

**DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA ENDÓFITA DE RAÍCES Y HOJAS DE
ORQUÍDEAS CULTIVADAS EN INVERNADEROS Y EVALUACIÓN DE SU
POTENCIAL BIOCONTROLADOR**

Marcelina Mendoza Salazar

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

Asesora

Pilar Ximena Lizarazo Medina MsC. DSc

**Universidad de Antioquia
Facultad Ciencias Exactas y Naturales
Instituto de Biología**

2013

DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA ENDÓFITA DE RAÍCES Y HOJAS DE ORQUÍDEAS CULTIVADAS EN INVERNADEROS Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL BIOCONTROLADOR

Marcelina Mendoza Salazar^{1,2}, Ana Isabel Gutiérrez G.², Pilar Ximena Lizarazo M.^{2,3}

¹Estudiante Instituto de Biología, Universidad de Antioquia.

²Grupo de Investigación en Ecología Microbiana y Bioprospección, Universidad de Antioquia.

³Profesora Instituto de Biología, Universidad de Antioquia

Correos electrónicos: ¹marcemendozasalazar@gmail.com, ²anaisaguti@gmail.com,

³pilarximenalizarazo.udea@gmail.com

RESUMEN

Los microorganismos endófitos crecen asintóticamente al interior de los tejidos. En este estudio se aislaron hongos endófitos de hojas y raíces de *Cattleya percivaliana* y de *Cattleya trianaei* cultivadas bajo condiciones de invernadero y se determinó su potencial biocontrolador y celulolítico. Se aislaron 323 hongos endófitos a partir de 4800 fragmentos de tejido; estos aislados fueron clasificados en 19 géneros, cinco de los cuales no pudieron ser identificados. Se observaron diferencias en el número de plantas colonizadas y en la diversidad de los endófitos a nivel de especie y tejido, siendo mayor en *C. trianaei* y a nivel de hoja. Se identificaron géneros que colonizaron exclusivamente algún tejido o ambos tejidos. Se registraron en hoja: *Nodulosporium*, *Chromelosporium*, *Gonatobotrys*, *Exophiala*, *Monilinia* y *Cladosporium*; mientras que *Curvularia*, *Gloeosporium* y los cinco morfotipos no identificados colonizaron solamente la raíz. Por último, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Colletotrichum*, *Botriotrychum* y *Trichoderma* crecieron en ambos tejidos. Los géneros más abundantes fueron *Fusarium* en raíz, y *Colletotrichum* y *Sclerotium* en hoja. La evaluación del potencial biocontrolador indicó que un aislado del género *Sclerotium* inhibió en más del 99% el crecimiento de fitopatógenos, como *Phytophthora cinnamomi* y *Colletotrichum* sp. La actividad celulolítica fue mayor en los hongos aislados de hoja sin embargo, la actividad no fue considerada alta de acuerdo con los estándares.

Palabras clave: endófito, orquídea, biocontrol, actividad celulolítica

ABSTRACT

Endophytic microorganisms grow asymptomatic within healthy plant tissues. In this study endophytic fungi were isolated from leaves and roots of *Cattleya percivaliana* and *C. trianaei* from greenhouses, in order to assess their potential as biocontrol agents and their cellulolytic activity. A total of 323 endophytic fungi were isolated from 4800 tissue fragments; these fungi isolates were classified into 19 genera, but five morphotypes could not be identified. Differences in the number of individual plants colonized by the endophytes were observed, as well as in their diversity by plant species and plant tissues, being higher in *C. trianaei* and in leaves. Endophytic genera that colonized only leaves included *Nodulosporium*, *Chromelosporium*, *Gonatobotrys*, *Exophiala*, *Monilinia*, and *Cladosporium*, while *Curvularia*, *Gloeosporium* and the five unidentified morphotypes only colonized roots. Finally, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Colletotrichum*, *Botriotrychum* and *Trichoderma* growth in both tissues. The most common genera were *Fusarium* in roots, and *Colletotrichum* and *Sclerotium* in leaves. In regard to the evaluation of the fungal biocontrol effect, an isolated of *Sclerotium* inhibited the growth of phytopathogens like *Phytophthora cinnamomi* and *Colletotrichum* sp., by over 99%. The cellulolytic activity was higher in fungi isolated from leaves, although this activity can not be considered as high, according to usual standards.

Key words: endophytic, orchid, biological control, cellulolytic activity

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las más diversas con aproximadamente 20.000-35.000 especies, de las cuales 10.849 están registradas en el trópico (Pridgeon 1996 y Tan *et al.* 2012). En Colombia se han reportado más de 3.500 especies y 1.745 se encuentran en la región andina, esta diversidad y la exuberancia de las flores han hecho que su cultivo y exportación sean de interés comercial y económico para el país (Angel *et al.* 2001 y Sarmiento y Betancur 2006). Dentro de los grupos con mayor valor comercial se encuentra el género *Cattleya* debido al tamaño de la flor, la forma y los atractivos colores, sin embargo, la recolecta masiva y la destrucción de su hábitat han hecho que sus especies estén en peligro de extinción (Angel *et al.* 2001).

Las interacciones planta-microorganismo se han definido de acuerdo a los beneficios o costos que le impliquen a la planta en su desarrollo y reproducción, de esta manera, si los costos son mayores la relación se considera negativa, como las de patogenicidad, o en caso contrario se denomina positiva (Newton *et al.* 2010). Entre las relaciones positivas más estudiadas se encuentra la que establecen las micorrizas con las orquídeas, las cuales promueven la germinación de las semillas, el desarrollo de las plántulas en estado juvenil y de protocormo, y facilitan la adaptación a diferentes condiciones ambientales (Chutima *et al.* 2011). Además de las micorrizas, al interior del tejido vegetal se pueden desarrollar hongos endófitos no micorrízicos (Schulz *et al.* 2006), los cuales se establecen en los espacios intercelulares, permaneciendo sin inducir síntomas o signos visibles y se diferencian de las micorrizas porque no forman pelotones al interior de las células vegetales (Wilson 1995, Schulz y Boyle 2005 y Hyde y Soitong 2008).

Los hongos endófitos han sido clasificados en dos grandes grupos: los clavicipitaceos, los cuales infectan algunas gramíneas, y los no clavicipitaceos que han sido aislados de la mayoría de linajes de plantas terrestres. Estos grupos se diferencian, entre otras características, por el tipo de transmisión, siendo mayormente vertical en el primero y horizontal en el segundo. Este criterio se ha relacionado con su diversidad en la planta, en el caso de los clavicipitaceos generalmente es un genotipo dominante el que coloniza una planta, mientras que en los no clavicipitaceos varias especies pueden estar infectado a su hospedero (Rodríguez *et al.* 2009).

La transmisión vertical hace referencia a la propagación mediante semillas que transfieren el endófito a la generación siguiente y la horizontal se produce mediante la dispersión de los simbiontes a través de vectores bióticos y abióticos (Gamboa 2006). En los estudios realizados sobre la distribución y diversidad de los hongos endófitos se ha determinado que las plantas albergan al menos una especie de estos endosimbiontes y que su riqueza e incidencia son mayores en el trópico (Arnold y Lutzoni 2007). Una de las evidencias acerca de la transmisión de estos hongos fue descrita por Arnold *et al.* (2003) quienes observaron en *Theobroma cacao* Linnaeus que la incidencia y la riqueza aumentan conforme a la edad como consecuencia de varios eventos de infección presentados a largo del tiempo, el estudio indicó que el porcentaje de infección incrementó con la edad de la hoja obteniendo valores del 82,2%, 95,6% y 100% en hojas jóvenes, maduras y viejas; este patrón se observó también en la riqueza, representada por 4,48, 6,23 y 8,69 morfotipos por hoja respectivamente.

La estructura de la comunidad de estos hongos depende del tipo de tejido colonizado, de tal manera que algunas de las especies muestran especificidad por cierto tejido como consecuencia de las diversas presiones selectivas que determinan las condiciones fisiológicas de la planta y consecuentemente el microhábitat de los endófitos. (Aly *et al.* 2011). Por ejemplo, Suryanarayanan y Vijaykrishna (2001) observaron que al comparar la composición de hongos endófitos en raíces y en hojas aéreas de *Ficus benghalensis* Linnaeus menos del 2% de las especies aisladas se compartían entre los dos tejidos.

Respecto a su función en la interacción con el hospedero, Arnold (2007), Sieber (2007) y Slippers *et al.* (2007) indicaron que la relación es de tipo mutualista disminuyendo la depredación de las plantas, favoreciendo la resistencia a condiciones de estrés y/o confiriéndoles protección contra microorganismos fitopatógenos y plagas. En la interacción *T. cacao-Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime y Phillips-Mora se demostró que la presencia del hongo endófito *Gliocladium catenulatum* Gilman y Abbott disminuye la incidencia de la escoba de bruja (Rubini *et al.* 2005). De forma similar *Nigrospora* sp. inhibe el desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., patógeno de *Solanum betaceum* Cavanilles (Delgado y Vásquez 2010). En *Zea mays* Linnaeus el endófito *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., ya reportado como entomopatógeno, provoca la muerte de larvas de *Ostrinia nubilalis* Hübner (Bing y Lewis 1992 y Vega *et al.* 2008). En ninguno de estos estudios se indican los mecanismos moleculares que desencadenan dichos efectos.

Los hongos endófitos también han sido reconocidos por la producción de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas, antiparasitarias y anticancerígenas, entre otras. Los más conocidos entre estos últimos son el paclitaxel, la vincristina y la camptotecina producidas por *Taxomyces andreanae* Strobel, Stierle, Stierle y Hess, *Fusarium oxysporum* Schltldl y *Entrophospora infrequens* (I.R. Hall) Ames y Schneid respectivamente (Aly *et al.* 2011). Además de su aplicación farmacéutica este grupo de hongos constituye una alternativa en la industria de los biocombustibles. Por ejemplo, *Chaetomium globosum* Kunze aislado de *Vitis vinifera* L. se reportó por su capacidad para hidrolizar sustratos que contienen celulosa (Longoni *et al.* 2012), al igual que *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling aislado de *Espeletia* spp. el cual puede ser empleado con el fin de aprovechar la biomasa celulósica contenida en los racimos vacíos de palma de aceite (Cabezas *et al.* 2012).

