
HONGOS ENDÓFITOS EN 2 PLANTAS MEDICINALES DEL NORDESTE ARGENTINO. I: ANÁLISIS MORFOTAXONÓMICO DE SUS COMUNIDADES FOLIARES

(Endophytic fungi in medicinal plants of northeast of Argentina. I: morphotaxonomic approach of their foliar community)

Gustavo Giusiano¹⁻², Marinella Rodolfi², Magdalena Mangiaterra¹,
Edoardo Piontelli³, Anna Maria Picco².

¹Departamento Micología. Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. Av. Las Heras 727, 3500 Resistencia, Argentina.
E-mail: gustavogiusiano@yahoo.com.ar

²Sezione di Micologia, Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italia

³Universidad de Valparaíso, Escuela de Medicina, Cátedra de Micología. Valparaíso, Chile.

Palabras claves: Plantas medicinales, hongos endófitos, Argentina.

Key words: Medicinal plants, endophytic fungi, Argentina.

RESUMEN

Se evaluó la presencia de hongos endófitos en hojas de dos plantas medicinales, *Acanthospermum australe* y *Pterocaulon alopecuroides*, utilizadas entre otras cosas para tratar infecciones cutáneas. El muestreo se realizó en el entorno rural de dos ciudades del noreste argentino. Los especímenes fueron recogidos por aborígenes de la zona conocedores de su distribución ambiental. Los hongos se aislaron mediante la técnica de Bisseger et al., 1994 y se identificaron empleando características morfofisiológicas.

Considerando las dos plantas, se encontraron 40 morfoespecies, donde los taxa más frecuentes en *Acanthospermum australe* fueron: *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Myrothecium roridum*, *Phoma* spp. y *Sordaria fimicola*, y en *Pterocaulon alopecuroides* fueron: *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata*, *Fusarium proliferatum* y *Myrothecium roridum*. Estos taxa considerados como generalistas (o de múltiples hospedadores), presentan según la literatura específica analizada, alta producción de metabolitos secundarios bioactivos con potenciales capacidades terapéuticas antimicrobianas.

ABSTRACT

The presence of endophytic fungi in leaves of two medicinal plants (*Acanthospermum australe* and *Pterocaulon alopecuroides*) used mainly to treat skin infections, was evaluated. The sampling was performed in the rural area of two cities of northeast Argentina. The specimens were collected by the aboriginals who know the «medicines». Fungi were isolated employing the Bisseger et al., 1994 technique and they were identifying by morpho physiological characteristics. Regarding the two plant species, 40 morphospecies were found. The most frequent taxa in *Acanthospermum australe* were: *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Myrothecium roridum*, *Phoma* sp. and *Sordaria fimicola*, and in *Pterocaulon alopecuroides* were: *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata*, *Fusarium proliferatum* y *Myrothecium roridum*. These species considered generalistics (found in multiple hosts), presented in the analyzed literature a high production of bioactive secondary metabolites with eventual antimicrobial therapeutic properties.

Recibido el 26 de Octubre 2010

Aceptado el 2 de Diciembre 2010

INTRODUCCION

El conocimiento y uso de plantas con fines curativos es un arte milenario llamado fitoterapia, que se ha practicado desde la prehistoria en todas las civilizaciones. Las creencias sobre ciertas enfermedades y los medios para curarlas forman parte de la «medicina popular». En esta materia, América posee un valioso legado de la cultura ancestral, con conocimientos acerca de las causas de las dolencias más comunes, de las propiedades de las plantas curativas y sobre numerosas recetas naturales. La sabiduría de los nativos llamó la atención de varios naturalistas, cronistas y viajeros, quienes anotaron las propiedades, preparaciones y usos de las hierbas. Gracias a ellos se conocen hoy las virtudes de las plantas medicinales. Ciertamente, a los conocimientos de las etnias autóctonas acerca de las propiedades medicinales de algunas plantas, se sumaron otras prácticas curativas traídas por los españoles. La mayor parte de las plantas medicinales son originarias de nuestros bosques, campos y esteros y se las denomina «nativas», muchas de ellas ya eran conocidas y utilizadas por los indígenas antes de la llegada de los europeos al continente americano, tales como el mburucuyá, el tapekue, el aguapé, el tuya caso, etc. Otras especies, como manzanilla, romero, eneldo, hinojo, son «introducidas» o «exóticas», ya que fueron traídas de Europa, Asia y África (UNESCO.org)

Los «yuyeros» (vendedores de yuyos) del noreste argentino, recomiendan el tapekue, *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze 1891 y el tuya-caso *Pterocaulon alopecuroides* (Lamarck) A.P. De Candolle, para curar heridas y para «sacar las manchas de piel». El «remedio» se prepara machacando las hojas que luego se colocan sobre la herida o las manchas, según el caso.

Los nombres vulgares de *A. australe* son muchos y diversos: «tapekue», «tapecué», «natiu», «tayecuí», «tepecurí», «yerba de la oveja», «ihi kukae hipa», «sandiabó guazú», «sandiabó miní», «tapé tuyá», «pipili». Tiene una amplia distribución geográfica, ha sido hallado en distintas áreas de América central y del Sur, en el sudoeste de Estados Unidos y en el sur de África (wikipedia.org; Zuloaga & Morrone, 1996; Freire *et al.*, 2006). En Argentina fue descrito en: Buenos Aires, Corrientes, Entre Ríos, Misiones y Santa Fe (Freire *et al.*, 2006; mozambiqueflora.org; Tressen *et al.*, 2008; dictionarioplantasnet.es; Burkart, 1987).

El «tapecué» es una hierba perenne que se puede encontrar en áreas cultivadas, espacios abiertos y también en lugares «alterados», tales como banquinas de caminos de zonas con elevados niveles de precipitación anual (mozambiqueflora.org). *A. australe*, es utilizado para tratar las manchas de la piel y es considerado como antiséptico, antiinflamatorio, cicatrizante y desinfectante de heridas y

úlceras (wikipedia.org; Zuloaga & Morrone, 1996; dictionarioplantasnet.es).

Los nombres vernáculos de *P. alopecuroides* varían según las etnias y pueden ser: «tuyá-casó»; «tuyá-cazó»; «cara-casó»; «caara-tuyá-casó»; «noom(a)rá»; «noom(a)rá ltaá»; «sup-toptobelité»; «toro caá»; «toro-caá-morotí»; «yakaré-caá», de acuerdo a la zona de influencia de cada una. Es esta una hierba nativa de la llanura chaqueña, perenne que vive en suelos arenosos. Se usa como colagogo y para paliar distintas afecciones de la piel, tales como granos, manchas, espinillas, picaduras, escozores e infecciones de heridas (Freire *et al.*, 2006; Cabrera & Rogonese, 1978).

Las plantas albergan en sus tejidos diversas comunidades de hongos y otros microorganismos sin que les causen daño. A los microorganismos que permanecen asintómicamente dentro de la planta hospedera se los denomina endófitos (Morales & Rodríguez, 2005; Piontelli *et al.*, 2002; Benavente *et al.*, 2008).

Los hongos endófitos fueron encontrados por primera vez hacia finales de los años 40 en Nueva Zelanda y los Estados Unidos, cuando en algunas zonas el ganado se intoxicó al ingerir ciertos pastos. En esa ocasión se determinó que varios de los metabolitos tóxicos aislados eran producidos por los hongos que se encontraban dentro de los tejidos de dichas gramíneas (Morales & Rodríguez, 2005).

