

ANÁLISIS QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE LA INTERACCIÓN
MICROORGANISMO ENDOFÍTICO-PLANTA EN *Sinningia magnifica*

CARLOS JOSE ALVAREZ CANTERO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA

2017

ANÁLISIS QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE LA INTERACCIÓN
MICROORGANISMO ENDOFÍTICO-PLANTA EN *Sinningia magnifica*

CARLOS JOSE ALVAREZ CANTERO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
Microbiólogo

Tutor: Prof. Dr. Marcos José Salvador
Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP

Tutor: PhD. Ramón Ovidio García Rico
Universidad de Pamplona

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA

2017

Nota de aceptación:

Firma Jurado 1.

Firma Jurado 2.

Pamplona, diciembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios por darme fuerzas y entendimiento cuando las cosas no parecían estar bien, pero principalmente por las horas en las cuales me llene de valentía.

Al profesor Dr. Marcos Jose Salvador, a Alvaro Jose Hernández Tasco por la oportunidad de recibirme en su laboratorio, gracias por su apoyo en mi crecimiento profesional y personal, sin el cual no hubiese podido ejecutar este proyecto.

A mis compañeros y personal técnico en el Laboratorio de Fisiología Vegetal (IB) y del Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) de la Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP).

Al profesor PhD. Ramón Ovidio García Rico, por ser un docente ejemplar y ser mi orientador en el desempeño de mi trabajo de grado.

A los profesores del programa de Microbiología de la Universidad de Pamplona, por verme crecer profesionalmente.

A mis compañeros y amigos de la Universidad de Pamplona, con los cuales he compartido grandes momentos.

A todos aquellos que siguen estando cerca de mí y le regalan a mi vida algo de ellos.

Dedico este trabajo a mis padres Roger Fredy Alvarez y Luz Neida Cantero, son el pilar más importante en mi vida. Su amor es inmensurable dentro de mi corazón, gracias por su confianza y permitirme llegar lejos...

... "Sueña, propóntelo y alcánzalo...Dios mi mayor motor".

Contenido

1. Introducción	13
2. Objetivos	15
3. Justificación	16
4. Marco Teórico	17
4.1 Generalidades especies de <i>Sinningia</i> sp.	17
4.1.1 <i>Sinningia magnifica</i> (SM)	17
4.2 Microorganismos endofíticos	19
4.2.1 Bacterias endofíticas	19
4.2.2 Hongos endofíticos	20
4.3 Correlación microorganismo endofítico-planta	22
4.3.1 Mutualismo	22
4.3.2 Simbiosis	22
4.4 Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs)	23
5. Metodología	24
5.1 Selección de la especie vegetal	24
5.2 Obtención de las plántulas de <i>S. magnifica</i>	24
5.3 Selección de las cepas de microorganismos endofíticos cultivables	24
5.4 Determinación de la diversidad de microorganismos endofíticos	25
5.4.1 Caracterización macroscópica y microscópica hongos filamentosos cultivables	25
5.4.2 Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias cultivables	25
5.4.3 Caracterización genética de las cepas de microorganismos endofíticos	25
5.5 Condiciones de crecimiento de los microorganismos endofíticos cultivables	26
5.5.1 Comportamiento de hongos endofíticos en medios de cultivo	27
5.5.2. Comportamiento de bacterias endofíticas en medios de cultivo	27
5.6. Co-cultivos entre microorganismos endofíticos cultivables y plántulas de <i>S. magnifica</i>	27
5.7. Análisis de COVs en los co-cultivos por Cromatografía de gases desorción térmica, acoplada a espectrometría de masas (TD-CG/MS)	28
5.8 Obtención de extractos a partir de los co-cultivos	28

5.9 Ensayos para evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana a partir de los extractos de los co-cultivos	29
5.9.1 Ensayo para la determinación de la actividad antioxidante por ORAC-FL	29
5.9.2 Determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución	29
6. Análisis estadístico	30
7. Cronograma de Actividades	31
8. Resultados	32
8.1 Caracterización fenotípica y genotípica de los microorganismos endofíticos aislados	32
8.1.1 Hongos filamentosos	32
8.1.2 Bacterias	36
8.2 Condiciones de crecimiento de los microorganismos endofíticos cultivables	38
8.2.1 Comportamiento de Hongos Filamentosos	38
8.2.2 Comportamiento Bacteriano	40
8.3 Análisis de compuestos orgánicos volátiles (COVs).....	42
8.4 Obtención de los extractos brutos a partir de las hojas de <i>S. magnifica</i> ..	43
8.4 Resultados pruebas de actividad biológica.....	45
8.4.1 Actividad antioxidante.....	45
8.4.2 Actividad Antimicrobiana	51
9. Análisis de Resultados.....	54
9.1 Identificación macroscópica, microscópica y genética de los microorganismos endofíticos	54
9.2 Comportamiento del crecimiento de los microorganismos endofíticos	55
9.3 Análisis perfiles cromatográficos de los compuestos orgánicos volátiles	56
9.4 Pruebas de actividad biológica	56
9.4.1 Ensayo ORAC-FL.....	56
9.4.2 Actividad antimicrobiana.....	57
10. Conclusiones	59
11. Recomendaciones	60
12. Glosario.....	61
13. Bibliografía	62
14. Anexos	70

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa de distribución de <i>S. magnifica</i> en Brasil	18
Figura 2. Espécimen de <i>S. magnifica</i>	18
Figura 3. Macro morfología del hongo endofítico SM4 en diferentes medios de cultivo.....	33
Figura 4. Macro morfología del hongo endofítico SM6 en diferentes medios de cultivo.....	33
Figura 5. Macro morfología del hongo endofítico SM24-2 en diferentes medios de cultivo.....	34
Figura 6. Macro morfología del hongo endofítico SMHN en diferentes medios de cultivo.....	35
Figura 7. Micro morfologías cepas de hongos filamentosos endofíticos aislados a partir de <i>S. magnifica</i>	35
Figura 8. Macro morfología de las cepas bacterianas endofíticas en diferentes medios de cultivo..	37
Figura 9. Micro morfologías cepas bacterianas endofíticas aisladas a partir de <i>S. magnifica</i>	38
Figura 10. Cromatograma comparativo de los compuestos orgánicos volátiles de las plantas control.....	46
Figura 11. Cromatograma comparativo de los compuestos orgánicos volátiles de las plantas inoculadas con los microorganismos endofíticos.....	47
Figura 12. Cromatograma comparativo de los compuestos orgánicos volátiles de la planta <i>in vitro</i> y de la planta inoculada con todos los microorganismos (MIX)..	48
Figura 13. Cromatograma comparativo de los compuestos orgánicos volátiles de las plantas de campo..	49

Lista de Tablas

Tabla 1. Bacterias endofíticas encontradas en algunas especies vegetales	20
Tabla 2. Géneros fúngicos endofíticos, sus metabolitos secundarios aislados y posible actividad biológica	21
Tabla 3. Iniciadores utilizados para la reacción de PCR.....	26
Tabla 4. Condiciones cromatográficas para análisis en GC/MS.	28
Tabla 5. Cronograma de actividades estipuladas en la ejecución del proyecto de investigación	31
Tabla 6. Rendimiento en masa de los extractos brutos de las plantas de <i>S. magnifica</i> : <i>in vitro</i> , campo e inoculadas con los microorganismos endofíticos cultivables.	44
Tabla 7. Resultados de la actividad antioxidante por el ensayo ORAC-FL de los extractos brutos de las plantas de <i>S. magnifica</i> : <i>in vitro</i> , campo e inoculadas con los microorganismos endofíticos cultivables.	50
Tabla 8. Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos brutos derivados de las plantas de <i>S. magnifica</i> : <i>in vitro</i> , campo e inoculadas con los microorganismos endofíticos cultivables.....	52

Lista de Gráficas

Gráfica 1. Curva de crecimiento de las cepas fúngicas endofíticas en medio de cultivo líquido MS.....	39
Gráfica 2. Curva de crecimiento de las cepas fúngicas endofíticas en medio de cultivo caldo Sabouraud-Dextrosa.	39
Gráfica 3. Curva de crecimiento de cepas bacterianas endofíticas en medio de cultivo ISP2. A. Grafica en general SM2, SM3, SM8 y SM9; B. Ampliación de la gráfica SM2 y SM3.....	41
Gráfica 4. Curva de crecimiento de cepas bacterianas endofíticas en medio de cultivo ISP2. A. Grafica en general SM2, SM3, SM8 y SM9; B. Ampliación de la gráfica SM2, SM8 y SM9.	42

Listas de Anexos

Anexo 1. Tabla con la composición de los medios de cultivo	70
Anexo 2. Diseño experimental utilizado para los experimentos entre microorganismos endofíticos cultivables Vs. <i>S. magnifica</i> (co-cultivos, prueba de actividad antioxidante y antimicrobiana)	71
Anexo 3. Características macroscópicas cepas de hongos filamentosos y bacterias endofíticas de <i>S. magnifica</i>	72
Anexo 4. Tabla valores de crecimiento de hongos filamentosos cultivables aislados de <i>S. magnifica</i> en medios de cultivo.....	75
Anexo 5. Tabla valores de crecimiento de bacterias endófitas de <i>S. magnifica</i> en medio de cultivo líquido ISP2.	75
Anexo 6. Tabla valores de crecimiento de bacterias endófitas de <i>S. magnifica</i> en medio de cultivo líquido MS.	77
Anexo 7. Datos de los perfiles de fragmentación obtenidos a partir de los tiempos de retención presentes en los cromatogramas.	79
Anexo 8. Perfiles cromatográficos por cromatografía gaseosa de tratamientos individuales efectuados en <i>S. magnifica</i>	90

Lista de Abreviaturas y Siglas

1. AAPH (2,2'-Azobis (2-amidiopropane) dihydrochloride)
2. BE Bacterias endofíticas
3. COVs Compuestos orgánicos volátiles
4. HE Hongos filamentosos endofíticos
5. ITS Espaciador transcrito interno
6. ME Microorganismos endofíticos
7. MS Medio de cultivo Murashige & Skoog
8. *m/z* Relación masa/carga
9. ORAC/FL Oxygen Radical Absorbance Capacity-Fluorescein
10. PCR Reacción en cadena de la polimerasa
11. RT Tiempo de retención en minutos
12. TD-GC/MS cromatografía de gases desorción térmica, acoplada a espectrometría de masas
13. UNT Unidades Nefelométricas de Turbidez

1. Introducción

La Tierra es un planeta orgánico, ecológicamente heterogéneo y vivo, capaz de sostener diversos organismos, estableciendo gran variedad de relaciones dependientes entre especies, lo que ha permitido, la evolución biológica y la continuidad de la vida por un gran periodo de tiempo (Falcão, Dáttilo & Izzo, 2015). La flora a nivel mundial es de gran interés y ampliamente estudiada por botánicos, taxónomos, químicos y farmacólogos, permitiendo esto, el descubrimiento de nuevos fármacos y fitoterápicos, siendo una tarea muy valorada, debido a la aparición de numerosas enfermedades y la transformación de las variantes patógenas farmacorresistentes (Joly et al., 2011). Tradicionalmente, las plantas fueron usadas empíricamente por el hombre para el tratamiento de enfermedades, proporcionando conocimientos de la mayor fuente de metabolitos bioactivos descubiertos actualmente (Brader, Compant, Mitter, Trognitz & Sessitsch, 2014). Sin embargo, recientemente se han hecho hallazgos donde los microorganismos de origen endofítico son causantes de dicha actividad biológica, como por ejemplo, Zaiyou, Li & Xiqiao (2017) aislaron un hongo endofítico que produce eficientemente Paclitaxel comercialmente conocido como Taxol, un fármaco quimioterapéutico que presenta actividad antiproliferativa y que es aceptado por la FDA (Food and Drug Administration US) para el tratamiento de cáncer de ovario, que históricamente dicha sustancia era atribuida al género de planta *Taxus* sp. (Ismail et al., 2017; Venugopalan et al., 2015).

La familia Gesneriaceae que incluye al género *Sinningia* sp., es una tribu caracterizada por su adaptabilidad a diversos ambientes y por la variabilidad de sustratos que utilizan (Ferreira, Chautems & Waechter, 2016), asimismo, es un microecosistema ideal para el establecimiento de diversos microorganismos con un amplio potencial metabólico, que pueden ser usados directamente como fármacos o funcionar como estructuras sustitutas en la fabricación de antibióticos (Kusari et al., 2014). Brader et al. (2014) describen en su trabajo que los microorganismos son una fuente primordial de más de 20 mil compuestos biológicamente activos, derivados de la asociación con otros organismos, por ejemplo, las plantas. Los microorganismos endofíticos son altamente interesantes debido a sus estrechas relaciones simbióticas en su ecosistema, cuya característica principal es su ecología con organismos vegetales. Estas interacciones proporcionan ventajas al organismo hospedero, entre estos tenemos: aprovechamiento de los recursos del suelo, resistencia herbívora, resistencia ante fitopatógenos, resistencia a estrés abiótico, entre otras (Gonçalves & Diniz, 2008; Selosse, Baudoin & Vandenkoornhuyse, 2004), de allí

la importancia de conocer la vida microbiana asociada a las plantas. Sin embargo, la interacción microorganismo endofítico-planta ha sido poco estudiada especialmente en el área de biociencias, puesto que, los nichos ecológicos se mantienen equilibrados bajo estos sistemas y resultan siendo útiles por la infinidad de rutas y sustancias metabólicas que se producen (Kusari et al., 2014). De ese modo, el presente trabajo busca analizar química y biológicamente la interacción microorganismo endofítico-planta (*S. magnifica*), buscando generar nuevos conocimientos sobre el grado de influencia que realizan estas interacciones en el metabolismo vegetal.

2. Objetivos

2.1 General

Analizar química y biológicamente la interacción microorganismo endofítico-planta en *Sinningia magnifica*.

2.2 Específicos

- Caracterizar fenotípica y genéticamente las cepas de microorganismos cultivables aislados de *S. magnifica*.
- Determinar las condiciones de crecimiento de los microorganismos endofíticos cultivables aislados de *S. magnifica*.
- Analizar químicamente mediante TD-GC/MS los co-cultivos entre los microorganismos endofíticos y las plántulas de *S. magnifica*.
- Evaluar la actividad antioxidante y actividad antimicrobiana, de los extractos metanólicos obtenidos a partir de los co-cultivos de *S. magnifica*.

3. Justificación

La farmacorresistencia es una problemática de salud pública mundial, que coloca en riesgo los sistemas de prevención y tratamientos de enfermedades infecciosas causadas por bacterias, hongos y parásitos, etc. Aumentando los costos sanitarios de los pacientes, puesto que, es necesario disponer de tratamientos con medicamentos más dispendiosos y agresivos para la salud (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016). No obstante, las sustancias bioactivas representan una fuente de fármacos, además, desempeñan un rol importante en el suministro de la diversidad química en las industrias farmacéuticas, dirigiendo perspectivas hacia el desarrollo de nuevos productos bioactivos (Monciardini et al., 2014).

La búsqueda de sustancias bioactivas actualmente está focalizada en los microorganismos, englobando diversos ecosistemas, como: acuáticos, terrestres, entre otros, facilitando el descubrimiento de nuevos metabolitos biológicamente activos (Brader et al., 2014). Asimismo, recientes investigaciones referentes a metabolitos microbianos, se concentran especialmente en los endófitos de plantas tropicales, representando un amplio y promisorio campo de investigación, esto se debe en gran medida a que los microorganismos que viven asociados a estos vegetales desempeñan roles importantes, como, aumento de captación de nutrientes y la protección contra agentes biológicos, físicos y químicos (García, Knaak & Fiuza, 2015). También, se tiene en cuenta que, las interacciones entre microorganismos endofíticos y plantas supone un sostenimiento del equilibrio en los diferentes ecosistemas, siendo así importante la continuidad de estudios para especificar la dinámica de las diferentes asociaciones (García et al., 2015). Entre tanto, para que esto sea una realidad algunos aspectos todavía deben ser evaluados, tales como: el desarrollo de estrategias aplicadas a la biotecnología y las biociencias, la obtención de conocimientos fundamentales sobre endófito-endófito y los mecanismos de comunicación endófito-planta usando los sistemas de co-cultivos acoplados a herramientas biotecnológicas disponibles y emergentes.

4. Marco Teórico

La biodiversidad del planeta es el resultado de la evolución biológica de muchos años, siendo ésta la garantía para la preservación de la vida, ocasionando que los sistemas biológicos interactúen entre sí, generando dinamismo en la asociación entre diferentes especies de organismos (Falcão et al., 2015). La biodiversidad de Brasil es una de las más completas de la tierra; reúne cerca del 15-25% de todas las especies vegetales descritas, entre ellas algunas con alta tasa de endemismo biológico. Su importancia biofarmacológica radica en que se han obtenido una amplia variedad de metabolitos macromoleculares y micromoleculares, impulsando el desarrollo de fármacos, cosméticos, agroquímicos y suplementos alimenticios (Joly et al., 2011). Por consiguiente, existe un especial interés en las plantas, debido a que, al ser organismos con alta plasticidad fenotípica utilizan una amplia variedad de sustratos (moléculas) disponibles en su entorno y de esa manera realizan su metabolismo (Berg, 2009). De igual modo, los microorganismos son responsables de la mayor parte de la biodiversidad y de las características presentes en las plantas; no obstante, la mayoría de estudios se centran en la manipulación de la diversidad de plantas y no en el enfoque de los microorganismos como elementos causales de la relación entre la biodiversidad y los ecosistemas (Gonçalves & Diniz, 2008).

4.1 Generalidades especies de *Sinningia* sp.

El género *Sinningia* hace parte de la familia pantropical Gesneriaceae que comprende 150 géneros y 3000 especies, estas plantas han sido utilizadas para el tratamiento de ciertas enfermedades en el hombre, como son: la fiebre, espasmos respiratorios, heridas en la piel e inflamaciones (Zaitlin, 2012), existen pocos estudios de su constitución química, sin embargo, existen algunas tendencias en el número de metabolitos aislados y su aplicación a la salud, como los descritos por Verdan & Stefanello (2012) quienes destacan los flavonoides, terpenos, esteroides, glucósidos fenólicos y quinonas, entre otros.

4.1.1 *Sinningia magnifica* (SM)

Sinningia magnifica es una especie de planta silvestre y rupícola, es decir, crece sobre zonas rocosas (geófito), recibió este nombre por Hans Joachim Wiehler en 1975 (Centro Nacional de Conservação da Flora [CNCFlora], 2012). Es nativa de Brasil distribuida a lo largo de la mata atlántica de los estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro y Espírito Santo (Figura 1), crece en ambientes húmedos cercanos a corrientes de agua en alturas desde 1.000-2.100 msnm,

presenta un ecotipo en lugares sombríos que se caracteriza principalmente por el hábito pendiente. Formadora de tubérculos globosos adheridos a la superficie de la raíz, de diámetro entre 8-10 cm; su tallo entre 30-100 cm, hojas opuestas, con inflorescencias de color rojo vivo o naranjas axilares pudiéndose encontrar entre 2-12 flores en las axilas de las hojas progresivamente. La recolección de sus flores se da de febrero a mayo (Chautems et al., 2003).

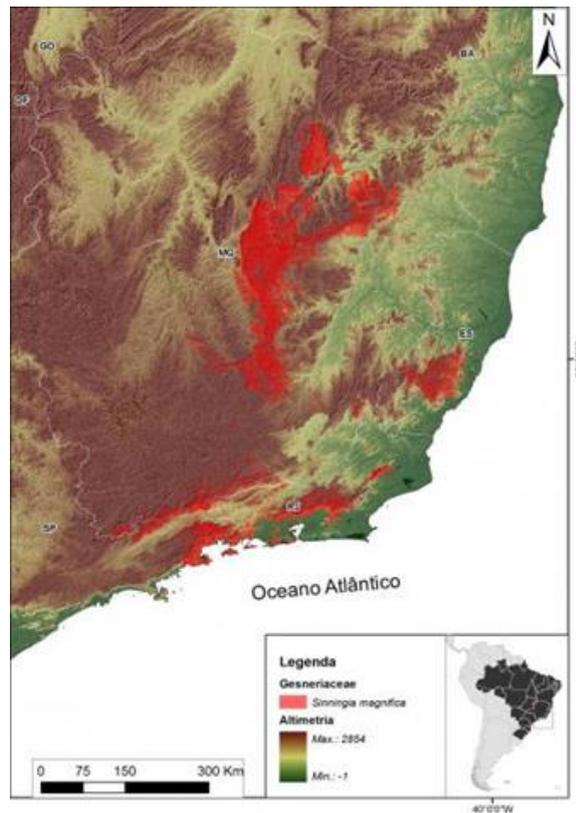


Figura 1. Mapa de distribución de *S. magnifica* en Brasil Fuente: CNCFlora, 2012

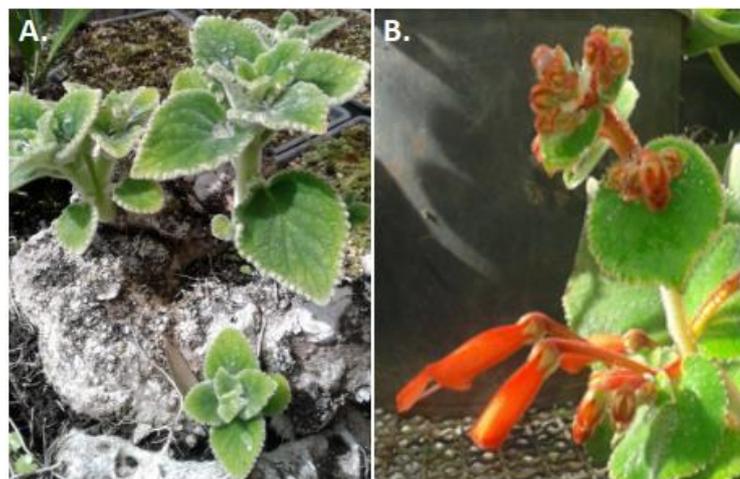


Figura 2. Especimen de *S. magnifica*, (A) planta (B) Flor (Fuente: Autor, 2017)

Para los cultivos *in vitro* de este género se han descrito dos vías, una de ellas es la regeneración de los brotes (organogénesis) y la embriogénesis somática (Park et al., 2012). La primera, pueden inducir brotes o raíces (es decir, órganos) y existe el diferenciamiento de células o grupos celulares, esta vía comúnmente implica inducción y desarrollo de un brote de tejido de explante, seguido por la transferencia a un medio de cultivo diferente para la inducción de raíz y posteriormente el desarrollo vegetal (Park et al., 2012). En tanto, para establecer las plantas, se requiere manipular un conjunto de factores con el fin de regenerar la estructura vegetal de forma adecuada, que comprende: los componentes del medio, explante apropiado y control del ambiente, entre otros (Chae et al., 2012).

4.2 Microorganismos endofíticos

En biología vegetal se ha adoptado un sistema de clasificación dependiendo del tipo localización microbiana: endofíticos, epifíticos, rizosféricos, entre otros (Selosse et al., 2004). Los microorganismos endofíticos (ME) son aquellos que habitan en el interior de las plantas (tallos, raíces y hojas) estableciendo una relación simbiótica, sin causar patologías visibles (Hong-thao, Mai-Linh, Hong-Lien & Hieu, 2016). Kandpal, Jain, Kumar, Tripathi & Kumar T. (2012), aseguran que se pueden encontrar en la mayoría de todas las especies de plantas investigadas hasta la fecha, siendo importantes para el desarrollo de la planta hospedera a través de la interacción microorganismo-huésped. De modo que, los ME interaccionan de manera inocua con su hospedero, otorgándoles beneficios a través de la producción de sustancias que podrían actuar como inductores/inhibidores; otras sustancias con funciones en el control biológico incluyen (compuestos antimicrobianos, herbicidas y fitohormonas), regulación homeostática ante el estrés abiótico y vectores genéticos (Selosse et al., 2004).

4.2.1 Bacterias endofíticas

Son organismos bacterianos que viven en asociación con plantas, muchas de estas producen metabolitos secundarios como agentes necesarios para la absorción de nutrientes, por ejemplo, los sideróforos involucrados en la adquisición de hierro (Brader et al., 2014). Aunque, son las menos estudiadas su capacidad metabólica es alta, sin embargo, algunas de las formas bacterianas endofíticas (BE) más investigadas son el género *Streptomyces* sp. aisladas de una amplia variedad de plantas y potencialmente productoras de antibióticos, entre otros productos bioactivos (Brader et al. 2014; Strobel 2003). En un informe de Sharma et al. (2014) reportan que de 23.000 compuestos bioactivos secundarios aislados de ME, el 43,5% fueron producidos por actinomicetos endofíticos y el 33% de estos compuestos se descubrieron en el género *Streptomyces* sp. Otros géneros que se han estudiado con mayor frecuencia son

descritos en la tabla 1, siendo principalmente aislados de plantas alimenticias y algunas plantas de uso industrial.

Tabla 1. Bacterias endofíticas encontradas en algunas especies vegetales

Planta hospedera	Microorganismos endofíticos
Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>)	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Clavibacter</i> sp., <i>Kluyvera</i> sp., <i>Listeria innocua</i> , <i>Morganella</i> sp., <i>Methylobacterium</i> sp., <i>Providencia alcalifaciens</i> , <i>Rhotia</i> sp., <i>Xanthomonas</i> sp.
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	<i>Azoarcus</i> sp.
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Micrococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Xanthomonas</i> sp.
Plantas cítricas (<i>Citrus</i> sp.)	<i>Alcaligenes</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Bacillus cereus</i> , <i>Erwinia herbicola</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Serratia liquefaciens</i> .
Trigo (<i>Triticum</i> sp.)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

(Azevedo 1998; Dibut et al., 2009)

4.2.2 Hongos endofíticos

Los hongos endofíticos (HE) incluyen una amplia variedad de géneros agrupados en los phylas Ascomycota, Basidiomycota y Zygomycota, los cuales han sido aislados de diferentes plantas en todo el mundo destacándose por ser una reserva de la diversidad fúngica mundial y a su vez constituyen una fuente de metabolitos secundarios con amplio potencial metabólico, como se ejemplifica en la tabla 2. No obstante, la mayoría de los estudios se basan en ecología, variabilidad y aplicaciones de los (HE) que se encuentran en asociación con madera y el pasto (Costa et al., 2015). No existen investigaciones sólidas sobre los grupos fúngicos endofíticos de plantas provenientes de bosques tropicales, donde la diversidad floral es mayor (Dibut et al., 2009).

Tabla 2. Géneros fúngicos endofíticos, sus metabolitos secundarios aislados y posible actividad biológica

Hongo endofítico/Planta hospedera	Metabolito secundario	Actividad biológica
<i>Penicillium</i> sp. (Trichocomaceae). Endófito de <i>Mauritia flexuosa</i> (Arecaceae).	Glandicolina B60 Alcaloide α -carbólico	Antimicrobiano. Contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> y <i>E. coli</i> .
<i>Aspergillus tamarii</i> (Trichocomaceae) Endófito de <i>Ficus carica</i> (Moraceae).	Fumitremorgina B. Alcaloide indolil dicetopiperazínico.	Antifúngico. Activo contra los fitopatógenos <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Phytophthora oryzae</i> .
<i>Pullularia</i> sp. BCC 8613 (Dothioraceae). Endófito de <i>Calophyllum</i> sp. (Calophyllaceae).	Pulularina A. Depsipéptido.	Antiplasmódico. Contra <i>Plasmodium falciparum</i> K1. Antiviral. Contra el virus del herpes simple (HSV-1).
<i>Cephalosporium</i> sp. IFB-E001 (Incertae sedis). Endófito de <i>Trachelospermum jasminoides</i> (Apocynaceae) <i>E. gomezpompae</i> (Pleosporaceae). Endófito de <i>C. acuminata</i> (Verbenaceae).	Grafislactona A. Benzocromeno policétido.	Antioxidante. Inhibe la peroxidación del ácido linoleico.
<i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae). Endófito de <i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae)	Preusomerina EG1 Bisnaftoespirocetal	Antifúngico. Contra <i>P. capsici</i> , <i>P. parasitica</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>A. solani</i> .
<i>Dwayaangam colodena</i> (Orbiliaceae). Endófito de <i>Picea rubens</i> (Pinaceae).	Cordianhídrido B. Anhídrido derivado de ácidos grasos.	Antifúngico. Activo contra <i>Mucor miehei</i> . Tóxico para <i>Artemia salina</i> Insecticida. Contra el lepidóptero <i>Choristoneura fumiferana</i> .

<i>Pestalotiopsis fici</i> (Amphisphaeriaceae). Endófito de un árbol no identificado colectado en Hangzhou, República Popular China.	Pestalofona C. Dímero policétido prenilado	Antifúngico. Contra <i>Candida albicans</i> , <i>Geotrichum candidum</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Phoma</i> sp. (Incertae sedis). Endófito de <i>Costus</i> sp. (Costaceae)	Formaxantona A. Dímero de xantona policétida	Antifúngico. Contra <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> y <i>Ustilago violacea</i> .

(Sánchez-Fernández et al., 2013)

4.3 Correlación microorganismo endofítico-planta

La interacción microorganismo endofítico-planta puede ser tanto positiva como negativa. Dependiendo del tipo de asociación los dos organismos generan metabolitos altamente tóxicos; en primer lugar, el microorganismo desarrolla exoenzimas y metabolitos que atacan la planta, por otro lado, la planta genera defensas (García et al., 2015). Entonces, si se establece un antagonismo equilibrado ambos organismos pueden perdurar, constituyéndose así algunas de las siguientes interacciones:

4.3.1 Mutualismo

Es un tipo interacción entre dos especies que benefician a ambos, su influencia trasciende los niveles de organización biológica donde se piensa que todas las especies están involucradas directa o indirectamente en una o más de estas interacciones. Los mutualismos son esenciales para la reproducción y supervivencia de prácticamente todos los organismos, así como a los ciclos de nutrientes en los ecosistemas (Powell & Klironomos, 2007).

4.3.2 Simbiosis

En 1878, Heinrich Anton de Bary (1831-1888) definió la simbiosis como un tipo de mutualismo siendo una interacción co-dependiente entre dos organismos en la que todos se benefician. El primer trabajo que involucró la simbiosis entre plantas y microorganismos lo desarrolló Pierre Mazé (1868-1947) cuando aisló las bacterias de los nódulos de leguminosas en el Instituto Pasteur demostrando que contribuyen a la adquisición de nitrógeno del medio en el cual habitan (Duperron, 2017). Adicionalmente, las plantas proveen a su simbionte con carbono fotosintético y ésta recibe a cambio un recurso limitante, por ejemplo, (nutrientes o agua) o protección contra antagonistas (Powell & Klironomos, 2007).

4.4 Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs)

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son compuestos de baja masa molecular, estructuralmente están constituidos de carbono, polaridad baja y alta volatilidad (Arrarte et al., 2017). Los COVs son generados por todos los organismos como resultado de su metabolismo, normalmente desempeñan roles importantes en la comunicación entre organismos, por ejemplo, en las plantas actúan como mecanismo de defensa frente patógenos, mediando la comunicación planta-planta y planta-insectos (Parafati et al., 2016; Materic et al., 2015). También, están relacionados a una gama de microorganismos, incluyendo bacterias, mohos y levaduras, implicados en las interacciones microbianas efectuando el llamado “Quorum sensing”, además, pueden presentar actividad antimicrobiana (Morath et al., 2012), Hushna et al. (2013) destacan a los organismos fúngicos por generar una variedad de COVs, los cuales vienen siendo estudiados con fines biotecnológicos.

Técnicas como la microextracción en fase sólida ayudan en el proceso de extracción analítica de los COVs en plantas y organismos fúngicos, tales como los reportados por Batista, Fialho, Marcio & Pedroso (2010), donde predominan los grupos químicos de tipo alcohol (etanol, 3-metil-1-butanol, 2-79 metil-1-butanol, 2-80 feniletanol), ésteres (acetato de etilo, octanoato de etilo) y aldehídos (2-81 metil-2-hexenal y 2-isopropil-5-metil-2-hexenal), en las plantas también es desarrollado mediante procesos analíticos para el análisis de pequeñas cantidades de gases, usando normalmente técnicas como cromatografía de gases y la espectrometría de masas por ionización (Materic et al., 2015). Babikova, Zdenka & Caulfield (2013) especifican compuestos COVs como el salicilato de metilo, ácido jasmónico y éster metílico, los cuales son importantes para la respuesta de las plantas a otros organismos, en cambio, el isopreno, monoterpenos, y sesquiterpenos (por ejemplo, isoprenoides, terpenoides) son relevantes como parte de la química de las plantas frente al cambio climático.

Cabe destacar que, la mayoría de los estudios de evaluación de compuestos orgánicos volátiles en plantas se centra en la asociación de estas con cepas antagonistas fúngicas, bacterianas y levaduriformes; que en su gran mayoría son patógenas para los hospederos, tales como los trabajos descritos por (Arrarte et al., 2017; Francesco et al., 2014; Hernández-León et al., 2014; Parafati et al., 2016; Raza et al., 2015). No se reportan estudios de los COVs en plantas, ni planta-microorganismos asociados a la familia Gesneriaceae, lo cual abre nuevas perspectivas para su estudio.

5. Metodología

5.1 Selección de la especie vegetal

Sinningia magnifica (Gesneriaceae) fue colectada en São Bento do Sapucaí, estado de São Paulo, Brasil. Esta especie fue plantada y cultivada en invernadero agrícola y en cultivos *in vitro* del DBV-IB-UNICAMP por el grupo de investigación del Prof. Dr. Marcos José Salvador para ser utilizadas en los diferentes proyectos de investigación. La identificación botánica fue realizada por el profesor Jorge Y. Tamashiro (IB-UNICAMP) y un espécimen de referencia se encuentra depositada en el herbario del IB-UNICAMP.