En orquídeas, los reportes de hongos endófitos se han hecho a partir de plantas establecidas en ambientes naturales, en su mayoría en el neotrópico. Algunos de los géneros que han sido objeto de estudio corresponden a *Lepanthes* (Bayman *et al.* 1997), *Bletilla* (Tao *et al.* 2012), *Ophrys*, *Anacamptis*, *Orchis*, *Serapias* (Gezgin y Eltem 2009), *Dendrobium* (Yuan *et al.* 2009 y Xing *et al.* 2011), *Pectelis* (Chutima *et al.* 2011), *Bulbophyllum*, *Vanda* (Sudheep y Sridhar 2012) y *Holcoglossum* (Tan *et al.* 2012); algunos de estos géneros con registros en Colombia. Entre los hongos endófitos reportados con mayor abundancia fueron *Aspergillus flavus* Link con un porcentaje de abundancia relativa mayor al 17% en *Bulbophyllum* y *Vanda*, *Guignardia* con una frecuencia relativa de ocurrencia en fragmentos superior al 7% en *Bletilla* y un 24,4% en *Dendrobium. nobile* Lindly. Al igual que estudios realizados en otras especies, diferentes a la familia Orchidaceae (Pimentel *et al.* 2006 y Wang *et al.* 2008), se reportó la presencia de hongos cosmopólitas como *Colletotrichum* en *Lepanthes* y *Fusarium* en *Bulbophyllum*, *Vanda*, *Ophrys*, *Anacamptis*, *Orchis*, *Serapias* y *Pectelis*; ambos géneros fueron aislados también de *Dendrobium*, *Holcoglossum* y *Bletilla*.

Al evaluar la diversidad y la tasa de colonización de hongos endófitos en orquídeas de acuerdo al tejido vegetal los resultados son contrastantes sin evidenciarse una tendencia. Bayman *et al.* (1997) observaron que las especies más frecuentes fueron las de *Xylaria* spp. y *Rhizoctonia* spp. encontrándose en el 29% de las raíces y en el 19% de las hojas, y en el 45% de las raíces y 31% de las hojas, respectivamente. Por el contrario, en *D. nobile*, Yuan *et al.* (2009) determinaron que la composición de especies varía de acuerdo al tejido estudiado observándose que *Trichoderma chlorosporum* Chavarrí y Samuels, *Clonostachys rosea* (Preuss) Mussat y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. colonizaron exclusivamente las raíces mientras *Guignardia mangiferae* A.J. Roy fue aislado únicamente del tejido foliar.

Estudios encaminados a establecer el papel de los endófitos de orquídeas indicaron que actúan como promotores de crecimiento, Chen *et al.* (2010) demostraron que plantas de *Dendrobium loddigesii* Rolfe inoculadas con *Fusarium* sp. presentaron mayor altura (84,5%) y peso seco (142,7%) respecto al control. La evaluación de la función de *C. rosea*, aislado de las raíces de *D. nobile*, indicó que mejora el vigor y la aclimatación de las plántulas micropropagadas (Yuan *et al.* 2009).

A partir de hongos endófitos de orquídeas también se han reportado aislados con potencial para producir sustancias antimicrobianas contra patógenos humanos, Xing *et al.* (2011) evaluaron dicho potencial en aislados fúngicos de dos especies de *Dendrobium*, los resultados indicaron que *Epicoccum nigrum* Link inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* Rosenbach, y *Phoma* sp. el de *Escherichia coli* Migula y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, superando la actividad de la ampicilina en todos los casos. De acuerdo con estos hallazgos los hongos endófitos son considerados nuevos blancos en la bioprospección de sustancias con actividad biológica por lo que su estudio ha aumentado en los últimos años.

Considerando la importancia que tiene el cultivo de orquídeas en Colombia para su mercado internacional y la necesidad del gremio de floricultores de implementar estrategias de control de patógenos más eficientes y sustentables como el uso de hongos endófitos, en este estudio se determinó la diversidad y la riqueza de la micobiota endófito, en hoja y raíz, en dos especies de orquídeas cultivadas en invernadero y adicionalmente se evaluó su potencial biocontrolador y enzimático como una aproximación al entendimiento de la función ecosistémica de esta comunidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las plantas fueron recolectadas durante el 2010 y 2011 en el invernadero Orquideas El Cerro, ubicado en el municipio de Fredonia (suroeste del departamento de Antioquia) el cual hace parte de los cultivos de los miembros de la Sociedad Colombiana de Orquideología SCO (tabla1).

Tabla 1. Localización geográfica y características climáticas del invernadero El Cerro. Fuente: Registros del cultivador.

Característica	2010	2011
Altitud (msnm)	1.920	
Temperatura promedio día (°C)	21	17
Temperatura promedio noche (°C)	14	15
Humedad relativa promedio	70%	65
Precipitación (mm)	3.800	2.800

Aislamiento de hongos endófitos

Se estudiaron dos especies de *Cattleya*, *C. percivaliana* y *C. trianaei*, a partir de las cuales se recolectaron 50 hojas y 50 raíces sanas (de mayor edad) por especie. De cada hoja y raíz sin velamen se tomó un fragmento de tejido que fue desinfectado superficialmente de forma individual en soluciones estériles de acuerdo con el protocolo establecido por Unterseher y Schnittler (2009) con algunas modificaciones. Para la desinfección los fragmentos se sumergieron en agua destilada estéril durante 30 s tres veces y posteriormente en una solución de etanol 70% durante 1 min, seguido por un lavado en hipoclorito de sodio (NaOCl) 1% durante 5 min y etanol 70% por 30 s. Finalmente, los fragmentos se enjuagaron en agua destilada estéril para eliminar el exceso de hipoclorito y etanol y se secaron con papel absorbente estéril. De cada fragmento se retiró la fracción de 3 mm de los bordes con el objetivo de eliminar las regiones que pudieron haber sufrido oxidación durante el proceso. Cada tejido de hoja y de raíz desinfectado se cortó en 34 fragmentos de 5 mm² y 5 mm, respectivamente, de los cuales 24 fueron inoculados en la superficie de PDA (agar papa dextrosa) en caja de Petri y 10 se emplearon para determinar la viabilidad tisular posterior a la desinfección. Los cultivos fueron incubados durante 15 días a temperatura ambiente realizando evaluaciones cada 24 h de la presencia o ausencia de colonias en el medio. Las colonias de hongos que se desarrollaron a partir de los fragmentos se transfirieron a un nuevo medio de cultivo para obtener cultivos axénicos.

Como control del proceso de desinfección se sembraron en PDA cinco alícuotas de 1 ml del agua destilada en la que se realizó el enjuague final de los fragmentos, ya que si el proceso de desinfección de la microbiota epífita es efectivo la última solución en la que se lavan los fragmentos debe estar estéril. Los cultivos fueron incubados por 15 días registrando diariamente el desarrollo de colonias.

Análisis de viabilidad de los fragmentos foliares

El estrés químico que se produce al someter los fragmentos a las soluciones desinfectantes puede ocasionar la muerte del tejido e impedir el desarrollo de los hongos endófitos, por esta razón se evaluó la viabilidad de los tejidos desinfectados mediante el test de tetrazolio. Este ensayo permite distinguir el tejido viable del no viable, debido a la reducción del cloruro de 2,3,5-

trifeniltetrazolio a 1,3,5-trifenilformazán en los tejidos metabólicamente activos, los cuales al finalizar la incubación se observan con un pigmento rojo.

Para evaluar la viabilidad de los tejidos se tomaron diez fragmentos de hoja y de raíz y se colocaron por separado en una solución de cloruro de tetrazolio 0,4% durante toda la noche. El control negativo se realizó con diez fragmentos que fueron sometidos a choque térmico, calentándolos en agua en ebullición por 1 min; como control positivo se emplearon diez fragmentos viables de cada tejido. Siguiendo el protocolo de Dixon (1996), con algunas modificaciones, a las 24 h se realizaron cortes para evaluar la ausencia o presencia de formazán en los fragmentos. El análisis también se realizó a los tejidos en los que no se observó desarrollo de micelio a los 15 días de incubación para garantizar que la ausencia de crecimiento no fue resultado de la muerte del tejido.

Identificación de los hongos endófitos

La identificación taxonómica de los hongos se realizó considerando los caracteres macroscópicos y microscópicos de las colonias. Las descripciones morfológicas se realizaron a los 10 días de cultivo en PDA y se establecieron características de apariencia, elevación, forma del borde, tamaño, color y pigmentación alrededor de la colonia y en el reverso del agar. La caracterización microscópica se realizó mediante la técnica de microcultivo en PDA, agar avena y agar V8. El microcultivo fue coloreado con azul de lactofenol y/o rojo fenol a los 15 días de incubación. La identificación taxonómica se realizó siguiendo las claves de Barnett y Hunter (1998).

Potencial biocontrolador de los endófitos

El potencial antagónico de los aislados endófitos se determinó contra 10 hongos fitopatógenos de orquídeas de los géneros *Botryotrichum* (2), *Colletotrichum* (2), *Sclerotium* (3), *Nigrospora* (1), *Phymatotrichum* (1) y *F. oxysporum* (1). Tanto los hongos endófitos como los fitopatógenos fueron mantenidos en cultivos axénicos en PDA a partir de los cuales se tomaron discos de micelio de 0,9 cm y fueron inoculados por enfrentamiento en cinco cajas de Petri con PDA. Como control de crecimiento cada hongo fue sembrado individualmente en PDA, los cultivos controles y los tratamientos se incubaron a temperatura ambiente.

Evaluación de la actividad antagónica del sobrenadante fúngico

Para la evaluación de la actividad antagónica del sobrenadante se sembraron cinco discos de micelio de 0,9 cm de diámetro en 200 ml de caldo de papa (200 g de papa por litro). A los 45 días de incubación a temperatura ambiente se separó el micelio del sobrenadante empleando gasa estéril. El sobrenadante se esterilizó mediante microfiltración usando filtros de nitrocelulosa Sartorius Stedim Biotech de 0,2 μm y se adicionó a 100 ml de una solución estéril de agar glucosa (agar 2% y glucosa 2%).

