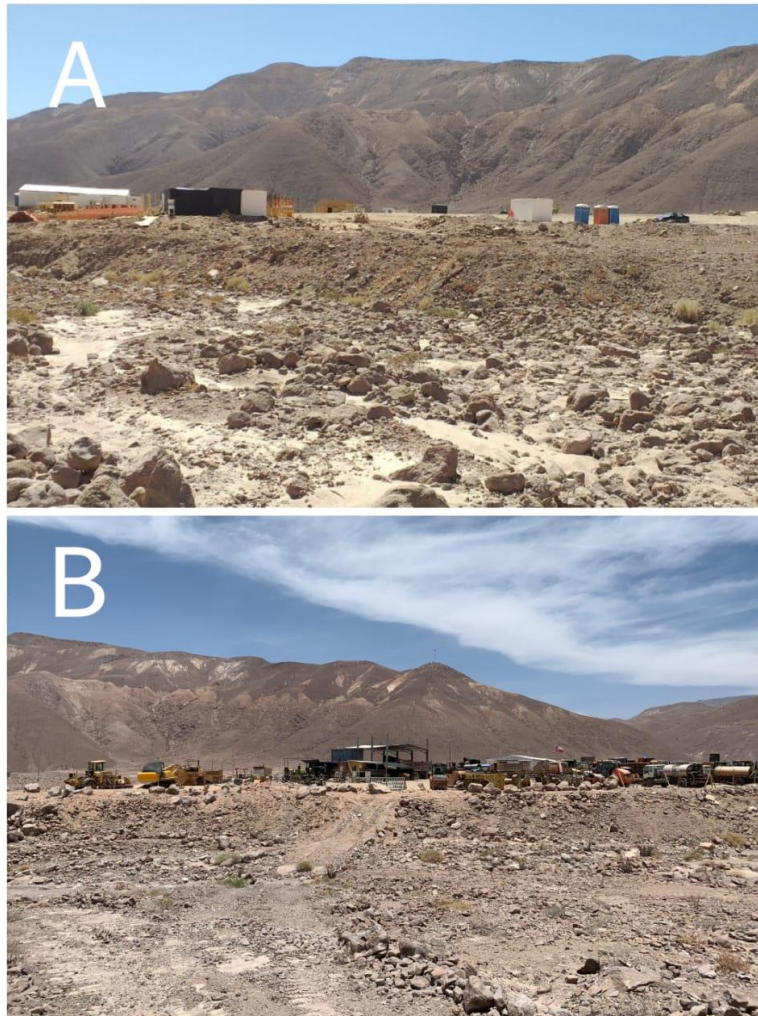


Figura 5. Comparación de las instalaciones durante 2019 y 2020 *in situ* en el hábitat de *Malesherbia auristipulata*. A. fotografía tomada en 2019. B fotografía tomada en 2020. Fuente: A. elaboración propia y B. Belmonte, 2020.



Figura 6. Huella que evidencia el paso de maquinaria pesada que atraviesa la hondonada donde habita *Malesherbia auristipulata*. Fuente: elaboración propia, 2019.

## Etnobotánica

Las plantas, de vital importancia para el hombre, permiten satisfacer sus necesidades de supervivencia de distintas formas, ya sea como alimento, ornamento, para producir calor o para el cuidado de la salud, en la construcción, producción de tintes, entre otros (Alban, 1998). El uso de estas tiene relación con las creencias y patrones de comportamiento de los seres humanos de acuerdo con su rol social. Esto cobra importancia, en la medida en que, a partir de investigaciones que cuantifiquen el conocimiento tradicional asociado a la flora, se pueda identificar especies vegetales que merezcan estudios más profundos, dándole validez y confiabilidad a los datos proporcionados por expertos (Castañeda, 2011).

Los métodos de investigación cuantitativos proporcionan un enfoque adicional para conocer las plantas consideradas más importantes para el humano, en el que se jerarquizan las plantas útiles con base al uso que le otorga un grupo humano (Martínez, 1991).

### Trascendencia de *Malesherbia auristipulata*

Erazo y colaboradores (2006), evaluaron la acción antimicrobiana, analgésica, antiinflamatoria y antioxidante de la parte aérea de *Malesherbia auristipulata*. Determinaron que la actividad antimicrobiana del exudado resinoso de la parte aérea de *M. auristipulata* mostró una mezcla activa frente a bacterias Gram (+): *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Mariniluteicoccus flavus* y menos activa frente a bacterias Gram (-): *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella aviatum* y *Escherichia coli*.

También revelaron la presencia de una mezcla de ácidos grasos poliinsaturados, siendo el ácido  $\gamma$ -linolénico el más abundante y el principal compuesto responsable de esta actividad. Igualmente, se profundizó acerca de las propiedades antiinflamatorias y analgésicas *per os* (administración oral) de *M. auristipulata*. La investigación exhibió componentes activos que podrían disminuir las actividades de ciclooxigenasa o lipoxigenasa; enzimas que permiten la síntesis de sustancias endógenas proinflamatorias como prostaglandina E2 o leucotrienos, respectivamente.

El extracto de diclorometano mostró actividad antioxidante, de este diclorometano bioactivo más extractos resinosos, se obtuvo  $\beta$ -sitosterol, kaempferol y una mezcla de ácidos grasos altamente saturados (siendo el ácido palmítico el más abundante). La presencia de los ácidos grasos polinsaturados principalmente ácido  $\gamma$ -linolénico, explica las actividades

antimicrobianas. La acción antioxidante del extracto de diclorometano estaría provocada por el kaempferol. Los efectos antiinflamatorios y analgésicos in vivo, confirman el uso medicinal como antiasmáticos de algunas especies de *Malesherbia*.

### **Métodos de laboratorio**

Con el fin de detectar y cultivar hongos endófitos, se han desarrollado diversas metodologías. Los procedimientos tradicionales consisten en la selección del material vegetal fresco y visiblemente sano, desinfección superficial del tejido vegetal, aislamiento en medios artificiales, purificación de colonias emergentes e identificación de los endófitos de acuerdo con la morfología (Schulz *et al.*, 1993; Stone *et al.*, 2004). Para aislar endófitos existe una gran variedad de técnicas, aunque ningún método es universal. Desde ese punto de vista, todo depende en general de la planta. Una vez desinfectado el material, se inoculan los fragmentos vegetales en medio de cultivo. Algunos de los medios idóneos son: agar agua (AA), agar papa dextrosa (PDA), agar extracto de levadura, agar ácido húmico vitaminado, Luria Bertani (LB), entre otros.

A continuación, se describe el método utilizado en el laboratorio de Patología vegetal de la Universidad de Tarapacá, adaptados de los procedimientos propuestos por el Dr. Andrea Campisano, especialista en microorganismos endófitos (Hergholi *et al.*, 2013; Pancher *et al.*, 2012).

### **Aislamiento y cultivo puro de bacterias y hongos**

Aislamiento, es el proceso en el que se separa uno o más microorganismos presentes en un sustrato, en este caso, hospedero (planta) forzándolos a crecer en medios de cultivo artificiales. Sin embargo, esto no es factible para todos los microorganismos. Existen algunos que no pueden cultivarse en medios artificiales, *e.g.*, organismos biotróficos (parásitos obligados), solo se desarrollan sobre tejido vivo de su hospedante (Montealegre, 1991).