5.2 Obtención de las plántulas de *S. magnifica*

Las plantas de *S. magnifica* fueron sometidas a estimulación de producción de sus frutos, después de la producción de los frutos, éstos fueron limpiados y desinfectados superficialmente para la obtención de las semillas. Las semillas se inocularon en el medio de cultivo MS, constituido por disolución de sales básicas (Murashige & Skoog, 1962) en agua destilada y desionizada, con adición de carbón activado como antioxidante, el pH fue ajustado a $6,0 \pm 0,1$ con solución de NaOH 1M, y Phytigel a 0,3% para obtener el medio de cultivo semisólido. Las plántulas se mantuvieron a 25 ± 2 °C.

5.3 Selección de las cepas de microorganismos endofíticos cultivables

Las superficies de las hojas sanas de *S. magnifica*, (n=5 plantas y de 1 a 2 gramos de hojas por planta) fueron sometidas a asepsia superficial para evitar contaminantes. Se realizaron cortes en las hojas para estimular el crecimiento de los microorganismos endofíticos, utilizando medios de cultivo específicos para la proliferación de bacterias y hongos. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante una semana. Se obtuvieron 14 cepas en total, donde se estabilizaron en el laboratorio ocho microorganismos (SM2, SM3, SM8, SM9) y (SM4, SM6, SM24-2, SMHN) correspondientes a bacterias y hongos filamentosos, respectivamente. El crecimiento de los microorganismos endofíticos fue monitoreado y las cepas axénicas fueron conservadas en glicerol 30% a temperaturas de -80 °C.

5.4 Determinación de la diversidad de microorganismos endofíticos

5.4.1 Caracterización macroscópica y microscópica hongos filamentosos cultivables

La caracterización morfológica se realizó utilizando el proceso clásico para identificar hongos filamentosos, mediante la combinación de características micro y macromorfológicas. En la caracterización macroscópica la inoculación de las cepas fúngicas se realizó por una única punción en los medios de cultivo sólidos SNA, Czapeck, MEA, PDA, Sabouraud-Dextrosa y OA e incubados a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 7 días, siguiendo los trabajos realizados por Bensch et al. (2012); Frisvad & Samson (2004), destacando forma, diámetro de crecimiento, color, pigmentación en el medio y textura. Para la caracterización microscópica fue utilizado el método de la cinta adhesiva transparente, además, se utilizó la técnica de microcultivo con los medios de cultivo Sabouraud y PDA, las placas fueron observadas en un microscopio óptico de fluorescencia ZEISS AXIO IMAGER A1 usando un aumento de 100X.

5.4.2 Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias cultivables

La caracterización morfológica de las bacterias endofíticas se realizó utilizando las características macro y micro-morfológicas. En la caracterización macroscópica el procedimiento de análisis consistió en una descripción de las características morfológicas (color, tamaño, textura) de las colonias en los medios de cultivo: Agar Nutritivo (AN), International Project *Streptomyces* medium 2 (ISP2) y agar Czapek Dox en condiciones de crecimiento de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 48/72 horas. Mientras que, para la caracterización microscópica fue utilizado el método de tinción de Gram (Stach et al., 2003).

5.4.3 Caracterización genética de las cepas de microorganismos endofíticos

Se realizó en el laboratorio de biología molecular del Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas y Agrícolas (CPQBA)-UNICAMP.

5.4.3.1 Extracción y cuantificación de ADN genómico

Las cepas bacterianas y hongos filamentosos, fueron reactivadas en medio Agar Nutritivo y Sabouraud-Dextrosa, e incubadas a 25°C / 48 h y 5 días, respectivamente. La extracción de ADN genómico fue realizada empleando los protocolos establecidos por Van Soolingen et al. (1991) para las bacterias & O'Donnell et al. (1997) para hongos. La cuantificación se hizo mediante la comparación del ADN λ en gel de agarosa a 1% TBE 1X, sometido a

electroforesis por 30 min en condición de 5V/cm. Después de su cuantificación, los ADN se mantuvieron a una temperatura de 4°C.

5.4.3.2 Secuenciación y análisis filogenético

Fueron amplificados por la técnica de PCR, el gen ARN ribosomal 16S completo para bacterias y las regiones ITS1 posiciones entre 1761-1779 y ITS4 posiciones 2390-2409 (Bellemain et al., 2010) para hongos filamentosos, utilizando los primers homólogos a sus extremidades conservadas, según lo descrito por Lane et al. (1985); White et al. (1990) y Turner et al. (1999) (ver tabla 3).

Tabla 3. Iniciadores utilizados para la reacción de PCR

Primer	Secuencia (5' → 3')	Concentración	Fabricante	Referencia
10f	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	500 µM	Invitrogen	(Lane D. J., 1991)
1100r	AGGGTTGCGCTCGTTG	300 µM	Sintetizado	(Turner et al., 1999)
1525r	AAGGAGGTGATCCAGCC	20 µM	Sintetizado	(Lane D. J., 1991)
1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	300 µM	Sintetizado	(Lane D. J., 1991)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	20 µM	--	(White, et al., 1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20 µM	--	(White, et al., 1990)

Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados utilizando mini-columnas (GFX PCR DNA & gel band purification kit, GE Health Care) y sometidos a secuenciación en el secuenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación se realizaron con el kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit para MegaBace DNA Analysis Systems (GE Health Care).

Las secuencias obtenidas fueron procesadas en el programa Bioedit versión 7.2.5 Windows (Hall, 1999) para el montaje de los contigs. Las secuencias con 1000 pb o más fueron sometidas a la comparación en los bancos de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y Ribosomal Data Project II 9.0 (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) y EZTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/>). Las secuencias similares recuperadas de las bases de datos se alinearon en el programa CLUSTAL W (Thompson et al. 1997), editadas en Bioedit (Hall, 1999).

5.5 Condiciones de crecimiento de los microorganismos endofíticos cultivables

Fue evaluado el crecimiento de hongos y bacterias endofíticas, haciendo uso de diferentes medios cultivo.

5.5.1 Comportamiento de hongos endofíticos en medios de cultivo

Los hongos fueron cultivados en agar Sabouraud-Dextrosa a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 7 días. A partir de las colonias se prepararon suspensiones de esporas en solución NT a una concentración de 1×10^5 esporas/mL; de cada suspensión de esporas fue tomado $10\text{ }\mu\text{L}$ y añadidos en microtubos de $1,5\text{ mL}$ conteniendo $990\text{ }\mu\text{L}$ de los medios de cultivo líquido MS y caldo Sabouraud-Dextrosa, obteniendo así una concentración final de 1×10^3 esporas/mL. Las condiciones de crecimiento fueron de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante /15 días, datos tomados por duplicado. A lo largo del tiempo, se llevaron a cabo etapas de centrifugación y lavados con agua destilada, separando el medio líquido. Posteriormente, la biomasa fue secada aproximadamente a $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24h, luego, se pesó en una balanza analítica, realizando los análisis correspondientes (Hernández-Tasco, 2016).

5.5.2. Comportamiento de bacterias endofíticas en medios de cultivo

Las bacterias se cultivaron en agar nutritivo a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 48-72 horas, las colonias fueron utilizadas para preparar una suspensión a 60 UNT (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ o 0,5 escala Macfarland) en solución salina al 0,9%, haciendo uso del turbidímetro Martini Instruments Mi 415. Las condiciones de crecimiento fueron de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ en los medios líquidos ISP2 y MS, por triplicado. A lo largo del tiempo, la concentración de bacterias fue medida por absorbancia con lectura a 620 nm, durante 60 horas en intervalos de 1 hora, utilizando el lector de microplacas BioTek Synergy 2 (Hernández-Tasco, 2016).

5.6. Co-cultivos entre microorganismos endofíticos cultivables y plántulas de *S. magnifica*

Se realizó un diseño experimental de los microorganismos endofíticos con las plantas de *S. magnifica* (ver anexo 2). El análisis de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) por co-cultivos entre los microorganismos endofíticos cultivables y las plántulas fueron realizados empleando la metodología descrita por Smedsgaard (1997), con modificaciones. Para ello, se emplearon las condiciones de cultivo utilizadas para el cultivo de las plántulas *in vitro* en el medio MS y los microorganismos endofíticos que se aislaron de *S. magnifica*. Los co-cultivos se realizaron inoculando $250\text{ }\mu\text{L}$ de suspensiones finales de bacterias (1×10^4 bacterias/ml), hongos (1×10^3 esporas/ml), mezcla (mix) bacteria-hongo, según el caso, sobre los tejidos foliares de las plantas, las cuales fueron incubadas y evaluadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 días.

5.7. Análisis de COVs en los co-cultivos por Cromatografía de gases desorción térmica, acoplada a espectrometría de masas (TD-CG/MS)

Para evaluar el efecto en la modulación en el perfil químico de los metabolitos secundarios en los co-cultivos, se utilizó la técnica de cromatografía de gases desorción térmica acoplada a espectrometría de masas (TD-GC/MS), siguiendo la metodología descrita por Materic et al. (2015) con modificaciones se determinaron las condiciones cromatográficas. Para el espectrómetro de masas se siguieron los siguientes parámetros: temperatura fuente Ion: 280°C; temperatura interface: 280°C; rango de masas: 40-1000 *m/z*. En cromatografía fueron las siguientes: presión: 11,1 Kpa; flujo total: 2,3 mL/min; flujo columna: 1,58 mL/min; velocidad linear: 45,0 cm/sec, seguidamente en la tabla 4 se describen las condiciones térmicas y los tiempos usadas en la cromatografía.

Las muestras fueron sometidas a la técnica de micro-extracción en fase sólida haciendo uso de una columna capilar Supelco SPME Fiber Holder, bajo la temperatura 30°C/20 min (baño maria). Pasado el tiempo de extracción, la columna se inyectó al GC/MS para efectuar la cromatografía, por un periodo total de 30 minutos.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para análisis en GC/MS.

	Rate	Temperatura Final (°C)	Tiempo de Retención (min)
0	-	30.0	2.50
1	15.00	150.0	5.00
2	11.00	250.0	5.00

5.8 Obtención de extractos a partir de los co-cultivos

Para la obtención de los extractos brutos, los tejidos foliares de las plantas provenientes de los co-cultivos se maceraron con metanol y expuestos por 30 minutos en ultrasonido, posteriormente, se filtró y se llevó a secado por 65°C/30 minutos (Hernández-Tasco, 2016).

5.9 Ensayos para evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana a partir de los extractos de los co-cultivos

5.9.1 Ensayo para la determinación de la actividad antioxidante por ORAC-FL

La capacidad antioxidante de los extractos fue medida utilizando el ensayo ORAC-FL con fluoresceína como sonda fluorescente y AAPH (2,2'-Azobis (2-amidopropane) dihydrochloride) como fuente de radical libre (Prior et al., 2003; Wu et al., 2004). Los análisis se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita por Salvador et al. (2006). Se prepararon soluciones stock de los extractos (1 mg/mL) en buffer fosfato/DMSO (99:1, v/v) y diluidas 100, 500, 1000, 5000 y 10.000 veces con buffer fosfato. Se utilizó Trolox (sustancia de referencia (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)-análogo de la vitamina E) como patrón y fue analizado en concentraciones de 12,5; 25; 50; 100 y 200 μM . La lectura se realizó con ayuda de un filtro fluorescente (excitación $\lambda= 485 \text{ nm}$ y emisión $\lambda=528 \text{ nm}$) en un lector de microplacas BioTek Synergy 2. La cinética de la reacción fue monitoreada cada 2 minutos durante un tiempo de 70 minutos (temperatura 37°C). Los resultados se expresaron en μmol de Trolox equivalente (TE) por gramo de extracto o fracción en base seca (μmol de TE/g) (Hernández-Tasco, 2016).

5.9.2 Determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución

La determinación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo frente a bacterias (gram-positivas y gram-negativas) y levaduras. Se utilizaron las siguientes cepas, gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella entérica*-Typhimurium cepa de la colección del laboratorio de microbiología de la facultad de ciencias farmacéuticas de la universidad de São Paulo, sede Riberão Preto (FCFRP/USP), gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 14458, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. Las bacterias fueron incubadas a 37°C durante 24 horas en Agar Müller Hinton (Difco)-MHb. Para determinar la actividad antifúngica frente a levaduras, se utilizaron las siguientes cepas: *Candida albicans* ATCC 10321 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019; cultivadas a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas en agar Sabouraud-Dextrosa. Todas las cepas fueron mantenidas como cultivos puros en el laboratorio de Fisiología Vegetal BV/IB/UNICAMP del grupo de investigación del profesor Dr. Marcos José Salvador.

El ensayo antimicrobiano se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por la ANVISA (2008). En cada pozo se agregaron 100 μL de medio de cultivo

líquido Müller Hinton (Difco)-MHb + 10 μ L de inóculo bacteriano ($1,5 \times 10^8$ bacterias/mL, diluido en 1/20) y 100 μ L de la solución de los extractos brutos previamente preparadas (2mg de extracto bruto + 50 μ L de propilenglicol + 950 de agua destilada estéril), concentración final de 1mg/mL de extracto bruto. Para las levaduras en cada pozo se agregaron 100 μ L de medio de cultivo líquido RPMI mezcladas con el inóculo (1×10^6 células/mL, diluido en 1/70, usando el medio de cultivo líquido para la dilución) y 100 μ L de la solución de los extractos brutos previamente preparadas (misma solución usadas en el ensayo bacteriano). Se usó como control positivo para las bacterias, cloranfenicol (1 mg/mL) y para las levaduras fluconazol (1mg/mL) y como control negativo propilenglicol estéril y agua destilada estéril (0.5:9.5 v/v). Posteriormente, las placas se llevaron a incubación a $37 \pm 2^\circ\text{C}/24$ horas para las bacterias y $37 \pm 2^\circ\text{C}/48$ horas para las levaduras. Para comprobar la inhibición del crecimiento microbiano, se adicionó a cada pozo 10 μ L de solución de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (MTT) el cual permite determinar la actividad respiratoria asociada a una cadena transportadora de electrones ya que en su forma reducida da lugar a un complejo de color morado (Okeke et al., 2001). Las placas fueron incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2-4 horas y se realizó una lectura en espectrofotómetro a 620 nm (bacterias) y 570 nm (levaduras) con el fin de corroborar los datos cuantitativamente en términos de absorbancia (Okeke et al., 2001; Salvador et al., 2002; 2003; Hernández-Tasco, 2016).

6. Análisis estadístico

Para cada uno de los experimentos se utilizará el test estadístico más adecuado (ANOVA, Wilcoxon, prueba de Tukey, prueba t de Student, entre otros) y / o métodos quimiométricos (análisis de agrupamiento por similitud y componentes principales). Los resultados deberán presentarse como media, desviación estándar y (coeficiente de variación, %CV).

7. Cronograma de Actividades

El proyecto presentado deberá ser completado en 4 meses (Tabla 5). Las revisiones bibliográficas con base a este proyecto de investigación se efectuarán durante todo el período. También, se destacan actividades extracurriculares desarrolladas por el autor.

Tabla 5. Cronograma de actividades estipuladas en la ejecución del proyecto de investigación

Actividad	Agosto					Septiembre				Octubre				Noviembre				Dic	
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
Revisión bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Activación de cepas y caracterización de los microorganismos endofíticos	■	■	■	■	■	■	■					■	■	■	■	■	■		
Determinación de condiciones de crecimiento de las cepas endofíticas						■	■	■	■										
Co-cultivos y análisis cromatográficos						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
Evaluación de las actividades antioxidante y antimicrobiana														■	■	■	■		
Cursar disciplinas, participación de eventos científicos y sustentación del trabajo de grado.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

8. Resultados

Este trabajo aborda diferentes temas: diversidad microbiana, co-cultivos y análisis químico. De modo que, se realizó un estudio interdisciplinario, que busca entender el grado de interacción endofítica entre los microorganismos cultivables asociados a *S. magnifica* y la planta, con el propósito de investigar el potencial metabólico para encontrar sustancias bioactivas. Los resultados obtenidos se describen, a continuación:

8.1 Caracterización fenotípica y genotípica de los microorganismos endofíticos aislados

Para la caracterización macroscópica se describen características como: color (anverso y reverso), tamaño, forma, textura, producción de exudados y/o producción de exopigmentos, entre otras características. Mientras que, las características microscópicas describen el conidióforo, coloración de las hifas, presencia o ausencia de septos, posición de las conidias o esporas. Por último, los análisis genéticos describen el grado de relación de la cepa en estudio con los resultados obtenidos en las bases de datos.

8.1.1 Hongos filamentosos

Las cepas SM4, SM6, SM24-2 y SMHN correspondientes a hongos mostraron los siguientes resultados:

La cepa SM4 presenta tonalidades verdes-amarillas y grises-blancas en el anverso, mientras que en el reverso las coloraciones son aquellas de tipo marrón-negro (Ver Figura 3). En cada uno de los medios de cultivo los diámetros de las colonias no sobrepasan los 25 mm, a excepción en el medio OA donde alcanzó 32 mm. Asimismo, las colonias son circulares, margen entero, con textura algodonosa, y aterciopelada en los medios PDA y Sabouraud-Dextrosa. Las micro morfologías obtenidas mostraron conidióforos con superficie rugosa, hialina a pigmentada, hifas septadas, triverticiliada, fiálides cilíndricas cortas y conidias elipsoides o cilíndricas en cadena corta, algunas con forma de escudo debido a las cicatrices coronales de unión entre ellos (ver Figura 7-A). Por otra parte, el análisis genético de la secuencia de las regiones ITS1 e ITS4 (553 pb) del hongo endofítico SM4, indica que corresponde al género *Cladosporium* sp, siendo posiblemente algunas de las siguientes especies: *C. tenuissimum* y/o *C. cladosporioides* con un porcentaje de identidad y similaridad de un 100%.

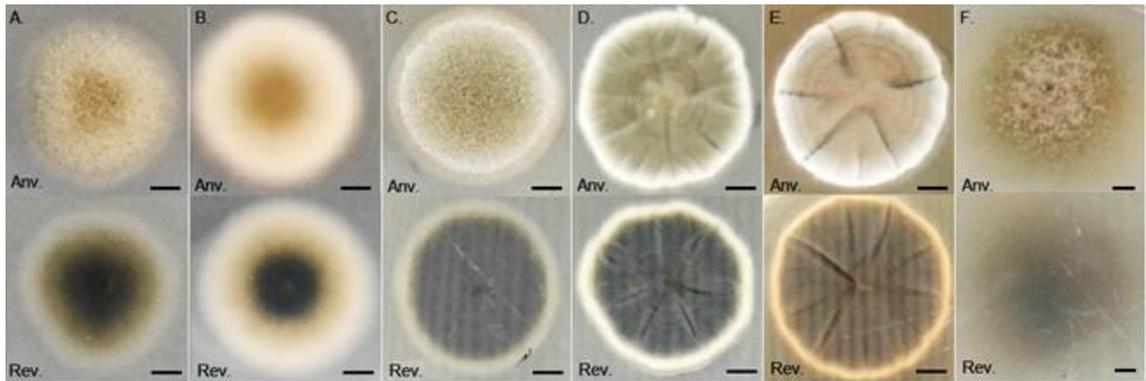


Figura 3. Macro morfología del hongo endofítico SM4 en diferentes medios de cultivo. A. SNA, B. Czapeck, C. MEA, D. PDA, E. Sabouraud-Dextrosa, F. OA. Tamaño de barra 5 mm. Anverso (Anv), Reverso (Rev).

La cepa SM6 al igual que la cepa SM4, presentan similitudes morfológicas con algunas variaciones, esto se puede observar en la Figura 4, en la mayoría de los medios presenta coloración verde-amarillo en el anverso y marrón en el reservo. Las colonias tienen un diámetro entre 17-23 mm, siendo de tipo circulares, filamentosas e irregulares, además, presentan algunas elevaciones de tipo Umbonado. Las micro morfologías obtenidas mostraron conidióforos laterales y terminales, hifas septadas irregulares y pigmentadas, fiálides cilíndricas largas y conidias ovaladas en cadena (ver Figura 7-B). La base de datos, a partir de la secuencia de las regiones ITS1 e ITS4 (555 pb) indica que corresponde al género *Cladosporium* sp., específicamente a las especies *C. halotolerans* y/o *C. sphaerospermum* con identidades y similaridad del 99%.

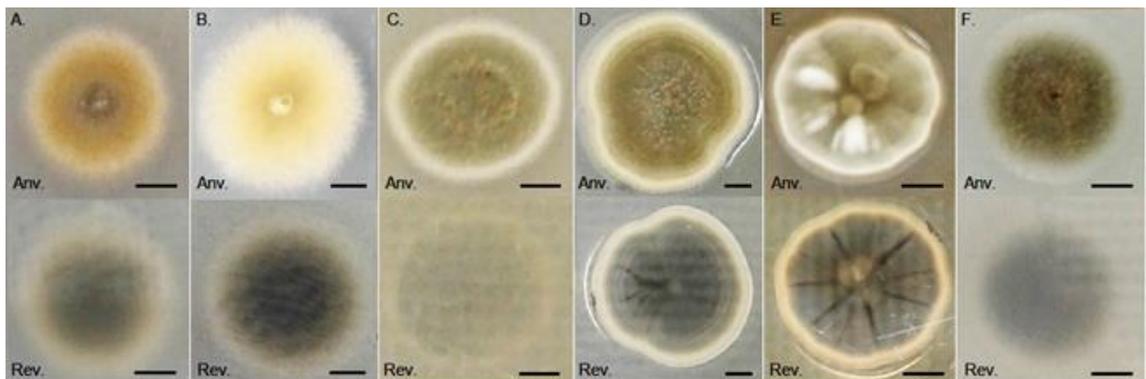


Figura 4. Macro morfología del hongo endofítico SM6 en diferentes medios de cultivo. A. SNA, B. Czapeck, C. MEA, D. PDA, E. Sabouraud-Dextrosa, F. OA. Tamaño de barra 5 mm. Anverso (Anv), Reverso (Rev).

La cepa SM24-2 en los medios de cultivo presenta tonalidades negras-marrón tanto en el anverso y reverso, no obstante, en el medio Sabouraud-Dextrosa se observaron coloraciones grises y blancas, además, de la producción de exopigmentación en el medio amarillo-anaranjado. Las colonias se destacan por ser filamentosas y planas, con diámetros entre 40-55 mm como se evidencia en la Figura 5. Micro morfológicamente, las colonias mostraron conidióforos geniculados soportados por hifas septadas dematiáceas pigmentadas, presenta conidias curvadas, con 3 a 4 septos transversales (ver Figura 7-C), los resultados genotípicos utilizando la secuencia de las regiones ITS (521 pb), indican que la cepa en mención corresponde a alguno de los siguientes géneros: *Curvularia* sp., *Cochliobolus* sp. y *Articulospora* sp., todas con identidades del 99%.

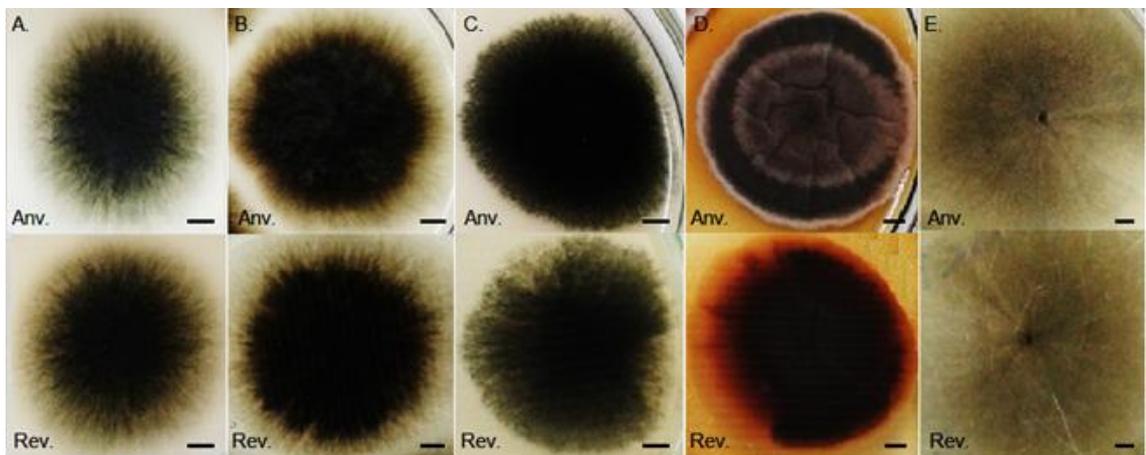


Figura 5. Macro morfología del hongo endofítico SM24-2 en diferentes medios de cultivo. A. SNA, B. Czapeck, C. MEA, D. Sabouraud-Dextrosa, E. OA. Tamaño de barra 5 mm. Anverso (Anv), Reverso (Rev).

Por otra parte, la cepa SMHN, en todos los medios de cultivo se caracteriza por crecer con coloraciones negras tanto en el anverso como en el reverso, las colonias son cremosas, con elevaciones, asimismo, es de crecimiento lento alcanzando diámetros de 5 mm (ver Figura 6). Microscópicamente, se presentan como conidios unicelulares de color marrón con centro característico de color oscuro, pudiéndose producir brotes, (ver Figura 7-D), cabe resaltar que, este microorganismo es de tipo dimórfico. El análisis genético de las regiones ITS utilizando (549 pb), demostró que corresponde al género *Hortaea* sp., con una identidad y similitud del 99%.

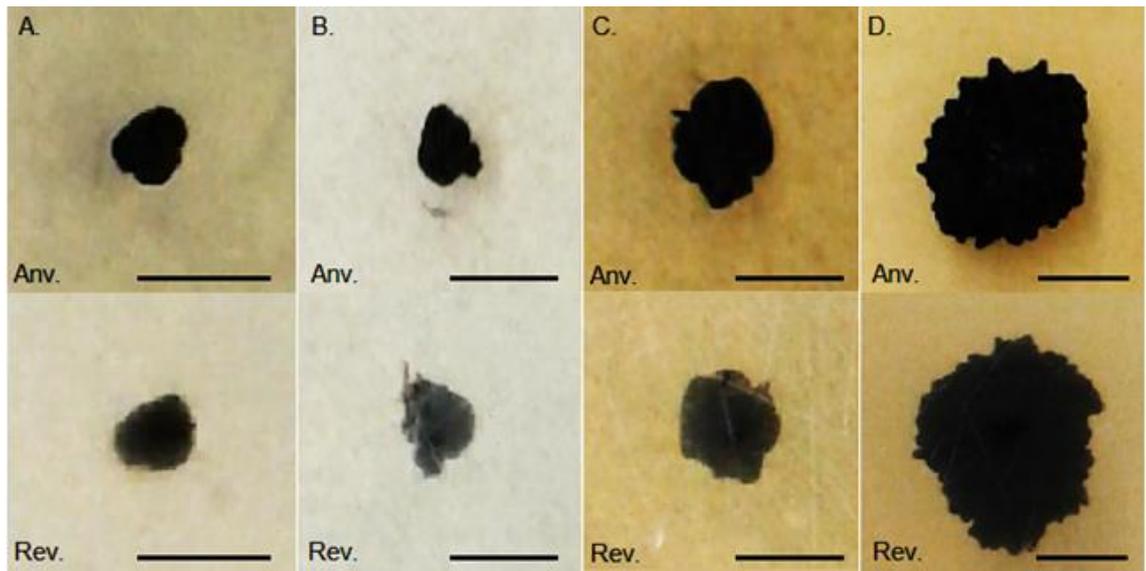


Figura 6. Macro morfología del hongo endofítico SMHN en diferentes medios de cultivo. A. Czapeck, B. MEA, C. PDA, D. Sabouraud-Dextrosa. Tamaño de barra 5 mm. Anverso (Anv), Reverso (Rev).

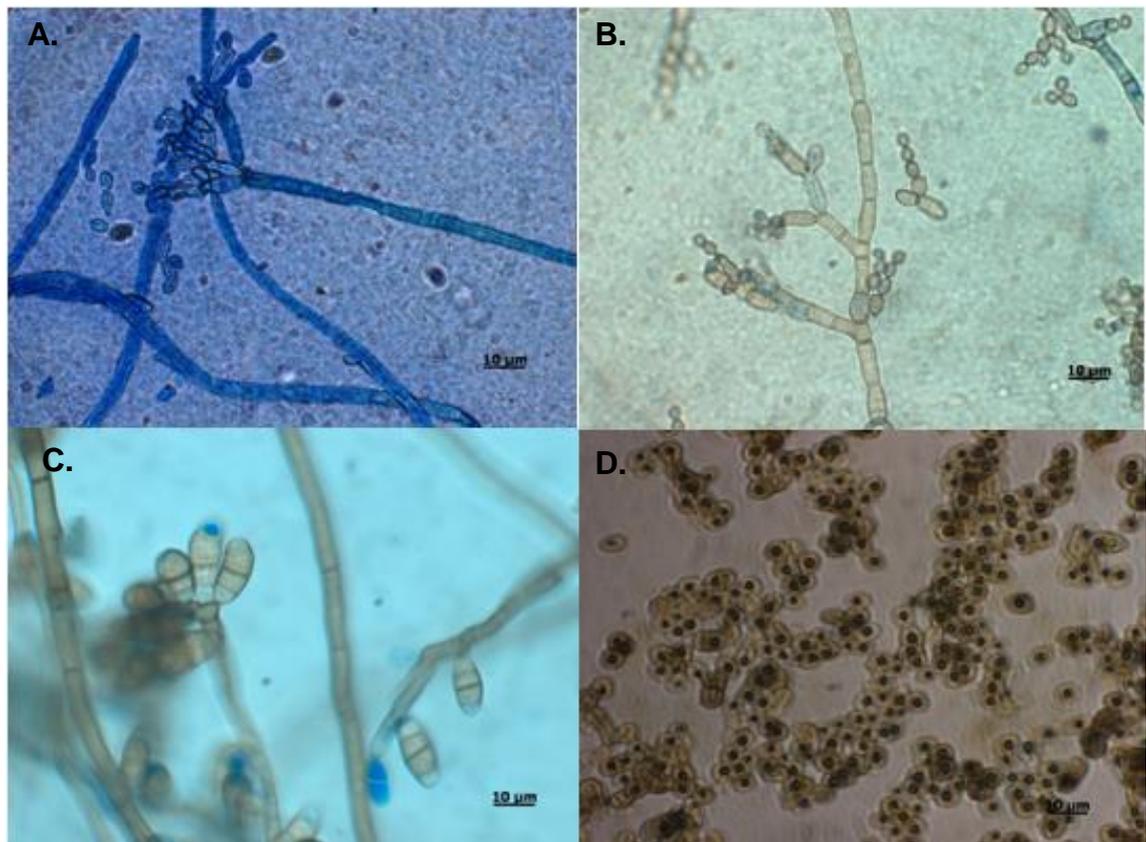


Figura 7. Micro morfologías cepas de hongos filamentosos endofíticos aislados a partir de *S. magnifica*, A. SM4, B. SM6, C. SM24-2, D. SMHN. Tamaño de barra de 10 μ m.

8.1.2 Bacterias

Las cepas SM2, SM3, SM8 y SM9 correspondientes a bacterias mostraron los siguientes resultados:

La cepa SM2, presenta colonias puntiformes rojas a rosadas (dependiendo del medio de cultivo), circulares, margen entera y cremosas (ver Figura 8 A-C), microscópicamente se evidenciaron bacilos alargados con extremos puntiformes, aparentemente no existe diferenciación de coloración, sin embargo, después de realizar la técnica de hidróxido de potasio (KOH 10%) confirmó bacilos grampositivos (ver figura 9-A). Después de realizar el análisis genotípico, el resultado obtenido de la comparación del gen parcial (1021 pb) para la bacteria SM2 con la base de datos, mostraron que esta cepa pertenece al género *Methylobacterium* sp., posiblemente las especies *M. aquaticum*, *M. indicum* y *M. platani*, con identidades del 91%.

Asimismo, la cepa SM3 posee características muy cercanas a la cepa SM2, presentando colonias puntiformes de color rosado pálido, circulares, margen entera, planas y cremosas (ver Figura 8 D-F), microscópicamente se observaron bacilos alargados gramnegativos (ver Figura 9-B); el análisis genético (994 pb) confirmó que corresponde al género *Methylobacterium* sp., siendo específicamente *Methylobacterium adhaesivum* y *M. goesingense* con identidades del 97% para ambos acervos.

En tanto, la cepa SM8 presenta colonias blancas a beige (dependiendo del medio de cultivo), brillantes, circulares, tamaño mediano, margen entera, convexas y textura cremosa (ver Figura 8 G-I). En la microscopia, se observaron bacilos cortos gram-negativos (ver Figura 9-C). El análisis genético del gen RNA 16S (1119 pb) sugiere que esta cepa pertenece al género *Stenotrophomonas* sp., siendo específicamente *Stenotrophomonas maltophilia*, con identidad del 89%.

Por último, la cepa SM9 muestra colonias anaranjadas rugosas en medio agar nutritivo, amarillas (ISP2) y beige (Czapeck Dox), circulares, tamaño grande, brillantes, convexas, margen entero y textura viscosa que varía dependiendo del medio (ver Figura 8 J-L). Microscópicamente, presentan bacilos cortos gramnegativos (ver figura 9-D).