Para el ensayo se inocularon discos de 0,9 cm de diámetro de *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet, *Phytophthora cinnamomi* Rands, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* y *Sclerotium* sp. en agar glucosa suplementado con el sobrenadante del hongo endófito en una proporción de 2:3 y en agar glucosa como control de crecimiento de cada aislado. Los cultivos fueron incubados 15 días a temperatura ambiente y se realizaron mediciones diarias del diámetro de la colonia en ambas condiciones para establecer el porcentaje de inhibición micelial.

El efecto del sobrenadante en el crecimiento de cada fitopatógeno se analizó tres veces y cada ensayo constó de tres repeticiones por tratamiento.

Evaluación de la actividad celulolítica de los hongos endófitos

Para establecer la capacidad metabólica de los aislados endófitos en hidrolizar la celulosa, se sembraron discos de micelio de cada aislado en agar CMC (NaNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 0,5 g, KCl 0,5 g, sal de carboximetilcelulosa (CMC) 2 g, peptona 0,2 g y agar 20g por litro) (Kasana *et al.* 2008), los cultivos se incubaron a temperatura ambiente hasta obtener colonias de 3 cm de diámetro; tiempo en el que se evaluó la degradación de celulosa mediante la adición de lugol (I 0,66%, KI 1,33%) al medio. La formación de halos incoloros alrededor de las colonias indicó que el hongo presenta actividad celulolítica. Como control de la producción de celulasas se utilizó la cepa de referencia *Aspergillus niger*.

Análisis de los datos

La abundancia de cada género en cada tejido y especie se expresó mediante el cálculo del porcentaje de la frecuencia de colonización de cada género identificado.

$$\%FC = \frac{\text{Número de fragmentos positivos para el género}}{\text{número de fragmentos muestreados}} * 100$$

Los índices de Shannon y Simpson, la riqueza estimada y las curvas de acumulación de los géneros de los aislados endófitos se calcularon en EstimateS 9.0 y para el análisis de cada resultado se consideró principalmente la especie vegetal hospedera, el tejido y los géneros identificados en cada una de estas.

Las diferencias entre la diversidad de los hongos endófitos de hojas y raíces en ambas especies fueron estadísticamente comparadas con el test U de Mann-Whitney utilizando el software IBM SPSS 20.

Para describir la similitud de la microbiota endófitas entre tejidos y especies se empleó el índice de Jaccard.

$$IJ = \frac{a}{(a + b + c)}$$

Donde *a* representa el número de géneros en ambas muestras, *b* y *c* los restringidos a la muestra 1 y a la muestra 2 respectivamente.

El análisis del potencial biocontrolador de los hongos endófitos se realizó calculando el porcentaje de inhibición micelial con la fórmula:

$$\%IM = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde *R1* es el crecimiento micelial en enfrentamiento y *R2* el crecimiento micelial individual (control de crecimiento).

Este porcentaje se analizó mediante una escala de valoración cualitativa dada por los porcentajes obtenidos. De acuerdo con los valores calculados de %IM se hizo una evaluación del efecto del hongo endófito sobre el fitopatógeno, considerando los siguientes estimativos: Negativo: ausencia de zona de inhibición o con un porcentaje menor de 10% y crecimiento de forma similar al control; Baja: ausencia de zona de inhibición o con un porcentaje entre 10-39% y con disminución en la colonia fúngica. Media: ausencia de zona de inhibición o un porcentaje entre 40-69% y con disminución del tamaño de la colonia, y Positiva: presencia de zona de inhibición definida o en un porcentaje entre 70-100% (Corrales *et al.* 2010).

RESULTADOS

Riqueza y diversidad de la microbiota endófito

Se obtuvieron aislados fúngicos a partir de los tejidos foliares y radiculares de las dos especies de *Cattleya* cultivadas en condiciones de invernadero. El protocolo de desinfección, propuesto en este estudio, para eliminar la microbiota epífita fue efectivo y no se observó crecimiento de microorganismos en el control de esterilidad. La prueba de tetrazolio indicó que la desinfección no afectó la viabilidad ningún fragmento vegetal, tanto en los evaluados posterior al proceso, como en los que no se observó crecimiento a los 15 días de incubación.

Se evaluaron 1.200 fragmentos de hoja y la misma cantidad de raíz, por especie, a partir de 50 plantas de *C. trianaei* y 50 de *C. percivaliana*. El desarrollo de hongos endófitos en los fragmentos se evidenció después de ocho días de incubación. La presencia de la microbiota varió de acuerdo al tejido y a la especie vegetal, siendo mayor la cantidad de fragmentos positivos en raíz que en hoja y mayor en *C. trianaei* que en *C. percivaliana*. La totalidad de fragmentos positivos fue 6,7%, a partir de los que se obtuvieron 323 aislados fúngicos correspondientes a 19 géneros.

En *C. trianaei*, 23 plantas fueron colonizadas, lo que correspondió al 46% de las muestras; de estas, 5 plantas fueron positivas simultáneamente en los dos tejidos evaluados. Se obtuvieron 276 fragmentos positivos (36 foliares y 240 radiculares), colonizados por 17 géneros. En las muestras de *C. percivaliana* el porcentaje de plantas positivas fue inferior, 32% (16 plantas), y solamente en una se reportó crecimiento tanto en hoja como en raíz. Se registraron 47 fragmentos positivos (13 foliares y 34 radiculares), colonizados por 9 géneros (tabla 2, figura 1).

El análisis de colonización de acuerdo al tejido indicó que en las dos especies se presentaron plantas con endófitos únicamente a nivel foliar, radicular o en ambos tejidos; en *C. trianaei* se registraron 7 (30,4%), 11 (47,8%) y 5 (21,7%) plantas respectivamente, mientras que en *C. percivaliana* estos valores fueron mayores para hoja y raíz, 5 (31,2%) y 10 (62,5%), y solamente en una planta se observó la presencia de endófitos en los dos tejidos (6,3%) (figura 2).

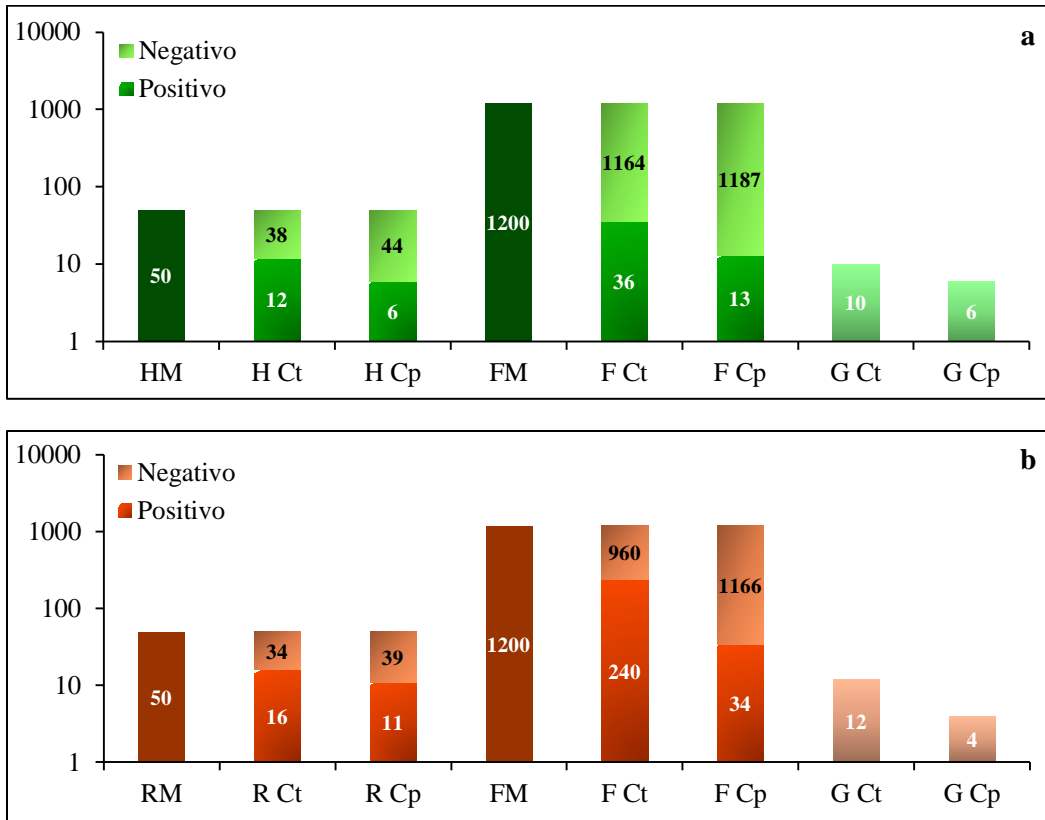


Figura 1. Aislamientos de hongos endófitos en hoja (a) y raíz (b) de *C. trianaei* (Ct) y *C. percivaliana* (Cp). HM: total hojas muestreadas, FM: total fragmentos muestreados, G: número de géneros identificados, RM: total raíces muestreadas.

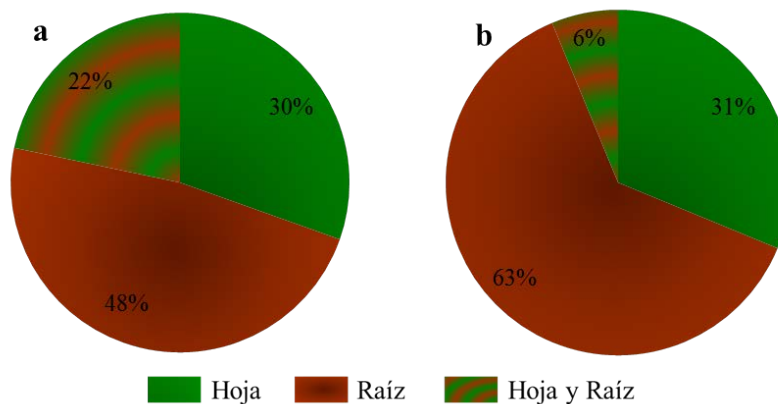


Figura 2. Porcentaje de plantas positivas por tejido en *C. trianaei* (a) y *C. percivaliana* (b).