### **Cultivo puro**

Es aquel que contiene una sola especie o tipo de microorganismos, por lo tanto, se ha obtenido a partir de una sola célula (cultivo axénico). En un cultivo puro, no necesariamente todas las células que lo componen tienen que ser exactamente iguales, puesto que es factible que algunas de ellas sufran mutaciones y se diferencien de las restantes (Montealegre, 1991). Es

necesario aclarar que los cultivos axénicos son muy extraños en la naturaleza, puesto que, en general, los medios naturales como el agua, suelo e incluso en el cuerpo humano existen cultivos mixtos que consisten en muchas y diferentes especies de forma conjunta.

### **Recuento en placa**

Este es el método más común para medir la cantidad de microorganismos y determinar el tamaño de una población bacteriana, la técnica mide la cantidad de células viables. El recuento supone que cada tipo de bacteria crecerá y se dividirá para producir una sola colonia. Para reflejar esta realidad, el recuento de placas suele registrarse como unidades formadoras de colonias (UFC) (Tortora *et al.*, 2007).

### **Observación microscópica de organismos**

Este corresponde a la primera etapa del estudio de los microorganismos y del diagnóstico, en la medida de que su observación permite determinar ciertas características de los microorganismos, por ejemplo: de qué forma se encuentran agrupados, cuál es la forma de cada microorganismo, su disposición, si presenta o no ciertas estructuras, su movilidad, etc. (Montealegre, 1991).

### **Materiales e instrumentos de laboratorio para aislamiento de endófitos**

Para realizar la metodología de extracción y aislamiento de endófitos se deben tener los siguientes insumos: vasos precipitados de 500-1000 mL, pinzas para manejar las muestras, tubos Falcon y Eppendorf (1,5 mL), tijeras, pistilos, puntas, asas de níquel-cromo o rastrillo, mechero de alcohol, papel parafilm, bisturí, hipoclorito de sodio al 2 %, alcohol al 70 % y 95 %, agua destilada esterilizada, placas de Petri con medios de cultivo como Agar-Agar (AA), Agar-Papa-Dextrosa (APD), medio de cultivo de *Rhizobium* Agar Usal (aislamiento y cultivo de *Rhizobia*) para bacterias endofíticas y Rhizobacterias (MRZ) según patente modificada en la Universidad de Salamanca (USAL), medio Luria Bertani (LB), etc., suero fisiológico, porta objetos, guantes de nitrilo, cubre boca y papel absorbente.

En cuanto a los instrumentos, son necesarios equipos, tales como cámara de flujo laminar (Streamline, modelo ESCO CLASS II BSD de USA); balanza analítica precisa (modelo BJ610C de USA); autoclave (modelo Phoenix Luferco AD-75 de Brasil); microscopio óptico (marca Olympus, modelo CX22 de USA); agitador magnético (marca HILAB, modelo MS 400

Alemán); destilador de agua (marca Pobel, modelo Desa 700, España); equipo de esterilización, tal como horno Pasteur (marca Memmert modelo 48 L, Alemán); estufa de cultivo (Binder Modelo BD 11 Alemán); un contador manual.

### Recolección de muestras

La experiencia desarrollada en Arica, indica que se deben coleccionar mínimo tres muestras de la especie vegetal a estudiar, definiendo espacial y temporalmente la colecta. Por ejemplo, *Malesherbia auristipulata* de la Cuesta El Águila en la región de Arica y Parinacota (GPS 19 k 408834.00 m E, 7956287.00 m S a 1830 msnm., Figura 7). Los materiales que se usan para extraer las muestras deben estar esterilizados. Al menos dos de estas debiesen ser planta completa (incluyendo raíz), si se consideran las características fisiológicas y botánicas de la planta al momento de su recolección. Claro está, se deben seleccionar sin que tengan aparentes enfermedades para trabajar con una planta sana y, de esta manera, tener en cuenta la presencia de microorganismos endófitos activos cuando la planta se encuentra en ciertos estados de desarrollo. Una vez colectada la muestra se deposita en un lugar desinfectado para su traslado a laboratorio.



Figura 7. Localización de muestra de *Malesherbia auristipulata* recolectadas a 1830 msnm., en sector Cuesta El Águila. Fuente: elaboración propia, 2019.

## Indicaciones para el trabajo en laboratorio

Antes de aislar los microorganismos endófitos, es importante que los mesones y área de trabajo esté en condiciones aptas (asepsia) y el personal cuente con los implementos de protección necesarios para evitar contaminación en las muestras, como también se debe evitar el tránsito constante entre sectores de laboratorio.

El material vegetal se debe lavar y disectar en un sector de lavado y, solamente, se ingresa al lugar de trabajo los trozos del material ya cortados. Por lo que una vez recolectada la muestra de *Malesherbia auristipulata*, se realiza en laboratorio –específicamente en el sector de lavado– la desinfección de los distintos tipos de cortes de la planta: raíz, tallo, hoja y flor. Cada corte pasa a ser una muestra, por ende, estas se depositarán en una primera instancia dentro de un vaso de precipitado con alcohol al 95 % (Figura 8). Es vital que se procure cubrir en su totalidad la muestra seleccionada durante 2 minutos. Luego, se extrae para depositarla en otro con solución de hipoclorito de sodio al 2 % por otros 2 minutos. Por último, se sumerge en solución de alcohol al 70 % por 2 minutos. Con este proceso se asegura la desinfección externa total y se evitan riesgos de contaminación externos.

La muestra se deposita en un nuevo vaso de precipitado con agua destilada estéril. A partir de este momento se trabaja dentro de la cámara de flujo laminar (Hergholi *et al.*, 2013).

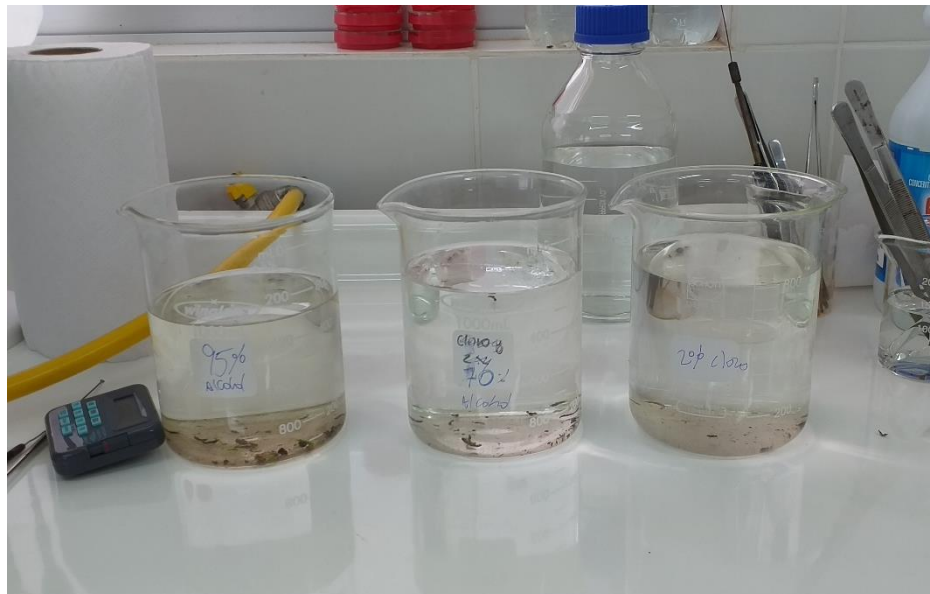


Figura 8. Tratamientos de desinfección realizados a las muestras de *Malesherbia auristipulata*. 2 minutos en alcohol al 95%, 2 minutos en hipoclorito de sodio al 2% y 2 minutos en alcohol al 70%. Al lado izquierdo el cronometro para tomar el tiempo. Fuente: elaboración propia, 2019.