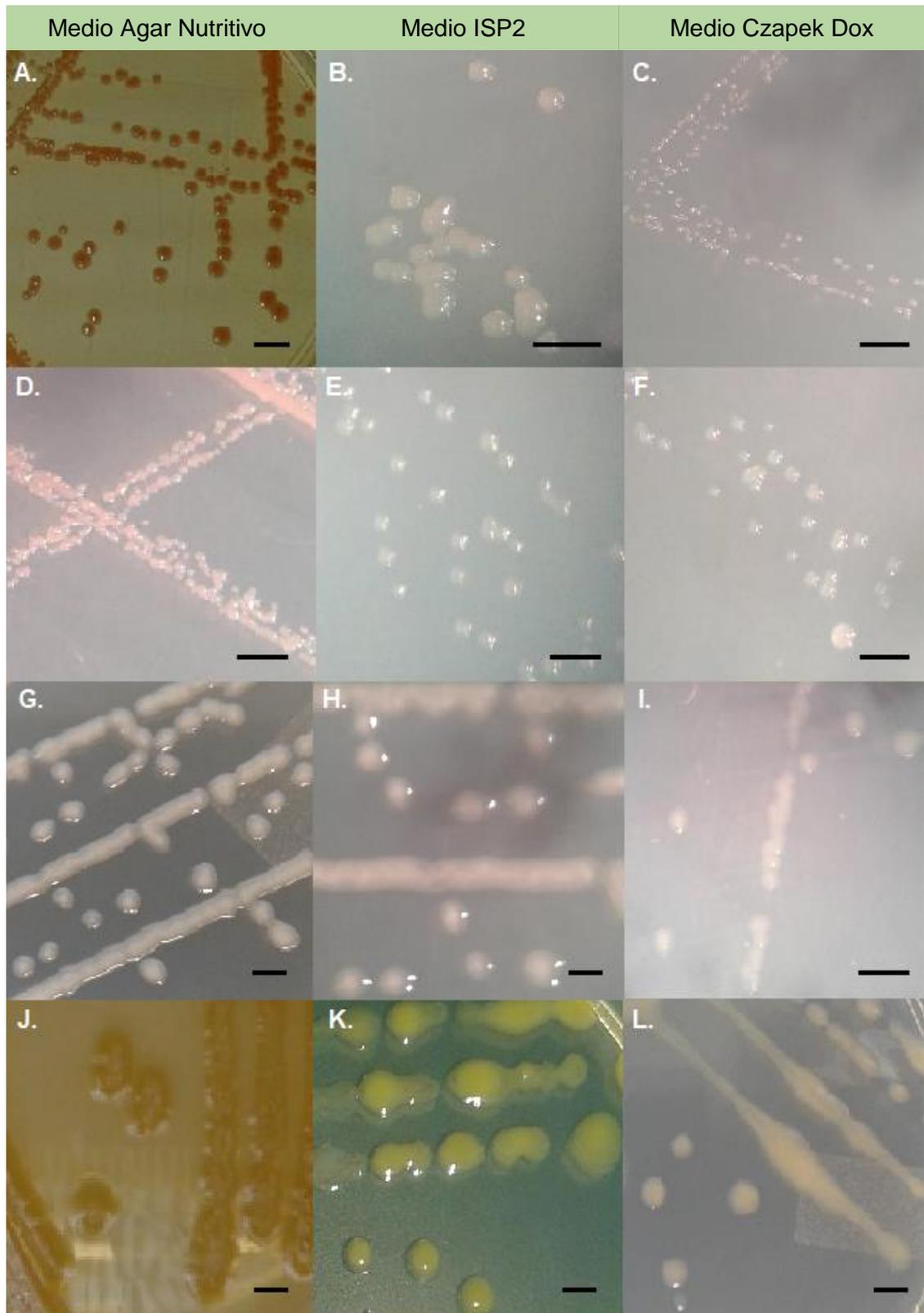


Figura 8. Macro morfología de las cepas bacterianas endofíticas en diferentes medios de cultivo. **A-C.** Cepa SM2; **D-F.** Cepa SM3; **G-I.** Cepa SM8; **J-L.** Cepa SM9. Tamaño de barra 5 mm.

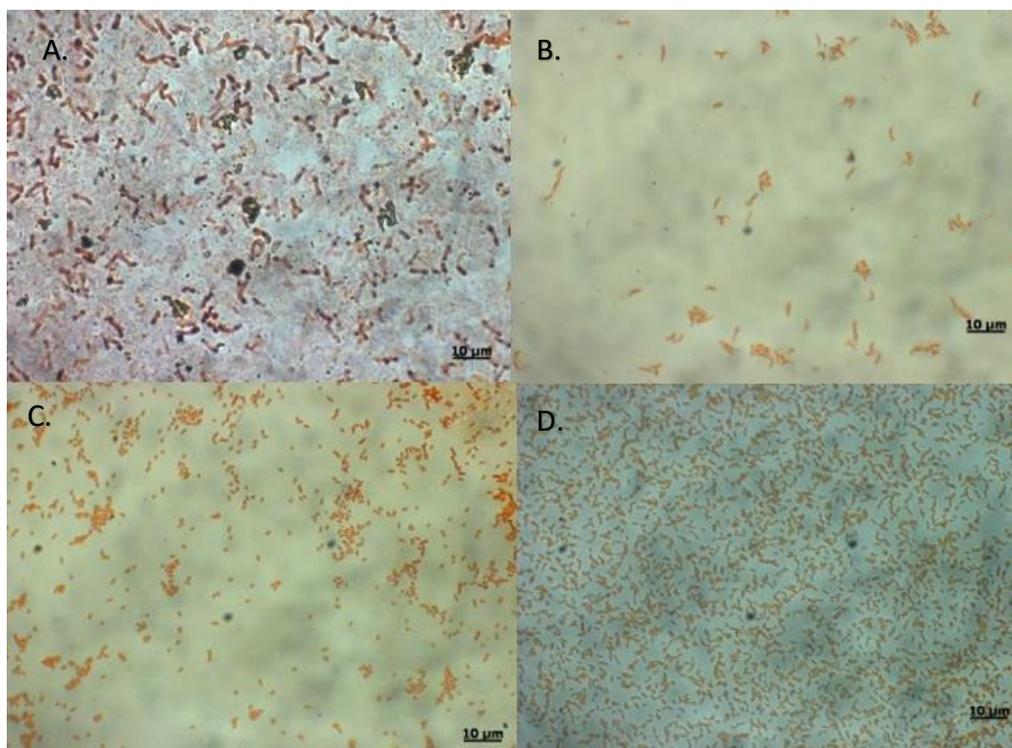
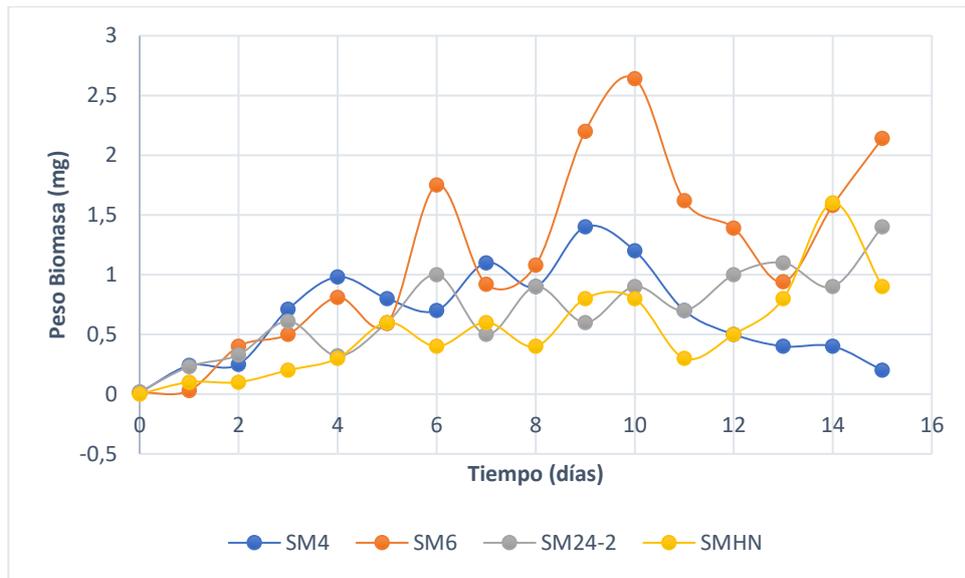


Figura 9. Micro morfologías cepas bacterianas endofíticas aisladas a partir de *S. magnifica*, A. SM2, B. SM3, C. SM8, D. SM9. Tamaño de barra de 10 µm.

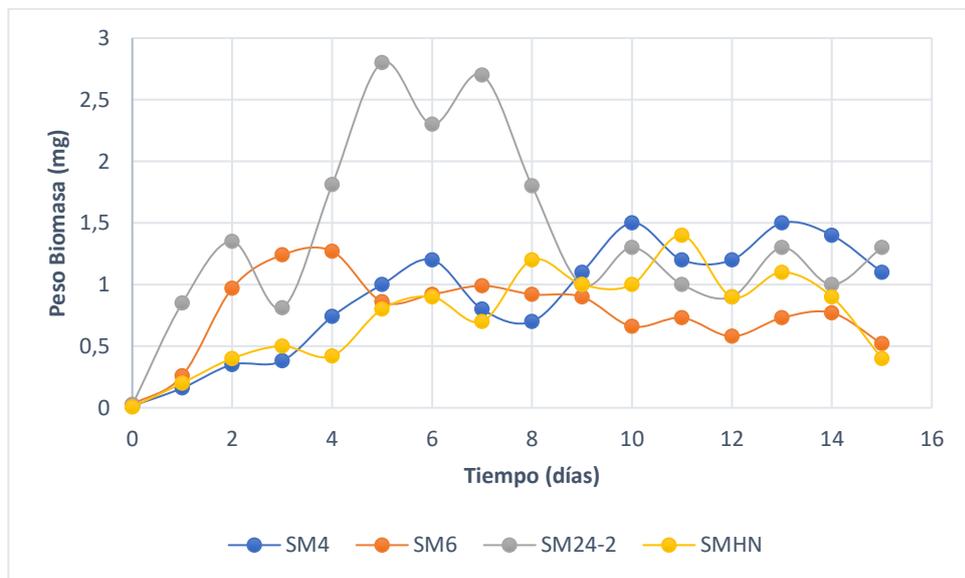
8.2 Condiciones de crecimiento de los microorganismos endofíticos cultivables

8.2.1 Comportamiento de Hongos Filamentosos

El comportamiento del crecimiento de las cepas fúngicas endofíticas cultivables (SM4, SM6, SM24-2, SMHN) fue realizada analizando la biomasa generada en un periodo de 15 días. El crecimiento es representado en peso seco (mg) en función del tiempo en (días), como se evidencia en las gráficas 1 (medio líquido MS) y grafica 2 (caldo Sabouraud-Dextrosa). La cantidad de inóculo inicial fue de 10 µL a una concentración de $1,0 \times 10^5$ esporas/mL de las cepas mencionadas anteriormente, en 990 µL de los medios de cultivo líquido MS y caldo Sabouraud-Dextrosa; los resultados obtenidos se expresan como la media (\bar{X}) de dos replicas realizadas (ver anexo 4).



Gráfica 1. Curva de crecimiento de las cepas fúngicas endofíticas en medio de cultivo líquido MS.



Gráfica 2. Curva de crecimiento de las cepas fúngicas endofíticas en medio de cultivo caldo Sabouraud-Dextrosa.

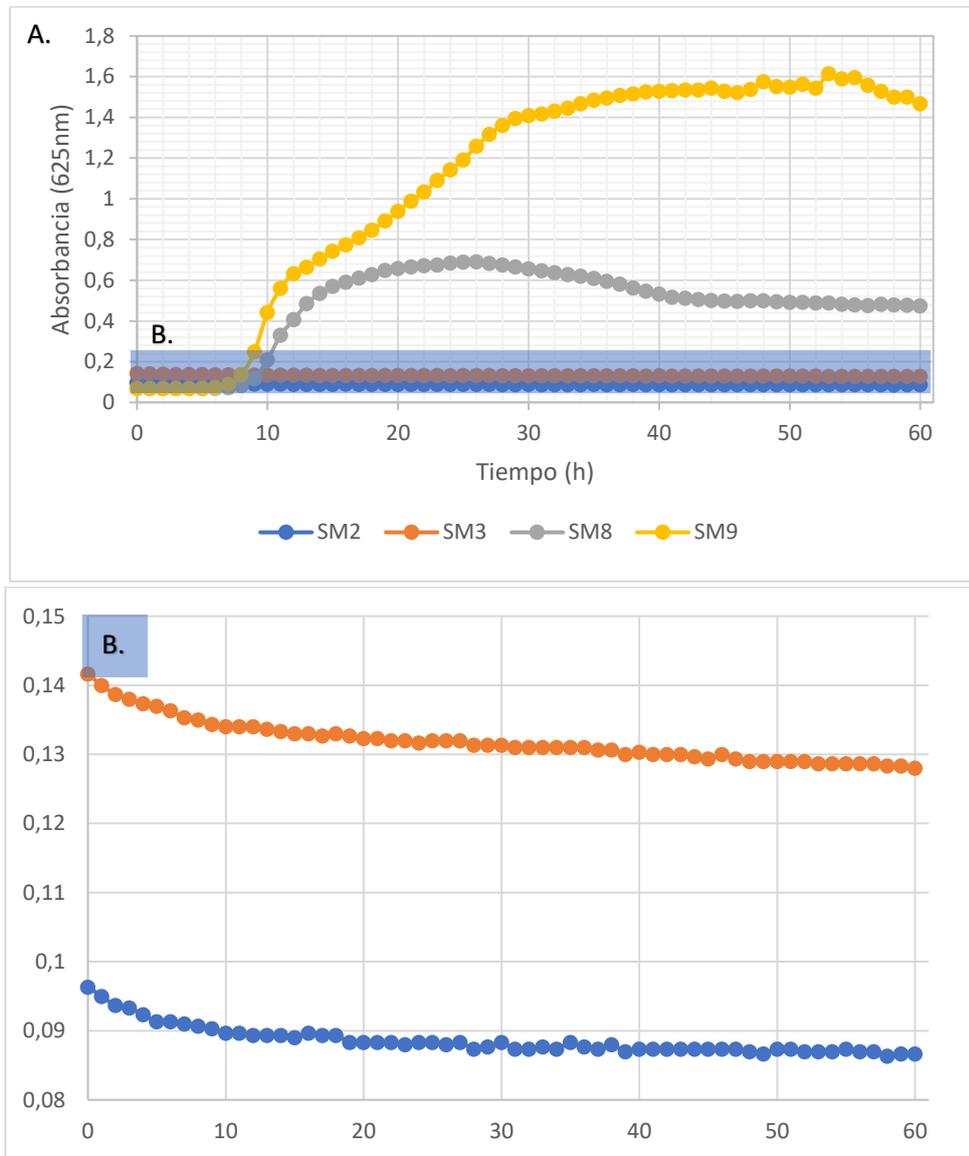
Las cuatro cepas, mostraron crecimiento acelerado y desacelerado en ambos medios de cultivo, siendo la cepa SM6 y SM24-2 aquellas que presentan las mayores variaciones en términos de biomasa (mg) en los medios líquidos MS y caldo Sabouraud-Dextrosa, respectivamente. Los datos cuantitativos donde se

alcanzan los puntos máximos de crecimiento son mostrados en el anexo 4. Siendo más representativa la cepa SM6 en el medio líquido MS, que alcanza su punto máximo en el día 10 con 2,64 mg en peso seco. De igual forma, en la gráfica 2 se evidencia las variaciones en el crecimiento de las cuatro cepas en medio líquido Sabouraud-Dextrosa, la cepa SM24-2 es la más representativa teniendo un punto máximo de crecimiento en el día 5 con 2,8 mg en peso seco.

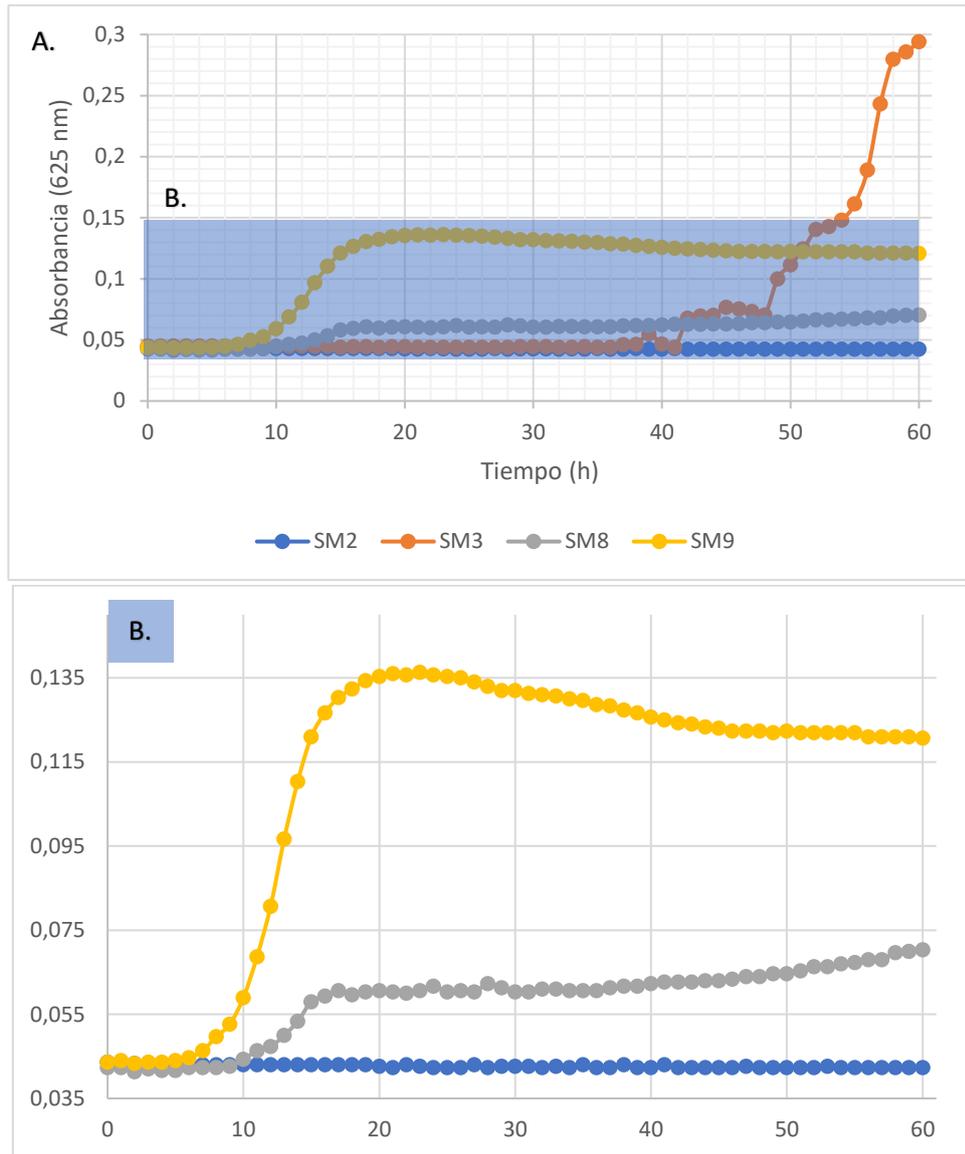
8.2.2 Comportamiento Bacteriano

Los resultados obtenidos del crecimiento bacteriano de las cepas SM2, SM3, SM8 y SM9, se expresan como los valores de Absorbancia (625nm) en función del tiempo en (horas). En la gráfica 3A, se muestra en forma general las curvas de crecimiento de las cepas en medio líquido ISP2, se puede observar que las cepas SM8 y SM9 presentan comportamientos similares, cuya diferencia principal radica en la cantidad de biomasa. El comportamiento de cepas SM2 y SM3 se muestra con mayor detalle en la gráfica 3B, el crecimiento de ambas cepas es similar en términos de comportamiento cinético en las 60 horas totales del experimento.

En tanto, los resultados del crecimiento bacteriano en el medio líquido MS son evidenciados en la gráfica 4. La gráfica 4A proporciona una visión general de las curvas de crecimiento de las cepas SM2, SM3, SM8 y SM9. La cepa SM9 fue la más representativa alcanzando el mayor crecimiento exponencial a partir de las 10 horas, asimismo, la cepa SM3 alcanza su fase exponencial después de las 40 horas. En la gráfica 4B, se muestra con mayor detalle las diferencias en los valores de absorbancia alcanzados por las cepas SM2, SM8 y SM9, particularmente, las cepas SM8 y SM9 muestran comportamientos similares, no obstante, la cepa SM2 se mantiene en fase de latencia a través del tiempo.



Gráfica 3. Curva de crecimiento de cepas bacterianas endofíticas en medio de cultivo ISP2. A. Grafica en general SM2, SM3, SM8 y SM9; B. Ampliación de la gráfica SM2 y SM3.



Gráfica 4. Curva de crecimiento de cepas bacterianas endofíticas en medio de cultivo ISP2. A. Gráfica en general SM2, SM3, SM8 y SM9; B. Ampliación de la gráfica SM2, SM8 y SM9.

8.3 Análisis de compuestos orgánicos volátiles (COVs)

Para evidenciar el grado de influencia de los microorganismos endófitos cultivables frente a *S. magnifica* se utilizaron métodos químicos indirectos, los COVs son medidos por CG/MS y aportan información química de las variaciones internas en las plántulas, efectuadas por los microorganismos. En las figuras 10, 11, 12 y 13 se presentan los perfiles cromatográficos por cromatografía gaseosa de las plántulas de *S. magnifica* (*in vitro*, *in natura*) y las inoculadas con las cepas de microorganismos endofíticos (ver Anexo 2). Las gráficas se encuentran divididas, siendo la parte A, el cromatograma general desde el minuto 1 hasta el

minuto 30. B y C, corresponden a ampliaciones de los cromatogramas desde 10-20 minutos y 20-30 minutos, respectivamente.

En la figura 10, se evidencia un análisis comparativo de los perfiles cromatográficos por cromatografía gaseosa de los COVs a partir de las plantas control, donde se puede observar que los picos siguen un patrón repetitivo sin variaciones importantes, solo existen variaciones entre ellos en términos de intensidad. En la figura 11, se muestra el análisis comparativo de las plántulas inoculadas con las cepas de microorganismos endofíticos cultivables, donde no se evidencian diferencias apreciables entre los diferentes tratamientos, sin embargo, se aprecian algunas divergencias en los picos ubicados en los tiempos de retención entre 20-30 minutos (ver Figura 11C), para la cepa SM2 en el (RT: 25.650), cepa SM6 (RT: 22.550; 22.917; 23.200; 23.400; 23.386; 26.850, 27.108 y 28.067, cepa SMHN (RT: 26.225) (ver Anexo 7 Perfil de fragmentación). Asimismo, en la figura 12 se presentan las diferencias entre los cromatogramas provenientes de los compuestos orgánicos volátiles de la planta *in vitro* y de la planta inoculada con todos los microorganismos (MIX), se evidencian variaciones para la planta en los tiempos de retención (RT: 26.608 y 28.433) y planta inoculada con todos los microorganismos (MIX) en los tiempos (RT: 26.367; 28.850) (ver Anexo 7, Perfil de fragmentación), es importante resaltar la variabilidad de la intensidad entre ambos perfiles cromatográficos, siendo mayor en la planta *in vitro*.

Por último, en la figura 13 se esquematizan los cromatogramas comparativos de los compuestos orgánicos volátiles de las plantas en campo (*in natura*), donde se puede apreciar que no existen diferencias en los perfiles cromatográficos.

8.4 Obtención de los extractos brutos a partir de las hojas de *S. magnifica*

Los extractos brutos obtenidos por reducción de partículas y maceración de los tejidos foliares de las plantas provenientes de los co-cultivos e *in natura* son descritos en la tabla 6, los rendimientos son expresados a partir de la cantidad de extracto seco (mg) en relación a la cantidad de biomasa (mg) inicial, multiplicado por cien. En azul, se expresan aquellos porcentajes superiores a 5%, siendo óptimos en los extractos brutos provenientes de la combinación entre: Planta + SM2+SM8, Planta + SM2+SM24-2, Planta + SM4+SMHN, Planta+ SM8+SM3, Planta + SM8+SMHN, Planta T2 y Plántula P1.

Tabla 6. Rendimiento en masa de los extractos brutos de las plantas de *S. magnifica*: *in vitro*, campo e inoculadas con los microorganismos endofíticos cultivables.

Extractos brutos	^B Biomasa (mg)	^A Rendimiento extracto bruto (mg)	Rendimiento (A/B) *100 (%)
Planta + SM2	*736	22,4	3,04
Planta + SM3	454,9	20,1	4,41
Planta + SM4	516,9	11,3	2,18
Planta + SM6	619,7	22,2	3,58
Planta + SM8	630,0	23,7	3,76
Planta + SM9	102,0	2,2	2,15
Planta + SM24-2	452,3	14,5	3,20
Planta + SMHN	710,1	34,2	4,81
Planta + SM2+SM3	272,0	11,3	4,15
Planta + SM2+SM4	336,3	16,6	4,93
Planta + SM2+SM8	413,9	32,4	7,82
Planta + SM2+SM24-2	237,5	12	5,05
Planta + SM2+SMHN	793,0	13,9	1,75
Planta + SM3+SM4	195,8	8,8	4,49
Planta + SM3+SM6	211,0	10,3	4,88
Planta + SM3+SM24-2	147,0	5,6	3,80
Planta + SM3+SMHN	250,5	20,8	8,30
Planta + SM4+SM6	147,65	5,4	3,65
Planta + SM4+SM8	118,4	2,3	1,94
Planta + SM4+SM9	102	2,3	2,25
Planta + SM4+SM24-2	176,3	7,7	4,36
Planta + SM4+SMHN	152,0	7,6	5,00
Planta + SM6+SM2	388,0	13	3,35
Planta + SM6+SM8	232,6	3,7	1,59
Planta + SM6+SM9	311,8	11	3,52
Planta + SM6+SM24-2	226,8	10,7	4,71
Planta + SM6+SMHN	517,3	20,3	3,92
Planta + SM8+SM3	255,1	24,2	9,48
Planta + SM8+SM9	274,9	7,6	2,76
Planta + SM8+SM24-2	618,3	10,2	1,64
Planta + SM8+SMHN	252,1	25,9	10,2
Planta + SM9+SM2	594,2	16,4	2,76
Planta + SM9+SM3	435,4	13,2	3,03
Planta + SM9+SM24-2	280,5	4,3	1,53
Planta + SM9+SMHN	635,5	29,6	4,65
Planta + SMHN+SM24-2	241,0	10,2	4,23
Planta + SM2 + SM3 + SM4 + SM6 +	222,7	5,2	2,33

SM8 + SM9 + SM24-2 + SMHN (MIX)			
Planta <i>in vitro</i>	470,8	17,5	3,71
Planta + diluyente	165	5,5	3,33
Planta T2	2328,1	128	5,49
Plántula P1	1679	128,5	7,65

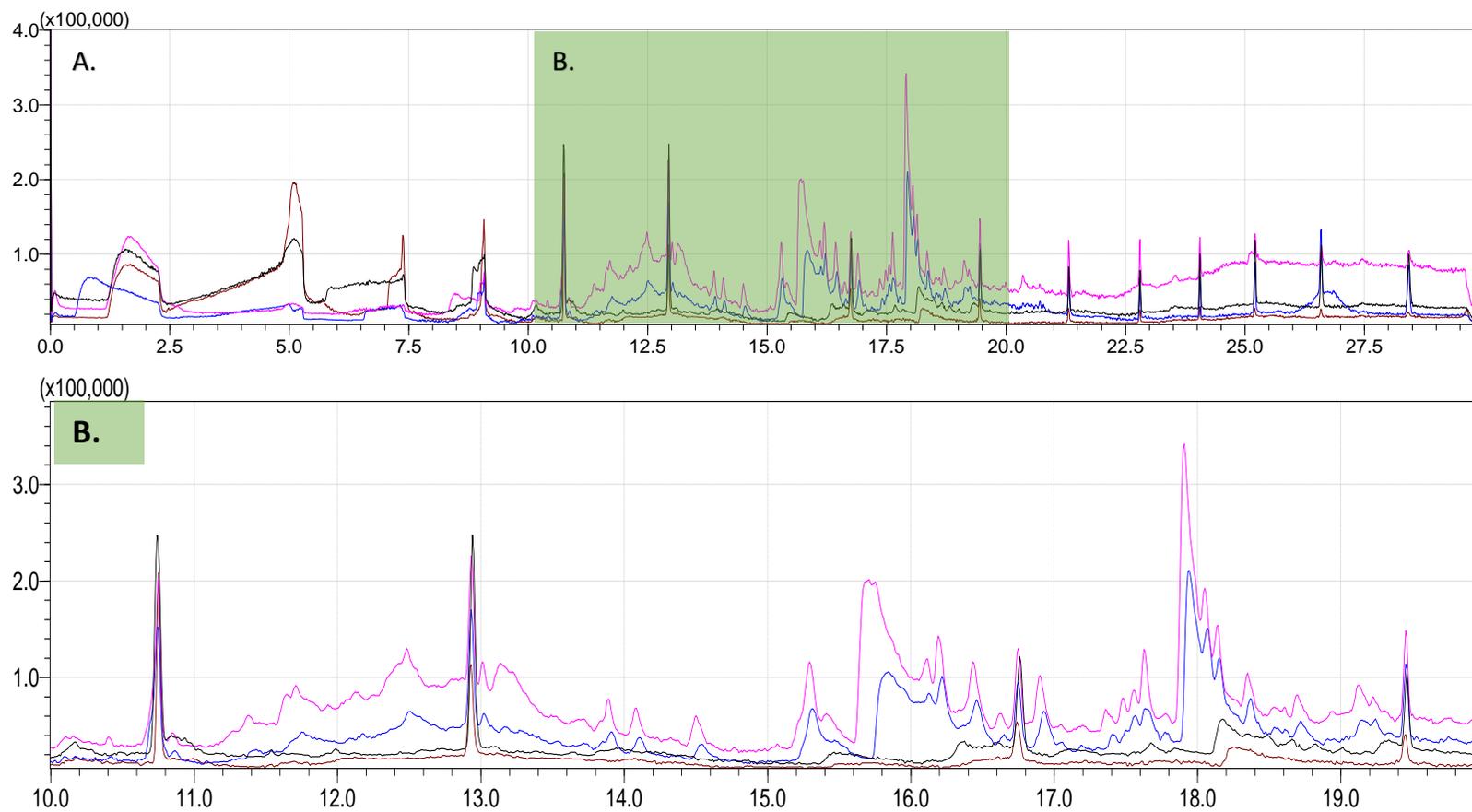
*Los resultados se expresan como la media de 3 réplicas; A. Rendimiento extracto seco bruto (mg), B. Biomasa húmeda (mg) de los tejidos foliares de *S. magnifica*, provenientes de los co-cultivos y plantas *in natura*.

8.4 Resultados pruebas de actividad biológica

Los resultados presentados en la actividad biológica referentes a los extractos brutos metanólicos de las plantas *S. magnifica*, planta en campo y plantas provenientes de los co-cultivos. Fueron testeadas en dos tipos de ensayos biológicos: el ensayo ORAC-FL para (actividad antioxidante) y ensayo de la técnica por microdilución (actividad antimicrobiana).

8.4.1 Actividad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante por el método ORAC-FL, emplea análisis de cinética química, basado en mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno, que utiliza la fluoresceína como sonda fluorescente, además de utilizar una fuente radical biológicamente el AAPH. En la tabla 7, se muestran los resultados de la actividad antioxidante de los extractos brutos metanólicos, en azul se destacan aquellos valores cuya capacidad antioxidante es >3000 $\mu\text{mol TE/g}$ de extracto.



Medio MS; *Planta in vitro*; *Planta + Solución NT*; *Planta + Solución Salina*

Figura 10. Cromatograma comparativo de los compuestos orgánicos volátiles de las plantas control. A. Perfil Cromatográfico general; B. Ampliación del cromatograma.

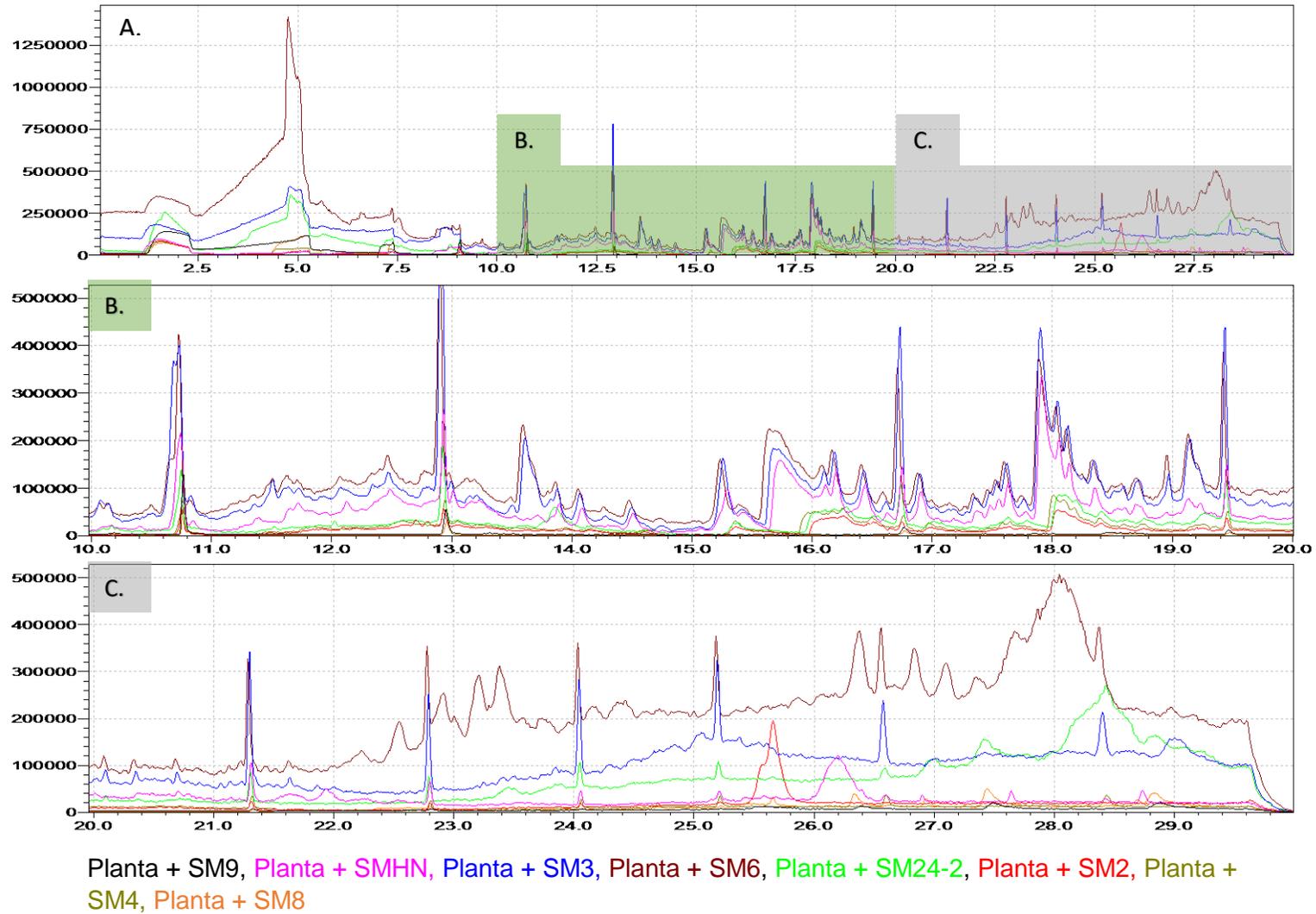


Figura 11. Cromatograma comparativo de los compuestos orgánicos volátiles de las plantas inoculadas con los microorganismos endofíticos. A. Perfil Cromatográfico general; B. Ampliación del cromatograma (minuto 10 al 20); C. Ampliación del cromatograma (minuto 20 al 30).