Los hongos endófitos aislados fueron clasificados en 19 géneros y cinco de estos se denominaron mf1, mf2, mf3, mf4 y mf5, ya que no presentaron estructuras que permitieran la identificación. De acuerdo a las observaciones microscópicas mf1 podría corresponder a *Epicoccum*, sin

embargo sus características macroscópicas son muy similares a las de *Pythium*; en mf2 se observaron gránulos phaeoides por lo que podría ser clasificado como *Botryotrichum*, *Humicola* o *Phymatotrichum*; mf3 fue similar a *Phialophora* o *Chloridium*, y de mf5 no se observaron estructuras características que permitieran la aproximación a algún género (tabla 2).

Tabla 2. Abundancia de hongos endófitos en *C. trianaei* y de *C. percivaliana*.

Género	<i>C. trianaei</i>				<i>C. percivaliana</i>				Total
	Hoja		Raíz		Hoja		Raíz		
	Plantas	Fragmentos	Plantas	Fragmentos	Plantas	Fragmentos	Plantas	Fragmentos	
<i>Aureobasidium</i>	2	3	1	8	0	0	0	0	11
<i>Botryotrichum</i>	2	4	2	4	1	1	0	0	9
<i>Chromelosporium</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>Cladosporium</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1
<i>Colletotrichum</i>	4	8	3	11	3	6	0	0	25
<i>Curvularia</i>	0	0	2	4	0	0	0	0	4
<i>Exophiala</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Fusarium</i>	2	4	11	166	0	0	8	27	197
<i>Gloeosporium</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1
<i>Gonatobotrys</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1
mf1	0	0	1	5	0	0	0	0	5
mf2	0	0	2	9	0	0	1	2	11
mf3	0	0	1	1	0	0	0	0	1
mf4	0	0	1	5	0	0	0	0	5
mf5	0	0	0	0	0	0	1	2	2
<i>Monilinia</i>	1	2	0	0	1	1	0	0	3
<i>Nodulosporium</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Sclerotium</i>	6	10	6	23	1	3	1	3	39
<i>Trichoderma</i>	0	0	1	3	1	1	0	0	4
Total	22	36	32	240	8	13	11	34	323

En las plantas de *C. trianaei* se identificaron 17 géneros, de los cuales se reportaron 10 en hoja y 12 en raíz. Los géneros aislados exclusivamente de las hojas de *C. trianaei* fueron *Exophiala*, *Chromelosporium*, *Gonatobotrys*, *Monilinia* y *Nodulosporium*, mientras que en raíz fueron *Curvularia*, *Gloeosporium*, mf1, mf2, mf3, mf4, y *Trichoderma*. Los hongos que se registraron en los dos tejidos correspondieron a *Aureobasidium*, *Botryotrichum*, *Colletotrichum*, *Fusarium* y *Sclerotium*. En *C. percivaliana* se aislaron 9 géneros, de los cuales se reportaron 6 en hoja y 4 en raíz. Los géneros aislados exclusivamente en las hojas de *C. percivaliana* fueron *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Monilinia* y *Trichoderma*, mientras que en raíz se identificaron *Fusarium*, mf2 y mf5, y en los dos tejidos se registró *Sclerotium* (figura 3).

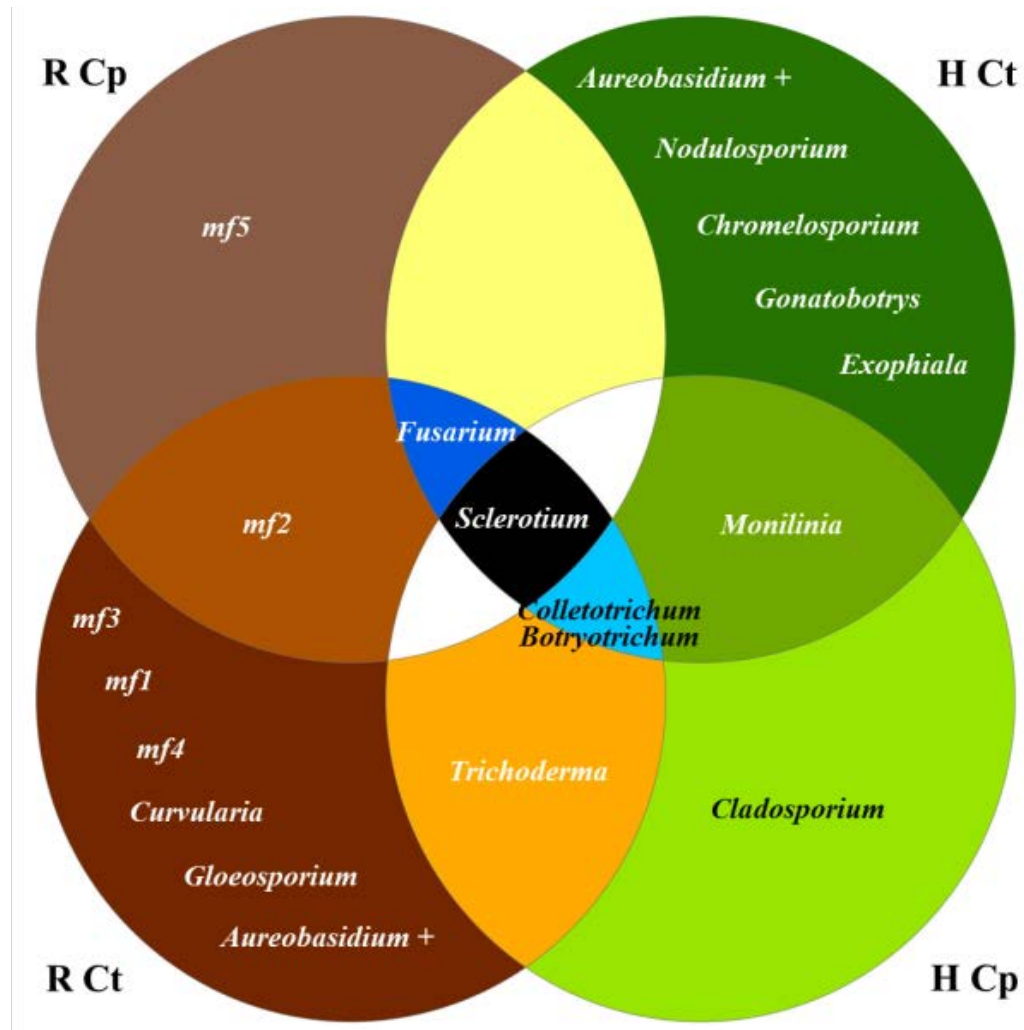


Figura 3. Diagrama indicando los géneros aislados de hoja (H) y raíz (R) de *C. trianaei* (Ct) y *C. percivaliana* (Cp).

La riqueza observada en las dos especies vegetales en cada tejido fue similar a la estimada (Chao1) excepto en la hoja de *C. percivaliana*, a pesar de no haberse observado el 100% de los géneros el inventario es confiable soportado por los valores de la pendiente (*C. trianaei* hoja = 0,06 y raíz = 0,084; *C. percivaliana* hoja = 0,04 y raíz = 0,036) (Jiménez y Hortal 2003) (figura 4).

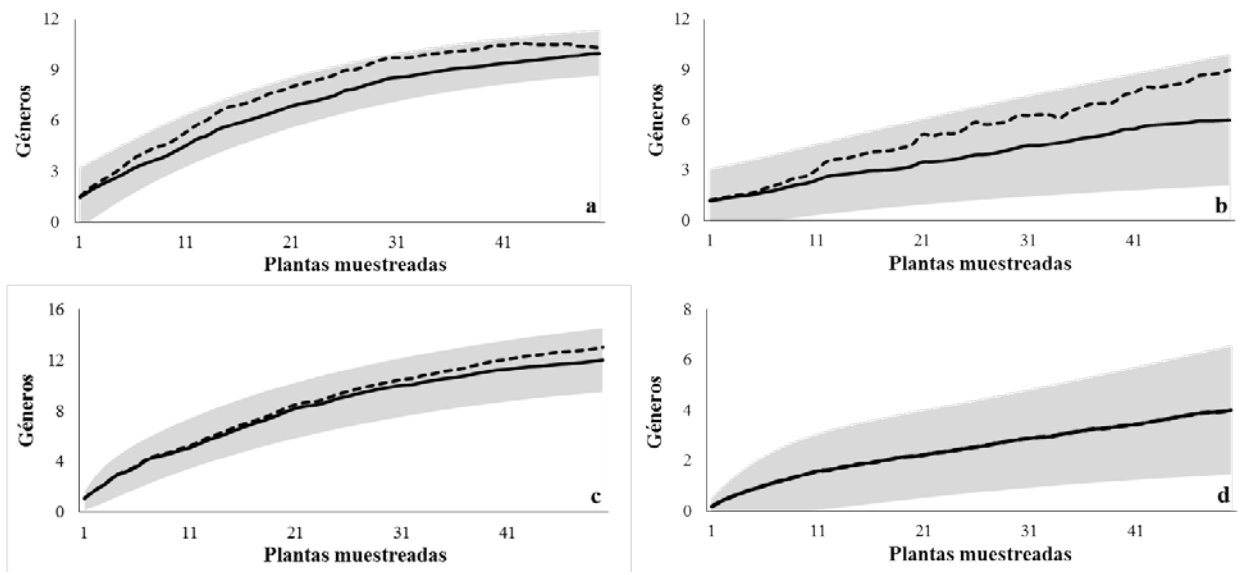


Figura 4. Curvas de acumulación de especies de hoja (a y b) y raíz (c y d) de *C. trianaei* (a y c) y *C. percivaliana* (b y d). Línea sólida: riqueza observada, línea punteada: Chao 1, y área gris: intervalo de confianza 95% de la riqueza observada.