Los hongos endófitos son cosmopolitas y diversos y se cree que la mayor parte de la inmensa cantidad de hongos que falta por describir, se encuentra asociada de este modo a plantas y líquenes, por esto, son necesarios estudios relacionados a la identificación de estos microorganismos especiales en distintas áreas geográficas (Gamboa & Gaitán, 2006; Ramírez *et al.*, 2006). Los endófitos establecen estrechos vínculos con la planta hospedadora, que pueden ser antagónicos, mutualistas o comensales (Benavente *et al.*, 2008). Los haces vasculares y los espacios entre las células, son el principal nicho de estos hongos, por ende considerados como sistémicos (Morales & Rodríguez, 2005).

Generalmente los endófitos desempeñan una importante labor fisiológica y ecológica relacionada con su hospedador; del cual obtienen nutrición y protección y en retribución, algunos de ellos proporcionan metabolitos secundarios bioactivos, que proveen resguardo contra herbívoros, insectos, patógenos diversos, agentes de biocontrol y como competidores en general, al alterar la fisiología, la morfología y los aleloquímicos de su hospedador (Benavente *et al.*, 2008; Rubalcava, 2008). En estos últimos casos, son parte de sus mecanismos de defensa (Benavente *et al.*, 2008). Estas interacciones están caracterizadas por una relación finamente equilibrada entre la virulencia del hongo y las defensas de la planta.

Es evidente que mucho trabajo resta por hacer en el campo de los hongos endófitos y uno de los aspectos prioritarios es la descripción taxonómica de especies en sus hospederos naturales (Gamboa & Gaitán, 2006; Ramírez *et al.*, 2006).

Los objetivos generales de esta investigación fueron:
a) Determinar por morfotaxonomía la riqueza de especies endófitas en las hojas de *A. australe* y *P. alopecuroides* y
b) Investigar en la literatura específica, sobre las capacidades potenciales de producción de antimicrobianos o metabolitos secundarios bioactivos de los taxa dominantes aislados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de *A. australe* y *P. alopecuroides* fueron recolectadas por aborígenes, quienes por tradición, son los conocedores de la utilidad de tales hierbas y, por lo tanto, de los mejores lugares para la cosecha de éstas. En el lapso de un año, se efectuaron 4 muestreos de ramas frescas de diferentes plantas de cada especie, la cuales se procesaron en el laboratorio en un tiempo no superior a las 24 horas.

P. alopecuroides fue recolectado en zonas rurales aledañas a la ciudad de Resistencia, ubicada entre los 27°27'05" S y los 58°59'12" O.

A. australe fue recolectado en zonas rurales aledañas a la ciudad de Corrientes, ubicada entre los 27°28'16" S y los 58°50'25" O.

Las ciudades de Resistencia y de Corrientes, sólo separadas por el río Paraná, constituyen un caso de capitales provinciales muy cercanas que se complementan entre sí. Estas ciudades están ubicadas en el nordeste argentino, en un área subtropical sin estación seca con un promedio de precipitación anual de aproximadamente 1600 a 2000 mm.

Se estudiaron en total 20 plantas de cada especie y de cada planta se tomaron 20 hojas. Para el aislamiento de hongos endófitos, las hojas o trozos de ellas, fueron lavadas bajo agua de la llave por 10 minutos y secadas bajo campana durante 1 hora, luego tratadas con una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 3 minutos y posteriormente, lavadas 3 veces con agua destilada estéril, según la técnica de Bisseger & Sieber, 1994).

Las hojas de *A. australe* se sembraron enteras, mientras las de *P. alopecuroides* se dividieron en 3 porciones por su tamaño. Por placa se sembraron 5 hojas de *A. australe* y 6 porciones de *P. alopecuroides*.

Las muestras se cultivaron en placas de Petri conteniendo Agar agua, incubándose a temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) hasta 4 semanas. Las placas se observaron bajo lupa estereoscópica a los 5, 10, 20 y 30 días. Para evitar la pérdida de agua, las placas se sellaron

con parafilm. Cada inicio de crecimiento de una colonia sobre el sustrato, se sembró en PDA inmediatamente, situación que se repitió cuando nuevas colonias aparecieron en el tiempo (2-3 semanas).

La morfometría de los aislamientos se realizó mediante observaciones directas sobre el sustrato y preparaciones en lactofenol y azul de algodón.

La colonias que no presentaron fructificaciones en 3 semanas fueron subcultivadas en un medio pobre como agar papa zanahoria, si aún con esta medida no presentaban propágulos de dispersión se les denominó micelios sin fructificar. En los casos que fue necesario, se emplearon técnicas y medios de cultivo especiales para identificar las especies según datos de las correspondientes monografías o referencias bibliográficas especializadas. (Onions *et al.*, 1981; De Hoog *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 1983; Samson *et al.*, 2000; Ellis, 1971-1976; Ellis & Ellis, 1987; Piontelli & Toro, 1994; Sivanesan, 1987; Carmichael *et al.*, 1980).

Los resultados se expresaron como Frecuencia de Colonización (FC), la cual fue calculada como describe Khan *et al.*, 2010. Como hongos dominantes se consideraron aquellos cuya frecuencia de colonización fueron superiores a 50.

$$FC = Nc/Nt \times 100$$

Nc: número de segmentos colonizados por el hongo

Nt: número total de segmentos observados

Para el estudio de la diversidad se aplicó el índice de Shannon-Wiener.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamientos fúngicos y biodiversidad.

Aunque hay limitaciones en la clasificación de los endófitos usando los métodos tradicionales, al presente no hay otras alternativas disponibles, dado que la identificación filogenética molecular aún no es aplicable a todos los taxa fúngicos a gran escala (Huang *et al.*, 2008) y los laboratorios no siempre cuentan con una estructura disponible por su alto costo.

Todos los géneros encontrados en ambas plantas pertenecen a los **Ascomycota**, mayoritariamente en su estado anamorfo. En *A. australe*, se recuperaron 13 géneros de hongos anamórficos (hiphomyces y coelomyces) 5 géneros teleomorfos y una baja frecuencia de hongos sin fructificar (Tabla 1).

En *P. alopecuroides* se recuperaron 18 géneros de hongos anamórficos (hiphomyces y coelomyces) y 3 teleomorfos (**Ascomycota**). Todos los hongos aislados fructificaron (Tabla 2). Los géneros de endófitos más frecuentes en ambos vegetales se muestran en el Gráfico 1.

De las 24 especies encontrados en *A. australe*, excluyendo la heterogeneidad de los considerados como

Tabla 1: Frecuencia de colonización (promedio) de hongos endófitos en *A. australe* en los 4 muestreos.

Especies	Frecuencia de Colonización
<i>Alternaria alternata</i> complex (Fr.) Keissl	97.5
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud var. <i>pullulans</i>	85
<i>Chaetomium bostrychodes</i> Zopf	25
<i>Chaetomium cupreum</i> L.M. Ames	45
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	25
<i>Clonostachys rosea</i> (Link. Fr.) var. <i>rosea</i> Schoers <i>et al.</i>	35
<i>Colletotrichum dematium</i> Cesati	50
<i>Corynascus</i> sp.	15
<i>Curvularia clavata</i> Jain	35
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedjin	35
<i>Curvularia pallescens</i> Boedjin	10
<i>Emericellopsis</i> sp.	20
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.: Fr.complex	85
<i>Fusarium</i> sección <i>Liseola</i> (<i>F. succisae</i> similis) (Schröter) Sacc.	10
<i>Fusarium solani</i> (Mart) Sacc. complex	85
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin	10
<i>Myrothecium roridum</i> Tode ex. Fr.	85
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E.W. Mason	45
<i>Nodulisporium</i> sp.	15
<i>Phoma</i> spp.	97.5
<i>Podospora minor</i> Ellis & Everh.	15
<i>Scolecobasidium compactum</i> M.B Ellis	10
<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.	85
<i>Trichotecium roseum</i> Link	15
Micelios sin fructificar	35

micelios estériles (o sin fructificar), 11 se presentaron también en *P. alopecuroides*: hubo 7 especies dominantes *Alternaria alternata* complex, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium oxysporum* complex, *Fusarium solani* complex, *Myrothecium roridum*, *Phoma* spp. y *Sordaria fimicola* (Tabla 1). De éstas, solo 3 se presentaron también como dominantes con frecuencias similares en *P. alopecuroides*: *Alternaria alternata* complex, *Aureobasidium pullulans* y *Myrothecium roridum*. Solo en esta hierba, 3 géneros presentaron la mayor diversidad de especies *Chaetomium*, *Curvularia* y *Fusarium* (Tabla 1).