Planta + SM2+ SM3+ SM4 + SM6 +SM8 +SM9 +SMHN + SM24-2; *Planta in vitro*.

Figura 12. Cromatograma comparativo de los compuestos orgánicos volátiles de la planta *in vitro* y de la planta inoculada con todos los microorganismos (MIX). A. Perfil Cromatográfico general; B. Ampliación del cromatograma (minuto 10 al 20); C. Ampliación del cromatograma (minuto 20 al 30).

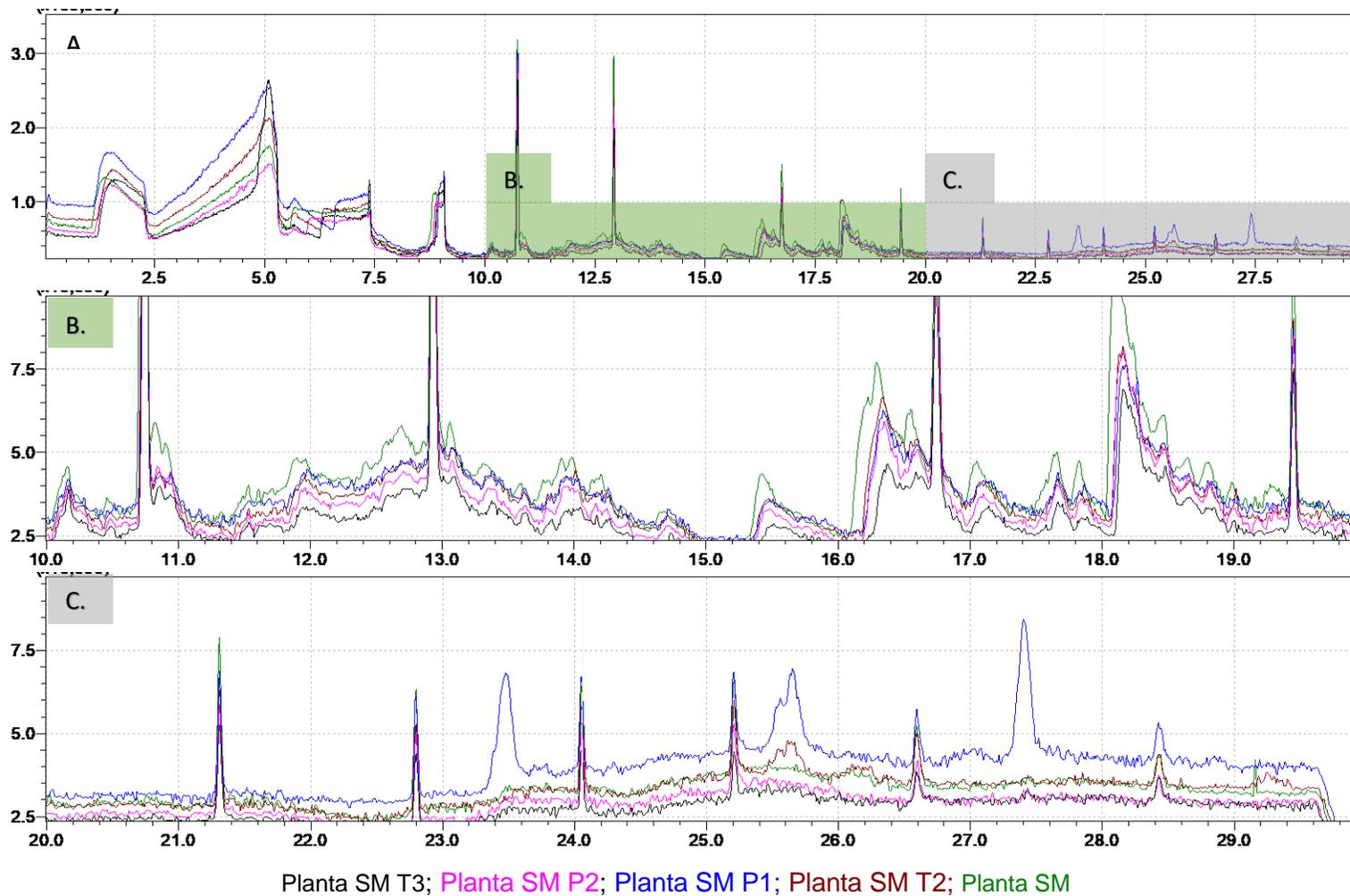


Figura 13. Cromatograma comparativo de los compuestos orgánicos volátiles de las plantas de campo. A. Perfil Cromatográfico general; B. Ampliación del cromatograma (minuto 10 al 20); C. Ampliación del cromatograma (minuto 20 al 30).

Tabla 7. Resultados de la actividad antioxidante por el ensayo ORAC-FL de los extractos brutos de las plantas de *S. magnifica*: *in vitro*, campo e inoculadas con los microorganismos endofíticos cultivables.

Extractos brutos	μmol de TE/g de extracto	*S	CV (%)
Planta + SM2	126,6	23,6	18,6
Planta + SM3	2330,9	84,1	3,61
Planta + SM4	304,0	56,9	18,72
Planta + SM6	2599,6	104,9	4,03
Planta + SM8	2335,4	234,6	10,05
Planta + SM9	2105,7	34,8	1,65
Planta + SM24-2	6046	28,81	0,47
Planta + SMHN	811,0	79,1	9,75
Planta + SM2+SM3	2788,9	89,6	3,21
Planta + SM2+SM4	1310,7	126,5	9,65
Planta + SM2+SM8	2473,5	187,5	7,58
Planta + SM2+SM24-2	2822,2	344,9	12,22
Planta + SM2+SMHN	333,3	126,4	37,97
Planta + SM3+SM4	3127,3	261,1	8,35
Planta + SM3+SM6	3309,9	82,6	2,5
Planta + SM3+SM24-2	1169,8	120,3	10,28
Planta + SM3+SMHN	918,4	164,8	17,94
Planta + SM4+SM6	2757,7	113,7	4,12
Planta + SM4+SM8	2906,8	112	3,85
Planta + SM4+SM9	282	118,7	42,09
Planta + SM4+SM24-2	3074,3	70,7	2,3
Planta + SM4+SMHN	245,3	81,0	33
Planta + SM6+SM2	2918,6	439,4	15,06
Planta + SM6+SM8	2245,7	95,4	4,25
Planta + SM6+SM9	3098	24,4	0,79
Planta + SM6+SM24-2	3644,6	147,1	4,04
Planta + SM6+SMHN	3727,4	54,8	1,47
Planta + SM8+SM3	997,1	137,6	13,8
Planta + SM8+SM9	2155,9	118,8	5,51
Planta + SM8+SM24-2	1327,8	185,4	13,96
Planta + SM8+SMHN	2393,2	85,6	3,58
Planta + SM9+SM2	2281,8	188,8	8,27
Planta + SM9+SM3	2752,3	131,7	4,79
Planta + SM9+SM24-2	2555,6	55,3	2,16
Planta + SM9+SMHN	2060,7	61,9	3,01
Planta + SMHN+SM24-2	1354,4	113,6	8,39
Planta + SM2 + SM3 + SM4 + SM6 + SM8 + SM9 + SM24-2 + SMHN	1935,5	66,7	3,45

Planta <i>in vitro</i>	2015,2	41,4	2,05
Planta + diluyente	2257,7	61,5	2,72
Planta T2	4697,2	341,8	7,28
Plántula P1	6153,8	89,5	1,45

*S= desviación estándar. Los resultados del ensayo ORAC-FL están expresados en micromol de trolox equivalente por gramo de extracto en base seca. Los datos son presentados como la media de los valores y el coeficiente de variación (CV) en porcentaje. los ensayos fueron analizados por triplicado.

8.4.2 Actividad Antimicrobiana

El screening de la actividad antimicrobiana de los extractos brutos metanólicos, fue evaluada por el método antimicrobiano de microdilución a una concentración de 1mg/mL. Los resultados mostraron reducciones en biomasa expresadas como unidades indirectas de Absorbancia (Abs) como se evidencia en la Tabla 8, para las bacterias grampositivas (*S. aureus*, *E. faecalis* y *K. rhizophila*), hubo reducciones considerables principalmente para *S. aureus*, a partir de los extractos provenientes de las combinaciones planta+ SM4+SM9, planta+ SM3+SM24-2, planta+ SM6+SM8, en tanto, frente a *E. faecalis* y *K. rhizophila*, los extractos provenientes entre planta+SM3 y planta+SM4+SMHN, respectivamente.

En el caso de las bacterias gramnegativas (*E. coli*, *Salmonella entérica-Typhimurium*, *P. aeruginosa*), los valores de reducción en términos de absorbancia fueron mínimos, destacando los extractos provenientes de las combinaciones planta+ SM4+SM9 y planta+ SM2+SMHN frente a *E. coli* y *S. enterica-Typhimurium*, respectivamente. Para *Pseudomonas aeruginosa* no se presentaron valores significativos de reducción.

Por último, los mejores valores de reducción se evidencian en las cepas de levaduras, principalmente frente a *Candida albicans* ATCC 1023.1 y *C. parapsilosis* ATCC 22019, derivados de los extractos entre planta+SM4+SM8, planta+SM3+SM24-2, planta+SM4+SM9 y los extractos provenientes de las plantas de campo.

Tabla 8. Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos brutos derivados de las plantas de *S. magnifica*: *in vitro*, campo e inoculadas con los microorganismos endofíticos cultivables.

Extractos brutos	Microorganismos							
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. entérica-Typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Planta + SM2	3,6983	3,2183	3,39567	3,11767	2,04567	≥4,00	1,126	1,9795
Planta + SM3	2,35067	0,9993	3,776	≥4,00	2,3567	≥4,00	1,937	2,402
Planta + SM4	3,5	3,391	3,49467	3,106	2,619	≥4,00	1,122	2,2
Planta + SM6	3,713	1,8743	≥4,00	≥4,00	2,8243	≥4,00	1,4067	1,492
Planta + SM8	3,563	1,70167	3,597	≥4,00	2,303	≥4,00	1,453	1,08567
Planta + SM9	0,92967	*NT	NT	2,17067	NT	NT	0,9367	NT
Planta + SM24-2	2,0967	1,6903	≥4,00	≥4,00	1,865	≥4,00	1,412	1,9165
Planta + SMHN	≥4,00	3,167	3,07367	≥4,00	2,129	≥4,00	1,1543	1,395
Planta + SM2 + SM3	3,469	3,30967	2,9853	≥4,00	2,847	≥4,00	1,701	1,168
Planta + SM2 + SM4	1,7867	1,997	3,417	3,8155	1,7753	2,9585	1,43867	1,8785
Planta + SM2 + SM6	1,602	1,59067	3,32067	≥4,00	2,0423	≥4,00	1,5823	2,1635
Planta + SM2 + SM8	≥4,00	2,684	≥4,00	≥4,00	2,198	3,101	1,543	1,931
Planta + SM2 + SM9	≥4,00	1,699	3,38067	3,416	2,6643	2,92	1,799	1,697
Planta + SM2 + SM24-2	3,302	3,22167	3,49167	≥4,00	2,38	≥4,00	1,6623	2,227
Planta + SM2 + SMHN	2,8773	2,79467	2,397	3,2003	1,584	≥4,00	1,3783	1,975
Planta + SM3 + SM4	1,67867	2,8443	2,51767	3,68167	2,2543	≥4,00	1,8313	2,0613
Planta + SM3 + SM6	2,11067	2,1645	2,70267	≥4,00	2,9583	≥4,00	1,9123	2,1173
Planta + SM3 + SM8	3,789	2,6963	3,4953	≥4,00	2,04467	≥4,00	1,46867	1,50567
Planta + SM3 + SM9	≥4,00	2,581	3,293	≥4,00	1,822	≥4,00	1,45067	1,478
Planta + SM3 + SM24-2	0,90167	NT	NT	1,895	NT	NT	0,8313	NT
Planta + SM3 + SMHN	3,721	1,835	3,365	3,436	2,02267	≥4,00	0,92067	2,0305
Planta + SM4 + SM6	2,71167	NT	NT	3,246	NT	NT	1,9673	NT
Planta + SM4 + SM8	1,16	NT	NT	2,633	NT	NT	0,5673	NT

Planta + SM4 + SM9	0,5875	NT	NT	1,60267	NT	NT	0,641	NT
Planta + SM4 + SM24-2	1,662	1,4783	≥4,00	≥4,00	2,30767	3,429	1,941	2,381
Planta + SM4 + SMHN	2,74767	2,19067	1,993	2,5267	1,77867	≥4,00	1,555	1,4863
Planta + SM6 + SM8	0,954	NT	NT	1,99367	NT	NT	1,14567	NT
Planta + SM6 + SM9	1,4183	1,5815	2,763	≥4,00	2,3067	≥4,00	1,86967	2,037
Planta + SM6 + SM24-2	3,1683	2,889	3,1943	3,5465	1,97367	≥4,00	1,5193	1,3705
Planta + SM6 + SMHN	2,0467	1,641	≥4,00	≥4,00	1,61	≥4,00	1,341	1,771
Planta + SM8 + SM9	2,632	1,09067	3,717	3,771	1,99367	≥4,00	1,8223	2,135
Planta + SM8 + SM24-2	3,792	≥4,00	3,5463	3,545	2,296	≥4,00	1,773	2,043
Planta + SM8 + SMHN	2,69167	NT	NT	≥4,00	NT	NT	2,099	NT
Planta + SM9 + SM24-2	1,525	NT	NT	3,829	NT	NT	1,649	NT
Planta + SM9 + SMHN	2,9453	1,19867	3,797	3,2853	2,0313	≥4,00	1,81567	2,4113
Planta + SMHN + SM24-2	≥4,00	3,2	3,8	3,25167	2,063	≥4,00	1,352	0,988
Planta + SM2 + SM3 + SM4 + SM6 + SM8 + SM9 + SM24-2 + SMHN	3,067	3,39067	2,427	3,40367	2,422	≥4,00	1,339	1,2367
Planta <i>in vitro</i>	2,3903	2,0743	3,6145	3,55967	2,351	≥4,00	1,463	1,674
Planta + diluyente	≥4,00	2,823	3,655	≥4,00	2,586	≥4,00	1,583	1,7393
Planta T2	0,99167	1,1353	3,3825	≥4,00	3,1803	3,608	0,5983	0,408
Planta P1	1,30867	1,4453	2,7135	≥4,00	2,6493	2,872	0,6595	0,972
Control positivo	0,07967	0,083	0,084	0,083	0,065	0,106	0,3843	0,38467
Control diluyente	≥4,00	≥4,00	3,698	3,656	2,834	≥4,00	2,038	1,544
Control crecimiento	≥4,00	3,639	3,74	3,725	3,42867	≥4,00	2,298	1,322
Control esterilidad	0,064	0,06267	0,04867	0,063	0,07167	0,04967	0,051667	0,043

*Abs= absorbancia, NT=No testado

9. Análisis de Resultados

9.1 Identificación macroscópica, microscópica y genética de los microorganismos endofíticos

Considerando los resultados que fueron obtenidos por la caracterización macroscópica de las colonias de los hongos filamentosos SM4 y SM6, en los diferentes medios de cultivo sólido y por la caracterización microscópica principalmente por las morfologías de sus conidióforos y conidios, y según las descripciones y claves taxonómicas realizadas por Bensch et al. (2012), los hongos endofíticos SM4 y SM6 pertenecen al filo Ascomycota, clase Dotideomicetes, orden Capnodiales, familia Cladosporiaceae y finalmente al género *Cladosporium*. Esto es confirmado por la identificación genética mediante el análisis de la región parcial del ITS comparado con las bases de datos existentes. Sin embargo, la identificación de la especie no fue concluyente para ambos casos, debido a los tamaños de los fragmentos utilizados en el alineamiento (< 600 pb), lo cual determina más de una especie de *Cladosporium* sp. Debe secuenciarse la región completa del ITS junto con las regiones situadas entre los genes 18S SSU (subunidad menor) y 28S LSU (subunidad mayor) (Bellemain et al., 2010), adicionalmente, un análisis multilocus podría delucidar y confirmar con mayor criterio las especies (Das et al., 2014).

La cepa 24-2 de acuerdo a sus características macro y micromorfológicas y según el trabajo descrito por Sun et al. (2003) pertenece al filo Ascomycota, clase Euascomycetes, orden Pleosporales, familia Pleosporaceae y género *Curvularia*, los cuales destacan sus hifas y conidias curvas, también, este género ha sido descrito como endofítico. Asimismo, se ha determinado que puede ser útil como una nueva fuente de metabolitos bioactivos, como lo reportado por Tawfike et al., (2017). La cepa SMHN taxonómicamente, pertenece al filo Ascomycota, clase Dothideomycetes, orden Capnodiales, familia Teratosphaeriaceae, género *Hortaea*, los resultados obtenidos son similares a los descritos por El-Gamal et al., (2016) quienes aislaron nuevas cepas asociadas a este género, a partir de matrices complejas.

Por otra parte, los resultados de la caracterización macro, microscópica y genética de las cepas bacterianas endofíticas permiten situar a las cepas SM2 y SM3 en el filo Proteobacteria, clase Alphaproteobacteria, orden Rhizobiales, familia Methylobacteriaceae, género *Methylobacterium*, esto puede ser contrastado con las descripciones y estudios realizados por Ardanov, Sessitsch, Häggman, Kozyrovska & Pirttilä (2012); Madhaiyan et al. (2015), los cuales

asociaron cepas endofíticas de *Methylobacterium* sp. con características similares a las presentes en este estudio en co-cultivos con otros géneros de plantas.

Igualmente, los resultados obtenidos para la cepa SM8 en comparación a los obtenidos por Ramos et al. (2011) establecen que dicha cepa pertenece al (filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Xanthomonadales, familia Xanthomonadaceae, género *Stenotrophomonas* sp. Los resultados del análisis genético indican con un porcentaje bajo de identidad (89%), que corresponde a la especie *S. maltophilia* siendo necesario aumentar proporcionalmente la cantidad de pares de bases que codifican las regiones ITS con el fin de establecer la especie de forma específica.

9.2 Comportamiento del crecimiento de los microorganismos endofíticos

En el estudio de evaluación del crecimiento de las cepas de hongos filamentosos, se observó que sus comportamientos variaron significativamente en los dos medios de cultivo estudiados, siendo más estable en el medio caldo Sabouraud-Dextrosa, en comparación al medio líquido MS, donde se presentan mayores fases de aceleraciones y desaceleraciones, esto ocurrió posiblemente, debido a las diferencias nutricionales de cada medio de cultivo. Además, no fue posible detectar la fase de latencia sugiriendo que esta fase adaptativa ocurre en menos de las 24 horas que fue el tiempo de la primera detección. La cepa y el medio de cultivo que presentó el mayor pico de biomasa fue la cepa *Curvularia* sp. en el medio Sabouraud-Dextrosa, este resultado es satisfactorio y esperado, debido a que, este medio de cultivo es más complejo en términos nutricionales (Zimbro et al., 2009). Por otro lado, la cepa de *Cladosporium* sp. (SM6) en el medio líquido MS presentó el mayor pico de biomasa. Las fuentes nutricionales, ya sea de naturaleza orgánica o inorgánica, proporcionadas por los medios de cultivo genera efecto directo en el crecimiento del hongo. En un trabajo realizado por Joong-Keun et al. (2007) con el hongo *Cladosporium phlei*, muestra que las fuentes de carbono simples tienen un efecto beneficioso en el crecimiento del hongo, debido a su facilidad en la asimilación de los nutrientes, siendo reflejado en los resultados para la cepa de *Cladosporium* sp. (SM6).

En tanto, las cepas bacterianas en los dos medios de cultivo testeados mostraron diferencias en términos de absorbancia asociados a la cantidad de biomasa presente en función del tiempo, el medio de cultivo que promovió mejor el crecimiento fue el medio ISP2 en comparación al medio líquido MS, esto se debe, a la composición de ambos sistemas, el medio ISP2 es más complejo y aporta factores de crecimiento con mejor estructuración y mayor disponibilidad para los microorganismos. El género *Methylobacterium* sp., asociado a las cepas SM2 y SM3 presentan fases de latencia prolongadas, lo que supone que sus fases exponenciales inician después de las 60 horas, esto se puede contrastar con el crecimiento alcanzado por la cepa SM3 en el medio líquido MS, este medio es considerado como un medio de cultivo químicamente definido, donde su única

fuerza de carbono es subsidiada por sacarosa y los demás macronutrientes requeridos para el crecimiento de un organismo se suministran en forma de sales inorgánicas (Andreote, 2011). Asimismo, esto nos aporta información adicional sobre los mecanismos adaptativos u otros metabolismos específicos, los cuales pueden dar un soporte al comportamiento endofítico de este microorganismo. Adicionalmente, *Stenotrophomonas* sp. y SM9 mostraron los mejores comportamientos cinéticos en ambos medios de cultivo, debido a las razones ya suscitadas.

9.3 Análisis perfiles cromatográficos de los compuestos orgánicos volátiles

En este estudio, algunas de las cepas de microorganismos se sabe que causan infecciones en las plantas, el aislamiento de microorganismos endofíticos de *Sinningia magnifica*, puede ser una forma útil de explorar nuevos productos de importancia biotecnológica en la familia Gesneriaceae, esto se vio reflejado en los perfiles cromatográficos por cromatografía gaseosa de los co-cultivos, principalmente, cuando la planta se encuentra asociada a una sola especie de microorganismo, mientras la interacción (planta+todos los microorganismos) proporciona un equilibrio homeostático determinado por los COVs. Además, los microorganismos endofíticos producen compuestos bioactivos, que ayudan a las plantas hospedadoras a adaptarse a su medio (Monggoot et al., 2017), lo que indica que, los consorcios de microorganismos endofíticos pueden ser útiles para el control de las rutas metabólicas de la plantas, estos resultados también se pueden comparar con los cromatogramas obtenidos de los COVs derivados de las plantas en campo (planta *in natura*) donde no se observaron diferencias entre los perfiles cromatográficos. Kanchiswamy et al. (2015) sugiere que las bacterias también pueden afectar el metabolismo de las plantas produciendo compuestos orgánicos volátiles extracelulares. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* (GB03) produce metabolitos volátiles que a largo plazo que estimulan el crecimiento, la eficiencia de la fotosíntesis, la acumulación de hierro en las plantas. También, se sabe que las bacterias endofíticas pueden actuar en la protección de los fotosistemas de las plantas contra las condiciones ambientales extremas a través de la activación de un sistema de defensa vegetal dependiente de hormonas y mejorar el transporte de electrones de PSII (Burlak et al., 2013), estos resultados podrían contrastarse con los obtenidos en la prueba de actividad antioxidante, donde las cepas fúngicas modificaron en mayor proporción la actividad metabólica de las plantas, de aquellas inoculadas con bacterias endofíticas.

9.4 Pruebas de actividad biológica

9.4.1 Ensayo ORAC-FL

Los resultados de la actividad antioxidante (ensayo ORAC-FL) de los extractos metanólicos entre las plantas de *S. magnifica*: *in vitro*, campo e inoculadas con

los microorganismos endofíticos cultivables mostraron que los extractos vinculados a las plantas con mezclas de los géneros *Methylobacterium* sp. (cepa SM3), *Cladosporium* sp. (cepa SM4 y SM6), *Curvularia* sp. (cepa SM24-2) y aquellos provenientes de las plantas en campo fueron los mejores en términos de actividad antioxidante en comparación con los extractos obtenidos de las combinaciones entre la planta con los géneros *Methylobacterium* sp. (cepa SM2) y *Hortaea* sp. (cepa SMHN), esto puede estar asociado a que la planta dentro de su metabolismo genera enzimas, principalmente peroxidasas en respuesta a la relación microorganismo-planta (Qui-Zapata et al., 2010), lo cual puede variar dependiendo del género de microorganismo asociado. También, se evidencia que el extracto entre la planta + todos los microorganismos (Mix) presenta una actividad antioxidante media (1935,5 μmol de TE/g de extracto). Estos resultados posiblemente se deben a que estas cepas promueven mayor estabilidad enzimática de tipo peroxidasa por parte de la planta, existiendo variaciones en aquellas plantas que se encuentran *in vitro* de aquellas *in natura* donde existe mayor intercambio con los factores abióticos, entre otros. Inclusive, algunos estudios señalan el aumento de la producción antioxidante se da como respuesta al estrés (Poljsak et al., 2013; Goiris et al., 2015). Lo que concuerda con los perfiles cromatográficos por cromatografía gaseosa de los co-cultivos entre *S. magnifica* con estas cepas. En términos de rendimiento, el co-cultivo entre la planta+SM24-2 presentó el mayor valor de actividad antioxidante, aun teniendo un porcentaje bajo de rendimiento. Lo anterior, sugiere que altos rendimientos no aseguran valores de capacidad de actividad antioxidante superiores.

Adicionalmente, las combinaciones entre las plantas inoculadas con cepas con alto potencial antioxidante y una con baja característica, tiende a la obtención de valores medios de actividad antioxidante, estableciendo que valores ≥ 800 μmol TE/g de extracto son considerados promisorios en términos de actividad antioxidante para los extratos (valores de capacidad antioxidante, Costa et al., 2015).

9.4.2 Actividad antimicrobiana

Los resultados del screening de la actividad antimicrobiana para los extractos metanólicos entre las plantas de *S. magnifica*: *in vitro*, campo e inoculadas con los microorganismos endofíticos cultivables presentaron mayor actividad antifúngica frente a las levaduras *C. albicans* y *C. parapsilosis*, siendo eficiente en los extractos brutos derivados de la planta+SM4+SM8, planta+SM3+SM24-2, planta+SM4+SM9. Frente a bacterias gramnegativas como *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* no fue posible detectar ningún efecto inhibitorio, en tanto, frente a bacterias grampositivas los extractos entre planta+SM4+SM9, SM3+SM24-2, SM6+SM8 poseen actividad contra *S. aureus* en mayor medida, esto puede deberse a las diferencias en la composición de las paredes celulares de cada grupo de bacterias. La pared celular en las gramnegativas está

compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que la pared en las grampositivas está formada sólo por un tipo de molécula (Madigan et al., 2004). El extracto planta+SM3 fue el único que presentó actividad antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*. Por otra parte, *Stenotrophomonas* sp. se ha descrito en asociación endofítica con algunas especies de plantas ejerciendo efectos beneficiosos sobre el crecimiento (fijación de nitrógeno, inducción de fitohormonas) y actividad antifúngica (Wolf et al., 2002), lo cual se puede ver reflejado en los valores obtenidos para los extractos de plantas asociados a esta cepa y que tuvieron efecto contra *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

10. Conclusiones

Los resultados obtenidos en la investigación microbiológica, curvas de crecimiento de los microorganismos, perfiles cromatográficos de los COVs asociados a co-cultivos entre *S. magnifica*-microorganismos aislados a partir de sus hojas y las pruebas de bioactividad han posibilitado las siguientes conclusiones:

- En lo que se refiere a la caracterización microbiológica, se determina que los microorganismos endofíticos aislados de las hojas de *S. magnifica* (2 cepas pertenecen a *Cladosporium* sp., 2 cepas al género de *Methylobacterium* sp., una cepa al género *Curvularia* sp., 1 cepa al género *Hortaea* sp. y 1 cepa vinculada al género *Stenotrophomonas* sp., siendo los primeros informes de aislamiento de estos géneros asociados a *S. magnifica* (Gesneriaceae).
- Con base en las condiciones de crecimiento, los géneros *Cladosporium* sp. (SM6) y *Curvularia* sp. y la cepa SM9 (cepa colonias amarillas), presentan los mejores valores de biomasa en función del tiempo. Además, se demuestra que los microorganismos endofíticos poseen poca afinidad al medio MS, siendo necesario el crecimiento de estos microorganismos con la planta hospedera.
- Basados en los análisis de los compuestos orgánicos volátiles de los co-cultivos, es concluyente que las interacciones entre todos los microorganismos endofíticos cultivables y la planta, forman una homeostasis metabólica, sin rastros de daños detectables.
- La actividad biológica de los extractos brutos muestran que las interacciones planta-microorganismo endofítico realizadas, altera los efectos naturales de las plantas, siendo visible el grado de efecto superior en el extracto bruto de la planta de campo, con respecto a la planta *in vitro*. Los extractos brutos en general mostraron gran potencial antifúngico frente a las especies de *Candida* y un alto grado de antioxidantes y pro-oxidantes.

11. Recomendaciones

Se espera abarcar las secuencias completas de las regiones ITS y aplicar análisis multilocus, identificación polifásica que permitan discernir el metabolismo en las cepas de hongos filamentosos, esto con el fin de establecer específicamente las especies en cada organismo. También, se deben comparar los resultados obtenidos por cromatografía gaseosa de los COVs con los perfiles cromatográficos obtenidos por UHPLC derivados de los extractos, lo que permitirá conocer las con más detalle las masas de compuestos implicados en la modulación metabólica de la planta *S. magnifica*. Adicionalmente, de los extratos que presentaron mejor actividad biológica, es significativo encontrar los valores CIM para la prueba de actividad antimicrobiana.

12. Glosario

Antimicrobiano: Sustancia que elimina microorganismos o inhibe su crecimiento, tales como bacterias, hongos o parásitos. Basado en ello, los siguientes pueden referirse a agentes microbianos: antibióticos, antifúngicos o antimicóticos, antiparasitarios, entre los cuales están los: antihelmínticos; otros tipos son, antivirales y antisépticos (Wolf et al., 2002).

Antioxidante: Sustancia o molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. La oxidación de tales sustratos podrá ser iniciada por dos tipos de especies reactivas: los radicales libres, y aquellas especies que, sin ser radicales libres, son suficientemente reactivas para inducir la oxidación de sustratos como los mencionados (Tan et al., 2015).

Cromatografía de gases-Espectrometría de masas(GC/MS): Método analítico que combina las características de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas para identificar diferentes sustancias dentro de una muestra de prueba (Smedsgaard, 1997).

Co-cultivos: Técnica que consiste en asociar dos o más organismos (microorganismos, microorganismos-plantas, planta-planta, etc.) en una misma matriz como procedimiento experimental (Madhaiyan et al., 2015).

13. Bibliografía

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA] (2008). Manual Clinical and Laboratory Standards Institute–CLSI (antigo NCCLS). www.anvisa.gov.br/servicos/saude/manuais/clsi.asp. Acesso em: 27/10/2017
- Ardanov, P., Sessitsch, A., Häggman, H., Kozyrovska, N., & Pirttilä, AM. (2012). *Methylobacterium*-Inducido Endophyte Community Changes corresponde a la protección de las plantas contra el ataque de patógenos. *PLoS ONE* 7 (10): e46802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046802>
- Andreote, F. D. (2011). Análises genômica e transcriptômica de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 em interação com a planta hospedeira. Dissertação de Maestria, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. doi: 10.11606/D.11.2011.tde-25042011-093922. Recuperado 2017-12-01, de www.teses.usp.br
- Arrarte, E., Garmendia, G., Rossini, C., Wisniewski, M., & Vero, E. (2017). “Volatile Organic Compounds Produced by Antarctic Strains of *Candida sake* Play a Role in the Control of Postharvest Pathogens of Apples.” *Biological Control*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.002>.
- Azevedo, J. L. (1998). “Microorganismos Endofíticos”, *Revista Ecologia microbiana*, UFGO: 117-136.
- Babikova, Z., & Caulfield, J. C. (2013). “Underground Signals Carried through Common Mycelial Networks Warn Neighbouring Plants of Aphid Attack.”: 835–43.
- Batista, M., Fialho, L., Marcio, P., & Pedroso, F. (2010). “Volatile Organic Compounds Produced by *Saccharomyces cerevisiae* Inhibit the *in vitro* Development of *Guignardia citricarpa*, the Causal Agent of *Citrus* Black Spot.”: 92-32.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in-silico* approach reveals potential PCR biases, 1–9.

- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z., & Crous, P.W., (2012). The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72: 1–401.
- Berg, Gabriele. (2009). “Plant – Microbe Interactions Promoting Plant Growth and Health: Perspectives for Controlled Use of Microorganisms in Agriculture.”: 11–18.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). “Metabolic Potential of Endophytic Bacteria.” *Current Opinion in Biotechnology* 27: 30–37.
- Chae, Soo Cheon, Haeng Hoon Kim, & Sang Un Park. (2012). “Ethylene Inhibitors Enhance Shoot Organogenesis of Gloxinia (*Sinningia speciosa*).” *The Scientific World Journal* 2012:1-5.
- Chautems, A. et al. (2003). “Gesneriaceae Chave Para Os Gêneros.” 3: 75–103.
- CNCFlora. *Sinningia magnifica* in Lista Vermelha da flora brasileira versão (2012). Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Sinningia magnifica](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Sinningia_magnifica)>. Acesso em: 24 setembro 2017.
- Costa, M. et al. (2015). “Molecular Phylogeny, Diversity, Symbiosis and Discover of Bioactive Compounds of Endophytic Fungi Associated with the Medicinal Amazonian Plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae).” *Biochemical Systematics and Ecology* 59: 36–44.
- Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.013>
- Dibut B., Martínez-Viera, R., Ortega, M., Ríos, Y., Tejeda, G., Planas, L. & Rodríguez, J. (2009). Situación Actual y Perspectiva de las Relaciones Endófitas Planta-Bacteria. Estudio de Caso *Gluconacetobacter Diazotrophicus*-Cultivos de Importancia Económica. *Cultivos Tropicales* 30(4): 16–23.

- Duperron, S. (1ra Ed.) (2017). *Microbial Symbioses*. London: ISTE Press Ltd.
- Falcão, J., Dáttilo, W., & Izzo, T. (2015). "Forest Ecology and Management Efficiency of Different Planted Forests in Recovering Biodiversity and Ecological Interactions in Brazilian Amazon." 339: 105–11.
- Ferreira, J., Chautems, & Waechter, L. (2016). "Subtropical Species of *Sinningia* (Gesneriaceae): Distribution Patterns and Limiting Environmental Factors." *Flora*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2016.04.002>.
- Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L., & Mari, M. (2014). "Production of Volatile Organic Compounds by *Aureobasidium Pullulans* as a Potential Mechanism of Action against Postharvest Fruit Pathogens." *BIOLOGICAL CONTROL*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.10.004>.
- Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology*. 49: 1–173.
- García, T., Knaak, N., & Fiuza, L. (2015). "Endophytic Bacteria as Biological Control Agents in Rice Fields." *Agricultural Microbiology* 82: 1–9.
- Gonçalves, A., & Diniz S. (2008). "Diversidade de Interações Micróbio-Planta e Processos Ecosistêmicos." *Ecologia de comunidades e ecossistemas*. 1-15.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hernández-Tasco, A. J. (2016). Investigação microbiológica, condições de crescimento e potencial metabólico para a busca de produtos naturais bioativos no fungo endofítico *Cladosporium* sp. (AC-1) isolado de *Annona cacans* (Annonaceae). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP.
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M., Macías-Rodríguez, L., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-

Cantero, E. & Santoyo, G. (2014). "Organic Compounds Produced by *Pseudomonas fluorescens* Strains Corresponding Author: Gustavo Santoyo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas," *BIOLOGICAL CONTROL*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>.

Hong-thao, Phan Thi, Nguyen Vu Mai-linh, Nguyen Thi Hong-lien, & Nguyen Van Hieu. (2016). "Biological Characteristics and Antimicrobial Activity of Endophytic *Streptomyces* sp. TQR12-4 Isolated from Elite *Citrus nobilis* Cultivar Ham Yen of Vietnam." 2016: 1–8.

Hushna, A., Minako, K., Miyazawa, M., & Hyakumach, M. (2013). "Analysis of Volatile Organic Compounds Emitted by Plant Growth-Promoting Fungus *Phoma* sp. GS8-3 for Growth Promotion Effects on Tobacco." *Microbes Environ* 28(1): 42–49.

Ismaiel, A., Ashraf S. Ahmed, & Ismail A. Hassan. (2017). "Production of Paclitaxel with Anticancer Activity by Two Local Fungal Endophytes, *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima*." 5831–46.

Joly, Carlos A., Hadd, Célio F. B., Verdade, Luciano M., Cabral, de Oliveira Mariana, Da Silva, Bolzani Vanderlan, & Berlinck R. (2011). *Diagnóstico Da Pesquisa Em Biodiversidade No Brasil*. 89: 114-133.

Kandpal, K. C., Jain, D. A., Kumar, U., Tripathi, Rashmi, & Kumar, T Siva. (2012). "Isolation and Screening of Endophytic Actinomycetes Producing Antibacterial Compound from *Citrus aurantifolia* Fruit." 2(5): 1733–37.

Kusari, Souvik, Satpal Singh, & Chelliah Jayabaskaran. (2014). "Biotechnological Potential of Plant-Associated Endophytic Fungi: Hope versus Hype." *Trends in Biotechnology* 32(6): 297–303.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.03.009>.

Lane, D. J.; Pace, B.; Olsen, G. J.; Stahl, D. A.; Sogin, M. L.; Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 6955-6959

Materic, D., Bruhn, D., Turner, C., Morgan, G., Mason, N., & Gauci, V. (2015). "METHODS IN PLANT FOLIAR VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS RESEARCH." *Applications in Plant Sciences* 3: 1–10.

- Morath, Shannon U., Hung, R. & Bennett, J. (2012). "Fungal Volatile Organic Compounds: A Review with Emphasis on Their Biotechnological Potential." *Fungal Biology Reviews* 26(2–3): 73–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Weber, N. S., & Trappe, J. M. (1997). Phylogenetic Relationships among Ascomycetous Truffles and the True and False Morels Inferred from 18S and 28S Ribosomal DNA Sequence Analysis. *Mycologia*, 89(1), 48–65.
- Okeke, M. J.; Iroegbu, C. U.; Eze, E. N.; Okoli, A. S., & Esimone, C. O., (2001). Evaluation of extracts of the root of Landolphia owenstonii for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 78: 119-127
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2016). "Performance Evaluation of Volatile Organic Compounds by Antagonistic Yeasts Immobilized on Hydrogel Spheres against Gray, Green and Blue Postharvest Decays." *Food Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.021>.
- Park, Eui-ho, Hanhong, B., Woo, Tae Park, Yon Bok Kim, Soo Cheon Chae & Sang Un Park. (2012). "Improved Shoot Organogenesis of Gloxinia (*Sinningia speciosa*) Using Silver Nitrate and Putrescine Treatment." 5(1): 6–9.
- Powell, J., & Klironomos J. (2007). "The Ecology of Plant–Microbial Mutualisms." 5: 12-34.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3273-3279 p.
- Raza, Waseem, Yuan, J., Ning, Ling, Qiwei, Huang, & Qirong, Shen. (2015). "Production of Volatile Organic Compounds by an Antagonistic Strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the Presence of Root Exudates and Organic Fertilizer and Their Antifungal Activity against *Fusarium oxysporum* F. sp. Niveum." *BIOLOGICAL CONTROL* 80: 89–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.004>

- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*.4: 406-425.
- Salvador, M. J.; Ferreira, E. O.; Pral, E. M. F.; Alfieri, S. C.; Albuquerque, S.; Ito, I. Y.; & Dias, D. A., (2002). Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae). *Phytomedicine*, 9: 566-571.
- Salvador, M.J., Pereira, P.S., França, S.C., Candido, R.C., Ito, I.Y., & Dias, D.A (2003). Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adults plants extracts from *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:131-136 p.
- Salvador, M. J., Ferreira, E. O., Mertens-Talcott, S. U., De Castro, W. V., Butterweck, V., Derendorf, H., & Dias, D. A. (2006). Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 61(1–2), 19–25.
- Sánchez-Fernández, Rosa Elvira et al. (2013). “Hongos Endófitos: Fuente Potencial de Metabolitos Secundarios Bioactivos Con Utilidad En Agricultura Y Medicina.” 16(2): 132–46.
- Selosse, M., Baudoin, E. & Vandenkoornhuysse, P. (2004). “Symbiotic Microorganisms, a Key for Ecological Success and Protection of Plants.” 327: 639–48.
- Smedsgaard, J., (1997). Microscale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of Chromatography Products*. 760: 264-270.
- Sharma, M., Pinki, D., & Meenakshi, C. (2014). “Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications.” *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(2): 801–32.
- Stach, J. E. M., Maldonado, L. A.; Ward, A. C., Goodfellow, M., & Bull, A. T., (2003). New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 5: 828–841.

- Strobel, Gary A. (2003). "Endophytes as Sources of Bioactive Products." *Microbes and Infection* 5: 535–44.
- Sun, G., Oide, S., Tanaka, E., Shimizu, K., & Tanaka, C. T. (2003). M. species separation in *Curvularia "geniculata"* group inferred from brnI gene sequences. *Mycoscience* 44: 239-244, 2.
- Tawfike, A., Grainne, Abbott, Louise, Young, & RuAngelie Edrada-Ebel, (2017), Metabolomic-Guided Isolation of Bioactive Natural Products from *Curvularia* sp., an Endophytic Fungus of *Terminalia laxiflora*, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, 12:45-56.
- Van, Soolingen D, Hermans, P.W.M, de Haas P.E.W, Soll, D.R., & Van Embdenl J.D.A. (1991). Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(11): 2578-2586
- Venugopalan, A., & Srivastava, S. (2015). "Endophytes as *in vitro* Production Platforms of High Value Plant Secondary Metabolites." *Biotechnology Advances*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.004>.
- Verdan, M., & Stefanello, A. (2012). "Secondary Metabolites and Biological Properties of Gesneriaceae Species." 9: 2701–31.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA, p,315–322.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., & Prior R.L. (2004). Lipophilic and hydrophilic capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4026-4037 p.
- Zaitlin, David. (2012). "Research Article Intraspecific Diversity in *Sinningia speciosa* (Gesneriaceae: Sinningieae), and Possible Origins of the Cultivated Florist' S Gloxinia.": 1–17.

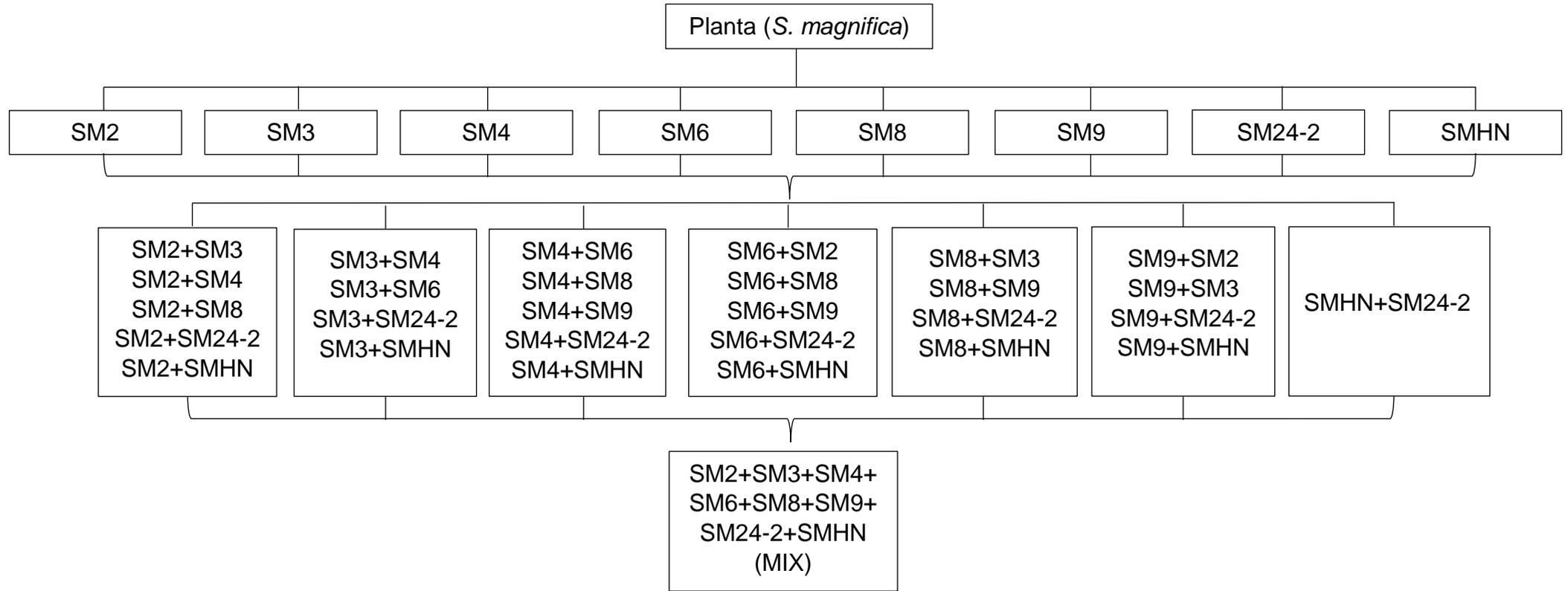
Zaiyou, J., Meng, L., & Hu, X. (2017). "An Endophytic Fungus Efficiently Producing Paclitaxel Isolated from *Taxus wallichiana* Var. *Mairei*." 27 (April): 8–11.

14. Anexos

Anexo 1. Tabla con la composición de los medios de cultivo

Medio de Cultivo	Composición (g/L)
(MS) Murashige & Skoog	Solución de Macronutrientes 10 X (NH ₄ NO ₃ 1.65 g/l, KNO ₃ 1.9 g/l, MgSO ₄ .7H ₂ O 0.37 g/l, CaCl ₂ 0.33 g/l, KH ₂ PO ₄ 0.17 g/l; Solución de micronutrientes 100X (KI 0.83 mg/l, H ₃ BO ₃ 6.2 mg/l, MnSO ₄ .4H ₂ O 22.3 mg/l, ZnSO ₄ .7H ₂ O 8.6 mg/l, Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0.25 mg/l, CuSO ₄ .5H ₂ O 0.025 mg/l, CoCl ₂ .6H ₂ O 0.025 mg/l; Solución EDTA-Fe Na ₂ .EDTA 37.3 mg/l, FeSO ₄ .7H ₂ O 27.8 mg/l); Solución Vitaminas Inositol 100 mg/L Acido Nicotínico 0.5 mg/L, Piridoxina HCl 0.5 mg/L, Tiamina HCl 0.1 mg/L Glicina 2 mg/L, Sacarosa (30 g), Phytigel (2,5 g), Carbón activado (1 g), Inositol (0,01 g).
SNA	Glucosa (0,2g), sacarosa (0,2g), KH ₂ PO ₄ (1g), KNO ₃ (1g), MgSO ₄ (0,25g), KCl (0,50 g) y agar (14g)
Agar Czapek	Sacarosa (30g), NaNO ₃ (3g), Na ₂ (PO ₄) ₃ (1g), MgSO ₄ (0,5g), KCl (0,5g), FeSO ₄ (0,01g), Agar (15g)
MEA	Extracto de malta (3%), peptona (0.1%), glucosa (2%), CuSO ₄ x 5H ₂ O (0,0005%), ZnSO ₄ x 7H ₂ O (0,001%) y Agar (1,50%)
PDA	Extracto de papa (4g), dextrosa (20g), Agar (15g)
Sabouraud-Dextrosa	Peptona (10g), dextrosa (40g) y Agar (12g)
OA	Harina de avena (3%), CuSO ₄ x 5H ₂ O (0,0005%), ZnSO ₄ x 7H ₂ O (0,001%) y Agar (1,50%)
Agar Nutritivo	Pluripeptona (5.0 g), extracto de carne (3.0 g), Cloruro de sodio (2.0 g), Agar (15 g).
Agar ISP2	Extracto de levadura (4.0 g), Extracto de Malta (10 g), Dextrosa (4.0 g), Agar (15 g).
Agar Czapek Dox	Sacarosa (30g), NaNO ₃ (3g), Na ₂ (PO ₄) ₃ (1g), MgSO ₄ (0,5g), KCl (0,5g), FeSO ₄ (0,01g), Agar (15g).
Caldo MS	Sacarosa (30g), Solución de Macronutrientes (100 ml), solución de micronutrientes (1 ml), solución de vitaminas (1 ml), EDTA-Fe (5 ml), Phytigel (2,5 g), Inositol (0,01 g).
Caldo ISP2	Extracto de levadura (4.0 g), Extracto de Malta (10 g), Dextrosa (4.0 g)
Caldo Sabouraud-Dextrosa	Peptona (10g), dextrosa (40g)
Solución Salina	Cloruro de sodio (9 g)
Solución NT	Tween 80 0,1%, NaCl 0.9 %

Anexo 2. Diseño experimental utilizado para los experimentos entre microorganismos endofíticos cultivables Vs. *S. magnifica* (co-cultivos, prueba de actividad antioxidante y antimicrobiana)



Anexo 3. Características macroscópicas cepas de hongos filamentosos y bacterias endofíticas de *S. magnifica*.

Cepa	Medio	Tamaño	Color	Forma	Margen	Elevación	Textura	Pigmentación o Exudado
Hongos Filamentosos	SNA	22 mm	Anv: Beige borde gris	Circular	Entera	Convexa	Algodonoso	No
			Rev: Marrón borde gris					
	Czapek	22 mm	Anv: Amarillo oscuro borde blanco	Circular	Entera	Convexa	Algodonoso	No
			Rev: Marrón borde blanco					
	MEA	20 mm	Anv: Verde oscuro borde crema, gris	Circular	Entera	Convexa	Algodonoso	No
			Rev: Negro borde gris					
	PDA	23 mm	Anv: Verde borde blanco	Circular	Enrulada	Umbonada	Aterciopelado pulverulento	No
			Rev: Negro borde blanco					
	Sabouraud	25 mm	Anv: Verde borde blanco	Circular	Enrulada	Umbonada	Aterciopelado	No
Rev: Marrón borde crema								
OA	32 mm	Anv: Verde	Filamentosa	Filamentosa	Convexa	Algodonoso	No	
		Rev: Marrón claro						
SNA	17 mm	Anv: Verde Oscuro borde blanca	Circular	Entera	Umbonada	Pulverulento	No	
		Rev: Verde Oscuro borde blanca						
Czapek	19 mm	Anv: Amarillo	Filamentosa	Filamentosa	Umbonada	Algodonoso	No	

SM6	MEA	15 mm	Rev: Marrón	Circular	Entera	Umbonada	Pulverulento	No
			Anv: Verde Oscuro borde crema					
	PDA	18 mm	Rev: Verde Oscuro borde crema	Irregular	Enrulada	Umbilicada	Pulverulenta	No
			Anv: Verde oscuro centro oscuro					
	Sabouraud	23 mm	Rev: Negro borde crema	Circular irregular	Entera	Pulvinada	Pulverulenta	No
Anv: Verde con pliegues blancos								
OA	17 mm	Rev: Negro borde crema	Circular	Entera	Umbonada	Pulverulenta	No	
		Anv: Verde oscuro borde blanco						
SM24- 2	SNA	40 mm	Rev: Verde oscuro borde blanco	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Aterciopelada	No
			Anv: Negro borde marrón					
	Czapek	42 mm	Rev: Negro borde marrón	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Aterciopelada	No
			Anv: Negro borde marrón					
	MEA	40 mm	Rev: Negro borde marrón	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Aterciopelada	No
			Anv: Negro					
Sabouraud	43 mm	Rev: Marrón oscuro	Circular	Entera	Elevada	Algodonosa	Sí	
		Anv: Marrón centro gris borde blanco						
OA	55 mm	Rev: Marrón anaranjado	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Aterciopelada	No	

Bacterias	SMHN	Czapek	4 mm	Rev: Marrón Anv: Negro Rev: Negro	Irregular	Ondulada	Convexa	Cremosa	No
		MEA	5 mm	Anv: Negro Rev: Negro	Irregular	Ondulada	Convexa	Cremosa	No
		PDA	6 mm	Anv: Negro Rev: Negro	Irregular	Ondulada	Convexa	Cremosa	No
		Sabouraud	5 mm	Anv: Negro Rev: Negro	Irregular	Lobulada	Convexa	Cremosa	No
	SM2	Agar Nutritivo ISP2	Pequeñas	Rojas	Puntiforme	Entero	Plana	Cremosa	-
		Czapek Dox		Rosadas					
	SM3	Agar Nutritivo ISP2	Pequeñas	Rosadas	Puntiforme	Entero	Plana	Cremosa	-
		Czapek Dox							
	SM8	Agar Nutritivo ISP2	Medianas	Blancas	Circulares	Entero	Convexa	Cremosa	-
		Czapek Dox		Beige Blancas					
	SM9	Agar Nutritivo ISP2	Grandes	Anaranjadas	Circulares	Entero	Convexa	Rugosa	-
		Czapek Dox		Amarillas Beige				Viscosa	

Anexo 4. Tabla valores de crecimiento de hongos filamentosos cultivables aislados de *S. magnifica* en medios de cultivo

Tiempo (Horas)	Biomasa producida (mg) medio MS				Biomasa producida (mg) medio caldo Sabouraud-dextrosa			
	SM4	SM6	SM24-2	SMHN	SM4	SM6	SM24-2	SMHN
0	0,012*	0,015	0,018	0,001	0,014	0,017	0,021	0,001
24	0,24	0,03	0,23	0,1	0,16	0,26	0,85	0,2
48	0,25	0,4	0,33	0,1	0,35	0,97	1,35	0,4
72	0,71	0,5	0,61	0,2	0,38	1,24	0,81	0,5
96	0,98	0,81	0,32	0,3	0,74	1,27	1,81	0,42
120	0,8	0,59	0,6	0,6	1	0,86	2,8	0,8
144	0,7	1,75	1	0,4	1,2	0,92	2,3	0,9
168	1,1	0,92	0,5	0,6	0,8	0,99	2,7	0,7
192	0,9	1,08	0,9	0,4	0,7	0,92	1,8	1,2
216	1,4	2,2	0,6	0,8	1,1	0,9	1	1
240	1,2	2,64	0,9	0,8	1,5	0,66	1,3	1
264	0,7	1,62	0,7	0,3	1,2	0,73	1	1,4
288	0,5	1,39	1	0,5	1,2	0,58	0,9	0,9
312	0,4	0,94	1,1	0,8	1,5	0,73	1,3	1,1
336	0,4	1,58	0,9	1,6	1,4	0,77	1	0,9
360	0,2	2,14	1,4	0,9	1,1	0,52	1,3	0,4

*Los datos se expresan como la media X de dos replicas

Anexo 5. Tabla valores de crecimiento de bacterias endófitas de *S. magnifica* en medio de cultivo liquido ISP2.

Tiempo (horas)	Cepas bacterianas/Absorbancia 625 nm			
	SM2	SM3	SM8	SM9
0	0,09633333*	0,14166667	0,06933333	0,06833333
1	0,095	0,14	0,069	0,06833333
2	0,09366667	0,13866667	0,06866667	0,06833333
3	0,09333333	0,138	0,06866667	0,06866667
4	0,09233333	0,13733333	0,06866667	0,06866667
5	0,09133333	0,137	0,069	0,07
6	0,09133333	0,13633333	0,07	0,07433333
7	0,091	0,13533333	0,07266667	0,089
8	0,09066667	0,135	0,08266667	0,136
9	0,09033333	0,13433333	0,11733333	0,24866667
10	0,08966667	0,134	0,20933333	0,44166667
11	0,08966667	0,134	0,33066667	0,56033333
12	0,08933333	0,134	0,40633333	0,63366667
13	0,08933333	0,13366667	0,485	0,66433333
14	0,08933333	0,13333333	0,535	0,70466667
15	0,089	0,133	0,56966667	0,743
16	0,08966667	0,133	0,59033333	0,77366667
17	0,08933333	0,13266667	0,61166667	0,80933333

18	0,08933333	0,133	0,62866667	0,84666667
19	0,08833333	0,13266667	0,648	0,89166667
20	0,08833333	0,13233333	0,65833333	0,93866667
21	0,08833333	0,13233333	0,66666667	0,98966667
22	0,08833333	0,132	0,67233333	1,034
23	0,088	0,132	0,675	1,091
24	0,08833333	0,13166667	0,68433333	1,142
25	0,08833333	0,132	0,68966667	1,19166667
26	0,088	0,132	0,69066667	1,25866667
27	0,08833333	0,132	0,683	1,316
28	0,08733333	0,13133333	0,67566667	1,361
29	0,08766667	0,13133333	0,66633333	1,39566667
30	0,08833333	0,13133333	0,657	1,409
31	0,08733333	0,131	0,64666667	1,41766667
32	0,08733333	0,131	0,63833333	1,43066667
33	0,08766667	0,131	0,629	1,44533333
34	0,08733333	0,131	0,62	1,46733333
35	0,08833333	0,131	0,60933333	1,484
36	0,08766667	0,131	0,59533333	1,49566667
37	0,08733333	0,13066667	0,58166667	1,50766667
38	0,088	0,13066667	0,56266667	1,51666667
39	0,087	0,13	0,547	1,525
40	0,08733333	0,13033333	0,53333333	1,52866667
41	0,08733333	0,13	0,517	1,532
42	0,08733333	0,13	0,51166667	1,534
43	0,08733333	0,13	0,50666667	1,535
44	0,08733333	0,12966667	0,50066667	1,54366667
45	0,08733333	0,12933333	0,49866667	1,52833333
46	0,08733333	0,13	0,49633333	1,52266667
47	0,08733333	0,12933333	0,50033333	1,53733333
48	0,087	0,129	0,499	1,57566667
49	0,08666667	0,129	0,495	1,55233333
50	0,08733333	0,129	0,49166667	1,54833333
51	0,08733333	0,129	0,49133333	1,563
52	0,087	0,129	0,48833333	1,544
53	0,087	0,12866667	0,48866667	1,61466667
54	0,087	0,12866667	0,483	1,59
55	0,08733333	0,12866667	0,479	1,59566667
56	0,087	0,12866667	0,47666667	1,55833333
57	0,087	0,12866667	0,48266667	1,529
58	0,08633333	0,12833333	0,47966667	1,49966667
59	0,08666667	0,12833333	0,477	1,5
60	0,08666667	0,128	0,47466667	1,468

*Los valores de absorbancia se presentan como la media (\bar{X}) de tres replicas

Anexo 6. Tabla valores de crecimiento de bacterias endófitas de *S. magnifica* en medio de cultivo líquido MS.

Tiempo (horas)	Cepas bacterianas/Absorbancia 625nm			
	SM2	SM3	SM8	SM9
0	0,04366667*	0,045	0,04233333	0,04366667
1	0,04333333	0,045	0,04233333	0,044
2	0,04333333	0,045	0,04133333	0,04333333
3	0,04333333	0,045	0,042	0,04366667
4	0,043	0,045	0,04166667	0,04366667
5	0,043	0,045	0,04166667	0,044
6	0,043	0,045	0,04233333	0,04466667
7	0,043	0,045	0,04233333	0,04633333
8	0,043	0,045	0,04233333	0,04966667
9	0,043	0,04433333	0,04266667	0,05266667
10	0,043	0,04466667	0,04433333	0,059
11	0,043	0,04466667	0,04633333	0,06866667
12	0,043	0,045	0,04733333	0,08066667
13	0,043	0,04466667	0,05	0,09666667
14	0,043	0,04466667	0,05333333	0,11033333
15	0,043	0,044	0,058	0,121
16	0,043	0,04433333	0,05933333	0,12666667
17	0,043	0,04433333	0,06066667	0,13033333
18	0,043	0,044	0,05966667	0,13233333
19	0,043	0,04433333	0,06033333	0,13433333
20	0,04266667	0,04433333	0,06066667	0,13533333
21	0,04233333	0,044	0,06033333	0,136
22	0,043	0,044	0,06	0,13566667
23	0,04266667	0,044	0,06066667	0,13633333
24	0,04233333	0,044	0,06166667	0,13566667
25	0,04233333	0,044	0,06033333	0,13533333
26	0,04233333	0,044	0,06066667	0,135
27	0,043	0,044	0,06033333	0,134
28	0,04233333	0,044	0,06233333	0,133
29	0,04266667	0,04433333	0,06133333	0,132
30	0,04266667	0,04433333	0,06033333	0,132
31	0,04266667	0,04433333	0,06033333	0,13133333
32	0,04233333	0,044	0,061	0,131
33	0,04266667	0,044	0,061	0,13066667
34	0,04233333	0,04433333	0,06066667	0,13
35	0,043	0,044	0,06066667	0,12966667
36	0,04233333	0,044	0,06066667	0,12866667
37	0,04233333	0,046	0,06133333	0,12833333
38	0,043	0,04633333	0,06166667	0,12733333
39	0,04233333	0,055	0,06166667	0,12666667
40	0,04233333	0,04666667	0,06233333	0,12566667
41	0,043	0,044	0,06266667	0,125
42	0,04233333	0,06766667	0,06266667	0,12433333
43	0,04233333	0,06966667	0,06266667	0,124
44	0,04233333	0,07	0,063	0,12333333

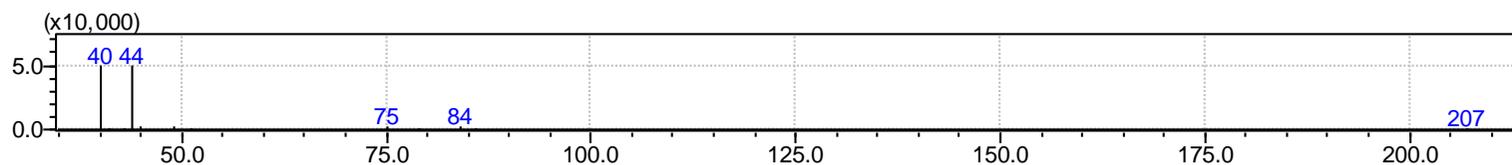
45	0,04233333	0,07666667	0,063	0,123
46	0,04233333	0,07533333	0,06333333	0,12233333
47	0,04266667	0,07333333	0,064	0,12233333
48	0,04233333	0,07033333	0,064	0,12233333
49	0,04233333	0,1	0,06466667	0,122
50	0,04233333	0,11133333	0,06466667	0,12233333
51	0,04233333	0,12433333	0,06533333	0,122
52	0,04233333	0,14033333	0,06633333	0,122
53	0,04266667	0,14266667	0,06633333	0,122
54	0,04233333	0,148	0,067	0,122
55	0,04233333	0,16133333	0,06733333	0,122
56	0,04233333	0,189	0,068	0,121
57	0,04233333	0,243	0,068	0,121
58	0,04233333	0,27966667	0,06966667	0,121
59	0,04233333	0,28566667	0,07	0,121
60	0,04233333	0,294	0,07033333	0,12066667

*Los valores de absorbancia se presentan como la media (\bar{X}) de tres replicas

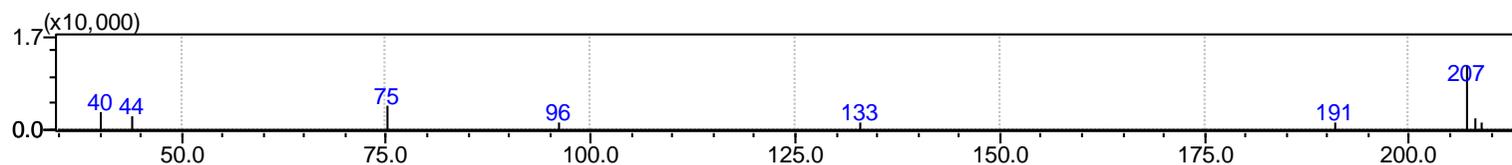
Anexo 7. Datos de los perfiles de fragmentación obtenidos a partir de los tiempos de retención presentes en los cromatogramas.

Anexo 7.1 Análisis por cromatografía gaseosa acoplada a masas de los fragmentos derivados del Medio MS; Planta *in vitro*; Planta + Solución NT; Planta + Solución Salina.