## Procedimiento para medios de cultivo para hongos (APD y AA) y bacterias (MRZ y LB)

Una vez que la cámara se encuentra desinfectada y esterilizada con luz ultra violeta, las muestras se llevan a su interior para su disección. En las muestras de tallo, se hacen cortes verticales en el centro de ellos y se depositan las muestras en medios de cultivo de APD (Agar-Papa-Dextrosa) y AA (Agar-Agua). Para aislar bacterias, se usa los medios MRZ (*Rhizobium* Agar USAL), después de seguir el mismo procedimiento anterior; sin embargo, para LB estas muestras se deben moler en un mortero, conteniendo 1,5 ml de agua destilada estéril mientras se muele el material. Luego se extrae 200  $\mu$ L de sobrenadante, el cual se deposita en medio de LB esparciendo con asa tipo rastrillo.

De forma similar, en el caso de las muestras de raíz, se eliminan los extremos y bordes de esta y, sumado a esto, se extrae un trozo de la zona interna o del centro y se disponen en medios de cultivo de APD y AA. Para bacterias se sigue el mismo procedimiento que el descrito en el tallo. En contraste, para el caso de las flores y hojas, se aplastan las muestras con un mortero y se ponen los trozos en los distintos medios. Para las bacterias se vuelve aplicar el procedimiento señalado.

A medida que se realiza cada procedimiento, las placas se deben cerrar con papel film para impedir el ingreso de agentes externos, luego se rotula cada placa para identificar la muestra (fecha, tipo de muestra). Para finalizar este procedimiento, se dejan en un lugar donde permanecerán un par de días (Figura 9). Estas placas serán denominadas a partir de ahora como placas madres.

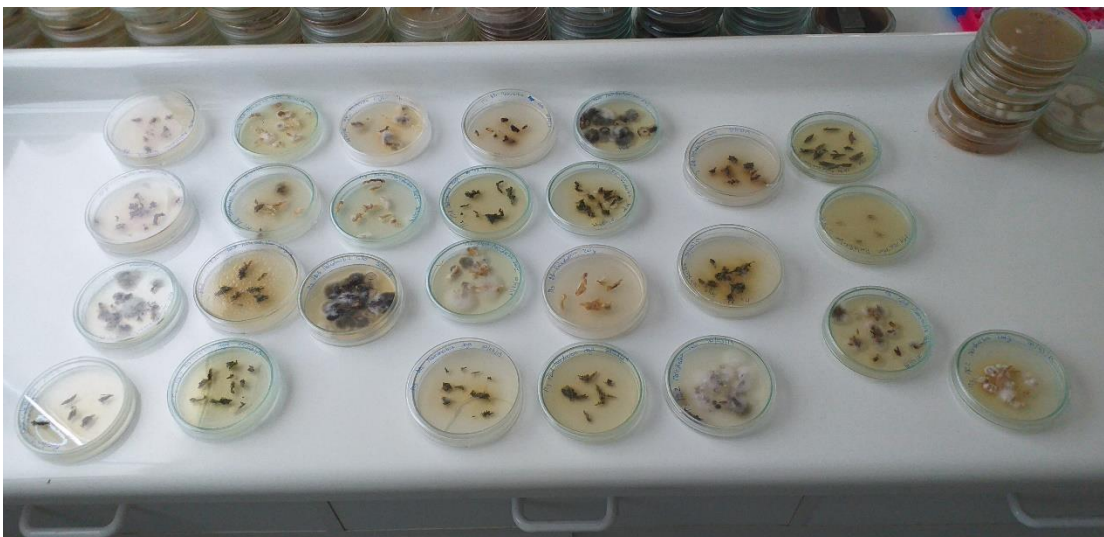


Figura 9. Placas con muestras de plantas en el proceso de extracción de endófitos. Fuente: elaboración propia, 2019.

## Rotulado

El rotulado corresponde a la identificación o clave que es asignada a cada muestra depositada en las placas de Petri. Esto dará información del endófito. Cada investigador rotula sus muestras con la información necesaria y otorgándole información en forma de clave; en general, esto contiene de manera básica el nombre del experto, el número de muestra, *i.e.*, cada planta recolectada llevará un número de identificación (1, 2, 3, etc.) conveniente. Cabe aclarar que el número de muestra se refiere a cada planta. También se escribe el lugar donde se recolectó la muestra (el que puede o no llevar clave), el tejido, el medio de cultivo y la fecha. Si él o la investigadora lo consideran, puede agregar otras observaciones que se incluirán en el código de las muestras. Ésta información ayudará, posteriormente, a formar el código de la placa madre y sus aislamientos derivados.

Por ejemplo: nombre de investigador(a): Alexandra Vielma, planta 1 de *Malesherbia auristipulata* (muestra 1): M1, localización Cuesta El Águila: CA, Tejido Tallo: T, medio de cultivo: APD. Entonces, para rotular el código sería: CAM1T(APD). Se prosigue de la misma forma con el resto de las muestras (Tabla 3).

Tabla 3. Ejemplo de códigos asignados por muestra.

Código	Muestra	Parte tejido	Medio	Lugar
CAM1T(APD)	1	Tallo	APD	Cuesta Águila
CAM1R(APD)	1	Raíz	APD	Cuesta Águila
CAM2H(AA)	2	Hoja	AA	Cuesta Águila
CAM2T(AA)	2	Tallo	APD	Cuesta Águila
CAM2R(LB)	2	Raíz	LB	Cuesta Águila
CAM3T(APD)	3	Tallo	APD	Cuesta Águila

Fuente: elaboración propia, 2019.

## Observación e Identificación de poblaciones de hongos y o bacterias

Pasados unos días, es posible detectar crecimiento de microorganismos en las placas con las muestras (Figura 10). El crecimiento no debe ser tal que las poblaciones entren en mayor contacto, ya que al momento de aislar al microorganismo se hará más fácil el evitar contaminaciones entre los mismos endófitos. Con un marcador, a medida que se van diferenciando colonias –ya sea de hongos y/o bacterias– se marcan sobre la placa para poder identificarlos fácilmente al momento de aislar cada uno.

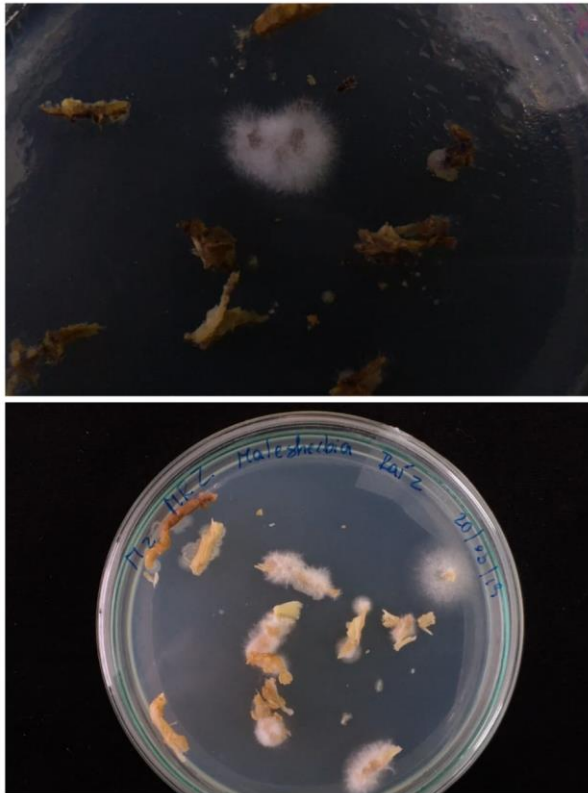


Figura 10. Ejemplo de la disposición de muestra de raíz de *Malesherbia auristipulata*. Placa con material fúngico en crecimiento rotulada. Fuente: elaboración propia, 2019.