En plantas de *C. trianaei* colonizadas únicamente en tejido foliar el 42,8% presentó un género por planta, el 28,6% 2 géneros, el 14,3% 4 géneros y el número máximo fue de 6 géneros por planta (14,3%). El género dominante fue *Sclerotium* presentándose en 6 plantas, además se reportó con mayor frecuencia de colonización (%FC = 17) (tabla 2 y tabla 3). En plantas con colonización radicular únicamente los géneros presentes por planta variaron entre 1 y 4, plantas en las que se observó 1, 2 y 3 géneros correspondieron a un 27,3% en cada caso, mientras que las que presentaron 4 géneros representaron el 18,2%. *Fusarium* fue el género más dominante (72,7%), colonizando en una de las plantas el 100% de los fragmentos analizados (%FC = 100). El 60% de las plantas colonizadas en los dos tejidos presentaron 2 géneros, uno en cada tejido, en el 20% se registraron tres géneros, uno en la hoja (*Exophiala*) y dos en la raíz (*Aureobasidium* y *Fusarium*) y en el 20% restante se observó que *Fusarium* fue el único género aislado en los dos tejidos de plantas diferentes, además fue el dominante en la raíz de plantas que presentaron colonización simultánea (tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de colonización de los géneros presentes en hoja, raíz y ambos tejidos. Coll: *Colletotrichum*, Fus: *Fusarium*, Scl: *Sclerotium*, Bot: *Botryotrichum*, Aur: *Aureobasidium*, Chr: *Chromelosporium*, Gon: *Gonatobotrys*, Mon: *Monilinia*, Cla: *Cladosporium*, Cur: *Curvularia*, Glo: *Gloeosporium*, Tri: *Trichoderma*, Exo: *Exophiala*, Nod: *Nodulosporium*.

Tejido foliar												
	Planta	Coll	Fus	Scl	Bot	Aur	Chr	Gon	Mon	Cla	Géneros totales	
<i>C. trianaei</i>	1	8,3									1	
	2			4,2							1	
	3			4,2							1	
	4	4,2		4,2							2	
	5			4,2			4,2				2	
	6	8,3		8,3	8,3	8,3	4,2				4	
	7		8,3	16,6	8,3	8,3	4,2	4,2			6	
<i>C. percivaliana</i>	1	4,2									1	
	2			12,5							1	
	3	8,3									1	
	4							4,2			1	
	5					4,2				4,2	2	

Tejido radicular													
	Planta	Coll	Fus	Scl	Bot	Cur	Glo	Tri	mf2	mf3	mf4	mf5	Géneros totales
<i>C. trianaei</i>	1		62,5										1
	2			4,2									1
	3		75,0										1
	4		83,3	8,3									2
	5	12,5				12,5							2
	6				8,3		4,2						2
	7		66,6	12,5					16,6				3
	8	8,3	45,8	8,3									3
	9		50,0					12,5		4,2			3
	10	16,6	54,2			4,2			20,8				4
	11		37,5	33,3	8,3						20,8		4
<i>C. percivaliana</i>	1			12,5									1
	2							8,33					1
	3										8,3		1
	4		4,2										1
	5		8,3										1
	6		8,3										1
	7		8,3										1
	8		16,6										1
	9		16,6										1
	10		20,8										1

Ambos tejidos															
	Planta	Hoja							Raíz				Σ Géneros		
		Coll	Fus	Mon	Exo	Nod	Tri	Géneros totales	Fus	Scl	Aur	mf1		Géneros totales	
<i>C. trianaei</i>	1			8,3				1	95,8				1	2	
	2					4,2		1		20,8			1	2	
	3		8,3					1	70,8				1	2	
	4	12,5						1				20,8	1	2	
	5				4,2			1	50		33,3		2	3	
<i>C. percivaliana</i>	1	12,5					4,2	2	29,2				1	3	

Las plantas de *C. percivaliana* fueron colonizadas por 9 géneros, 6 de estos se identificaron en hoja y 4 en raíz. Cinco plantas presentaron endófitos únicamente en la hoja, en el 80% se aisló solamente un género por planta, mientras que en el 20% restante, el tejido fue colonizado por dos géneros. *Colletotrichum* fue el género dominante, aislándose a partir de dos plantas con %FC de 4,2 y 8,3, y *Sclerotium* fue el endófito que registró mayor frecuencia de colonización. Las plantas colonizadas únicamente en raíz presentaron un género por planta, *Fusarium* fue el más dominante y también presentó mayor frecuencia de colonización. La planta positiva en ambos tejidos presentó tres géneros, *Colletotrichum* (%FC = 13) y *Trichoderma* (%FC = 4,2) en hoja y *Fusarium* (%FC = 29) en raíz (tabla 3).

El análisis de diversidad en las dos especies indicó que a nivel de hoja los géneros endófitos en común fueron *Botryotrichum*, *Colletotrichum*, *Monilinia* y *Sclerotium*; y en raíz mf2, *Fusarium* y *Sclerotium* (figura 3, 5 y 6). Al comparar en cada especie de *Cattleya* la comunidad de endófitos de hoja y de raíz, la similitud fue mayor en *C. trianaei* (Jaccard = 0,29) que en *C. percivaliana* (Jaccard = 0,11). También se observaron diferencias al contrastar un mismo tejido entre las dos especies, con cuatro géneros compartidos en hoja (Jaccard = 0,3) y tres en raíz (Jaccard = 0,231).

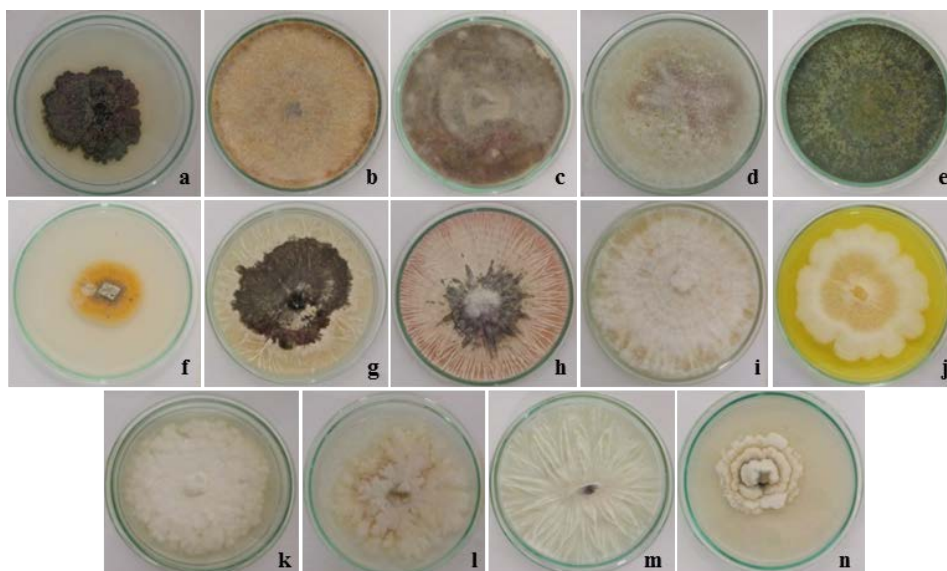


Figura 5. Géneros aislados de hoja. *Aureobasidium* (a), *Botryotrichum* (b), *Colletotrichum* (c), *Fusarium* (d), *Trichoderma* (e), *Exophiala* (f), *Sclerotium* (g-l) y *Monilinia* (m-n).

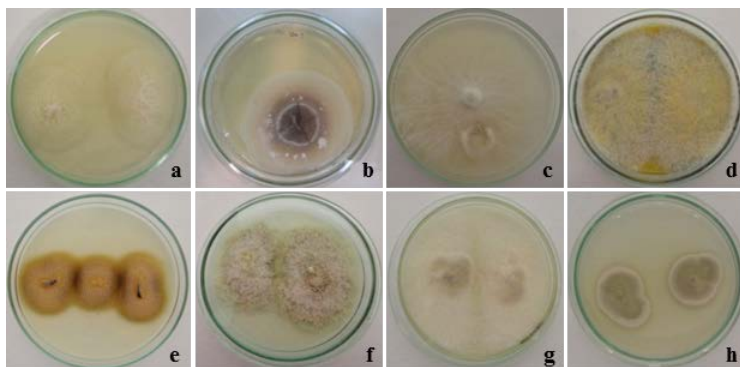


Figura 6. Géneros aislados de raíz. mf1(a), *Curvularia* (b), mf2 (c), mf2 (d), mf3 (e), *Botryotrichum* (f), mf4 (g) y mf5(h).

Los índices de Shannon y Simpson mostraron que la diversidad fue mayor en hoja que en raíz, sin embargo, al comparar los tejidos intraespecíficamente no hubo diferencias significativas (U de Mann-Whitney = 1087 en *C. trianaei* y 1200 en *C. percivaliana*, $P < 0.05$). Al comparar los valores de la diversidad de un tejido entre las dos especies se observó que diferían estadísticamente solamente en la raíz (U de Mann-Whitney = 975, $P < 0.05$) (tabla 4).

Tabla 4. Estimativos de diversidad de los hongos endófitos aislados de hoja y raíz de *C. trianaei* y *C. percivaliana*.

Índice	Hoja		Raíz	
	<i>C. trianaei</i>	<i>C. percivaliana</i>	<i>C. trianaei</i>	<i>C. percivaliana</i>
Shannon	2	1,48	1,26	0,73
Simpson	7	4,33	2,03	1,55

Potencial funcional de los hongos endófitos

Se determinó el potencial antagónico de 34 morfotipos de hoja y 25 de raíz contra 10 hongos fitopatógenos aislados de orquídeas. Los endófitos evaluados pertenecen a 12 géneros foliares, entre paréntesis se indica el número de aislados: *Colletotrichum* (7), *Sclerotium* (10), *Monilinia* (2), *Botryotrichum* (4), *Exophiala* (1), *Nodulosporium* (1), *Fusarium* (2), *Aureobasidium* (2), *Chromelosporium* (2), *Gonatobotrys* (1), *Cladosporium* (1) y *Trichoderma* (1); y a 9 géneros radiculares: *Gloeosporium* (1), *Colletotrichum* (2), *Curvularia* (1), *Fusarium* (12), mf5 (1), mf2 (4), mf4 (2), *Sclerotium* (2).