De los 26 especies encontradas en *P. alopecuroides*, 12 se presentaron también en *A. australe*; hubo 6 especies dominantes: *Alternaria alternata* complex, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides* complex, *Curvularia lunata*, *Fusarium proliferatum*, *Myrothecium roridum* (Tabla 2). De éstas, solo 4 se presentaron también como dominantes con frecuencias similares en *A. australe* (*A. alternata* complex, *Au. pullulans*, *M. roridum* y considerando como similar la presencia asociada de 2 integrantes diferentes del género *Fusarium* (*F. proliferatum* y *F. subglutinans*). Esto último

indica las distintas capacidades de adaptación de los integrantes de este género ya sea como endófitos, saprotrofos o patógenos en plantas medicinales de interés (Prasad *et al.*, 2010). Destacamos que ningún representante del género *Cladosporium* se detectó en *A. australe*, en cambio, en *P. alopecuroides* se detectaron en los cuatro muestreos y con dos especies de los complejos. *C. cladosporioides* y *C. oxysporum* (Tabla 2). Este último, a pesar de su baja frecuencia de colonización, es considerado en la literatura como una de la especie más frecuente en plantas tropicales (Gamboa-Gaitán 2006).

Referente a los aislamientos de integrantes del género *Phoma* (dominantes solo en *P. alopecuroides*), y aparentemente similares morfológicamente, a los integrantes de la sección *Phoma*, no pudieron clasificarse a nivel de especie (salvo *P. medicaginis*), debido a las dificultades taxonómicas actuales inherente a este taxon altamente polifilético y disperso en una extensa literatura. Dentro los llamados coelomycetes el género *Phoma* actualmente debe considerarse bajo un concepto general, debido a que los miembros que presentan su morfología se encuentran dispersos en las **Pleosporales**, aunque

Tabla 2: Frecuencia de colonización (promedio) de hongos en *P. alopecuroides* en los 4 muestreos.

Especies	Frecuencia de Colonización
<i>Alternaria alternata</i> complex (Fr.) Keissl	97.5
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud var. <i>pullulans</i>	86.6
<i>Chaetomium bostrychodes</i> Zopf	25
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries complex	86.6
<i>Cladosporium oxysporum</i> Berk. & Curt.	10
<i>Clonostachys rosea</i> (Link. Fr.) var. <i>rosea</i> Schoers et al.	9.6
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedjin	85
<i>Epicoccum nigrum</i> Ehrenberg	10
<i>Exserohilum rostratum</i> (Dreschsler) Leonard & Suggs	4.8
<i>Fusarium proliferatum</i> (Matsush.) Nirenberg	65
<i>Fusarium subglutinans</i> (Wollenw. & Reink) Nelson et al	43.3
<i>Metharhizium anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin	4.8
<i>Myrothecium gramineum</i> Lib	4.8
<i>Myrothecium roridum</i> Tode ex Fr.	86.6
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) Mason	10
<i>Periconia byssoides</i> Pers. Ex Mérat	15
<i>Periconia laminella</i> E.W. Mason & M.B. Ellis	32.5
<i>Phoma</i> spp.	21.6
<i>Phoma medicaginis</i> Sacc.	4.8
<i>Pithomyces chartarum</i> (Berk. & Curt.) M.B. Ellis	9.6
<i>Pleospora</i> sp.	4.8
<i>Podospora</i> sp.	4.8
<i>Ramichloridium</i> sp.	9.6
<i>Scolecobasidium compactum</i> M.B. Ellis	9.6
<i>Trichoderma viride</i> Pers:Fr.	10
<i>Ulocladium chartarum</i> (Preuss) Simmons	4.8

muchos de sus integrantes se ubican en las **Didimellaceae** (Aveskamp et al., 2010).

El índice de diversidad de Shannon-Wiener mostró leves diferencias entre ambas plantas y es mayor que el

hallado en diferentes estudios de hojas de plantas medicinales (Khan et al., 2010; Huang et al., 2008; Raviraja, 2005; Rajagopal et al., 2010). La diversidad en *A. australe* según el índice de Shannon-Wiener fue de 2,6 y la de *P.*

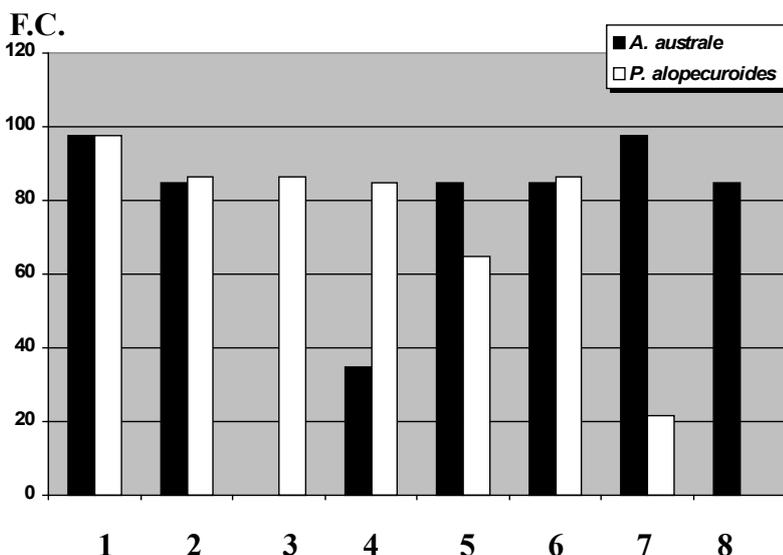


Gráfico 1. Especies endófitas con mayor frecuencia de colonización en ambas plantas medicinales (El grupo de especies marcadas con asterisco son diferente en ambas hierbas (ver Tabla 1-2)

1. *Alternaria alternata* complex
2. *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*
3. *Cladosporium cladosporioides*
4. *Curvularia lunata*
5. *Fusarium* spp.*
6. *Myrothecium roridum*
7. *Phoma* spp.
8. *Sordaria fimicola*

alopecuroides de 2,5.

Distribución, hospedadores y dinámica poblacional

Un buen porcentaje de los géneros y especies detectados en este estudio, han sido informados como endógenos de plantas medicinales, tanto en zonas tropicales como temperadas (Gamboa-Gaitán, 2006; Raviraja, 2005; Ravindra, *et al.*, 2008; Mohanta, *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008); sin embargo, su composición y abundancia puede variar acorde al tejido analizado y sus posibles hospedadores. En nuestro estudio solo se estudiaron las hojas, que es un ambiente conocido por la abundancia de endófitos, como lo describe la literatura (Promputtha *et al.*, 2005; Gazis & Chaverry, 2010; Shankar & Shashikala, 2010); no conocemos si esta distribución se presenta en alguna medida en los tallos y raíces. Algunos endófitos comunes en plantas medicinales u otras, no se aislaron o tuvieron escasa o regular presencia en algunas de las dos hierbas analizadas, como ejemplo podemos citar los representantes del género *Colletotrichum* (Tabla 1), que solo se presentó con buena frecuencia en *A. australe*, sus especies son bien conocidas como débiles patógenos oportunistas y reportadas recientemente como prolíficos productores de sustancias bioactivas con propiedades antifúngicas frente a hongos fitopatógenos (Inacio *et al.*, 2006; Gazis & Chaverry, 2010). Los micelios estériles o sin fructificar, que consisten en varios tipos morfológicos fúngicos, considerablemente frecuentes en los estudios sobre endófitos (Huang *et al.*, 2008), no se detectaron en *P. alopecuroides*, una situación que podríamos atribuir a la presencia de taxa de fácil esporulación en medios pobres o a endófitos que pueden alterar fácilmente sus modalidades de colonización, de epífitos a saprotrofos, en la senescencia de su hospedador (Promputtha *et al.*, 2006). Otro ejemplo, para citar son los integrantes de la familia **Xilariaceae** frecuentemente como endófito en los trópicos (Gamboa-Gaitán, 2006; Azevedo, 2000). En nuestro trabajo, solo se detectó *Nodulisporium* con baja frecuencia, como representante anamorfo de esa familia, presente solo en *A. australe*.