## Aislamiento y cultivo puro de hongos

Una vez marcadas todas las placas con hongos, se procede nuevamente a desinfectar y esterilizar la cámara de bioseguridad (donde se trabajará). Enseguida, se depositan las placas con las muestras y con un asa de siembra esterilizada se extrae una pequeña cantidad de micelio o esporas del hongo seleccionado previamente y, al mismo tiempo, se depositan tres lugares distintos de una nueva placa de Petri con medio de cultivo APD, en el

que se forma una especie de triángulo (Figura 11). Este hongo llevará un nuevo código que continuará con el de la placa madre (Tabla 4). La placa se sella con papel parafilm y se escribe en ella el nuevo código y, luego, se deja en un lugar con condiciones óptimas de luz y temperatura, de preferencia una incubadora para acelerar la esporulación y crecimiento del hongo.



Figura 11. Placa Petri con aislamiento de endófitos y crecimiento fúngico en medio de cultivo PDA a temperatura ambiente. Fuente: elaboración propia, 2019.

El procedimiento se realiza con cada placa madre en el que se haya marcado un hongo endófito. El medio de cultivo empleado a partir de este punto será APD, por lo que el nuevo código ya no incluirá el medio utilizado originalmente (placa madre).

Tabla 4. Ejemplo rotulación de hongos en placa de Petri en aislamiento de hongos endófitos.

<b>Código</b>	<b>Muestra</b>	<b>Parte tejido</b>	<b>Medio</b>	<b>Hongo o bacteria</b>	<b>lugar</b>
CAM1H1T (APD)	1	Tallo	APD	1	Cuesta El Águila
CAM1H2T (APD)	1	Tallo	APD	2	Cuesta El Águila
CAM2H1H (APD)	2	Hoja	APD	1	Cuesta El Águila
CAM2H2H (APD)	2	Hoja	APD	2	Cuesta El Águila
CAM2H3H (APD)	2	Hoja	APD	3	Cuesta El Águila

Fuente: elaboración propia, 2019.

## **Reaislamiento**

Si al pasar los días en las placas de hongos endófitos aislados se observa contaminación, ya sea externa o cruzada con otros hongos endófitos, se debe volver a realizar el procedimiento anterior para obtener una muestra pura.

## **Cultivo monospórico**

Cuando el hongo aislado ha crecido y esporulado, se procede a obtener un cultivo monospórico que garantiza la autenticidad y pureza del aislamiento, lo cual entrega consistencia a la información que se genere posterior a este proceso. Para este procedimiento, se utilizan unas gradillas con tubos Eppendorf, 5 tubos para cada hongo aislado, micropipetas, agua destilada, un agitador vórtex y bisturí o asa, mechero para esterilizar el bisturí o las asa y, por último, la cámara de flujo laminar (CFL).

Una vez el material dentro de la CFL se toman cinco tubos, al primero se le agrega 1000  $\mu$ l (1 ml) de agua destilada estéril con la micropipeta y 900  $\mu$ l (0,9 ml) a los otros cuatro. Enseguida, se coge una de las placas con los hongos aislados esporulados con un asa o un bisturí esterilizado; se extrae una pequeña muestra del hongo y se deposita en el tubo número 1 que contiene 1 ml de agua destilada; se tapa el tubo y se agita durante varios segundos en el vórtex hasta que se homogeniza. Después, con la micropipeta se extraen 100  $\mu$ l, y se vacía en el segundo tubo (que contenía 900  $\mu$ l); se completan así los 1000  $\mu$ l, se cierra y se lleva a vórtex una vez más durante varios segundos hasta mezclar bien; se extraen nuevamente 100  $\mu$ l y se introducen al tercer tubo. Se realiza el mismo procedimiento hasta llegar al quinto tubo; de este se extraen solo 50  $\mu$ l y se esparce el líquido homogéneamente en una placa de Petri con medio de cultivo APD y se sella con parafilm. Se rotulan los tubos del 1 al 5 con su concentración y se procede de la misma forma con el resto de los hongos que se obtengan de la planta.

Una vez finalizado el procedimiento de cada hongo, se toman las gradillas con los tubos etiquetados y se guardan en una cámara de frío para conservar las muestras y hacer uso de ellas en caso de cualquier imprevisto. Es importante mencionar que, luego de realizado el procedimiento de aislamiento y cultivo monospórico, las placas se dejan en un ambiente adecuado dentro del laboratorio para que los hongos se desarrollen.

## **Aislamiento de punta de hifa**

El aislamiento de punta de hifa es otro método de producir un cultivo puro proveniente de una sola conidia. Esta metodología consiste en preparar una dilución de conidias de 2500 ml con Tween 80 al 1 % estéril; después, poner en un vaso precipitado una cantidad conveniente de agar agua caliente o APD (40° C), tomar una lámina portaobjeto y sumergir el extremo en el vaso y sacarlo. Se limpia la superficie inferior de la lámina y se deposita en una placa Petri. La placa debe tener papel filtro estéril en el fondo humedecido con agua destilada estéril. Se prosigue a sembrar el hongo con un asa en la porción de la lámina que tiene la película del medio y estirarla cuidadosamente. Después de este procedimiento, es vital incubar por dos o tres días y observar en cámara de flujo laminar las colonias que se han formado. De estas colonias, hay que tomar la que esté más aislada y en el microscopio buscar la punta de alguna hifa solitaria, cortarla y poner la punta cortada en una placa de Petri con APD.

Sin embargo, este método tiene algunas desventajas, puesto que presenta problemas con el método al ser más tedioso y largo; incluso, existe una mayor probabilidad de contaminación (Cañedo y Ames, 2004).

## **Observación microscópica, descripción e identificación**

La descripción corresponde a la explicación y detalle cualitativo lo que se observa en las colonias monospóricas: forma, color de la colonia madura, aspecto de la superficie, etc. Es fundamental fotografiar el proceso.

En un portaobjeto se agrega una gota de lactoglicerol y, con la ayuda de una aguja de disección o asa, se procede a sacar una pequeña parte del hongo (micelio) en su medio de cultivo. Después se deposita en un portaobjeto, se cubre con un cubreobjeto y se observa en microscopio. Cada aislamiento se identifica con criterios morfométricos de acuerdo con la clasificación taxonómica vigente (Kirk *et al.*, 2001), y se describen las estructuras que se observen, verbigracia: forma de los conidios, ubicación, tipo de conidióforo, tipo de célula conidiógena, etc.

La Figura 12, detalla el aspecto macroscópico de las colonias en placas cultivadas con distintos tipos de hongos endófitos de *Vanilla planifolia* Andrews.