El porcentaje de inhibición micelial en el 95% de los endófitos de hoja estuvo entre el 0 y 39,9%; un 2,06% restante, representado principalmente por un aislado del género *Trichoderma*, inhibió

un 66% el crecimiento de *Botryotrichum* sp. y un 55% el de *Colletotrichum* sp. El aislado de *Sclerotium* (E8KS80) presentó una zona de inhibición contra los hongos evaluados por lo que se consideró positivo a pesar del bajo porcentaje (16,52 - 40,58%) (figura 7).

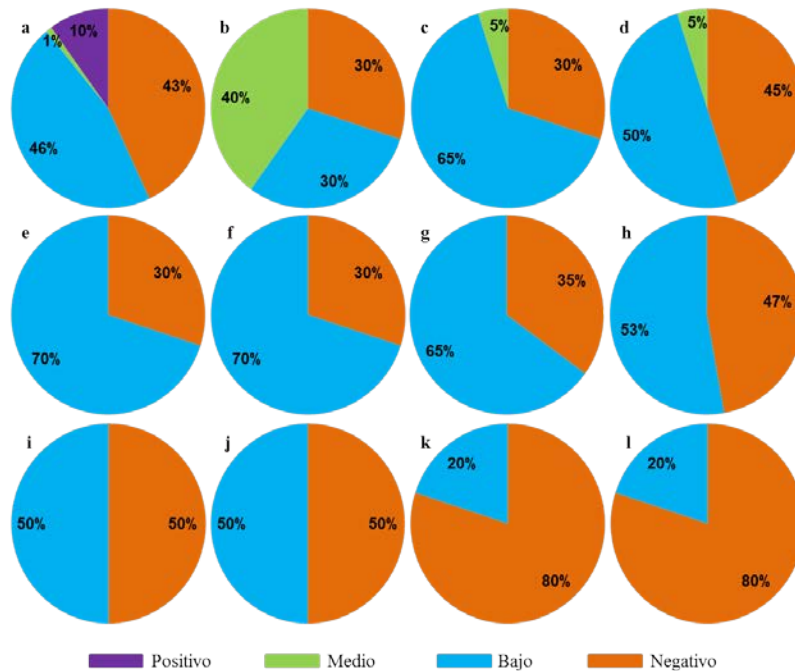


Figura 7. Proporción de casos positivos, medios, bajos y negativos en cada género de hongos endófito de hoja evaluado. *Sclerotium* (a), *Trichoderma* (b), *Chromelosporium* (c), *Aureobasidium* (d), *Monilinia* (e), *Fusarium* (f), *Nodulosporium* (g), *Colletotrichum* (h), *Botryotrichum* (i), *Gonatobotrys* (j), *Cladosporium* (k) y *Exophiala* (l).

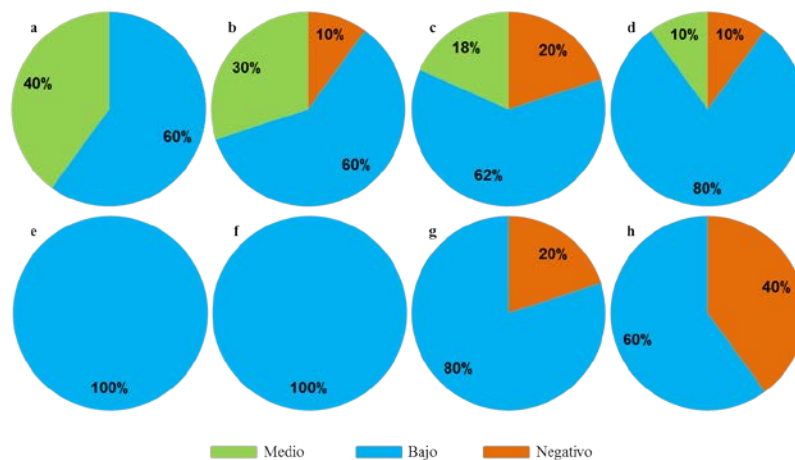


Figura 8. Proporción de casos positivos, medios, bajos y negativos en cada género de hongos endófito de raíz evaluado. *Sclerotium* (a), *Colletotrichum* (b), *Fusarium* (c), mf4 (d), mf5 (e), *Curvularia* (f), mf2 (g) y *Gloeosporium* (h).

En relación a los endofitos de raíz, el 85% de los enfrentamientos mostraron porcentajes entre 0 y 38,89%, mientras que un 15% presentó valores entre 40 y 53,85%. Entre estos últimos, se destacó la interacción antagonista de *Sclerotium* sp. sobre *Colletotrichum* sp. y *Botryotrichum* sp. inhibiendo su crecimiento un 41% en ambos casos (figura 8).

El sobrenadante evaluado en agar del aislado E8KS80 inhibió del crecimiento de los hongos fitopatógenos entre el 70 y 100%. Los porcentajes de inhibición micelial más altos se presentaron contra *P. cinnamomi* y *Colletotrichum* sp. (figura 9). En general, los porcentajes de inhibición calculados fueron menores al enfrentar los hongos fitopatógenos a E8KS80 que al inocularlos en el agar suplementado con el sobrenadante de este aislado (tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes de inhibición micelial obtenidos al enfrentar E8KS80 con los fitopatógenos por enfrentamiento y por siembra en el medio sólido con el sobrenadante del hongo (2:3 v/v).

Fitopatógeno	Enfrentamiento	Sobrenadante
<i>P. cinnamomi</i>	32,50	99,59
<i>Colletotrichum</i> sp.	30,70	99,02
<i>M. fijensis</i>	5,60	93,62
<i>F. oxysporum</i>	21,43	77,57
<i>Sclerotium</i> sp.	23,53	72,66

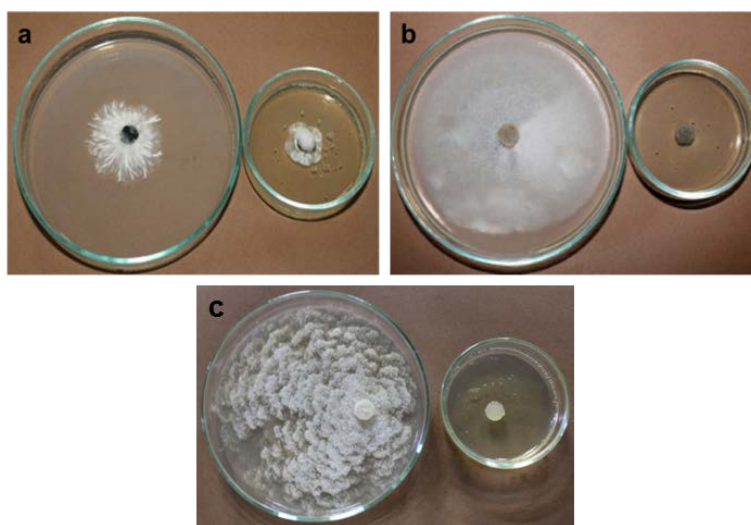
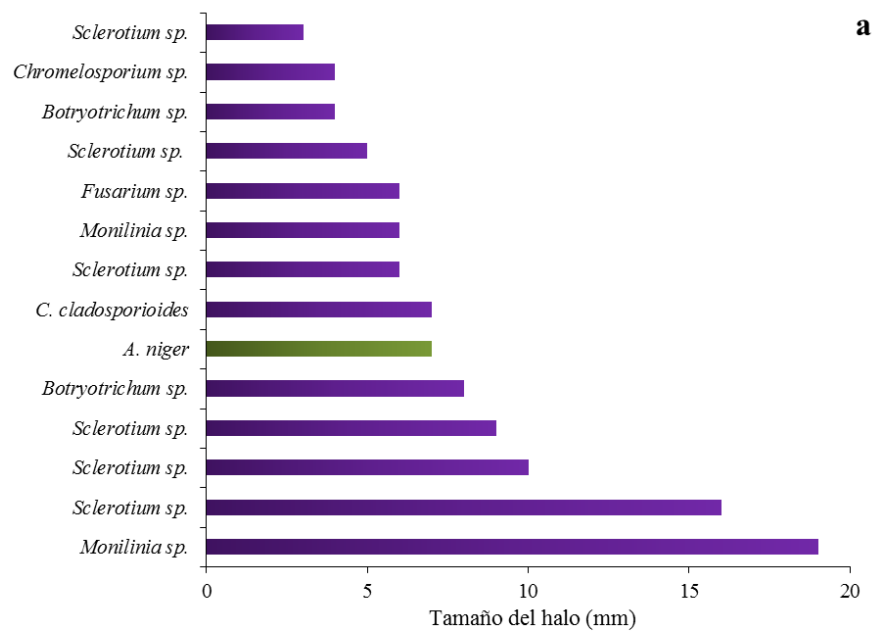


Figura 9. Evaluación del extracto de E8KS80 a los 15 días de incubación. *Sclerotium* sp. (a) *Colletotrichum* (b) y *P. cinnamomi* (c) en PDA sin el extracto (izquierda) y con el extracto (derecha).

Actividad celulolítica

Todos los aislados de raíz y hoja fueron evaluados en cuanto a su capacidad de hidrolizar celulosa. Se observó que 13 endófitos foliares y 23 radiculares degradaron celulosa y la mayor actividad se registró en los aislados de hoja. El grado de actividad medido como el diámetro del halo que rodea a la colonia varió entre 3 - 19 mm en los aislados de hoja, observándose mayor actividad en los géneros *Botryotrichum*, *Sclerotium* y *Monilinia*: en los aislados de raíz este valor se registró entre 1 - 10 mm (figura 10).