Mientras aumentan notablemente las investigaciones sobre nuevos endófitos, poco sabemos aún sobre los procesos involucrados en su biología y adaptación. Si algo nos queda claro, es que existen grados de especificidad en relación a los tejidos de sus hospedadores (Bacon & White, 2000; Raviraja *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008; Banerje *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios referentes a los hongos endófitos se ha enfocado principalmente a los presentes en plantas de regiones temperadas, sin embargo, la presencia, diversidad y distribución geográfica es aún ampliamente desconocida (Hyde & Soyong, 2007-2008) y son necesarias mayores investigaciones para analizar

los diversos roles que estos microorganismos representan en la estimación de la diversidad fúngica global, la dinámica, el control de la comunidad fúngica/vegetal y la fuente de sustancias bioactivas (Fröhlich & Hyde, 1999; Azevedo *et al.*, 2000; Hawksworth, 2001; Arnold *et al.*, 2001; Borges & Pupo, 2006). Algunos autores opinan que su relación simbiótica no es dañina y permanecen asintomáticos en el hospedador (Bacon & Yates 2005), otros, opinan que pueden permanecer sin causar daños como latentes patógenos, mientras la interacción entre la demanda del invasor y la respuesta del vegetal esté balanceada. Cuando ésta se termina, el endófito puede transformarse en un patógeno (Kogel *et al.*, 2006).

Endófitos y sus posibles roles en la producción de metabólicos (aportes bibliográficos)

La identificación de los constituyentes químicos o la determinación de sus efectos sobre la inhibición de diversos microorganismos u otras cualidades, no es el objetivo de esta primera parte del trabajo, sin embargo, conocer mediante la literatura si las cepas dominantes aisladas tengan un posible rol en la producción de sustancias bioactivas, inhibitorias individuales o conjuntas de importancia farmacéutica para el hombre o en las áreas de la agricultura, es el primer paso para la selección de pruebas de antagonismo frente a bacterias y hongos patógenos.

El complejo *Alternaria alternata* (**Pezizomycotina, Dothideomycetes, Pleosporomycetidae, Pleosporales, Pleosporaceae**), fue la especie con mayor presencia en ambos vegetales y ha sido informada como uno de los endófitos dominantes de plantas leñosas como el corcho y el *Eucalyptus* (Morales-Rondán & Rodríguez-González, 2006) y también en diversas especies de plantas medicinales (Khan *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2008; Raviraja, 2005; Rajagopal *et al.*, 2010).

Los metabolitos de *Alternaria alternata* representados principalmente por el alternariol (AOH), el monometil eter alternariol (AME) y el ácido tenuazónico (AT), aún en bajas concentraciones, han demostrado ser altamente tóxicos. Estas toxinas afectan el retículo endoplásmico y las membranas mitocondriales. AME es citotóxica y AOL y AT muestran efecto sinérgico. Las propiedades antifúngicas y antibióticas de estas micotoxinas han sido estudiadas y, entre ellas, se ha comprobado que los metabolitos de *Alternaria alternata* inhiben el desarrollo de *Staphylococcus aureus*. Los géneros *Alternaria*, *Epicoccum*, *Nigrospora* y *Phoma* aislados de plantas medicinales de Ecuador (Ramirez *et al.*, 2006), han demostrado tener actividad antagónica contra bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*) y los hongos, *Candida albicans*, *Microsporum canis* y

Aspergillus niger (Chicaiza & Ramírez, 2010). Todos estos géneros fueron hallados en *P. alopecuroides*, mientras en *A. australe* se encontraron solo *Alternaria* y *Phoma*, como dominantes.

La alta presencia de *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* en ambos vegetales (Tabla 1-2), merece destacarse por ser una especie ampliamente cosmopolita, usualmente presente en el suelo, aguas frescas, material muerto vegetal, como epifito en el filósfera y carpósfera de muchas plantas, sedimentos de estuarios marinos y en madera, textiles, alimentos, frutas y superficies pintadas, así como en diversos ambientes internos como casas y edificios donde abunda la humedad. (Samson et al., 2000). *A. pullulans* var. *pullulans* es la especie más común del género (de Hoog 1977; Zalar et al., 2008) y su capacidad de buen competidor por espacio y nutrientes se debe a la producción de numerosos compuestos como: enzimas pectolíticas, metabolitos antimicrobianos y la producción de polisacáridos de alto peso molecular (Pullulan) (Takesako et al., 1991; Pouliot, et al., 2005; Prasongsuk et al., 2005.). Su rol potencial de biocontrolador se ha empleado en los viñedos para inhibir fitopatógenos en pre y post cosecha (*Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Plasmopara viticola*, entre otros) (Saikkonen et al., 1998, Skena et al, 2003; Martini et al., 2009). *A. pullulans* se ha aislado comúnmente como endófito de varias plantas medicinales y sus metabolitos secundarios tienen propiedades antimicrobianas en microorganismos patógenos humanos tales como: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Trichophyton concentricum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* (Shankar & Shashikala 2010; Kuddus et al., 2009).

Los representantes del género *Cladosporium*, son conocidos en la literatura por ser cosmopolitas, mayoritariamente saprotrofos, algunos fitopatógenos, colonizadores secundarios de partes necróticas en muchos vegetales y aislados del suelo, aire, alimentos, entre otros diversos sustratos (Domsch et al., 1993). *C. cladosporioides* (Pezizomycotina, Dothideomycetes, Capnodiales, Davidiellaceae), la especie dominante en *P. alopecuroides*, es un integrante de un complejo de especies recientemente estudiadas por Bensch et al. (2010). *C. cladosporioides* se ha aislado como endófito con alta presencia en diferentes vegetales, como *Oryza sativa* (Naik et al. 2009), en un pasto marino tropical (Devarajan et al. 2002), en un pasto de valor medicinal (*Cymbopogon citrates*), común en diferentes partes de la India, donde sus extractos exhiben propiedades anticancerígenas y antimicrobianas. (Deshmukh et al., 2010). Esta especie se ha aislado también

como endófito del mango en Australia y en Venezuela (Morales-Rondán & Rodríguez-González, 2006). La literatura describe un sinnúmero de actividades farmacéuticas de interés atribuidas a esta especie, tales como: las antifúngicas como endófito en: *Hyoscyamus muticus*, una planta medicinal (Abdel-Motaal et al., 2010), productora de una brefeldina A (C₁₆H₂₄O₄) y una lactona con potentes propiedades antifúngicas como endófito en *Quercus variabilis* (Wang et al., 2007). Puede producir taxol, una sustancia anticancerígena idéntica a la producida por la planta (Zhang et al., 2009) y Huperzina A, un inhibidor de la actividad de la Acetilcolinoesterasa, como endófito en hojas de *Huperzia serrata*, sustancia que puede ser una alternativa a considerar en el tratamiento del Alzheimer (Zhang et al., 2010). *C. cladosporioides*, es además la fuente de una serie de compuestos químicos conocidos como calfoquinas, inhibidoras específicas de las proteínasas. Estos compuestos y sus derivados son útiles para tratar o disminuir la gravedad de una variedad de trastornos, incluyendo, problemas inflamatorios, trastornos proliferativos tales como cáncer y condiciones asociadas con el trasplante de órganos, entre otras (Kobayashi et al., (1989).