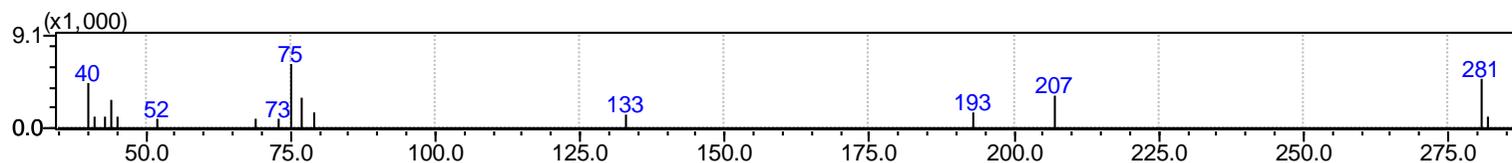
RT:1.683



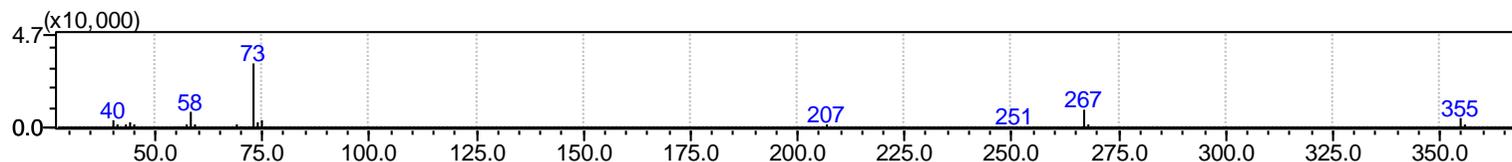
RT: 5.017



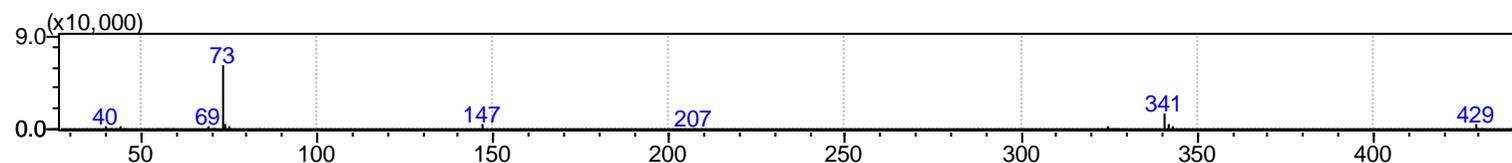
RT:7.433



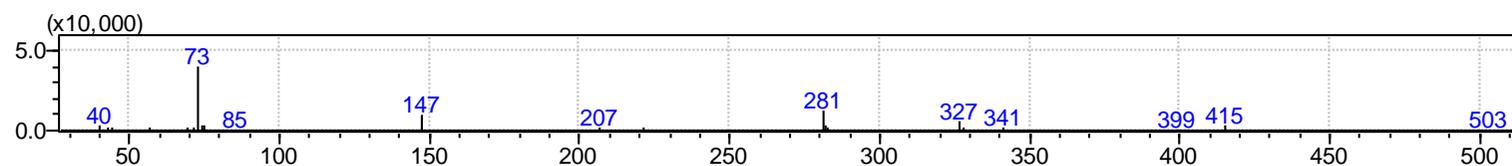
RT:9.083



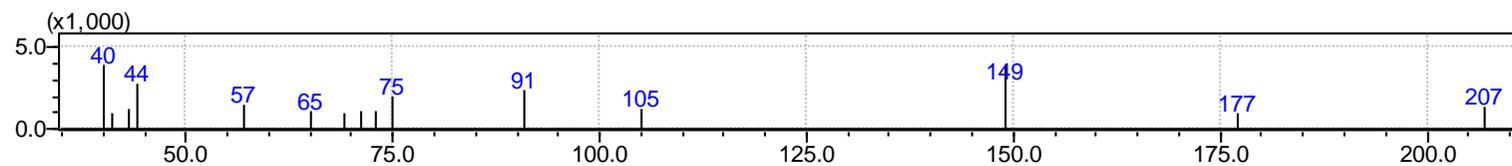
RT:10.767



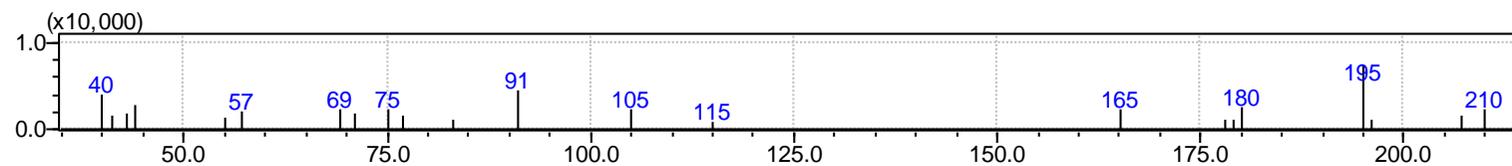
RT: 12.925



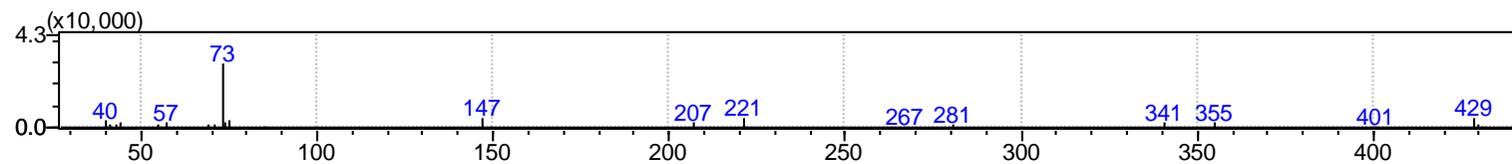
RT:16.700



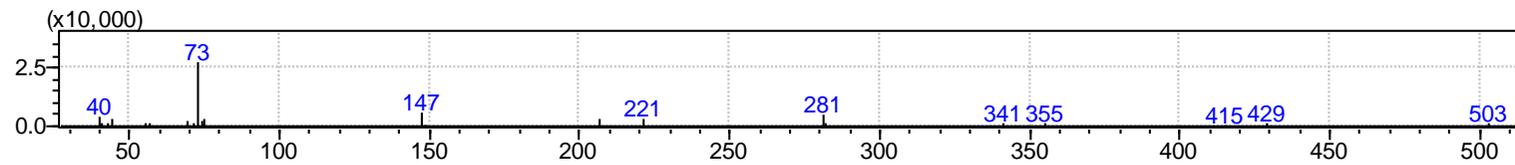
RT:18.200



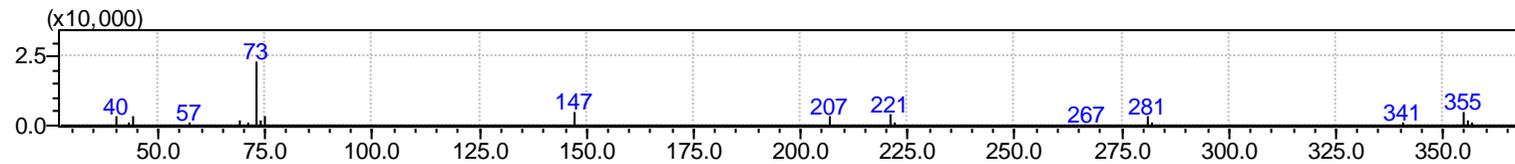
RT: 19.450



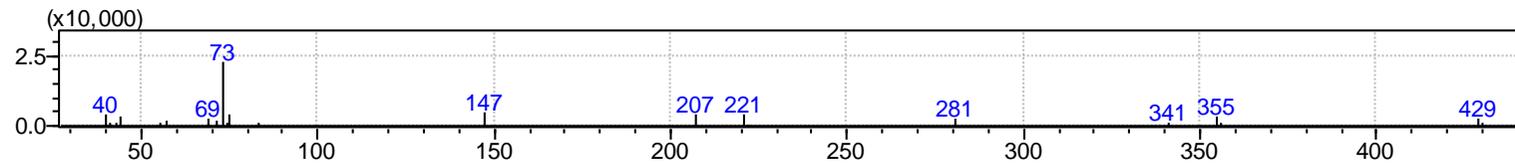
RT:21.317



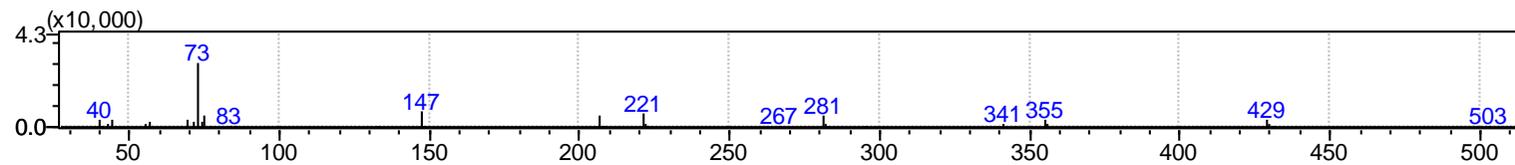
RT:22.800



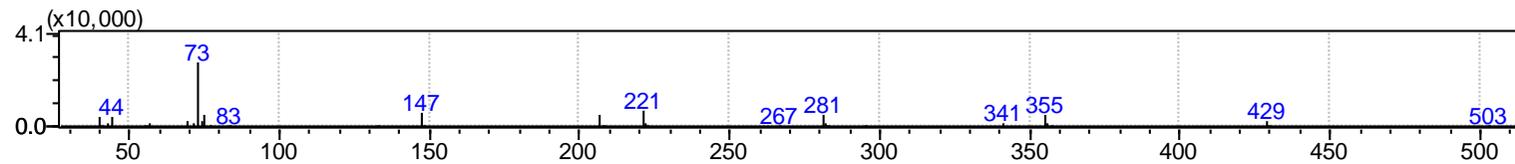
RT:24.067



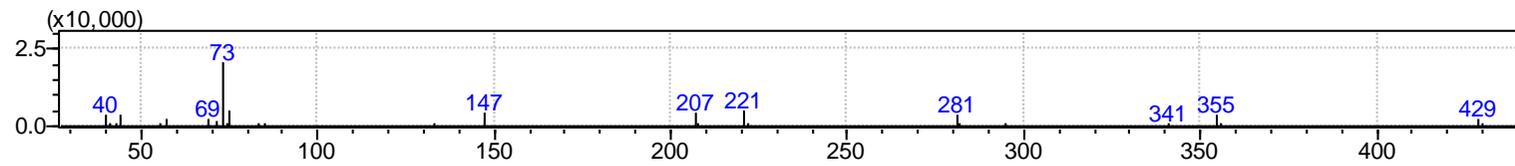
RT:25.208



RT:26.600

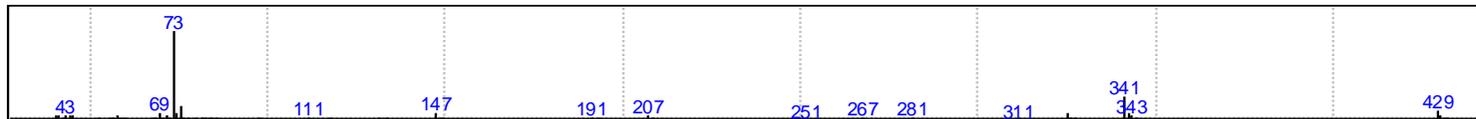


RT:28.442

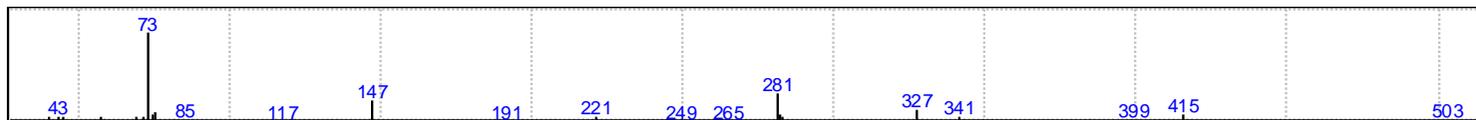


Anexo 7.2. Análisis por cromatografía gaseosa acoplada a masas de los fragmentos derivados de las plantas inoculadas con los microorganismos endofíticos

RT:10.75



RT: 12.925



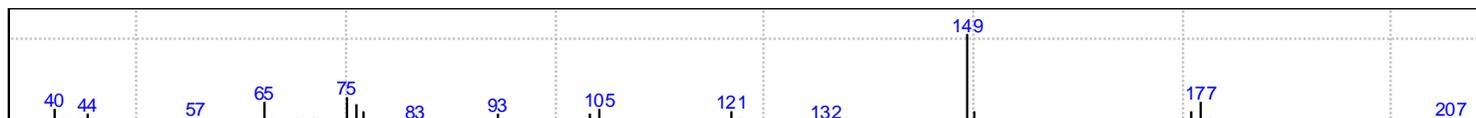
RT: 13.617



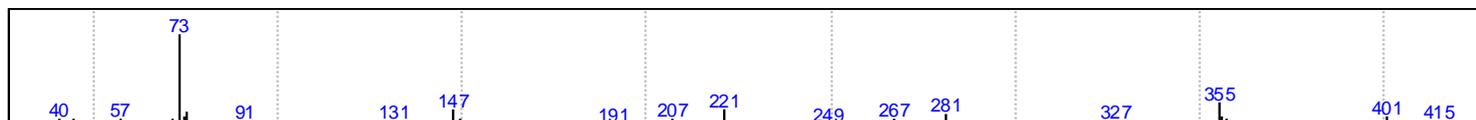
RT:15.258



RT: 15.717



RT: 16.733



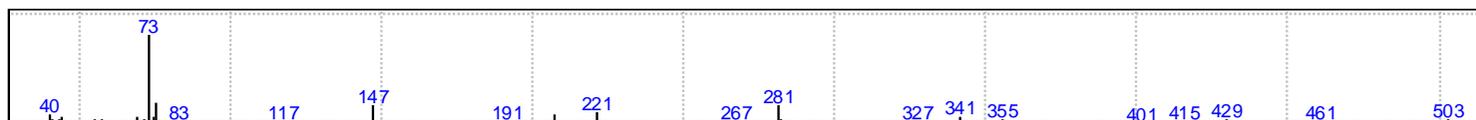
RT: 17.892



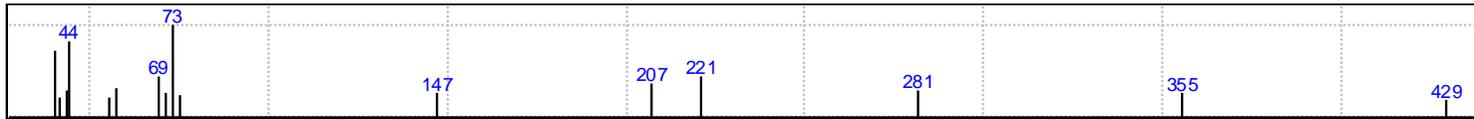
RT: 19.425



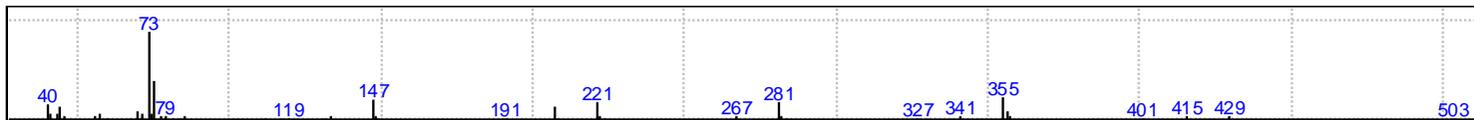
RT: 21.308



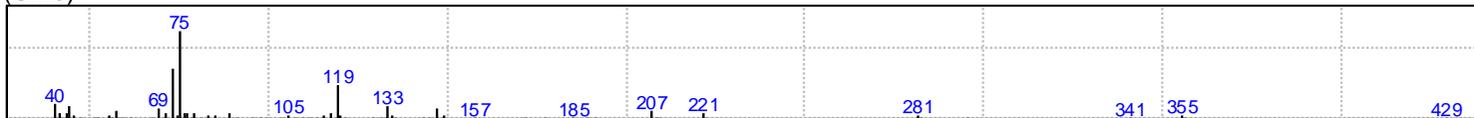
RT: 22.550 (SM6)



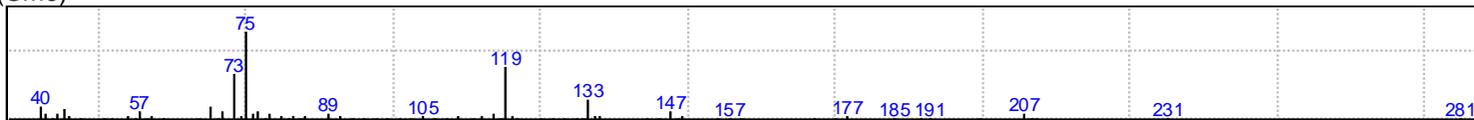
RT: 22.775



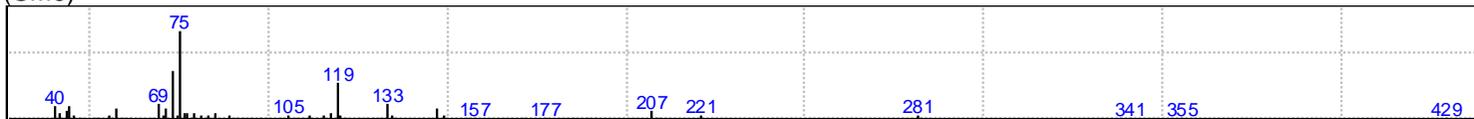
RT: 22.917 (SM6)



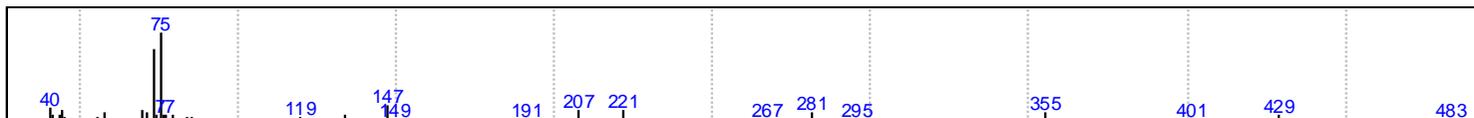
RT: 23.200 (SM6)



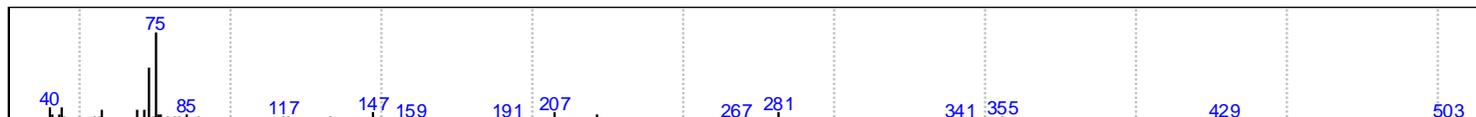
RT: 23.400 (SM6)



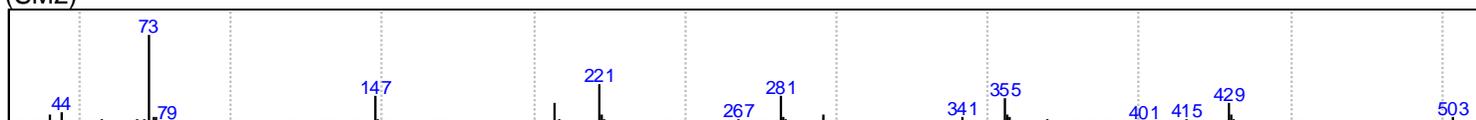
RT: 24.042



RT: 25.200



RT: 25.650 (SM2)



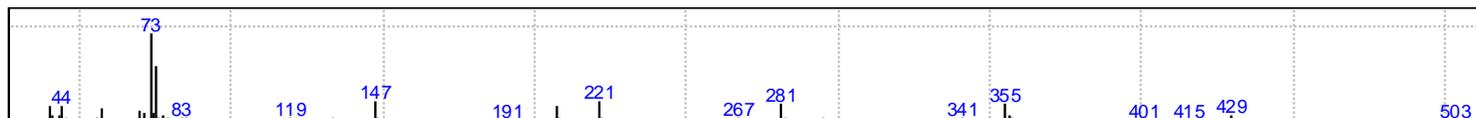
RT: 26.225 (SMHN)



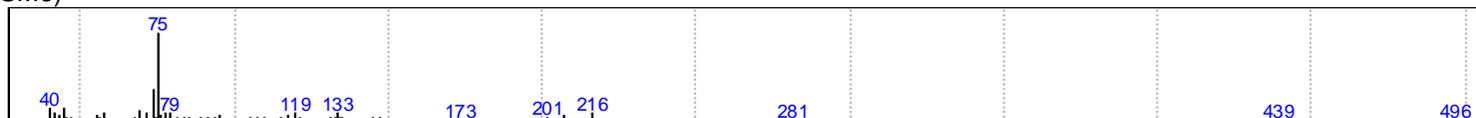
RT: 26.386 (SM6)



RT: 26.575



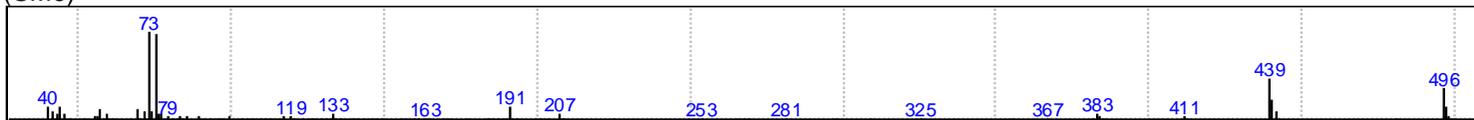
RT: 6.850 (SM6)



RT: 27.108 (SM6)



RT: 28.067 (SM6)

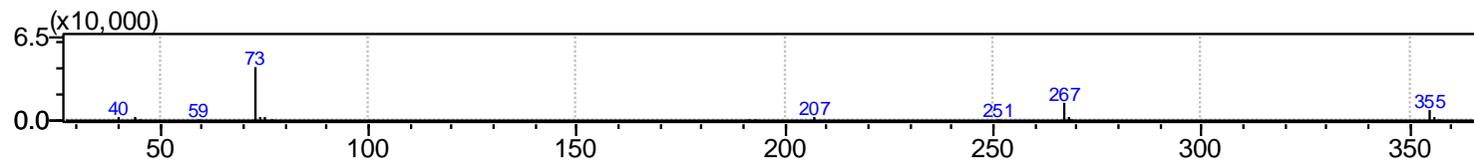


RT: 28.367

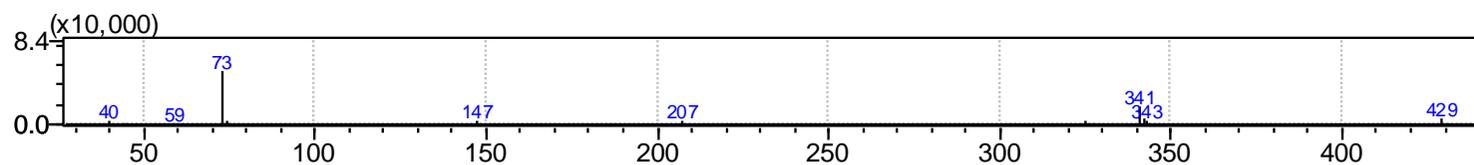


Anexo 7.3. Análisis por cromatografía gaseosa acoplada a masas de los fragmentos derivados de la planta *in vitro* y de la planta inoculada con todos los microorganismos (MIX).

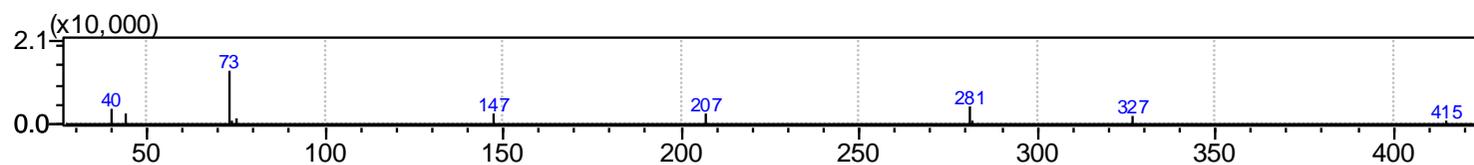
RT: 9.075



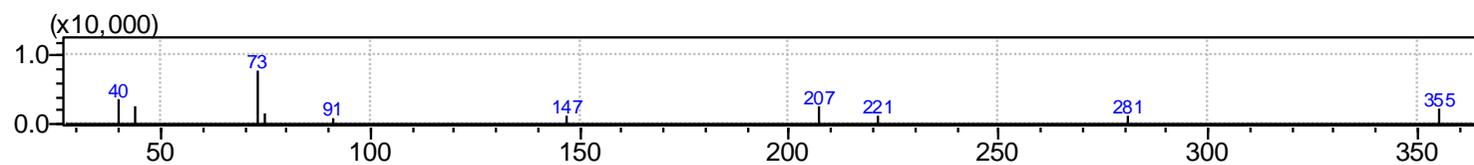
RT: 10.767



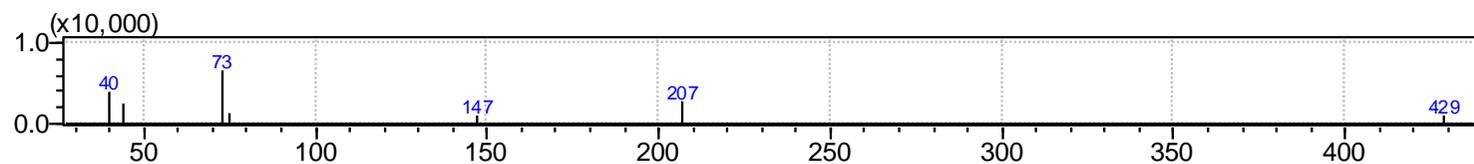
RT: 12.975



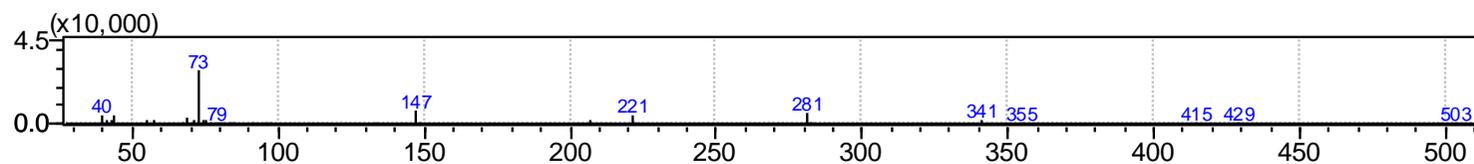
RT: 16.783



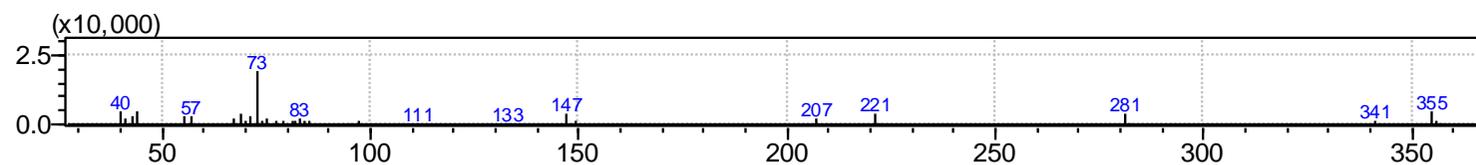
RT: 19.467



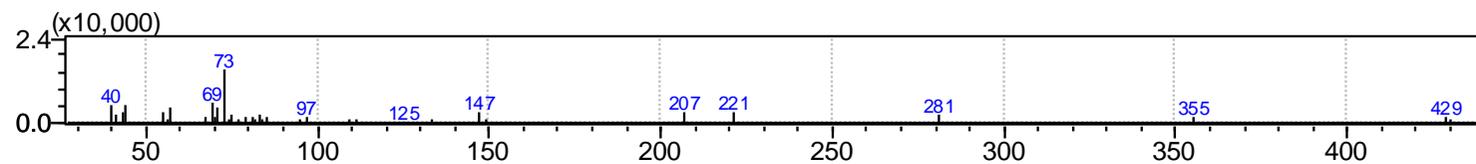
RT: 21.317



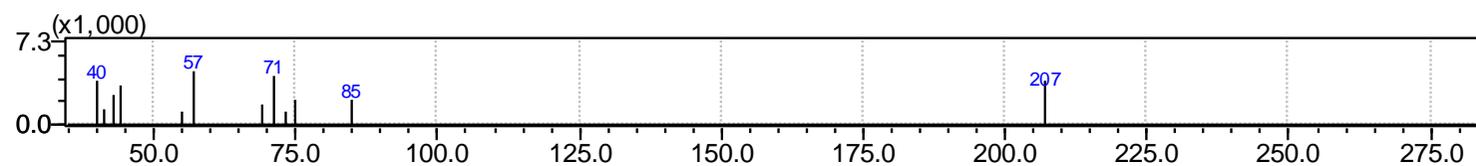
RT: 22.808



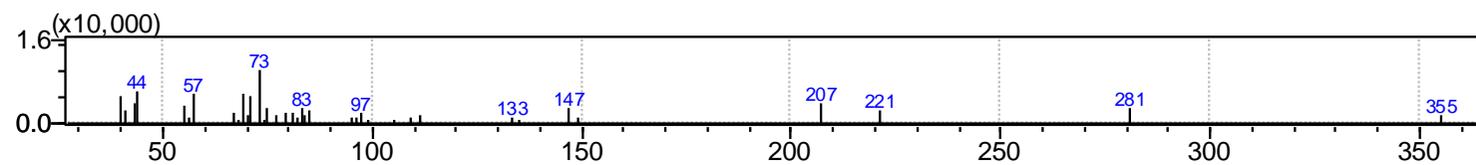
RT: 24.067



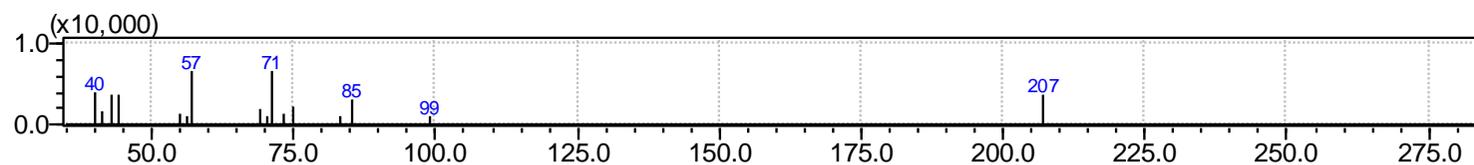
RT: 26.367 (MIX)



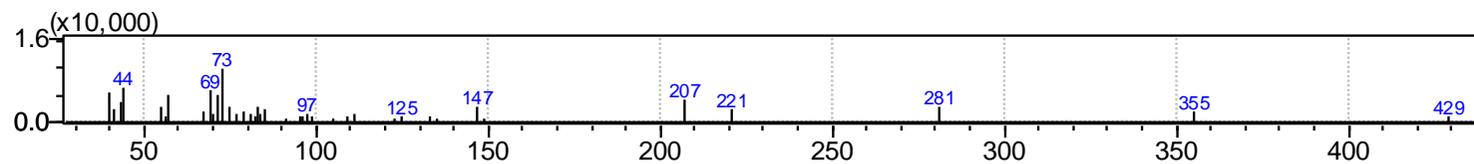
RT: 26.608 (PLANTA)



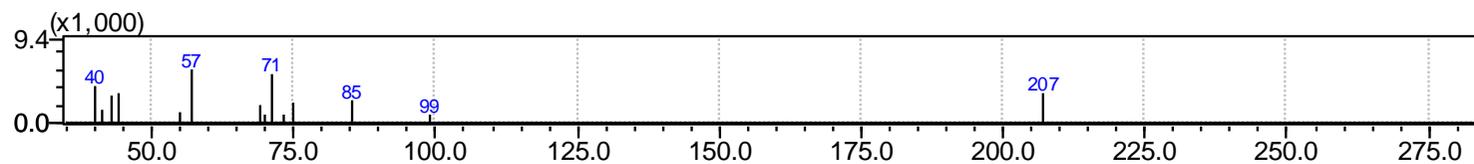
RT: 27.467



RT: 28.433 (PLANTA)

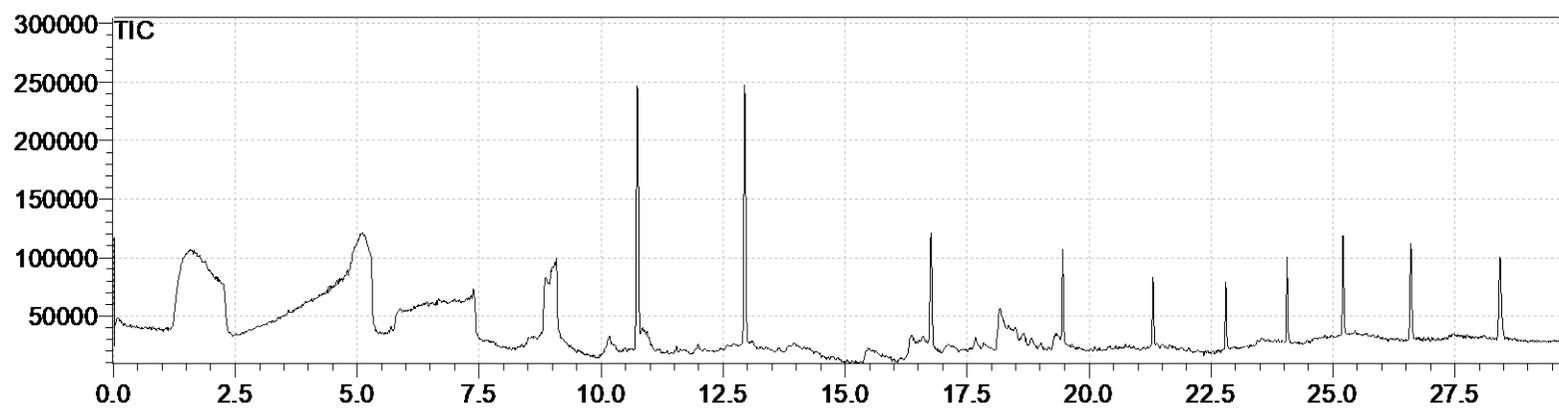


RT: 28.850 (MIX)

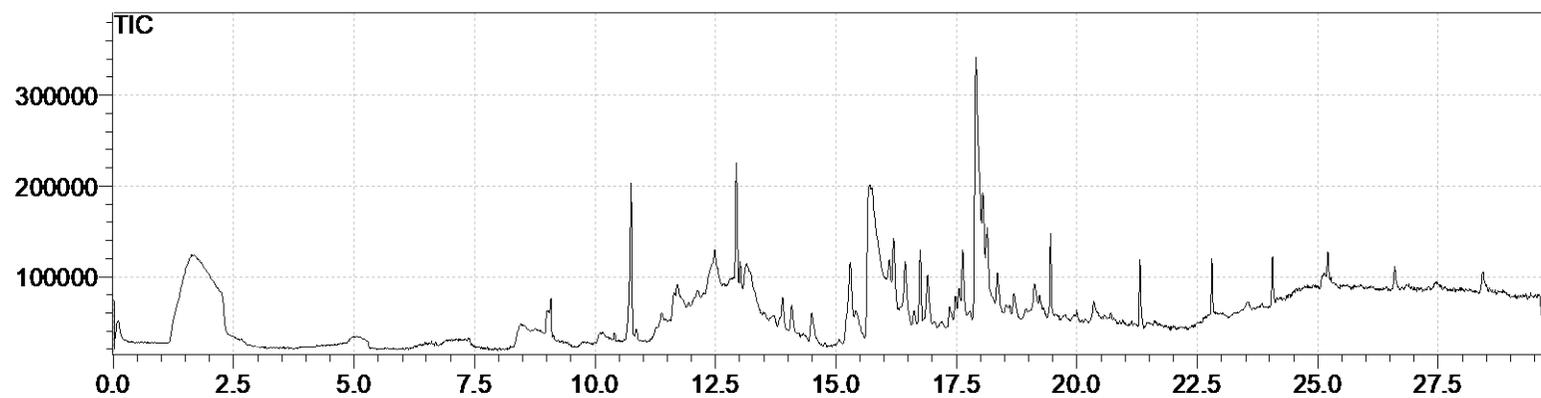


Anexo 8. Perfiles cromatográficos por cromatografía gaseosa de tratamientos individuales efectuados en *S. magnifica*.