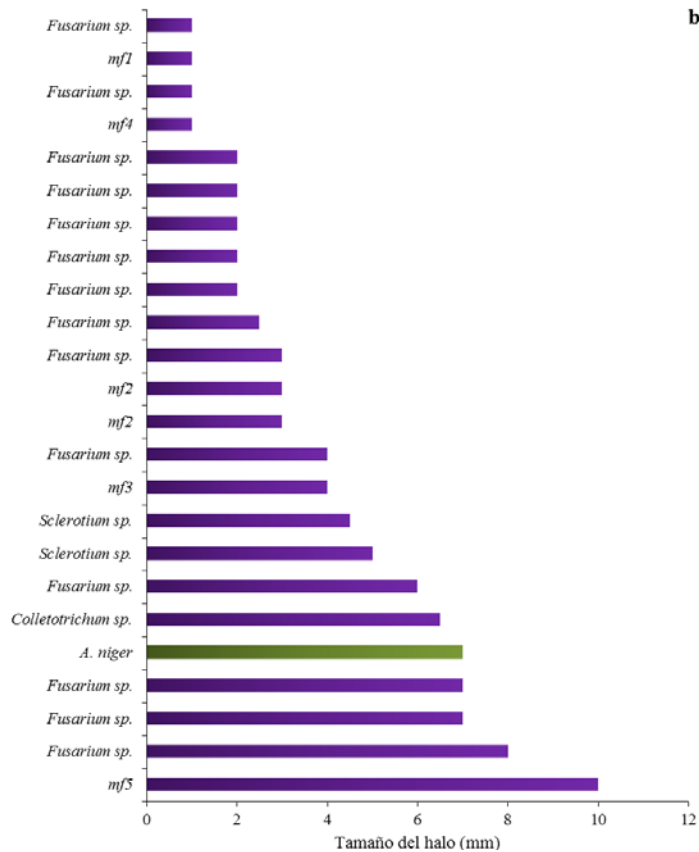


Figura 10. Tamaño del halo revelado en los ensayos de actividad celulolítica en los aislados de hoja (a) y raíz (b).

DISCUSIÓN

Las plantas interactúan con comunidades microbianas establecidas en la superficie y al interior de sus tejidos, constituyendo un sistema complejo que da lugar a un gradiente de interacciones positivas y negativas. Entre estas comunidades se encuentran los microorganismos endófitos, los cuales colonizan asintómicamente el interior de los tejidos estableciéndose como mutualistas, comensalistas o en algunos casos patógenos o saprótrofos latentes (Porrás-Alfaro y Bayman 2011).

Los métodos para el estudio de microorganismos endófitos requieren una estricta garantía de que la comunidad epífita ha sido eliminada, de tal forma que se desarrolle únicamente la microbiota que se encuentra al interior del tejido. Convencionalmente, el aislamiento de hongos endófitos se ha efectuado mediante desinfección superficial del tejido asegurando que además de eliminar la microbiota acompañante, la viabilidad del tejido no se vea comprometida y los microorganismos

endófitos puedan desarrollarse (Schulz *et al.* 1993). La efectividad de un protocolo de desinfección, además de los controles propuestos, puede evaluarse de acuerdo al tiempo de aparición de los microorganismos en el medio, siendo menor el de los epífitos que el de los endófitos (Arnold 2007) En este estudio al igual que lo reportado en *Vanda* y *Bulbophyllum* (Sudheep y Sridhar 2012), el crecimiento de la micobiota endófito del tejido foliar y radicular de *C. trianaei* y *C. percivaliana* se observó a partir de una semana de incubación, lo que indicó una eficiente desinfección del tejido.

El estudio de la riqueza y diversidad de hongos endófitos ha permitido hipotetizar que una planta puede estar colonizada por al menos un endófito (Arnold y Lutzoni 2007), sin embargo en este trabajo de investigación el porcentaje de plantas positivas fue inferior respecto a lo reportado en otras especies de orquídeas, por ejemplo se observó que de los tejidos analizados de *D. devonianum* y *D. thyrsoiflorum* el 100% fueron colonizados (Xing *et al.* 2011). La ausencia de colonización, tal como indicó el análisis de viabilidad, no se debió a la pérdida de integridad del tejido; probablemente los porcentajes obtenidos en este estudio estén explicados, en parte, por las prácticas en el mantenimiento de las plantas en los invernaderos, como la aplicación de fungicidas y protectantes. Al respecto Sieber y Grünig (2006) señalaron que el uso de estas sustancias efectivamente afectan la diversidad de hongos endófitos; Bayman *et al.* (2002) coinciden en esta afirmación al observar una disminución significativa del número de colonias aisladas de la raíz de *L. rupestris* al aplicar propioconazol. Las curvas de acumulación de especies indicó que la riqueza observada fue similar a la esperada, lo que podría indicar que los géneros no detectados están representados por microorganismos con algún requerimiento especial o de lento crecimiento (Vartoukian *et al.* 2010) los cuales no se desarrollan bajo las condiciones experimentales de este estudio.

Los mayoría de aislados se observaron en su estado anamórfico y cinco morfotipos no pudieron ser identificados; es frecuente que se presente esta dificultad en los estudios de diversidad de hongos endófitos y se debe principalmente a que estos no esporulan en medio de cultivos artificiales y a que en su mayoría no han sido descritos (Bayman y Otero 2006). En la actualidad algunas de las de herramientas moleculares, como el uso de la secuenciación de las regiones ITS (Internal transcribed spacer) permiten la identificación de estos aislados (Chen *et al.* 2011), sin embargo, su acceso está limitado debido a los costos.

Los géneros identificados en este estudio que se han reportado en orquídeas epífitas, fueron *Colletotrichum* en *Encyclia fragrans*, *Fusarium* en *Epidendrum porpax*, *Trichoderma* en *Lepanthes caritensis*, *Cladosporium* en *Pleurothallis periodica*, *Sclerotium* en *Dendrobium* y *Aureobasidium* y *Curvularia* en plantas no identificadas. Además se identificaron géneros que se desarrollaron exclusivamente en hoja, en raíz o en ambos, sin embargo, no se puede indicar que la presencia de un género en un tejido o especie sea un caso de especificidad ecológica considerando la diversidad de hongos endófitos y la variación de los métodos entre estudios. En orquídeas no hay evidencia de hongos endófitos hospedero-específicos, los endófitos que se han reportado corresponden a especies aisladas en otras plantas. En las orquidáceas se ha evidenciado que las diferencias en la composición de especies se presentan dependiendo el hábito de crecimiento de cada planta, por ejemplo en las terrestres *Phialocephala* es el género más frecuente mientras que en las epífitas son *Hadrotrichum*, *Epicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Xylaria* y *Pestalotiopsis* (Bayman y Otero 2006).

Se observaron diferencias en el ensamble de las comunidades de endófitos a nivel de especie y tejido, al igual que en el estudio de diversidad de hongos endófitos de dos especies de *Dendrobium* (Chen *et al.* 2011). La riqueza fue mayor en *C. trianaei* que en *C. percivaliana* y a nivel de tejido no se observó una tendencia. En relación a la diversidad, se encontró que los valores de *C. trianaei* fueron mayores que los de *C. percivaliana*, y a nivel de tejido fueron menores en la raíz que en la hoja, estos resultados de diversidad también fueron reportados en *Vanda* por Sudheep y Sridhar (2012).

Las diferencias en la riqueza y diversidad entre hoja y raíz se han reportado en algunos estudios, las que se han atribuido principalmente a la variedad de factores tanto bióticos, incluyendo el genotipo de la planta, como abióticos que afectan los tejidos (Aly *et al.* 2011, Ghimire *et al.* 2011). Los microorganismos asociados al filoplano están sometidos a condiciones como la desecación, y a la radiación UV, además el ambiente se caracteriza por ser oligotrófico, factores que no se presentan en el rizoplano (Gamboa 2006). Estas presiones selectivas influyen en la composición y estructura de las especies asociadas a un hospedero (Arnold 2007). Bayman y Otero (2006) indicaron que las hojas y las raíces de las orquídeas epífitas al estar en el mismo ambiente no presentarían diferencias en la comunidad de hongos endófitos, tal como se evidenció

en el trabajo de Bayman et al (1997), en orquídeas del género *Lepanthes*; sin embargo, en este estudio las comunidades fueron diferentes probablemente debido a que las condiciones de las hojas varían respecto a las de las raíces, que se encuentran compactadas en un sustrato. Se ha observado que la mayoría de los microorganismos endófitos asociados a la hoja se establecen como epífitos y posteriormente penetran el tejido (Porras-Alfaro y Bayman 2011), dos de los géneros identificados en este estudio se han reportado con esta capacidad *Cladosporium* y *Aureobasidium* (Arnold 2007).

El alto número de géneros aislados en la hoja por planta respecto al de raíz podría estar explicado por la interacción específica determinado el potencial del endófito en colonizar, establecerse e inhibir el desarrollo de otros endófitos; sobre esto se ha observado en la raíz de orquídeas epífitas que algunos hongos endófitos pueden desencadenar mecanismos de resistencia inducida mediante la producción de fitoalexinas como el orquinol, para evitar la colonización de otros hongos endófitos o micorrícicos, afectando de esta manera la diversidad en este tejido (Schulz 2006).

Los géneros de hongos endófitos más abundantes fueron *Fusarium* en raíz y *Sclerotium* y *Colletotrichum* en hoja. *Fusarium* fue el único que se desarrolló en el tejido foliar y radicular de una planta, colonizando con una mayor frecuencia la raíz. Este género se ha reportado como un hongo endófito y patógeno de todos los tejidos y en varios hospederos, reportándose asociado a las raíces de las orquídeas. (Ovando et al. 2005, Tao et al. 2012 y Tan et al. 2012). Es hemibiotrofo, y su relación con las orquídeas se ha estudiado ampliamente, considerándose un endófito involucrado en su crecimiento. La especie *F. semitectum* induce la formación del protocormo y la germinación de las semillas en *Cypripedium reginae*, y *F. proliferatum*, aislado *D. moschatum*, promueve su crecimiento mediante la producción de giberelinas (Tsavkelova et al. 2008). Especies de este género también han sido reportadas como patógenos, en cattleyas *F. oxysporum* causa la pudrición radicular provocando la muerte de la planta (Angel et al. 2001).