Referente a los aislados del género *Curvularia*, *C. lunata* (Pezizomycotina, Dothideomycetes Pleosporales, Pleosporaceae), fue una de las especies de mayor presencia en *P. alopecuroides*, mientras en *A. australe* compartió porcentajes menores junto a otras 2 especies del género (*C. clavata* y *C. pallescens*) (Tabla. 1-2). *C. lunata* (Wakker) Boedijn, es la especie tipo del género, el cual posee un elevado número de especies, polífagas, cosmopolitas y conocidas como saprotrofas en diferentes sustratos vegetales, el suelo, el aire y como fitopatógenas en mono y dicotiledóneas, especialmente en gramíneas en regiones tropicales y subtropicales (Sivanesan, 1987; Lima & Furtado, 2007). Un pequeño número de especies puede originar raramente micosis diversas en humanos y otros animales (de Hoog et al., 2000). Las especies endófitas del género, especialmente en hojas de plantas medicinales, se han estudiado en países con climas tropicales y subtropicales, en especial en la India, donde Banerjee et al. (2009), encontraron una especificidad de hospedador en algunos géneros fúngicos, entre ellos una especie de *Curvularia* en *Ocimum sanctus*. Otra planta medicinal como *Catharanthus roseus* en áreas del subcontinente Indico, posee varios atributos medicinales, por la producción de vinca alcaloides (vincristina, vindesina, vinorelbina, vinblastina y vinflunina), con propiedades anticancerígenas y efectos antisépticos. Esta planta, muestra una gran diversidad en su población de endófitos foliares donde especies de *Drechslera*, *Curvularia*, *Bipolaris*, *Alternaria* y *Aspergillus* fueron los hongos

dominantes aislados (Ravindra *et al.*, 2008). También se describen las propiedades de los integrantes del género *Curvularia* en la producción de Citocalasinas y Antraquinoides (Millar & Trenholm, 1994; Bräsa *et al.*, 2007). Raviraja (2005), investigó los endófitos de 5 plantas medicinales, encontrando que las especies dominantes fueron *Curvularia clavata*, *C. lunata*, *C. pallescens* y *Fusarium oxysporum*, donde la alta riqueza de especies como la frecuencia de colonización fue mayor en los segmentos de las hojas más que en los peciolo y corteza, dejando en evidencia que estos hongos son en cierta medida hospedero y tejidos específicos. *C. lunata*, se ha encontrado también como endófito en segmentos de hojas de 10 plantas medicinales en la India (plantas trepadoras y pastos) (Shankar & Shashikala, 2010).

Acorde a la literatura, las especies endófitas de *Curvularia*, parecen tener otras propiedades, tales como ayudar a las plantas a soportar constantemente las altas temperaturas del suelo de 50°C y temperaturas intermitentes de hasta 65°C (Johri, 2006). En un estudio reciente, Mohanta *et al.* (2008), aislaron varias especies de *Curvularia* (incluyendo *C. lunata*) como endófitas hospedero específicas de la planta medicinal *Andrographis paniculata*. Se ha observado en esta planta su capacidad de sobrevivir a altas temperaturas durante el verano y en otras condiciones ambientales adversas.

Los representantes del género *Fusarium* son organismos de amplia distribución cosmopolita en el suelo que actúan ya sea como saprotrofos o patogénicos en numerosa plantas silvestres o cultivadas; son frecuentes en alimentos granos, frutas y detritus vegetales, entre otros ambientes (Domsh *et al.*, 1993). Es interesante destacar que *Foxysporum* y *F. solani* compiten con las mismas altas frecuencias de colonización en *A. australe*, mientras en *P. alopecuroides* lo hacen *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. A pesar que estos últimos comparten frecuencias menores de colonización, representan una asociación no despreciable en el conjunto de especies.

Foxysporum (Pezizomycotina, Sordariomycetidae, Hypocreales, Nectriaceae), fue una de las especies entre las dominantes en *A. australe*. En general, las características ecológicas de esta especie son similares a otros integrantes del género, debido a que comparten los hábitos de ser comunes en el suelo, parásitos facultativos y formas patogénicas y saprotrofas. En estudios recientes se ha aislado como endófito en *Juniperus recurva*, presentando metabolitos con diversas actividades biológicas (Kour *et al.*, 2008) y como endófito en rizomas de *Dioscorea zingiberensis* y *Acorus calamos*, muestra actividades antibacterianas sobre Gram positivos y negativos (Xu *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2009). Estos resultados son similares a los efectuados con endófitos

asociados a diversas plantas medicinales, donde diversas especies de *Fusarium* presentan una fuerte actividad antimicrobiana (Tan & Zou, 2001; Wang *et al.*, 2007; Mohanta *et al.*, 2008; Li-Juan & Shun-Xing, 2009). El complejo *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* son productores de variadas toxinas y metabolitos tóxicos en especial la toxina T2, un integrante de los tricótecos, que tienen múltiples efectos toxicogénicos en las células eucarióticas (Rocha *et al.*, 2005; Llorens *et al.*, 2006).

Fusarium solani, un endófito presente en la corteza del tejo en los Himalaya, mostró una considerable actividad antimicrobiana frente a 3 bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*), 3 bacterias Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*) y 2 hongos patógenos oportunistas (*Candida albicans* y *C. tropicalis*) (Tayung *et al.*, 2011). *F. solani*, se ha encontrado también entre los hongos endofíticos más frecuentes en ramas y hojas de 23 plantas siempre verdes, donde el 70% de los hongos aislados, produjo metabolitos antifúngicos que mostraron gran inhibición frente al crecimiento de los 6 fitopatógenos analizados (Liu *et al.*, 2010). Como endófito en *Apodytes dimidiata*, esta especie produce Camptotecina y 10-hydroxycamptotecina, 2 importantes precursores de la síntesis de drogas clínicas útiles (Shweta *et al.*, 2010).

F. subglutinans y *F. proliferatum* entre otros *Fusarium*, se asocian comúnmente al maíz como patógenos o integrando la diversa comunidad de endófitos asintomáticos (Fisher *et al.*, 1992). Estas especies pueden producir metabolitos secundarios tóxicos, incluyendo la moniliformina, fumonisina y deoxynivalenol. Varias de estas micotoxinas como la fumonisina B-1 y el ácido fusárico, tienen propiedades antibacterianas que pueden influenciar las interacciones entre los *Fusarium* spp. y las bacterias en el ambiente del maíz (Desjardins & Proctor, 2001). No se conoce mucho en relación a los efectos de las micotoxinas en los hongos filamentosos y es posible que varias micotoxinas, además de las fumonisinas, tengan propiedades antifúngicas, un factor importante que debe considerarse al implementar estrategias de biocontrol (Bacon *et al.*, 2006). *F. subglutinans*, fue encontrado en plantaciones de mango con la capacidad de formar agallas y permanecer asintóticamente en las plantas como endófito (Morales-Rondán & Rodríguez-González, 2006).