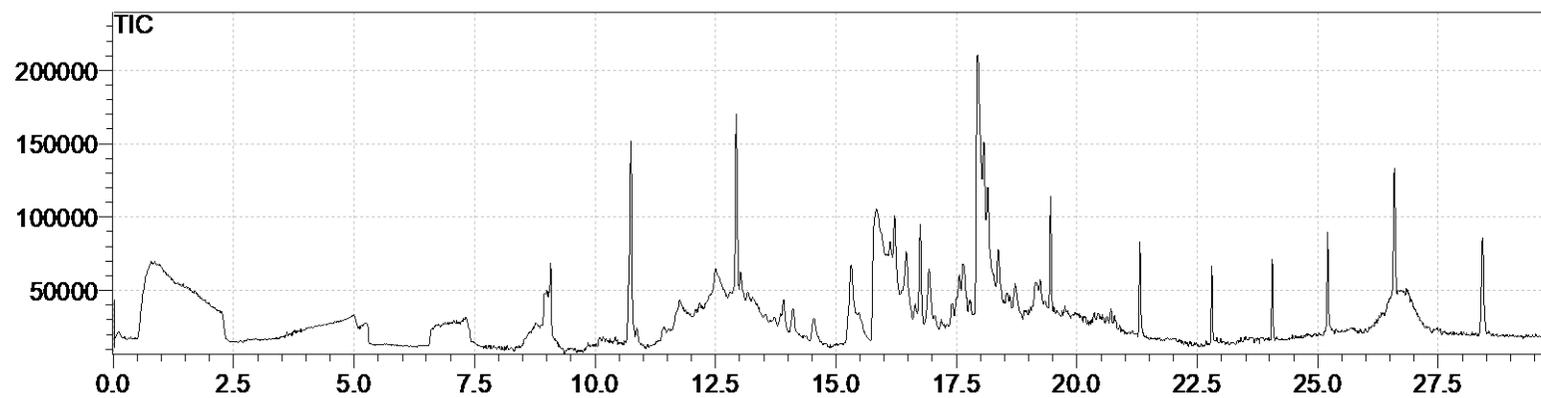
Anexo 8.1 Perfil cromatográfico Medio de Cultivo MS



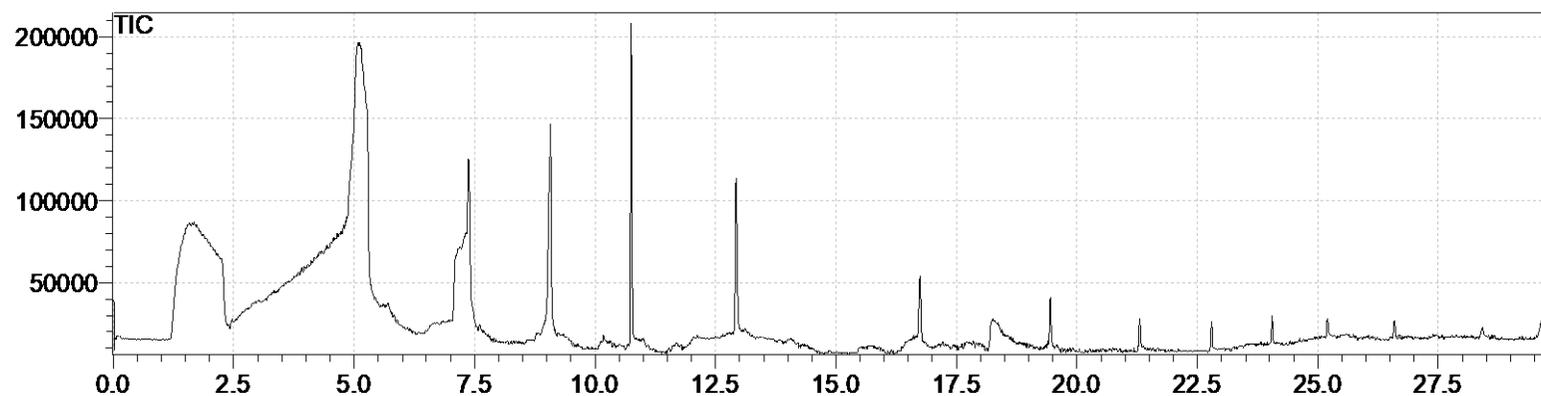
Anexo 8.2 Perfil cromatográfico Planta Control de *S. magnifica*



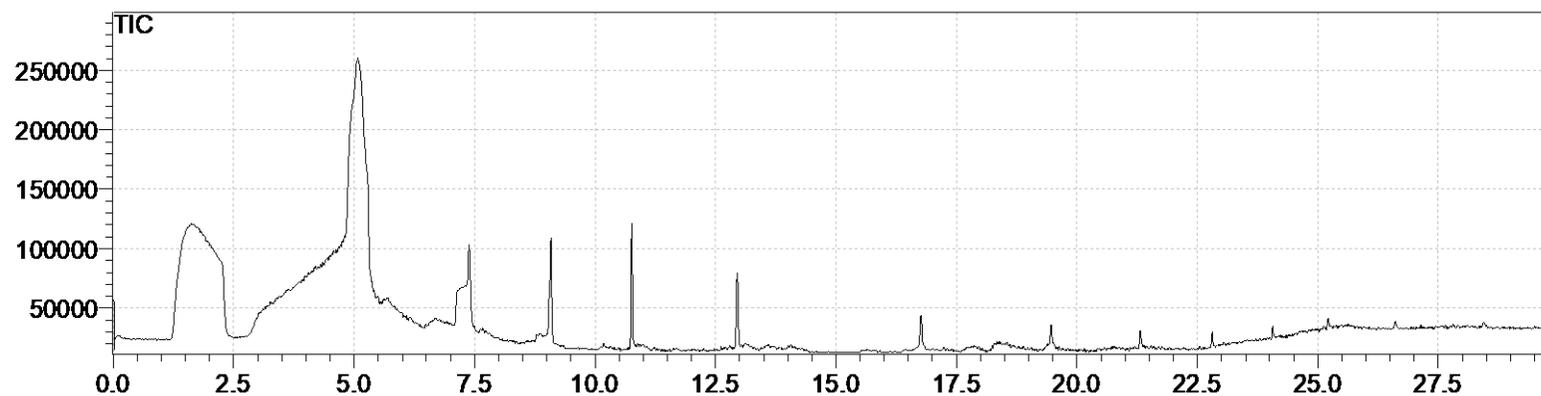
Anexo 8.3 Perfil cromatográfico Planta + Solución NT



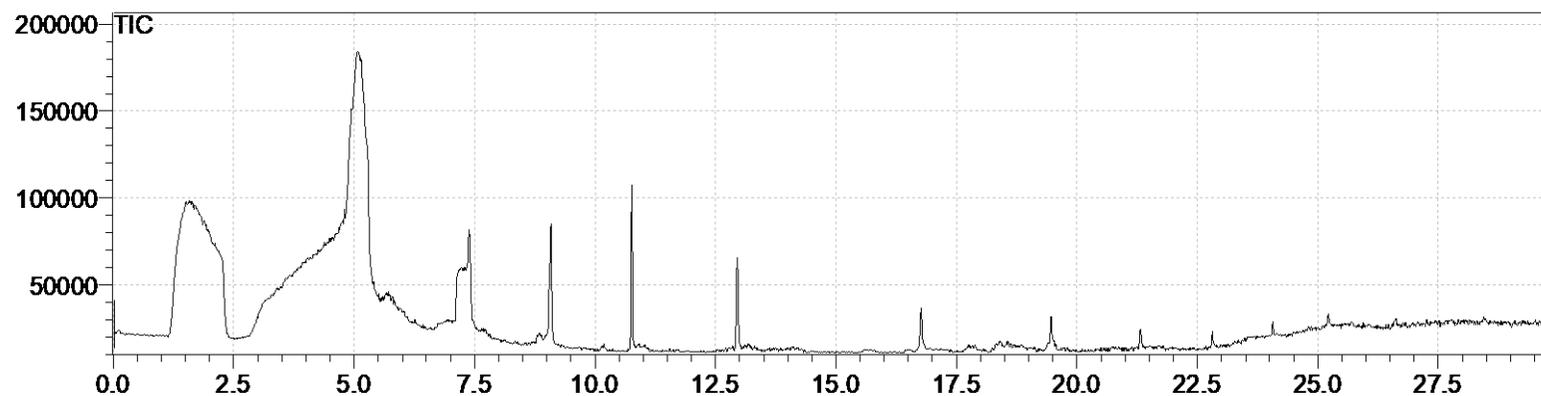
Anexo 8.4 Perfil cromatográfico Planta + Solución Salina



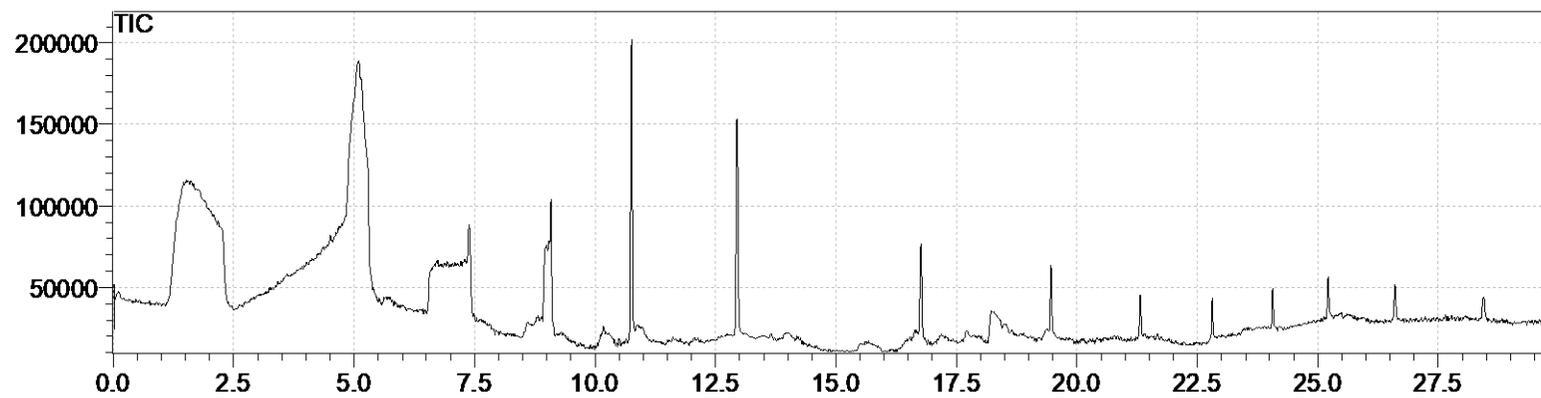
Anexo 8.5 Perfil cromatográfico Planta + SMHN



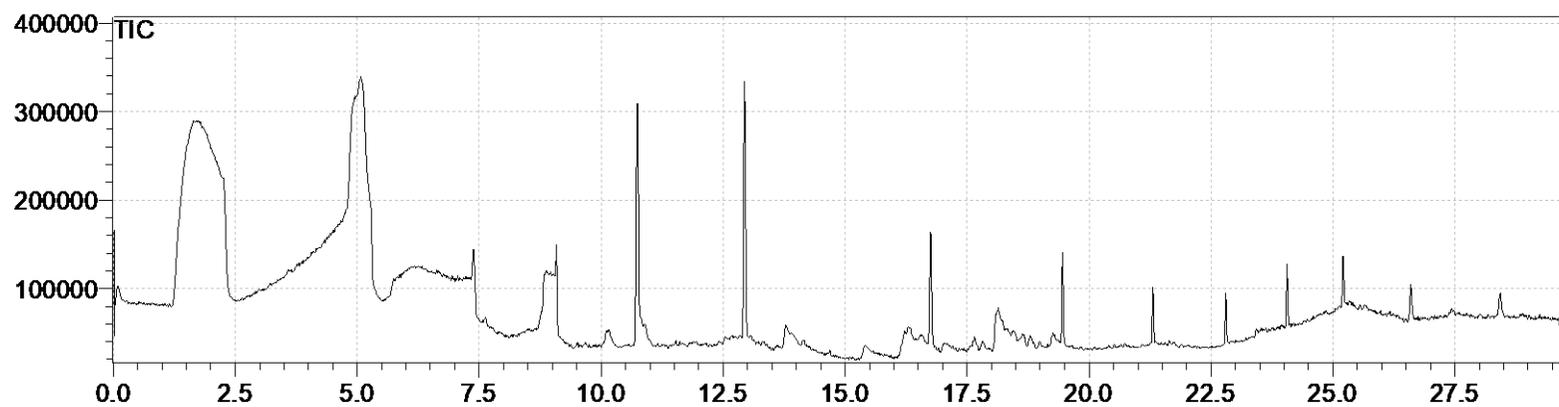
Anexo 8.6 Perfil cromatográfico Planta + SM2



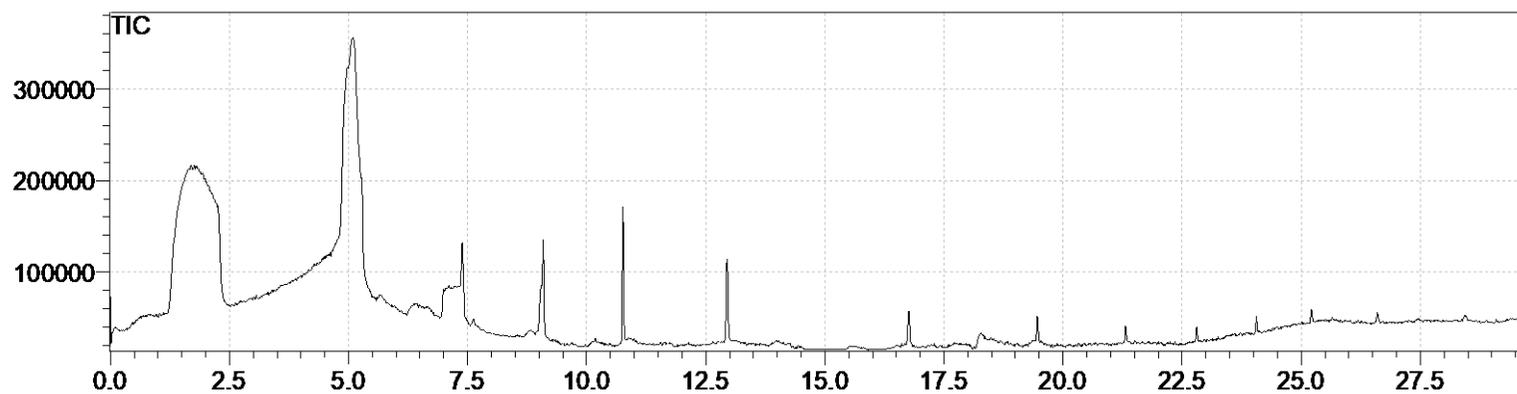
Anexo 8.7 Perfil cromatográfico Planta + SM3



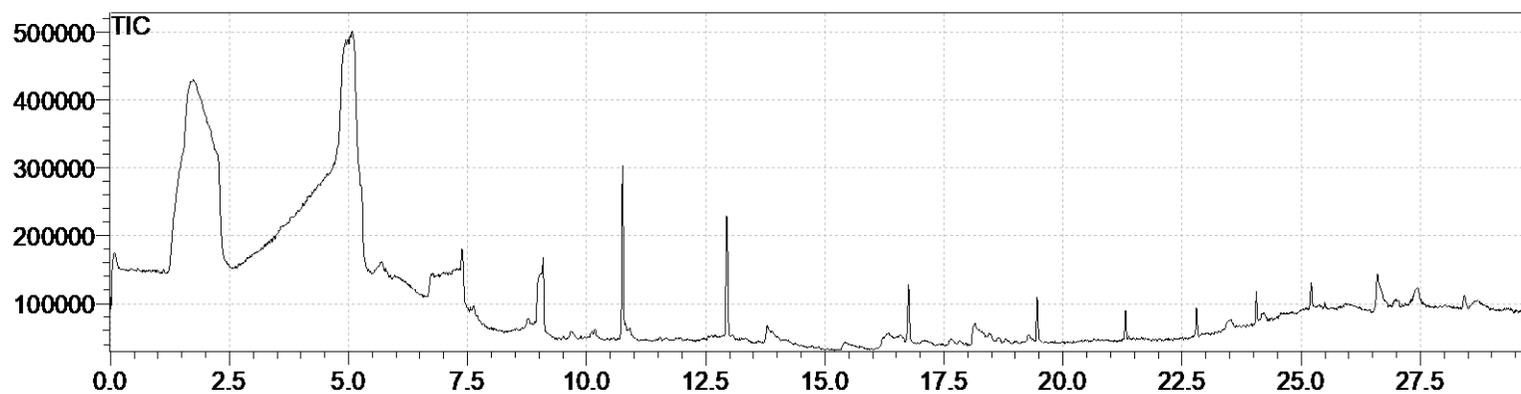
Anexo 8.8 Perfil cromatográfico Planta + SM4



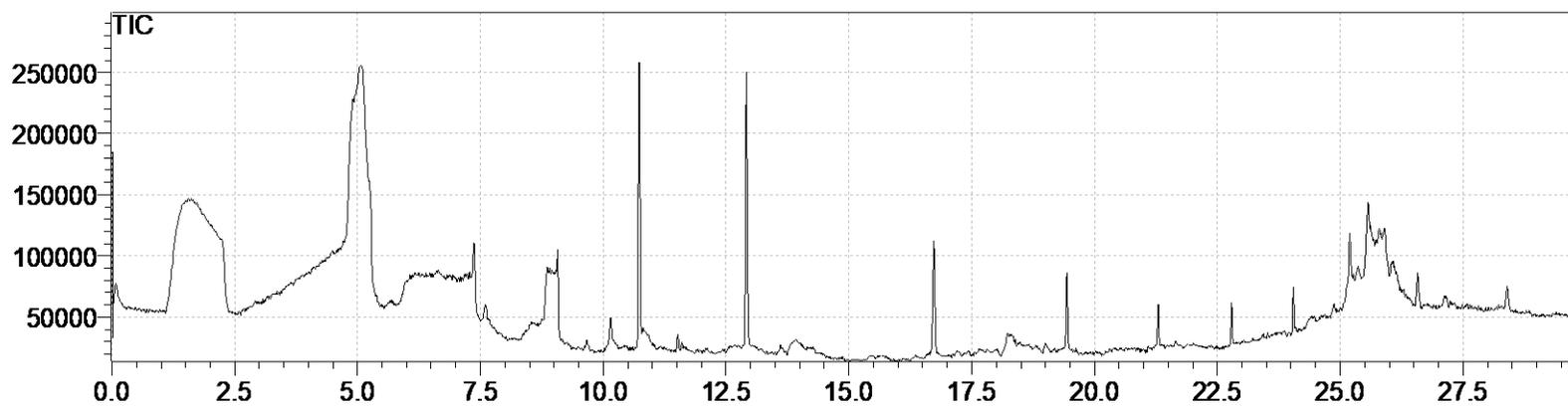
Anexo 8.9 Perfil cromatográfico Planta + SM6



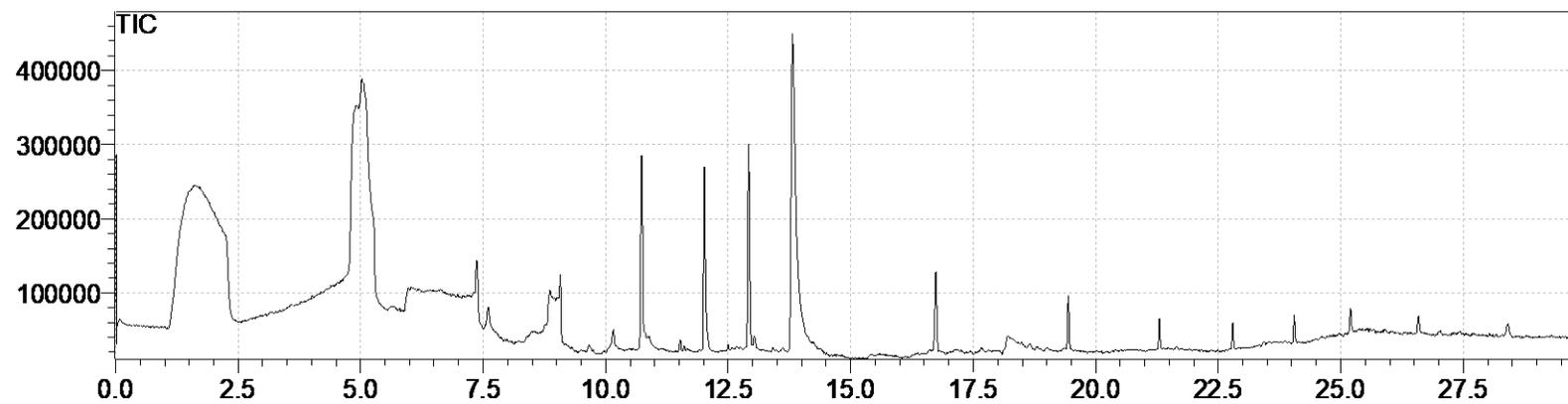
Anexo 8.10 Perfil cromatográfico Planta + SM24-2



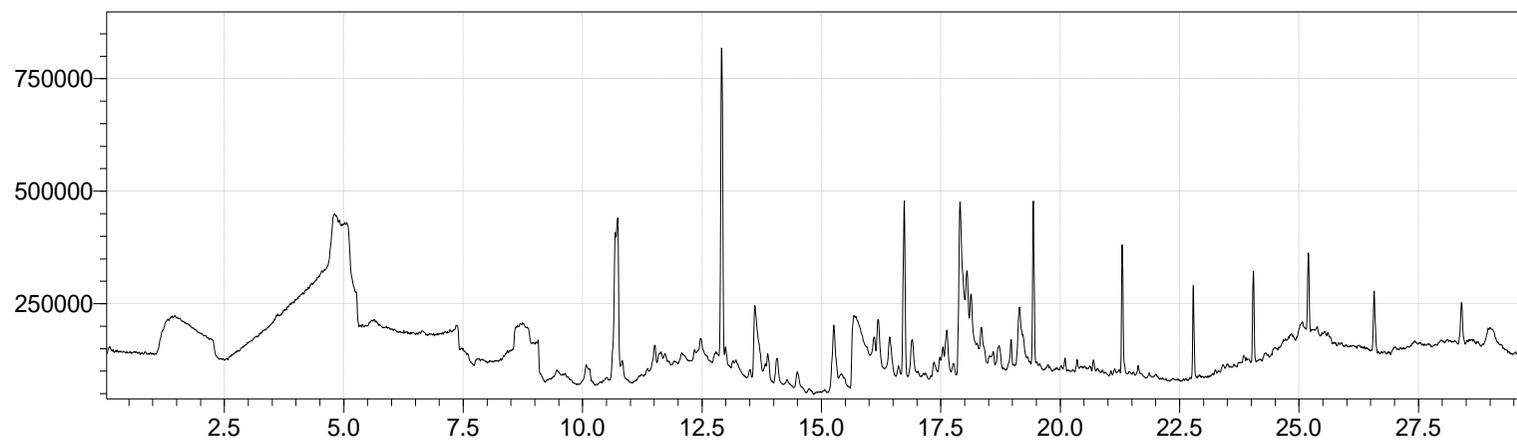
Anexo 8.12 Perfil cromatográfico Planta+SM3+SM6



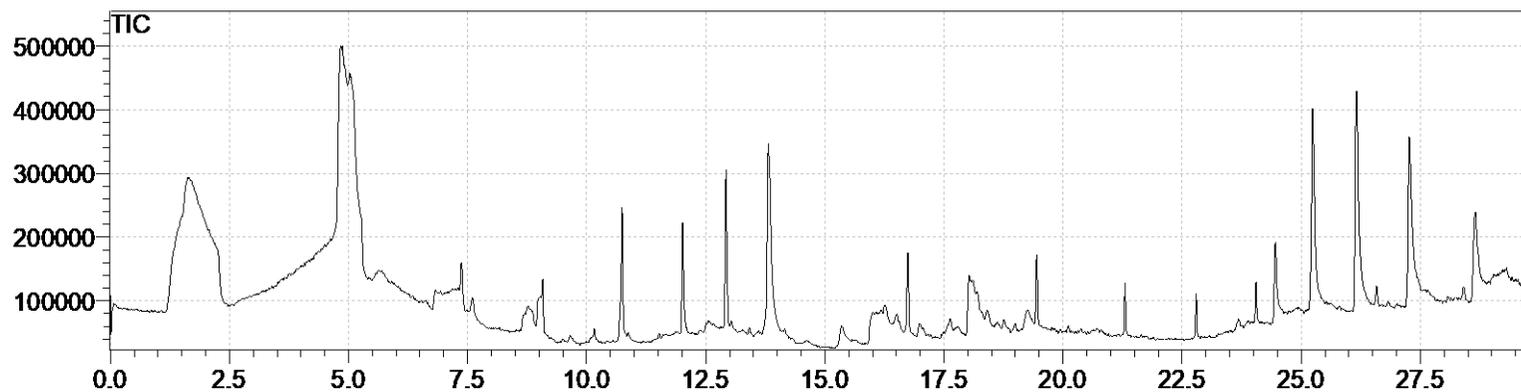
Anexo 8.13 Perfil cromatográfico Planta+SM6+SM24-2



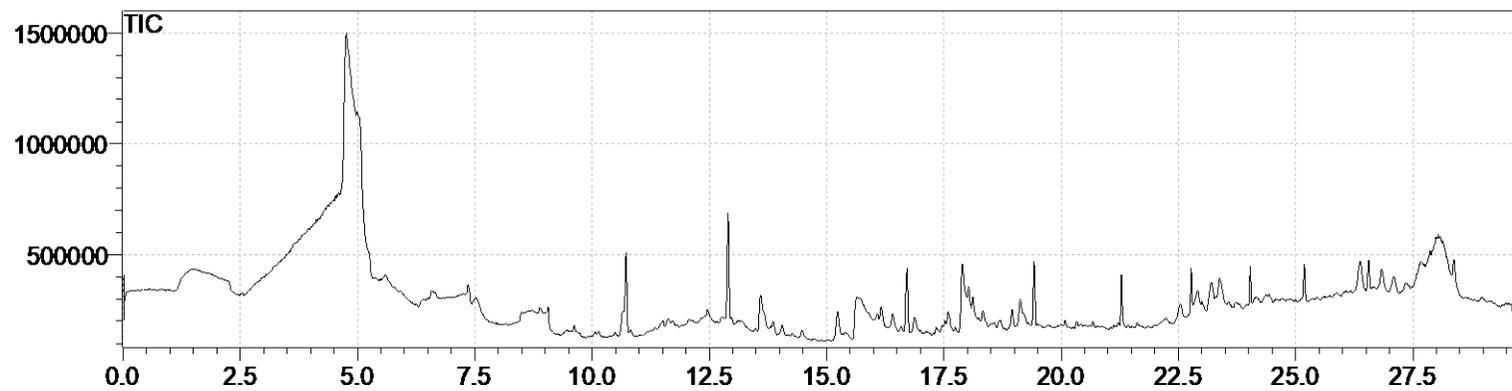
Anexo 8.14 Perfil cromatográfico Planta + SM3



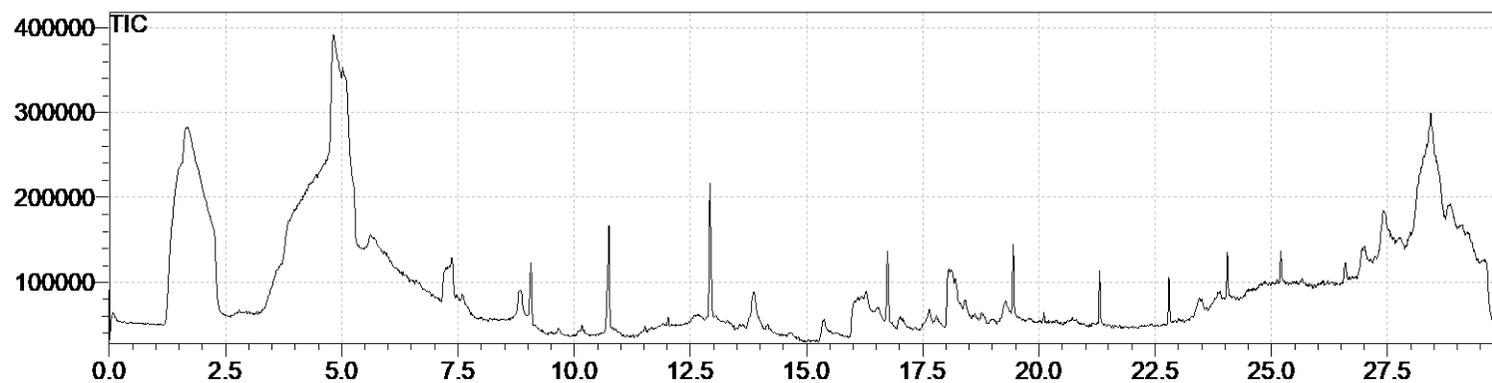
Anexo 8.15 Perfil cromatográfico Planta + SM3+SM6+SM24-2



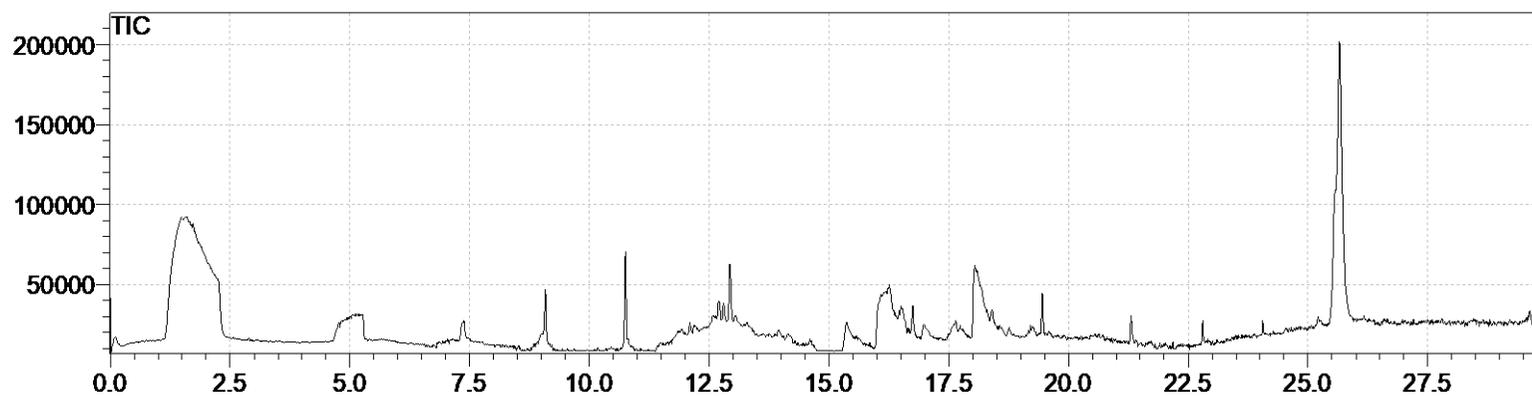
Anexo 8.16 Perfil cromatográfico Planta + SM6



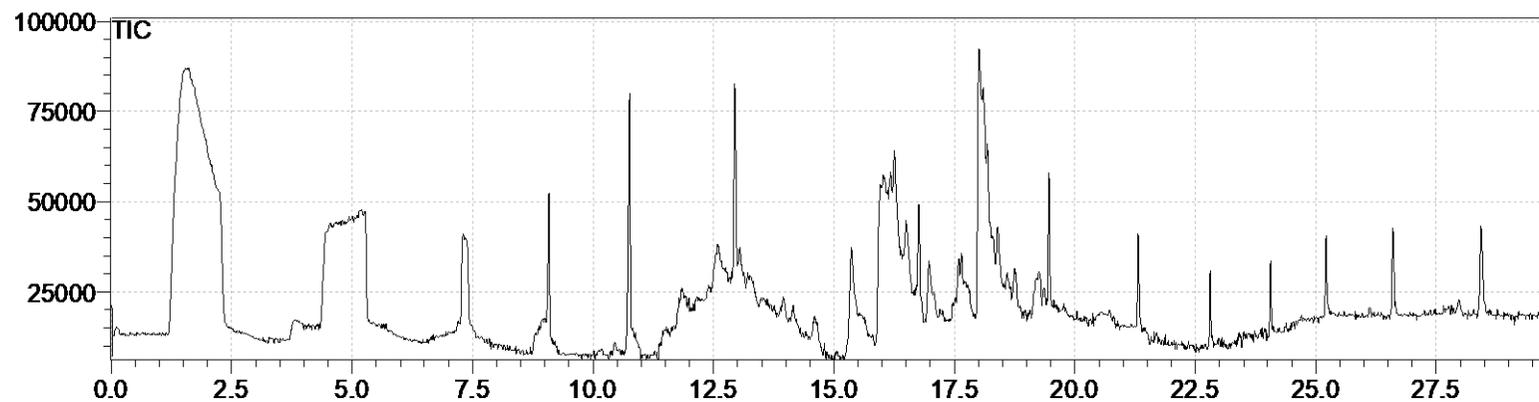
Anexo 8.17 Perfil cromatográfico Planta + SM24-2