Colletotrichum al igual que *Fusarium* se ha registrado como un endófito cosmopolita y hemibiotrofo y se ha reportado también como fitopatógeno y endófito de varias especies. En un estudio en el que *C. acutatum* aislado de *Fragaria* sp se inoculó en plantas de las especies *Capsicum annuum*, *Solanum melongena*, *Solanum lycopersicum*, *Phaseolus vulgaris* y *Fragaria* sp. se observó que solamente se presentó antracnosis en esta última, a pesar de aislarse asociado a

las otra especies como endófito y/o epífito sin causar enfermedad. En orquídeas este género ya ha sido reportado como endófito, y en cattleas como patógeno causando antracnosis (Angel *et al.* 2001), siendo este el primer reporte como endófito foliar de *C. percivaliana* y *C. trianaei*. Aunque las bases genéticas de la comunicación simbiótica no han sido esclarecidas, los estudios al respecto han mostrado que algunos aislados de especie fúngicas pueden desarrollarse estableciendo interacciones positivas o negativas dependiendo del genotipo del huésped colonizado (Unterseher y Schnittler 2010).

Las evaluaciones para determinar el potencial antagónico de los aislados indicaron que un aislado de *Trichoderma* y de *Sclerotium*, inhibieron el crecimiento de los hongos fitopatógenos analizados. *Trichoderma* es un género que se reconoce por su potencial biocontrolador debido a la variedad de mecanismos físicos y químicos que emplea en el antagonismo de otras especies (Infante *et al.* 2009). En este estudio se observó su capacidad para colonizar y competir por recursos disponibles en el medio, inhibiendo el crecimiento de los hongos fitopatógenos. *Sclerotium* aunque mostró una baja tasa de crecimiento (3mm/día) inhibió el desarrollo de los fitopatógenos de orquídeas, de *Persea americana* (*P. cinnamomi*) y de *Musa* sp. (*M. fijiensis*). Aunque se desconoce el mecanismo que provoca este fenómeno, Benítez *et al.* (2004), indicaron que cuando el agente biocontrolador es un hongo endófito, el efecto se produce mediante la síntesis de metabolitos que impiden la germinación de esporas, lo que interfiere en el crecimiento del patógeno. El éxito de la mayoría de los hongos endófitos en el control de enfermedades se debe además de su alta capacidad de reproducción, a la eficiencia en el uso de nutrientes, resistencia a condiciones desfavorables, y a la promoción de crecimiento e inducción de los mecanismos de defensa en las plantas (Sikora y Pocasangre 2006). Los trabajos revisados que abordan el potencial biocontrolador de hongos endófitos no reportan *Sclerotium* sp con esta capacidad.

Considerando que los hongos endófitos no causan daño en el tejido vegetal se evaluó su potencial para degradar celulosa, los resultados indicaron que un bajo porcentaje de los aislados de endófitos foliares y radiculares presentaron esta capacidad, la cual fue en la mayoría de casos inferior a la del control. Es necesario evaluar el tipo de enzima y las condiciones óptimas de actividad para determinar si pueden considerarse o no un factor de patogénesis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aly AH, Debbab A, Proksch P. 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied microbiology and biotechnology*, 90: 1829-1845.
- Angel CA, Tsubota A, Leguizamón J, Cárdenas M, Cháves C, Cadena G, Bustillo A. 2001. Enfermedades y plagas en Cattleyas; antecedentes e investigaciones en Colombia. Chinchiná (Colombia): CENICAFE. p. 322.
- Arnold AE. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 2: 51-66.
- Arnold E, Lutzoni F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88 (3): 541-549.
- Arnold E, Mejía L, Kylló 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.
- Barnett H, Hunter B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th ed. Saint Paul (U.S.A): APS Press. p. 218.
- Bayman P, Lebron L, Tremblay R, Lodge L. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist*, 135 (1): 143-149.
- Bayman P, Gonzalez EJ, Fumero J, Tremblay RL. 2002. Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field. *Journal of Ecology* 90:1002-1008.
- Bayman P y Otero J T. 2006. Microbial endophytes of orchid roots. En: Schulz B, Boyle C y Sieber T, editores. *Microbial root endophytes*. Berlin, Heidelberg. Springer. p. 153-173.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC y Codón AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- Bing L, Lewis L. 1992. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Science and Technology*, 2: 39-47.
- Cabezas L, Calderón C, Medina L, Bahamón MI, Cárdenas M, Bernal AJ, González A, Restrepo S. 2012. Characterization of cellulases of fungal endophytes isolated from *Espeletia* spp. *Journal of Microbiology*, 50 (6): 1009-1013.
- Chen J, Hu KX, Hou XQ y Guo SX. 2011. Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 1009-1016.
- Chen XM, Dong HL, Hu KX, Sun ZR, Chen J, Guo SX. 2010. Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29 (3): 328-337.

Chutima R, Dell B, Vessabutr S, Bussaban B, Lumyong S. 2011. Endophytic fungi from *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand. *Mycorrhiza*, 21 (3): 221-229.

Corrales L, Sánchez L, Cuervo J, Bautista D, González L, Guevara M. 2010. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *NOVA: publicación científica*, 8 (13): 63-75.

Delgado E, Vásquez S. 2010. Control biológico de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. y Sacc.) en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) mediante hongos endófitos antagonistas. *La Granja*, 11 (1): 36-43.

Dixon RA. 1996. *Plant cell culture: a practical approach*. 2nd ed. Inglaterra: Universidad de Oxford. p. 236.

Gamboa-Gaitán MA. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta biológica colombiana* 11S:3-20.

Gezgin Y, Eltem R. 2009. Diversity of endophytic fungi from various Aegean and Mediterranean orchids (saleps). *Turkish Journal of Botany*, 33: 439-445.

Ghimire SR., Charlton ND, Bell JD, Krishnamurthy YL, Craven KD. 2011. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. *Fungal Diversity*, 47(1): 19-27.

Hyde K, Soyong K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33: 163-173.

Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24 (1): 14-21.

Jiménez-Valverde A, Hortal J. 2003. Las curvas de acumulación de especies y la necesidad de evaluar la calidad de los inventarios biológicos. *Revista Ibérica de Aracnología* 8: 151-161.

Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*, 57(5):503-507.

Longoni P, Rodolfi M, Pantaleoni L, Doria E, Concia L, Picco AM, Cella R. 2012. Functional analysis of the degradation of cellulosic substrates by a *Chaetomium globosum* endophytic isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (10): 3693-705.

Newton A, Fitt B, Atkins S, Walters D, Daniell T. 2010. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends in Microbiology*, 18 (8): 365-373.

- Ovando I, Damon A, Bello R, Ambrosio D, Albores V, Adriano L, Salvador M. 2005. Isolation of endophytic fungi and their mycorrhizal potential for the tropical epiphytic orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 4 (3): 309-315.
- Pimentel I, Glienke-Blanco C, Gabardo J, Makowiecky R, Azevedo J. 2006. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Brazilian archives of biology and technology*, 49 (5): 705-711.
- Porras-Alfaro A y Bayman P. 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annual Review of Phytopathology* 49: 24.1-24.25.
- Pridgeon AM. 1996. Orchids: Status survey and conservation action plan. Suiza: Union Internationale pour la Conservation de la Nature et de ses Ressources. p. 157.
- Rodríguez RJ, White JF, Arnold E, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182 (2): 314-330.
- Rubini M, Silva-Ribeiro R, Pomella A, Maki C, Araújo W, Santos D, Azevedo JL. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1: 24-33.
- Sarmiento J, Betancur JC. 2006. Sinopsis sobre la riqueza y la distribución geográfica y altitudinal de las orquídeas de Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 11 (1): 167.
- Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust HJ. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 97(12): 1447-1450.
- Schulz B, Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109 (6): 661-686.
- Schulz B. 2006. Mutualistic interactions with fungal root endophytes. En: Schulz B, Boyle C y Sieber T, editores. *Microbial root endophytes*. Berlin, Heidelberg. Springer. p. 261-276.
- Schulz B, Boyle C, Sieber T. 2006. *Microbial Root Endophytes*. Alemania: Springer. p. 367.
- Sieber T y Grünig CR. 2006. Biodiversity of fungal root-endophyte communities and populations, in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii* s. l. En: Schulz B, Boyle C y Sieber T, editores. *Microbial root endophytes*. Berlin, Heidelberg. Springer. p. 107-126.
- Sieber T. 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21: 75-89.
- Sikora RA y Pocasangre LE. 2006. The concept of a suppressive banana plant: root health management with a biological approach. En: *Memorias XVII Reunión Internacional Acobat*. Joinville, Brasil.

- Slippers B, Wingfield M. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21: 90-106.
- Sudheep NM, Sridhar KR. 2012. Non-mycorrhizal fungal endophytes in two orchids of Kaiga forest (Western Ghats), India. *Journal of Forestry Research*, 23 (3): 453-460.
- Suryanarayanan TS, Vijaykrishna D. 2001. Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. *Fungal Diversity* 8: 155-161.
- Tan XM, Chen XM, Wang CL, Jin XH, Cui JL, Chen J, Guo SX, Zhao LF. 2012. Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (Orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China. *Current Microbiology*, 64 (2): 140-147.
- Tao G, Liu Z, Sun B, Zhu Y, Cai L, Liu X. 2012. Occurrence and diversity of endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae) in Guizhou, China. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (12): 2859-2868.
- Tsavkelova EA, Bömkea C, Netrusov AI, Weiner J y Tudzynski B. 2008. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1393-1403.
- Unterseher M y Schnittler M. 2009. Dilution-to-extinction cultivation of leaf-inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.) different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment. *Mycological Research*, 113: 645-654.
- Unterseher M, Schnittler M. 2010. Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology*, 3: 366-378.
- Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. 2010. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS microbiology letters*, 309 (1): 1-7.
- Vega F, Posada F, Aime M, Pava-Ripoll M, Infante F, Rehner S. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*, 46: 72-82.
- Wang YT, Lo HS, Wang PH. 2008. Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan: first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an endophyte of *Taxus mairei*. *Botanical studies*, 49 (1): 39-43.
- Wilson D. 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73: 274-276.
- Xing YM, Chen J, Cui JL, Chen XM, Guo SX. 2011. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thysiflorum* from Vietman. *Current microbiology*, 62 (4): 1218-1224.
- Yuan ZL, Chen YC, Yang Y. 2009. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25 (2): 295-303.