Entre los representantes del género *Myrothecium*, *M. roridum* (Pezizomycetes, Sordariomycetes, Hypocreales, Hypocreaceae o Bionectriaceae) integra un grupo parafilético en la base de los Hypocreales (Castlebury *et al.*, 2004). Esta especie, obtuvo junto a otros taxa, los más altos porcentajes entre los hongos de mayor presencia en

las dos plantas analizadas (Tabla 1-2) y se conoce en la literatura por sus hábitos saprotrofos y patógenos en vegetales (Quezado *et al.*, 2010). *M. roridum* es un hongo del suelo que sobrevive como saprotrofo en los tejidos senescentes de los tejidos vegetales (Souza-Motta *et al.*, 2003; Domsch *et al.*, 1993), pero también puede causar enfermedades como parásito facultativo en las partes aéreas de algunas plantas ornamentales, frutales y vegetales, principalmente angiospermas (Ahrazem *et al.*, 2000; Domsch *et al.*, 1993; Poltronieri *et al.*, 2003; Murakami & Shirata, 2005; Silva & Meyer, 2006). Se ha reportado como productor de toxinas con un amplio potencial de efectos antimicrobianos sobre diversos hongos y bacterias (Turhan & Grossmann, 1994; Murakami *et al.*, 1998). Las especies de *Myrothecium* producen amplios rangos de enzimas celulolíticas de uso biotecnológico en la industria farmacéutica, del papel, la conversión de biomasa agrícola, residuos industriales, biocombustibles, alimentos animales y control de contaminación ambiental (Murao & Tanaka, 1982; Viikari *et al.*, 1994; Okunowo *et al.*, 2010). Recientemente *M. roridum* fué aislado como endófito de pinos de corteza blanca (*Pinus albicaulis*) en Oregon, creciendo por primera vez en una gimnosperma y, debido a su habilidad de producir metabolitos que impiden el crecimiento de otros hongos, es posible que pueda tener un rol en combatir. *Cronartium ribicola*, uno de los más dañinos patógenos de plantas en América del Norte (Worapong *et al.*, 2009).

M. roridum y otras especies relacionadas, pueden producir sustancias que inhiben el crecimiento de células tumorales del pulmón, hígado y la próstata. Son productoras de Tricotecenos macrocíclicos, considerados como sesquiterpenos tóxicos (Trapp *et al.*, 1998; Schoettler *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2009). *M. roridum* posee además el potencial de ser usado como un bioherbicida de amplio espectro (Lee *et al.*, 2008).

El aislamiento de esta especie u otras del género en plantas de uso medicinal, no es un hallazgo nuevo, debido a que la literatura las registra en diversas especies vegetales en climas tropicales y subtropicales (Mysore *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006-2009)

Los pocos taxa dominantes analizados como otros cuyas diversas propiedades fisiológicas se encuentran descritas, parecen por si solos poseer muchas capacidades antagonicas según el breve análisis de literatura efectuado. Mucho más se podría agregar con los otros taxa dominantes aislados como: *Epicoccum*, *Nigrospora*, *Phoma* y *Sordaria fimicola*, los 3 primeros encontrados en plantas medicinales de Ecuador (Ramírez *et al.*, 2006), que también han demostrado tener actividad antagonica contra bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus*

aureus) y los hongos, *Candida albicans*, *Microsporium canis* y *Aspergillus niger* (Chicaiza & Ramírez, 2010). Todos estos géneros fueron hallados ya sea en *P. alopecuroides* o en *A. australe*. *Sordaria fimicola*, solo presente en *A. australe* como dominante, es común en muchos ambientes en la naturaleza, como el suelo, vegetales senescentes, excrementos de herbívoros, pero también como epífitos y como endófito en hojas y otros tejidos vegetales (Karamchand *et al.*, 2009). Probablemente desempeñando también un rol protectorio como simbiote.

Conclusiones

Las investigaciones químicas y biológicas sobre hongos endófitos en plantas medicinales, han permitido evidenciar que éstos constituyen una fuente particular y extremadamente rica en productos naturales con actividades biológicas importantes. Este potencial, parece no ser específico para un solo tipo de endófito, sino que abarca una amplia gama de especies fúngicas que en forma individual o conjunta, son capaces de regular o alterar la competencia en un determinado sustrato, en beneficio de sus capacidades competitivas y los aportes en la fisiología de su planta hospedadora. Nuestros primeros objetivos no incluyeron el análisis de los extractos para aseverar sus propiedades medicinales o antimicrobianas de los hongos dominantes encontrados (parte II en preparación), probablemente, estas actividades antagonicas conocidas por la literatura y efectivas contra mohos, levaduras y bacterias patógenas, podrían ser parte de la explicación del uso habitual de nuestras plantas por los aborígenes, ya sea, como agentes tópicos en infecciones cutáneas u en otras patologías. Las limitaciones de la metodología empleada, no fueron impedimento en la obtención de buenos resultados en la frecuencia y distribución de las especie detectadas, donde varios taxa fúngicos dominantes en *P. alopecuroides* y *A. australe* han sido aislados en otras familias de plantas, lo que implica que estas especies son generalistas (de múltiples hospedadores), preferentemente comunes en hojas, pero también, en otros tejidos vegetales. Los ejemplos se refieren principalmente a integrantes de los géneros: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phoma* y *Sordaria*, donde se evidencia por la literatura, la ubicuidad y el éxito bioecológico de la mayoría de estos hongos, mientras las diferencias o semejanzas en la composición de especies en ambos vegetales puede asociarse no solo al tipo de hospedador, sino a los tipos de suelos y a la composición de la estructura vegetal asociada en las zonas de muestreo. El trabajo a efectuarse en el estudio y descripción de los endosimbiontes en plantas medicinales es aún considerable, nuestros datos iniciales son otro aporte a este campo de la investigación.