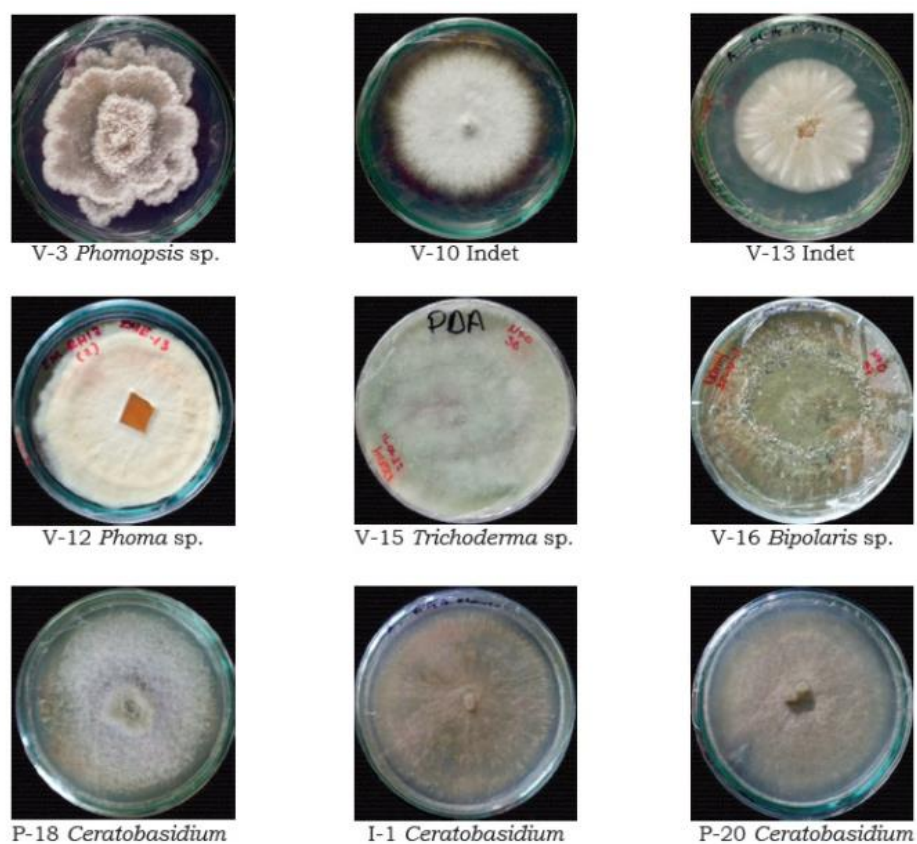


Figura 12. Morfología de colonias de algunos aislamientos inoculados en plantas de Vainilla. Fuente: Ordóñez et al., 2012.

La variación en las comunidades endofíticas se dará entonces, dependiendo de factores ambientales y el tejido colonizado, en las raíces, los tallos u otros órganos vegetales.

Se ha propuesto a la raíz como un punto principal de ingreso y colonización de microorganismos endófitos a las plantas. Lo anterior, debido a que, en una primera instancia, el ecosistema edáfico es una gran fuente de organismos que están en constante relación con las demás especies. Esto incluye a las plantas, las cuales pueden hacer contacto a través de grietas y poros de las raíces y heridas de los tejidos (Sørensen y Sessitsch, 2007). Un estudio realizado en *vitís vinífera* indica diferencias entre comunidades endofíticas de raíces y tallos en términos de composición y respuesta dinámica a la temperatura, donde taxas bacterianas se ven más afectadas en tallos que en raíces. Sin duda, esto sugiere que las raíces ofrecen un ambiente más estable y menos perturbado (Campisano *et al.*, 2017).

Schulz y Boyle (2006), propusieron que micorrizas y los hongos endófitos pueden proteger a las plantas hospedantes contra el ataque de fitopatógenos o pueden generar algún tipo de resistencia a factores estresantes. Como se vio anteriormente, diversos estudios comprueban y aluden a dar más importancia a los endófitos, no solo en beneficio de las

plantas, sino también, para el ser humano en la búsqueda de medicinas, entre otros factores positivos.

La producción de compuestos bioactivos por endófitos, especialmente aquellos exclusivos de sus plantas hospedantes, no solo son importantes desde una perspectiva ecológica, sino también desde un punto de vista bioquímico y molecular (Sánchez *et al.*, 2013).

La evidencia indica que con el cambio en el uso de productos químicos sintéticos al uso de bacterias en el suelo, el mundo está en el borde de un importante cambio de paradigma agrícola (Glick, 2014). La investigación en profundidad de los endófitos junto a nuevos descubrimientos, podría marcar un antes y un después en la historia de la ecología, agricultura y medicina. Un ejemplo puntual, es el descubrimiento del taxol o paclitaxel en relación con el estudio del área de la medicina y la industria farmacéutica, en el que, a partir de la corteza de *Taxus brevifolia*, se extrajo este metabolito que posee una gran actividad citotóxica y antileucémica (Centellesa e Imperial, 2010).

## CONCLUSIÓN

Los hongos endofíticos tienen una amplia aplicación en diferentes campos y, asimismo, producen una variedad de compuestos bioactivos. Muchos metabolitos secundarios tienen la capacidad de actuar como agente de biocontrol y como componentes químicos en el área agrícola y farmacéutica, por ejemplo, biofertilizantes y bioplaguicidas, anticancerígenos, antioxidantes, biorremediación, etc.

La mayoría de los expertos estudian las plantas como si fuesen un individuo. No cabe duda de que éstas son el núcleo de toda una comunidad, un completo ecosistema, lo que obliga a cambiar la perspectiva de las investigaciones en relación a integrar a las comunidades de microorganismos en el contexto vegetal. No se trata de la interpretación funcional de un único organismo –la planta- sino de una interpretación funcional comunitaria e integrada, algo que las futuras investigaciones deberían explorar.

Las plantas silvestres sobreviven bajo estrés biótico y abiótico, lo que, a grandes rasgos, genera adaptaciones al hábitat. Esto ocurre por la existencia de microorganismos endófitos que ayudan a la planta en su desarrollo en varias funciones: promotor de crecimiento, soportar las temperaturas extremas y sobrevivir al ataque variado de fitopatógenos o herbívoros. De este modo, se puede describir la manera en que logra desarrollarse *Malesherbia auristipulata*

en las condiciones de la región y sobrevivir en las adversidades ambientales. Incluso, se podría dar la oportunidad a nuevos estudios que aludan al tema de *M. auristipulata*. Los estudios realizados en diferentes plantas, comprueban la gran diversidad de microorganismos endófitos colonizando raíces, en comparación con el resto de la planta, esto es un indicio de cómo se está desarrollando la relación endófito-planta en el caso de *Malesherbia auristipulata*, es decir, que es en la raíz de *M. auristipulata* donde se ubica la mayor concentración de microorganismos endófitos, ayudándole en el crecimiento y desarrollo en un suelo inhóspito.