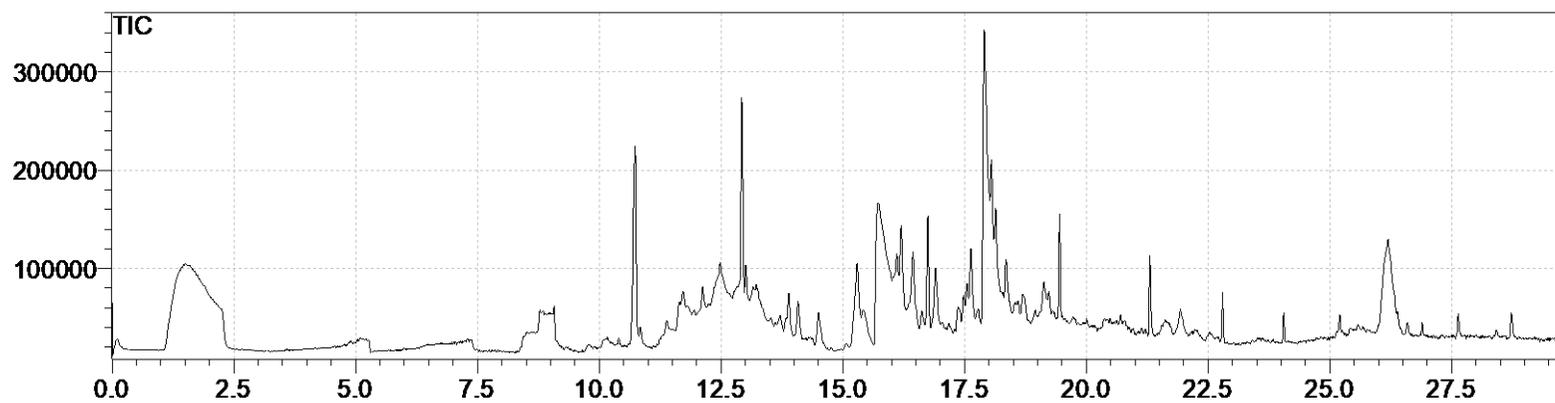
Anexo 8.18 Perfil cromatográfico Planta + SM2



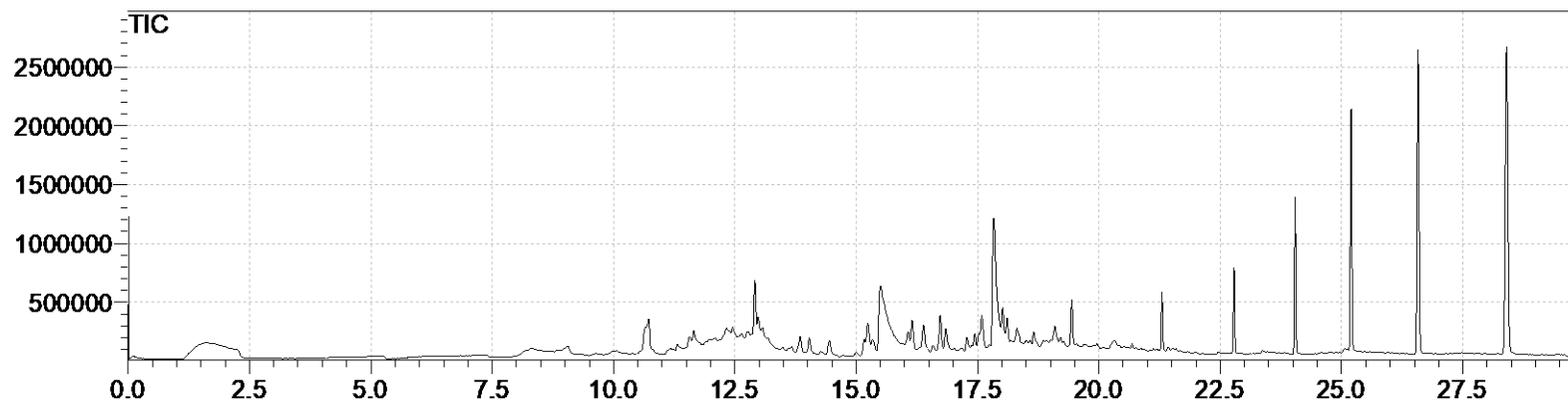
Anexo 8.19 Perfil cromatográfico Planta + SM4



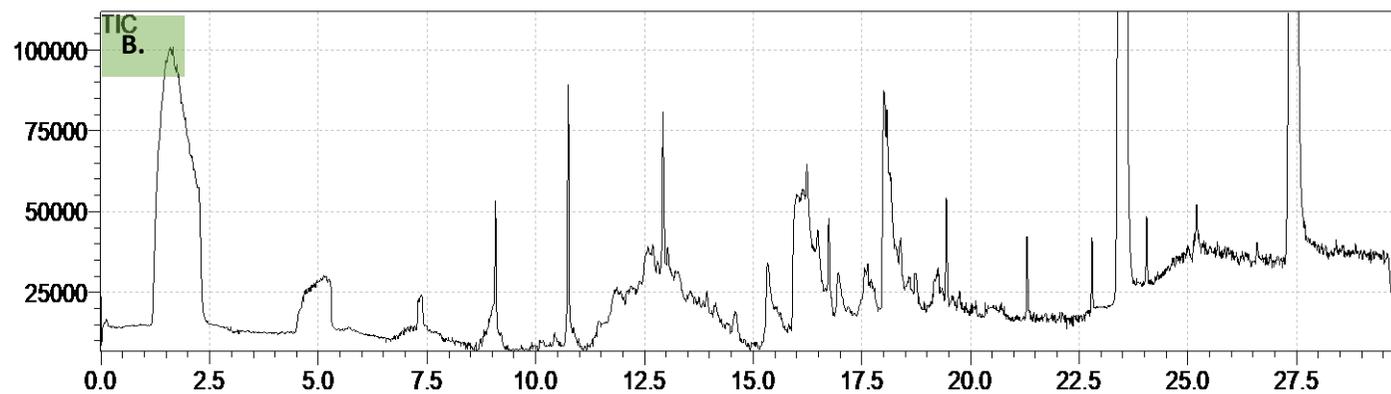
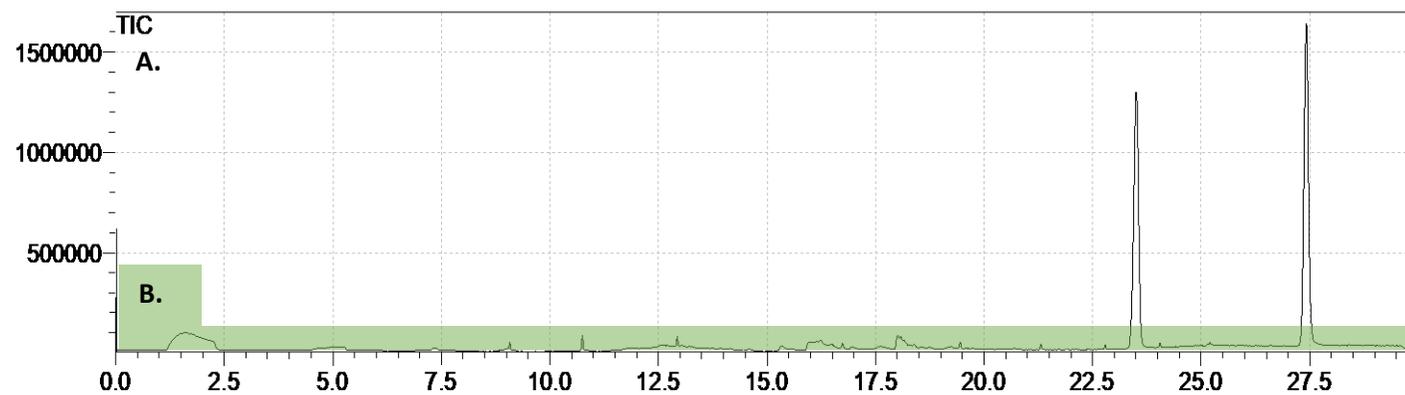
Anexo 8.20 Perfil cromatográfico Planta + SMHN



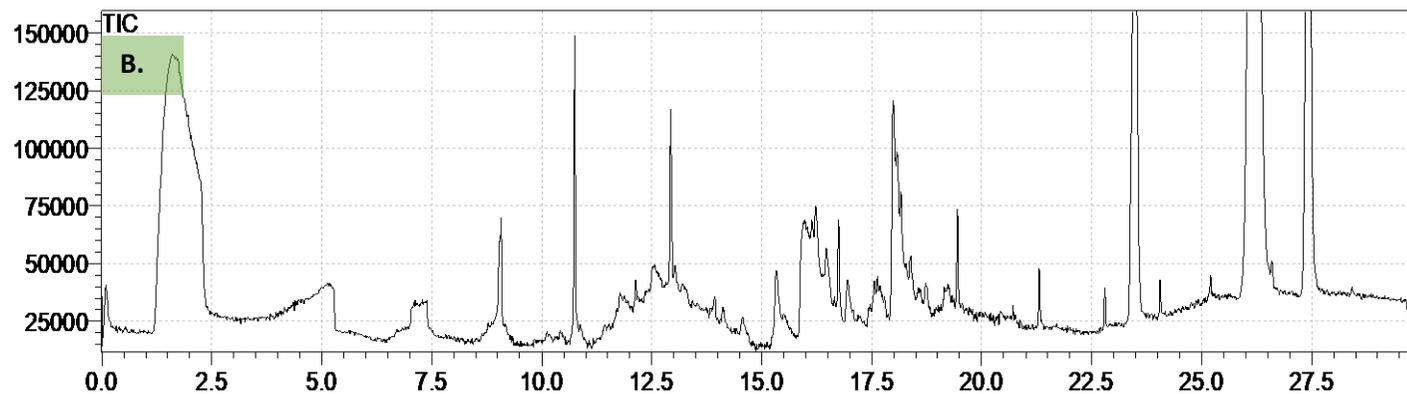
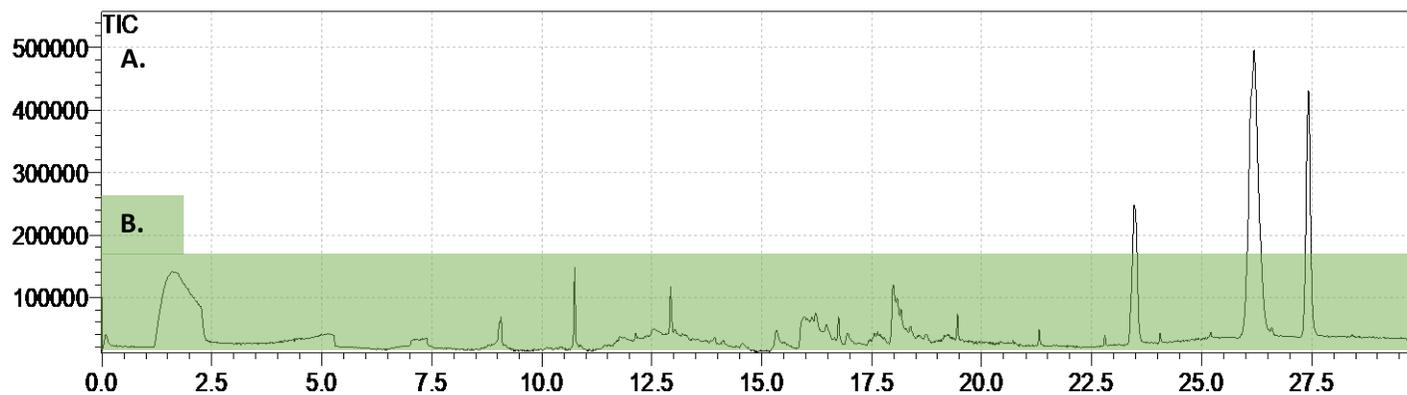
Anexo 8.21 Perfil cromatográfico Planta + SM4 + SM2+ SMHN



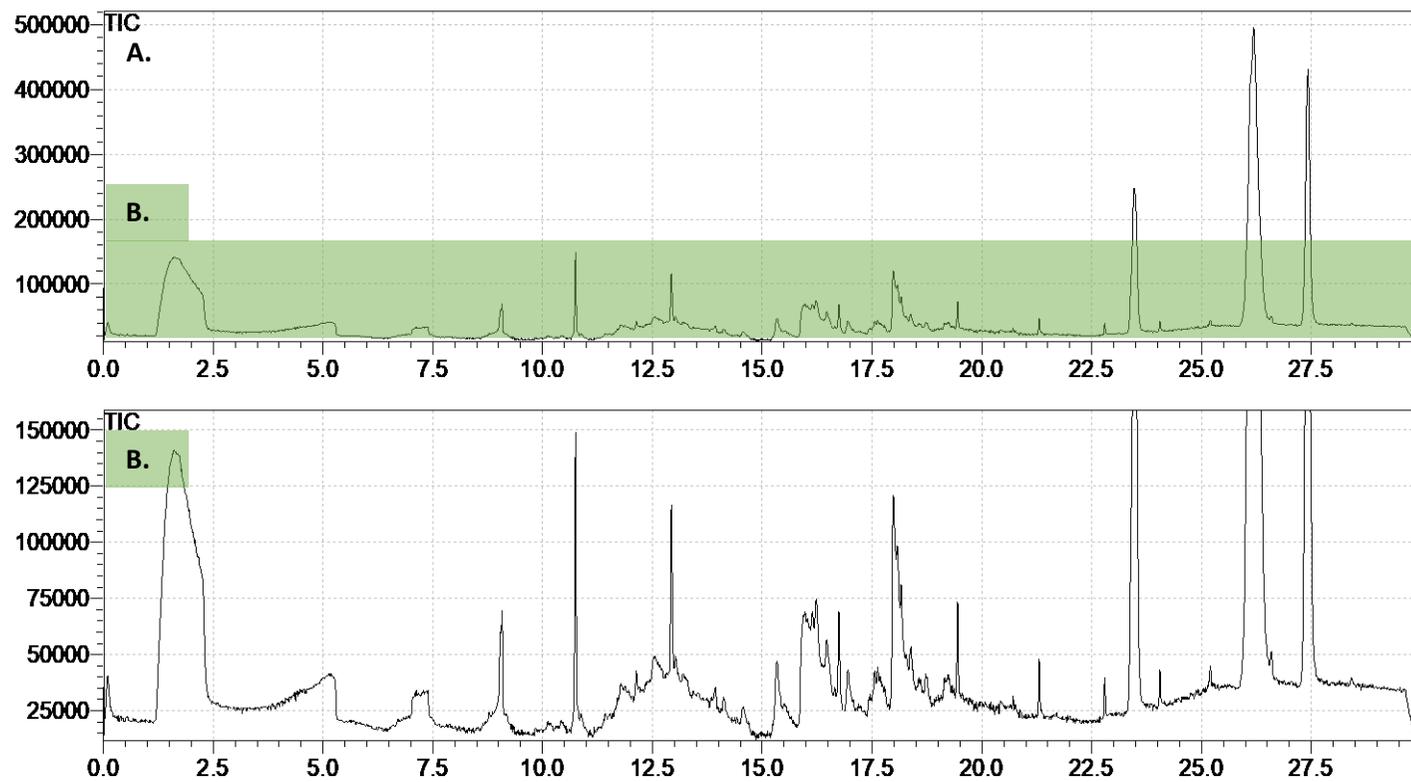
Anexo 8.22 Perfil cromatográfico Planta + SM2 + SMHN



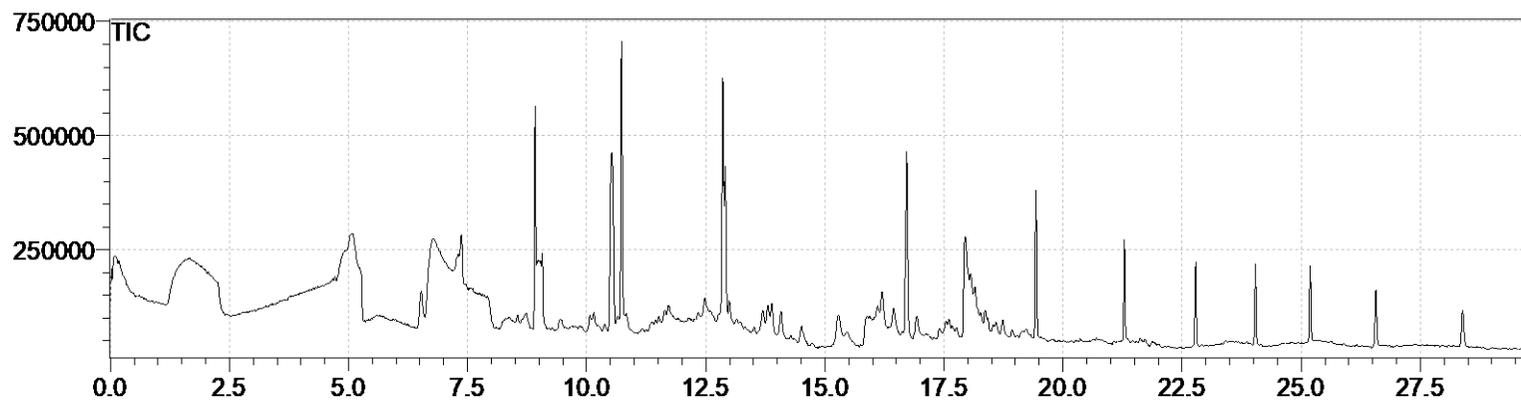
Anexo 8.23 Perfil cromatográfico Planta + SM4 + SM2



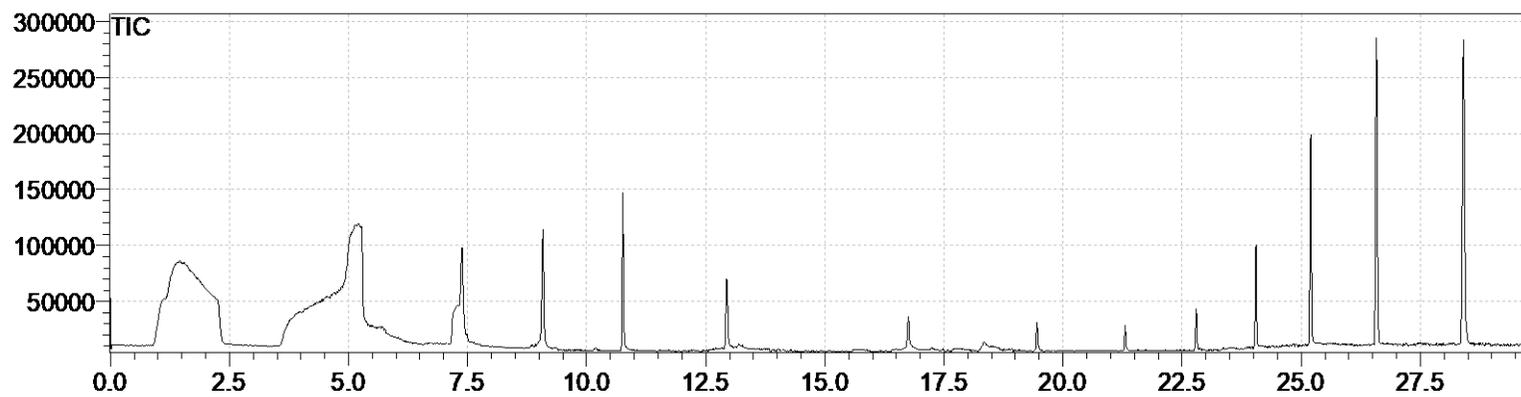
Anexo 8.24 Perfil cromatográfico Planta + SM4+SMHN



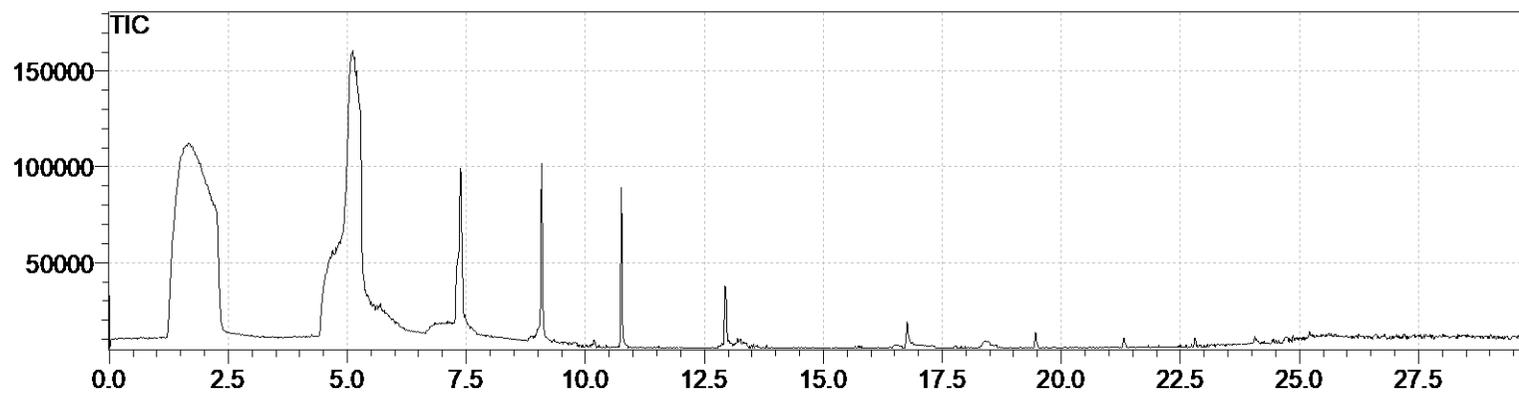
Anexo 8.25 Perfil cromatográfico Planta + SM2+SM24-2



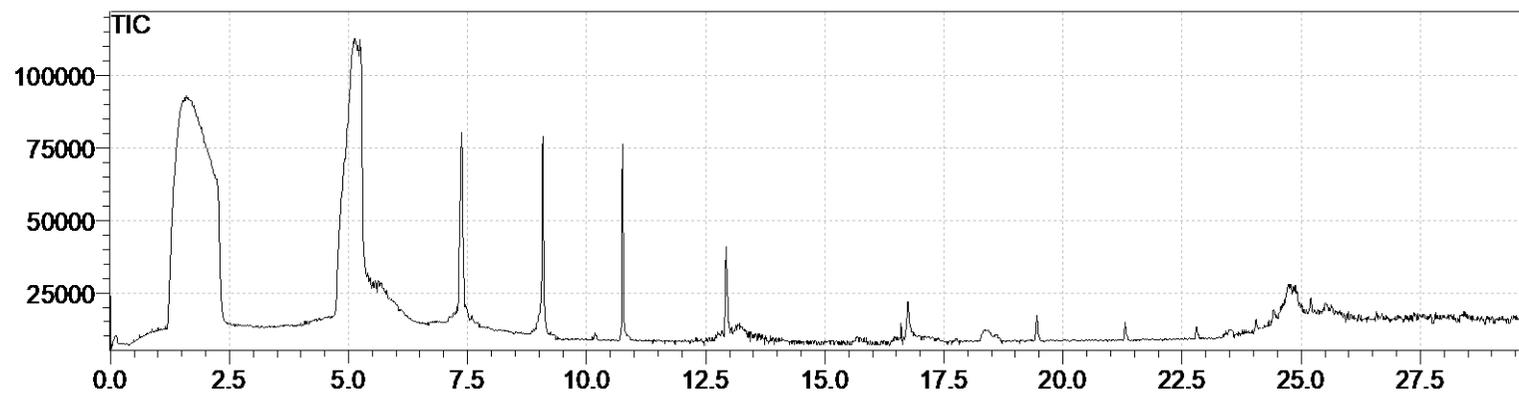
Anexo 8.26 Perfil cromatográfico Planta +SM3+SMHN



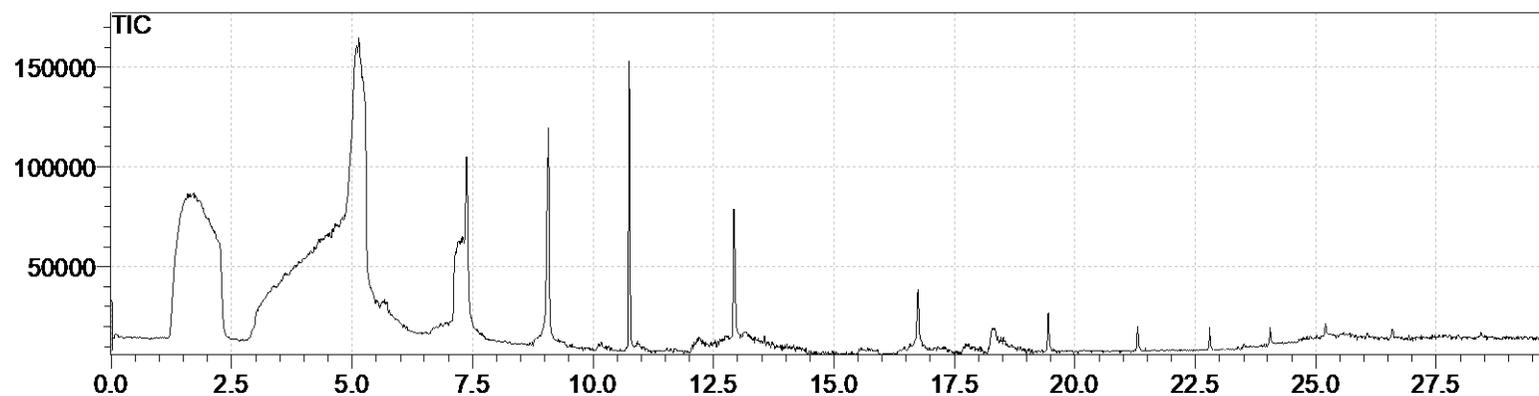
Anexo 8.27 Perfil cromatográfico Planta + SM6 + SM24-2



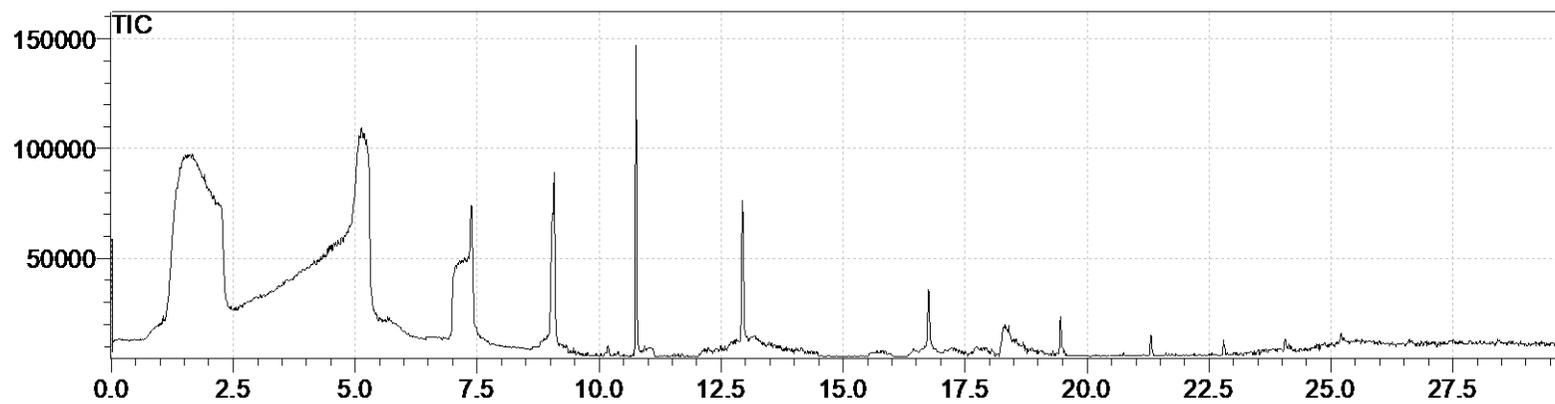
Anexo 8.28 Perfil cromatográfico Planta + SMHN + SM6



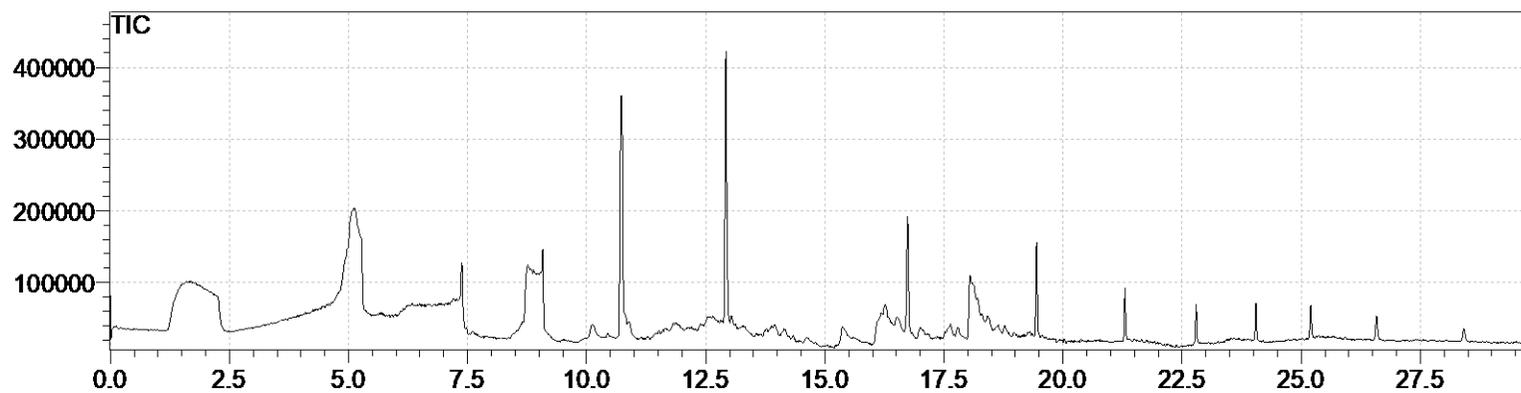
Anexo 8.29 Perfil cromatográfico Planta + SMHN + SM6+ SM4 +SM3 + SM2 + SM24-2



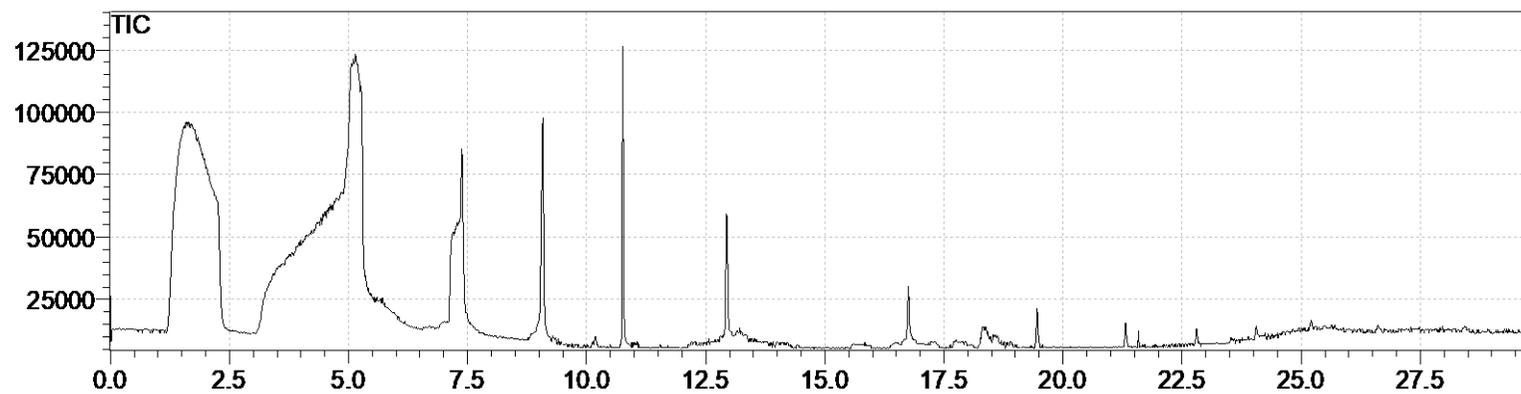
Anexo 8.30 Perfil cromatográfico Planta+SMHN+SM24-2



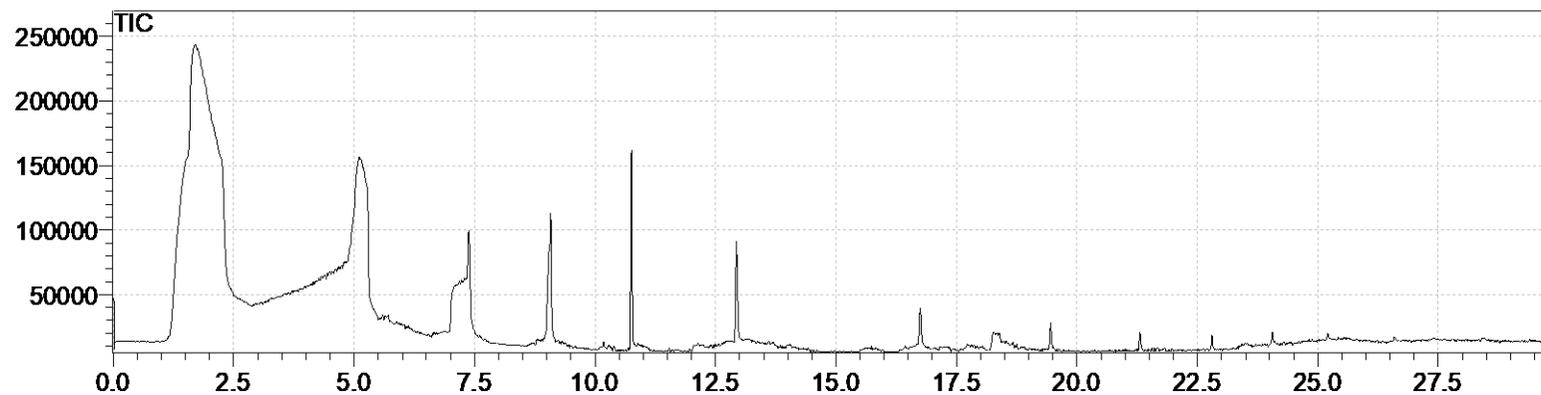
Anexo 8.31 Perfil cromatográfico Planta + SM2+SM3



Anexo 8.32 Perfil cromatográfico Planta + SM3 + SM4



Anexo 8.33 Perfil cromatográfico Planta + SM3 + SM24-2



Anexo 8.34 Perfil cromatográfico Planta + SM4+SM6