REFERENCIAS

- Abdel-Motaal, F. F.; Nassar, M. S.; El-Zayat, M. S. A.; El-Sayed, M. A.; Shin-Ichito.** (2010). Antifungal activity of endophytic fungi isolated from Egyptian Henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). Pak. J. Bot., 42: 2883-2894
- Acevedo, J. L.; Maccheroni, J.R.; Pereira, W.; Odair, J.; De Araujo, W.L.** (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electron. J. Biotechnol. 3:15-16
- Ahrazem, O.; Gómez-Miranda, A.P.; Bernabé, M. & Leal, J.A.** (2000). Heterogeneity of the genus *Myrothecium* as revealed by cell wall polysaccharides. Arch. Microbiol. 173: 296-302.
- Arnold, A. E.; Maynard, Z. & Gilbert, G. S.** (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycol. Res.* **105**: 1502-1507.
- Aveskamp, M.; Gruyter de, H.; Wouderber, J.; Verkley, G.; Crous, W.P.** (2010). Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology* 65:1-60
- Bacon, C. W. & White, J. F.** (2000). *Microbial Endophytes*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Bacon, C.W. & Yates, I.E.** (2005). Microbial root endophytes. In: Schulz, B. Boyle, B. & Sieber, T.N. (Eds.). *Endophytic root colonization by Fusarium species: histology, plant reactions, and toxicity*. Springer, New York pp.133-152
- Bacon, C. W.; Hinton, D. M. & Hinton, A.** (2006). Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus majavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.* 100:185-194
- Banerjee, D.; Nerjee, S.; Manna, S.; Mahapatr, S. & Pati, B. R.** (2009). Fungal endophytes in three medicinal plants of Lamiaceae. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56:243-250
- Benavente, C.A.; Kurina-Sanz, M.; Lugo, M.A.** (2008) Micófilas, endófitos fúngicos y alcaloides en poblaciones de *Melica stueckertii* (*Poaceae*) del centro de Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 43:3-4
- Bensch, K.; Groeneward, J.Z.; Diksterthius, J. et al.** (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology* 67:1-94
- Bisseger, M. & Sieber, T.** (1994) Assamblages of endophytic fungi in coppice shoots of *Castanea sativa*. *Mycologia* 86:648-655
- Borges, W. S. & Pupo, M. T.** (2006). Novel Anthraquinone Derivatives Produced by *Phoma sorghina*, an Endophyte Found in Association with the Medicinal Plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 17:929-934
- Brasa, S.; Encinas, S.; Keck, J. & Nising, C.F.** (2007). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. <ftp://fluorous.com/...Brase%Chem%Rev%202009%Mycotoxins.pdf>
- Burkart, A.** (1987). *Leguminosae*. En: A. Burkart (ed.), *Flora ilustrada de Entre Ríos*. Vol. 6: 465-466. Colección Científica INTA, Buenos Aires, pp.693-695
- Cabrera, A.L. & Ragonese, A.M.** (1978). Revisión del género *Pterocaulon* (*Compositae*). *Darwiniana* 21:185-257
- Carmichael, J.; Kendrick, B.; Connors, I.; Sigler, L.** (1980). *Genera of Hyphomycetes*. The University of Alberta Press. Canada
- Castlebury, A.L.; Rossman, Y.A.; Sung, Gi-Ho.; Hyten, S.A.; Spatafora, W.J.** (2004). Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycological Research* 108:864-872
- Chicaiza Songor, A.V. & Ramírez Robles, J.Y.** (2010). Investigación del potencial bioactivo de hongos endófitos, aislados en cuatro especies de plantas medicinales, *Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia*, *Borreria leavis* y *Piper barbatum*, pertenecientes a la provincia de Loja. Disponible en: <http://repositorio.utpl.edu.ec/handle/123456789/3445>.
- De Hoog, G.S.** (1977). *Rhinochadiella* and allied genera. *Stud. Mycology* 15. 1-140
- De Hoog, G. & Guarro, Gené, J. & Figueras, M.L.** (2000). *Atlas of Clinical Fungi*, 2ª ed. The Netherlands: CBS. Baarn and Delft, Universitat Rovira I Virgili Reus. España.
- Desjardins, A. E. & Proctor, R. H.** (2001). Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins, p. 50-69. In B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden, and L. W. Burgess (ed.), *Fusarium*: Paul E. Nelson memorial symposium. American Phytopathology Society Press, St. Paul, MN.
- Desmukh, S.K.; Kolet, M.J. & Verekar, S. A.** (2010). Distribution of endophytic fungi in lemon grass (*Cymbopogon citratus* (Dc.) Stapf.). *J. Cell and Tissue Research* 10:2263-2267
- Devarajan, P.T.; Suryanarayanan, T.S. & Geetha, V.** (2002). *Indian J. Marine Sci.* 31:73-74
- Diccionario Online De Las Plantas Medicinales Plantasnet.** Disponible en: <http://www.diccionarioplantasnet.es/tapekue/tapekue.htm>
- Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson, T.** (1993). *Compendium of soil fungi*. 2nd Edition. IHW Verlag. Eching, Germany.
- Ellis, M.B. & Ellis, J.P.** (1987). *Microfungi on land plants. An identification handbook*. Croom Helm. Australia.
- Ellis, M.B.** (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. CIM, Kew
- Ellis, M.B.** (1976). *More Dematiaceous Hyphomycetes*. CIM, Kew
- Fisher, P. J.; Petrini, O. & Scott, H. M. L.** (1992). The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytol.* **122**:299-305.
- Freire, S.E.; Urtubey, E.; Sancho, G.; Bayón, N.; Katinas, L.; Gutierrez, D.; Giuliano, D.; Saenz, A.; Iharlegui, L.; Delucchi, G.** (2006). Inventario de la biodiversidad vegetal de la provincia de Misiones: *Asteraceae*. *Darwiniana*. 44 (2): 375-452
- Fröhlich, J. & Hyde, K. D.** (1999). Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? *Biodivers. Conserv.* 8: 977-1004

- Gamboa-Gaitán, M.A.** (2006). Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biol Colomb.* 11 (suppl.1): 3-20
- Ge, H.M.; Jiao, R.H.; Zhang, Y.F.; Zhang, J.; Wang, Y.R.; Tan, R.X.** (2009). Cytotoxicity and phytotoxicity of trichothecene macrolides from *Myrothecium graminum*. *Planta Med.* 75:227-229
- Gazis, R. & Chaverry, P.** (2010). Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology* 3: 240-254
- Hawksworth, D. L.** (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimated revised. *Mycol. Res.* 105: 1422-1432.
- Huang, W.Y.; Cai, Y.Z.; Hyde, K.D.; Corke, H.; Sun, M.** (2008). Bio-diversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plant. *Fungal Diversity* 33:61-75
- Hyde, K. & Soyong, K.** (2007). Understanding microfungal diversity-a critique. *Cryptogamie Mycologie* 28:1-9
- Hyde, K. & Soyong, K.** (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33:163-173
- Karamchand, K.S.; Sridhar, K.R. & Bhat, R.** (2009). Diversity of fungi associated with estuarine sedge *Cyperus malaccensis* Lam. *Journal of Agricultural Technology* 5:111-127
- Khan, R.; Shahzad, S.; Choudhary, M.I.; Khan, S.A.; Ahmad, A.** (2010). Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pak. J. Bot.* 42:1281-1287
- Kobayashi, E; Ando, K; Nakano, H; Iida, T; Ohno, H; Morimoto, M; Tamaoki, T.** (1989). «Calphostins (UCN-1028), novel and C. I. Fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities». *J. Antibiot* 42:1470-1474
- Kogel, K.H.; Franken, P. & Hüchelhoven, R.** (2006). Endophytes or parasite-what decides ?. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:358-363
- Kour, A.; Shawl, A.S.; Rehman, S.; Sultan, P.; Qazi, P.H.; Suden, P.; Khajuria, R.K.; Verma, V.** (2008). Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24:1115-1121
- Kuddus, R.; Oakes, J.; Sharp, C.; Scott, J.; Slater, K.; Kirsi, J.; Kopp, O.; Burt, W.** (2009). Isolation of medically important fungi from Ginkgo biloba leaves and crude Ginkgo supplements. *The Internet Journal of Microbiology*. 2009 Volume 7 Number 1
- Inacio, M.L.; Silva, G.H.; Teles, H.L.; Trevisan, H.C.; Cavalheiro, J.; Bolzani, V.S.; Young, M.C.M.; Pfenning, L.H.; Araujo, A.R.** (2006). Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandiocana* Nees (Lauraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34:822-824
- Johri, B.N.** (2006). Endophytes to the rescue of plants. *Current Science*, 90:1315
- Lee, H.B.; Kim, J.; Hong, K. & Kim, C.** (2008). Evaluation of a Fungal Strain, *Myrothecium roridum* F0252, as a Bioherbicide Agent. *Plant Pathol. J.* 24:453-460
- Li-Juan, G. & Shun-Xing, G.** (2009). Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology* 8:731-736
- Lima, A. & Furtado, M.** (2007). *Curvularia* species (anamorphic fungi: Hyphomycetes) from Santiago island, Cape Vert. *Portugaliae Acta Biol.* 22:145-156
- Liu, C.; Liu, T.; Yuan, F. & Gu, Y.** (2010). Isolating endophytic fungi from evergreen plants and determining their antifungal activities. *African Journal of Microbiology Research* 4:2243-2248
- Llorens, A.; Hinojo, M.; Mateo, R.; Medina, A.; Valle-Algarra, F.; González-Jaén, M.; Jiménez, M.** (2006). Variability and characterization of mycotoxin-producing *Fusarium* spp isolates by PCR-RFLP analysis of the IGS-rDNA region. *Antonie van Leeuwenhoek* 89:465-478
- Martini, M.; Musetti, R.; Grisan, S.; Polizzotto, R.; Borselli, S.; Pavan, F.; Osler, R.** (2009). DNA-Dependent Detection of the Grapevine Fungal Endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Dis.* 93:993-998
- Miller, J.D. & Trenholm, H.L.** (eds.) (1994). *Mycotoxins in grains: Compound other than aflatoxins*. Eagan Press St, Paul Minnesota, USA.
- Mohanta, J.; Tayung, K. & Mohapatra, B.U.** (2008). Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethno-medicinal plants of Simlipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology*. 2008. Volume 5 Number 2
- Morales-Randon, V. & Rodríguez-González, M.** (2005). Hongos endófitos un nuevo paradigma para la fitopatología. *CENIAP HOY* N° 9. *Colomb. 11 (suppl.1):* 3-20
- Morales-Rondon, V.; Rodríguez-González, M.** (2006). Hongos endófitos en plantaciones de mango «Haden» de la planicie de Maracaibo, Venezuela. *Rev. Fac. Agron.* 18:23-33
- Mozambiqueflora.** com/speciesdata/species.php?species_id=160260
- Murakami, R.; Shirata A. & Inoue, H.** (1998). A selective medium containing the toxins of *Myrothecium roridum* for isolation from soil. *J. Seric. Sci. Jpn.* 67:381-387
- Murakami, R. & Shirata, A.** (2005). Myrotoxin B detection from mulberry leaves infected with *Myrothecium roridum*, cause Myrothecium leaf spot of mulberry, and possible roles in pathogenicity. *Japan. J. Phytopath.* 71:91-100
- Murao, S. & Tanaka, N.** (1982). Isolation and Identification of a Microorganism Producing Bilirubin Oxidase. *Agric. Biol. Chem.* 46: 2031-2034.
- Mysore, V. Tejesvi.; Basavanna, Mahesh.; Monnanda, S. Nalini.; Harishchandra, S. Prakash.; Kukkundoor, R. Kini.; Ven, Subbiah.; Hunthrike, S. Shetty.** (2006). Fungal endophyte assemblages from ethnopharmacologically important medicinal trees. *Can. J. Microbiol.* 52:427-435
- Naik, B.S.; Shashikala, J. & Krishnamurthy, Y.L.** (2009). *Microbiol. Res.*, 164:290-296
- Nelson, P.; Tousson, T.; Marasas, F.** (1983). *Fusarium* species.