Este enfoque conduce a desarrollar tecnologías y estrategias de control sostenibles como métodos ambientales, los cuales ayudan a la conservación de especies y, desde luego, observar de otra forma aquellas plantas que, a nivel mundial, se encuentran en peligro de extinción. La idea ya no solo se fundamenta en mantener la riqueza cultural de una zona o país o proteger la pérdida de organismos, si no, consiste en asegurar una fuente de material genético que posiblemente será de utilidad en futuras investigaciones. Por tanto, a futuro se deben desarrollar estrategias que permitan dar a conocer a *Malesherbia auristipulata*, a los endófitos y la importancia que ambos tienen a la población en general. Un proceso, logrado a través de charlas educativas a jóvenes, adultos y agricultores, congresos regionales y nacionales, investigaciones, talleres y simposios que permitan visibilizar el rol que cumple *M. auristipulata*, las plantas en general y estos “pequeños animálculos” llamados endófitos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, S., Basukriadi, A., Pawiroharsono, S. & Sjamsuridzal, W. (2015). Insecticidal activity of ethyl acetate extracts from culture filtrates of mangrove fungal endophytes. *Mycobiology*, 43: 137 - 149.
- Aguilar, A., & Barea, J. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6: 457 - 464.
- Alban, J. (1998). Etnobotánica y conservación en la comunidad andina de Pamparomás Huaylas. Ancash, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol Biochem*, 80: 160 - 7.
- Álvarez, M. (1990). Inventos y descubrimientos más famosos. Panamá: América S.A.
- Arnold, A., & Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88: 541 - 549.
- Arnold, A., Mejia, L., Kylo, D., Rojas, E., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26): 15649 - 15654.
- Atlas, R., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental* 4. Madrid: Pearson.
- Bacon, C. W. (1993). Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte - infected tall fescue. *Agricult. ecosyst. environ*, 44: 123 - 141.
- Bacon, C., Porter, J., Robbins, J., & Luttre, E. (1977). *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34: 576 - 581.
- Barea, J., & Azcón-Aguilar, C. (1982). La Rizosfera: Interacciones microbio-planta. *Anales de Edafología y Agrobiología XII*, 41: 1517-1532.
- Barrales, H., & De la Rosa, R. (2014). Uso de hongos endófitos en la producción del fármaco anti-cáncer Taxol. *Bioteconología Vegetal*, 14(1): 3 - 13.

- Barraquio, W., Revilla, L., & Ladha, J. K. (1997). Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil*, 194: 15 - 24.
- Bayman, P., & Tupac, J. (2006). Microbial Endophytes of *Orchid* Roots. En B. Schulz, C. Boyle, & T. Sieber , *Microbial Root Endophytes*, 9: 153 - 178. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Bayman, P., Angulo Sandoval, P., Baez Ortiz, Z., & Lodge, D. J. (1998). Distribution and Dispersal of *Xylaria* endophytes in Two Tree Species in Puerto Rico. *Mycological Research*, 102: 944 - 948.
- Bayman, P., Mosquera Espinosa, A. T., & Porrás Alfaro, A. (2011). Mycorrhizal relationships of *vanilla* and prospects for biocontrol of root rots. En D. Havkin Frenkeland, & F. Belanger , *Handbook of vanilla science and technology*, 266 - 280. Reino Unido: Blackwell Publishing.
- Beltrán, H., Roque, J., & Cáceres, C. (Agosto de 2018). Sinopsis del género *Malesherbia* (Passifloraceae) en el Perú. *Revista Peruana de biología*, 25(3): 229 - 240.
- Benoit, I. L. (1989). Libro Rojo De La Flora Terrestre De Chile (primera parte) . Santiago: CONAF.
- Bischoff, J., & White, J. (2005). Evolutionary development of the Clavicipitaceae. En J. Dighton, J. White, & P. Oudemans, *The fungal community: Its organization and role in the ecosystem*, 505 – 551. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis.
- Bowen, G., & Rovira, A. (1999). The Rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron*, 66: 1 - 102.
- Brewer, R. (1979). Types of interactions. *Principles of ecology*. Philadelphia: W.B. Saunders company.
- Bull, K. (2020). The genus *Malesherbia* Ruiz & Pav. (Passifloraceae) in Chile. *Phytotaxa*, 468(1): 1 - 44.
- Campisano, A., Albanese, D., Yousaf, S., Pancher, M., Donati, C., & Pertot, I. (2017). Temperature drives the assembly of endophytic communities' seasonal succession. *Environmental microbiology*, 19(8): 3353 - 3364.
- Campos, I. (2003). *Saneamiento ambiental* (1 ed.). San José, Costa Rica: AUNED.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), 1 - 62.

- Carroll, G. C. (1986). The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. En N. J. Fokkema, & J. Van den heuvel, *Microbiology of phyllosphere*, 205 - 222. London: Cambridge University Press.
- Castañeda, R. (2011). Valor de uso de las plantas silvestres en Pamparomás, Ancash. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Centellesa, J., & Imperial, S. (2010). Paclitaxel. Descubrimiento, propiedades y uso clínico. *Ámbito Farmacéutico*, 29(4): 68 - 75.
- Chen, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguez Kibana, R., & Kloepper, J. W. (1995). Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control: Theory and Applications in Pest Management*, 5: 83 - 91.
- Chwedorzewska, K. (2009). Terrestrial Antarctic ecosystems in the changing world: an overview. *Polish Polar Research*, 30: 263 - 276. doi:doi: 10.4202/ppres.2009.13
- Clay, K. (1988). Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, 69: 10 – 16.
- Clay, K., & Schardl, C. L. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, 160: 99 – 127.
- Cocking, E. C. (2003). Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil*, 252: 169 – 75.
- Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual review of microbiology*, 61: 401 - 415.
- De la Cruz, M., Zamudio, M., Corona, A., González, J., & Rojas, R. (ene./abr. de 2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(4): 99 - 115.
- Dillon, M., & Rundel, P. (1990). The Botanical Response of the Atacama and Peruvian Desert Floras to the 1982-83 El Niño Event. En P. Glynn, *Global Ecological Consequences of the 1982–83 El Niño—Southern Oscillation*, 52: 487 - 504. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Oceanography Series.
- Doty, S. L., Oakley, B., Xin, G., Kang, J. W., Singleton, G., Khan, Z., Staley, J. T. (2009). Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. *Symbiosis*, 47: 23 – 33.

- Erazo, S., Negrete, R., Zaldúa, M., Backhouse, N., Belmonte, E., Rojas, O., Delporte, C. (2006). Active metabolites and biological from *Malesherbia auristipulata*. Santiago: Universidad de Chile.
- Eyberger, A., Dondapati, R., & Porter, J. (2006). Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of Natural Products (Lloydia)*, 69: 1121 - 1124.
- Faeth, S., & Sullivan, T. (2003). Mutualistic, asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *American Naturalist*, 161: 310 – 325.
- Faeth, S., Gardner, D., Hayes, C., Jani, A., Wittlinger, S., & Jones, T. (2006). Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 307 – 324.
- Firáková, S., Šturdíková, M., & Múčková, M. (2007). Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia*, 62: 251 - 257.
- Freeman, E. (1904). The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 196: 1 - 27.
- Gamboa, M. (2006). Hongos endófitos tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 11: 3 - 20.
- Gamboa, M., Laureano, S., & Bayman, P. (2003). Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? *Mycopathologia*, 156(1): 41 - 45. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1021362217723>
- Gardner, W., Barber, D., & Parbery, D. (1983). Non-infecting rhizosphere microorganisms and the mineral nutrition of temperate cereals. *Journal of Plant Nutrition*, 6(2): 185 - 199.
- Gay, C. (1846). *Historia física y política de Chile. Botánica (Vol. Tomo 2)*. Chile: Fain y Thun.
- Gengler-Nowak, K. (Jan-Mar. de 2002). Reconstruction of the Biogeographical History of Malesherbiaceae. *Botanical Review*, 68(1 ): 171 - 188. Recuperado el 2019
- Geris, R., Rodrigues, E., Simas, M., & Caldas, W. (2003). Endophytic fungi from *Melia azedarach*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 767 – 770.
- Glick, B. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169: 30 - 39.

- Goodman, R., Kiraly, Z., & Wood, R. (1968). *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. Columbia USA: University of Missouri Press.
- Granér, G., Persson, P., Meijer, J., & Alström, S. (2003). A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiology Letters*, 224: 269 - 276.
- Guerin , M. P. (1898). Sur la presencia d'un champignon dans l'ivraie. *J. Botanique*, 230 - 238.
- Guerin, M. (1898). Structure particuliere du fruit de quelques graminees. *Botanique*, 365 - 374.
- Guerrero, R., & Berlanga, M. (2009). La Evolución y la Microbiología: Darwin y la enorme diversidad microbiana. *Ambiociencias - revista de divulgación científica*, 100 - 108.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W., & Kloepper, J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 895 – 914.
- Hamayun, M., Khan, S., Ahmad, N., Tang, D., Kang, S., Na, C., Lee, I. (2009). *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth- promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. *World J Microbiol Biotechnol.*, 25: 627 - 632.
- Hergholi, N., Javan, M., Ghosta, Y., Campisano, A., & Pancher, M. (2013). First report of new endophytic fungi in grapevine trees (*Vitis vinifera* L) in west Azerbaijan province. 1th Iranian mycological Congress, 43. Rasht, Irán: University of Guilan.
- Hernández, R., Rojas, D., Contreras, M., Orozco, M., Macías, L., Reyes, H., . . . Santoyo, G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, 81: 83 - 92.
- Hilje, L. (1984). Simbiosis: Consideraciones terminológicas y evolutivas. *Uniciencia (EUNA)*, 1(1): 57-60.
- Hinton, D., & Bacon, C. (1995). *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, 129: 117 – 125.
- Huang, J. (1991). Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annual Review of Phythopatology*, 24: 141-157.

- Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z., & SU, W. (2001). Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 31(2): 163-167.
- Hurek, T., Reinhold, B., Van Montagu, M., & Kellenberger, E. (1994). Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. *Journal of bacteriology*, 176(7): 1913-1923.
- Ingraham, J., & Ingraham, C. (1998). *Introducción a la microbiología* (Vol. 2). Barcelona: Reverté.
- Intendencia región de Arica y Parinacota. (2019). *Cuenta publica participativa 2019*. Arica y Parinacota: Gobierno de Chile.
- Johnson, M. C., Dahlman, D. L., Siegel, M. R., Bush, L. P., Latch, G. M., Potter, D. A., & Varney, D. R. (1985). Insect feeding deterrents in endophyte-infected tall fescue. *Appl Environ Microbiol*, 49: 568 - 571.
- Kirk, P., Cannon, P., David, J., & Stalpers, J. (2001). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. Oxon, UK,: CAB International.
- Kloepper, J., Schooners, B., & Baker, P. (1992). Proposed elimination of the term Endorhizosphere. *Phytopathology*. Obtenido de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9300728>
- Kobayashi, D. Y., & Palumbo, J. D. (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon CW, White JF *Microbial endophytes*, 199 - 236.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chem. & Biol.*, 19: 792 - 798.
- Kusari, S., Verma, V. C., Lamshöft, M., & Spiteller, M. (2012). An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1287 - 1294.
- Larran, S., Perelló, A., Simo, M., & Moreno, V. (2002). Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World J Microbiol Biotechnol*, 18: 683 - 686.
- Lu, H., Xou, W., Meng, J., Hu, J., & Tan, R. (2000). New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia*. *annua. Plant Sci.*, 151: 67 - 73.

- Lv, Y., Zhang, Y., Chen, Y., Cui, J., Xing, Y., Li, X., & Guo, S. (2010). Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with the Alpine Plant *Saussurea involucre*. *Biol Pharm Bull.*, 33: 1300 - 1306.
- Ma, Y., Prasad, M. N., Rajkumar, m., & Freitas, H. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol Adv.*, 29: 248 - 258.
- Macculley, M. (2002). Niches for bacterium endophytes In crop plants: A plant Biologists view. *Functional Plant Biology*, 28(9): 983 - 990.
- Marquez-Santacruz, H. A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M. C., Velazquez-Sepulveda, I., & Santoyo, G. (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*, 9: 2372 - 2380.
- Martínez , M. (1991). La etnobotánica en Latinoamérica. Memorias III Simposio Colombiano de Etnobotánica (págs. 1-14 ). Cali: INCIVA.
- Martínez Absalón, S., Rojas Solís, D., Hernández León, R., Prieto Barajas, C., Orozco Mosqueda, M. d., Peña Cabriales, J. J., Santoyo, G. (2014). Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology*, 24: 1349 - 1362.
- Martínez, E., & Martínez, J. (2004). *Microbios en línea*. México: centro investigación sobre fijación de nitrógeno.
- McMullen, C. K. (1999). *Flowering plants of the Galápagos*. Ithaca: Cornell University press.
- Ministerio del Medio Ambiente. (2019). 16º Proceso de Clasificación de Especies. Acta sesión nº 07, 1 - 21. Santiago, Chile.
- Misaghi, I. J., & Donndelinger, C. R. (1990). Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 80: 808 - 811.
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). Los microorganismos: Pequeños gigantes. *Elementos: Ciencia y cultura*, 17( 77): 15-23.
- Montealegre, J. (1991). *Microbiología Manual De Laboratorio*. Santiago: Universidad de Chile.
- Muñoz, M., Pinto, R., Mesa, A., & Moreira, A. (2001). "Oasis de neblina" en los cerros costeros del sur de Iquique, región de Tarapacá Chile, durante

- el evento El Niño 1997-1998. *Revista Chilena de Historia Natural*, 74(2): 389 - 405.
- Novak, S. (1998). Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas sp.* strain PsJN). *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 528 - 536.
- Ordóñez C, N., Tupac Otero, J., & Díez G, M. C. (2012). Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta agronómica*, 61(3): 282 - 290.
- Page, M., Landry, N., Boissinot, M., Halie, M. C., Harvey, H., & Gagne, M. (1999). Bacterial mass production of taxanes and paclitaxel. US Patent No. WO, 99, 32651.
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P., Oliveira, C., Yousaf, S., Pertot, I., & Campisano, A. (2012). Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to Crop Management. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12): 4308 – 4317.
- Perez, A., Rojas, J., & Fuentes, J. (2010). Diversidad de Bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bathriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre. *Acta Biol.*, 15: 219 - 228. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/download/12553/28173>
- Petrini, O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. En J. H. Andrews, & S. S. Hirano (Edits.), *Microbial Ecology of Leaves*, 179 - 197. New York: Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience.
- Philippi, R. A. (1860). Viage al desierto de atacama. Librería de Eduardo Anton, 236.
- Philippi, R. A. (1865). Descripción de algunas plantas de la provincia de Atacama . *Anales de la Universidad de Chile*, 27: 339–351.
- Philippi, R. A. (1891). *Catalogus plantarum in itinere tarapacano lectarum*. *Anales del Museo Nacional de Chile. Botánica*, 2: 1 - 98.
- Piñeiro, D., Martín, M. E., Guerra, N., Salinas, M., & González, V. M. (2007). Calpain inhibition stimulates caspase- dependent apoptosis induced by Taxol in NIH3T3 cells. *Experimental cell Research*, 313: 369 - 379.
- Ramadan, M., Abdelhafez, A., Hassan, E., & Saber, F. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria and their potential for biocontrol of

- phytopathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 10 (15): 486 - 504. doi:10.5897/AJMR2015.7714.
- Ricardi, M. (1965). Estudios en Malesherbiaceae II. *Gayana Botanica*, 12: 3-10.
- Ricardi, M. (1967). Revisión taxonómica de las Malesherbiáceas. *Gayana Botanica*, 16: 3 - 139.
- Rodrigues, K., & Petrini, O. (1997). Biodiversity of Endophytic Fungi in Tropical Regions. En K. Hyde, *Biodiversity of Tropical Microfungi*, 57 - 69. Hong Kong, China: Hong Kong University Press.
- Rodrigues, K., & Samuels, G. (1990). Preliminary Study of Endophytic Fungi in a Tropical palm. *Mycological Research*, 94(6): 827 - 830.
- Rodríguez, J., White, F., Arnold, A., & Redman, R. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *The new phytologist, Tansley review*, 182(2): 314 - 330. doi:doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.
- Rodríguez, R., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Redman, R. S. (2008). Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *International Society of Microbial Ecology*, 2: 404 – 416.
- Rodríguez, R. & Marticorena A. (2019). Catálogo de las plantas vasculares de Chile. Editorial Universidad de Concepción, Chile.
- Rosa, L. H., Vieira, M., Cota, B. B., Johann, S., Alves, T., Zani, C. L., & Rosa, C. A. (2011). Endophytic Fungi of Tropical Forests: A Promising Source of Bioactive Prototype Molecules for the Treatment of Neglected Diseases. En C. Rundfeldt, *Drug development a case study based insight into modern strategies*, 469 - 486. Rijeka, Croatia: InTech.
- Rubalcava, M., Hernández, B., Oropeza, F., Duarte, G., González, M., Glenn, A., Anaya, A. (2010). Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *J. Chem. eco.*, 36: 1122 - 1131.
- Saikkonen, K., Helander, M., Faeth, S. H., Schulthess, F., & Wilson, D. (1999). Endophyte-grass-herbivore interactions: the case of *Neotyphodium* endophytes in Arizona fescue populations. *Oecologia*, 121: 411 – 420.
- Saikkonen, K., Ion, D., & Gyllenberg, M. (2002). The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269: 1397 – 1403.

- Sánchez, J. (2007). Interacciones microbianas importancia en el suelo y la agricultura. Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Sánchez, R., Sánchez, B., Sandoval, M., Ulloa, A., Armendáriz, B., García, M., & Macías, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2): 132 - 146.
- Santoyo, G., Moreno Hagelsieb, G., Orozco Mosqueda, M. C., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183: 92 - 99.
- Schardl, C. (2001). *Epichloe festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. *Fungal Genet Biol.*, 33: 69 - 82.
- Schardl, C., Leuchtmann, A., & Spiering, M. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 315 - 340.
- Schulz, B. (2006). Mutualistic interactions with fungal root endophytes. En B. Schulz, C. Boyle, & T. Sieber, *Microbial root endophytes*, 9: 261 - 279. Springer.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109: 661 - 686 .
- Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are Endophytes? En B. Schulz, C. Boyle, & T. Sieber, *Microbial Root Endophytes*, 9: 1 - 13. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A., & Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(9): 996 - 1004.
- Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S., & Aust, H. J. (1993). Endophytes from herbaceous plants and shrubs: Effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 97(12): 1447 - 1450.
- Selim, K., El-Beih, A., AbdEl Rahman, T., & El Diwany, A. (2012). Biology of endophytic fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 3: 31 - 82.
- Selosse, M., & Schardl, C. (2007). Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytol*, 173: 452 - 458.

- Selosse, M., Vohník, M., & Chauvet, E. (2008). Out of the rivers: are some aquatic hyphomycetes plant endophytes? *New Phytologist*, 178: 3 – 7.
- Sessitsch, A., & Clément, C. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 669 - 678.
- Shi, Y., Zhang, X., & Lou, K. (2013). Isolation, characterization, and insecticidal activity of an endophyte of drunken horse grass, *Achnatherum inebrians*. *Journal of Insect Science*, 13: 151. doi:<https://doi.org/10.1673/031.013.15101>
- Siegel, M., Latch, G., & Johnson, M. (1987). Fungal endophytes of grasses. *Annual rev. Phytopathology*, 25: 193 - 315.
- Singh, S., Strobel, G., Knighton, B., Geary, B., Sears, J., & Ezra, D. (2011). An endophytic *Phomopsis* sp. possessing bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds. *Microbial Ecology*, 61: 729 - 739.
- Soleimani, M., Afyuni, M., Hajabbasi, M., Nourbaksh, F., Sabzalian, M., & Christensen, J. (2010). Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non infected grasses. *Chemosphere*, 81: 1084 - 1090.
- Sørensen, J., & Sessitsch, A. (2007). Plant-associated bacteria - Lifestyle and molecular interactions. En J. D. van Elsas, J. T. Trevors, & J. K. Jans, *Modern soil microbiology*, 211 - 236. Boca Ratón, Florida, USA: CRC Press.
- SRK Consulting. (2009). Estudio de impacto ambiental exploración minera Catanave. Obtenido de [http://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/123456789/7013/MMA-HUM2\\_0027.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/123456789/7013/MMA-HUM2_0027.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Staniek, A., Woerdenbag, H. J., & Kayser, O. (2008). Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *J. Plant interact*, 3: 75 - 93.
- Stierle, A., Strobel, G. A., & Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260: 214 - 216.
- Stone, J., Polishook, J., & White, J. (2004). Endophytic fungi. En: G.M. Muelle. En G. Muelle, G. Bilis, & M. Foster, *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*, 241 - 270. EE.UU: Elsevier Academic Press.

- Stone, K., Bacon, C., & White, J. (2000). An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. En C. Bacon, & J. Withe, *Microbial endophytes*, 3. New York: Marcel Dekker.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 67: 491 - 502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products (Lloydia)*, 67: 257 - 268.
- Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. S., & Hess, W. M. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiol. Microbiology*, 142: 435 - 440.
- Sturz, A., & Nowak, J. (2000). Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Appl Soil Ecol.*, 15: 183 - 190.
- Suja, M., Vasuki, S., & Sajitha, N. (2014). Anticancer activity of compounds isolated from marine endophytic fungus *Aspergillus terreus*. *World J Pharm Pharm Sci.*, 3: 661 - 672.
- Tadych, M., Bergen, M., Dugan, F. M., & White, J. F. (2007). Evaluation of the potential role of water in the spread of conidia of the *Neotyphodium* endophyte of *Poa ampla*. *Mycological Research*, 111: 466 – 472.
- Tayung, K., Barik, B. P., Jha, D. K., & Deka, D. C. (2011). Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. *Mycosphere*, 2: 203 - 213.
- Tomita, F. (2003). Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. *Fungal Diversity*, 14: 187 - 204.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a La Microbiología*. Buenos Aires: Panamericana.
- Turner, R., James, E., & Poole, P. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, 14: 209. doi:<https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>
- Vasiliauskas, R., Menkis, A., Finlay, R., & Stenlid, J. (2007). Wood-decay fungi in fine living roots of conifer seedlings. *New Phytologist*, 174: 441 – 446.
- Vega, M. A. (2012). Aspectos y avances en ciencia, tecnología e innovación. *Polis*, 11(33): 451-470.

- Verma, S., Ladha, J., & Tripathi, A. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.*, 91: 127 – 141.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., . . . Kogel, K. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Nat. Acade Sci*, 102(38): 13386-13391.
- Wani, M., Taylo, H., Wall, M., Coggon, P., & McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93: 2325 - 2327.
- Wille, P., Aeschbacher, R., & Boller, T. (1999). Distribution of fungal endophyte genotypes in doubly infected host grasses. *Plant Journal*, 18: 349 – 358.
- Zhang, H., Song, Y., & Tan, R. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep.*, 23: 753 - 771.
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and environmental microbiology*, 68: 2198 - 2208.
- Zuckerberg, C. (2001). Cartas al comite de redacción. *Medicina*, 61: 114-120.