An illustrated Manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park and London.

- Okunowo, W.O.; Gbenle, G.O.; Osuntoki, A.A.; Adekunle, A.A.; Ojokuku, S.A.** (2010). Production of cellulolytic enzymes by a phytopathogenic *Myrothecium roridum* and some avirulent fungal isolates from water hyacinth. Afr. J. Biotechnol. 9:1074-1078
- Onions, A.; Allsopp, D. & Eggins, H.** (1981). Smiths's introduction to industrial Micology, 7^a ed. John Wiley & Sons. New York.
- Piontelli, E. & Toro, M.A.** (1994). Manual de identificación para microhongos comunes en alimentos. Universidad de Valparaíso. Escuela de medicina. Cátedra de Micología. Valparaíso
- Piontelli, E.; Toro, M.A.; Giusiano, G.; Vivar, V.** (2002). Distribución altitudinal de hongos queratinófilos, epífitos y endófitos en suelos desérticos del norte chileno (II Región 23°L.S. y 68°L.W.) Bol. Micológico 17: 3-43
- Poltronieri, L.S.; Duarte, M.L.R.; Alfenas, A.C.; Trindade, D.R.; Albuquerque, F.** (2003). Three new pathogens infecting antilles cherry in the State of Pará. Fitopatol. Bras. 28:24-426
- Pouliot, J. M.; Walton, I.; Parkhouse, M. N.; Abu-Lail, L. I.; Camesano, T. A.** (2005). Adhesion of *Aureobasidium pullulans* is controlled by uronic acid based polymers and pullulan. Biomacromolecules 6:1122-1131
- Prasad B.B.; Kumananda, Tayung.; Prema, Narayan. J.; Sushil Kumar. D.** (2010). Phylogenetic Placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with Antimicrobial Activity. EJBS 2:8-16
- Prasongsuk, S.; Sullivan, R. F.; Kuhirun, M.; Eveleigh, D. E.; Punnapayak, H.** (2005). Thailand habitats as source of pullulanproducing strains of *Aureobasidium pullulans*. World J. Microb. Biot. 21:393-398
- Promputtha, I.; Jeewon, R.; Lumyong, S.; McKenzie, E.H.C.; Hyde, K.D.** (2005). Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non-sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). Fungal Diversity 20: 167-186
- Promputtha, I.; Lumyong, S.; Dhanasekaran, V.; McKenzie, E.H.C.; Hyde, K.D.; Jeewon. R.** (2006). A Phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. Microbial Ecology. 53:579-590
- Quezado, Duval, A.M.; Henz, G.P.; Paz-Lima, M.L.; Medeiros, A.R.; Miranda, B.E.C.; Pfenning, L.H.; Reis, A.** (2010). New hosts of *Myrothecium* spp. in Brazil and a preliminary *in vitro* assay of fungicides. Brazilian Journal of Microbiology 41 doi: 10.1590/S1517-8382201 0000100034
- Rajagopal, K.; Kalabathy, S.; Kokila, S.; Karthikeyan, S.; Kathiravan, G.; Prasad, R.; Balassubraminan, P.** (2010). Diversity of fungal endophytes in few medicinal herbs of South India. Asian J. Exp. Biol. Sci. 1:415-418
- Ramirez, R.; Delgado, E.; Rodolfi, M.; Solveig, T.** (2006). Actividad antagonica de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. Bol. Micológico 21:49-53
- Ravindra, N.; Vijai, C.K.; Gary .S. V. & Strobel, G. & Ezra, D.** (2008). The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Current Sciences 95:228-233
- Raviraja, N.S.** (2005). Fungal endophytes in five medicinal plant species from Kudremukh Range Western Ghats of India. J. Basic Microbiol. 45:230-235
- Rocha, O.; Ansari, K. & Doohan, F.M.** (2005). Effect of trichotecene micotoxins on eukariotic cells: a review. Food Addit. Contam. 22:369-378
- Rubalcava, M.** (2008). Descubren colaboradores de la UNAM hongos endófitos con potencial plaguicida. Disponible en: http://www.alfa-editores.com/web_index.php?option=com_content&task=view&id=24_25&Itemid=28
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., and Sullivan, T. J.** (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. Annu. Rev. Ecol. Syst. 29:319-343
- Samson, R.; Hoekstra, E.; Frisvad, J.C. & Filtenborg, O.** (2000). Introduction to food and airborne fungi. Utrecht. Centraalbureau voor Schimmelcultures. The Netherlands.
- Schena, L.; Nigro, F.; Pentimone, I.; Ligorio, A.; Ippolito, A.** (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. Postharv. Biol. Tec. 30:209-22
- Schoettler, S.; Bascope, M.; Sterner, O.; Anke, T.** (2006). Isolation and Characterization of Two Verrucarins from *Myrothecium roridum*. Z. Naturforsch. 61:309-314
- Shankar, N.B. & Shashikala, J.** (2010). Diversity and structure of fungal endophytes in some climbers and grass species of Malnad region, Western Ghats, Southern India. Mycosphere 1:265-274
- Shen, Li.; Shi, Da Hua.; Song ,Yong Cun; Tan, RenXiang.** (2009). Chemical constituents of liquid culture of endophyte IFB-E012 in *Artemisia annua*. Chinese Journal of Natural medicine 7:354-356
- Shen, Li.; Rui, H. Jiao.; Yong, H. Ye.; Xiao, T. Wang.; Chen, Xu.; Yong, C. Song.; Hai, L. Zhu.; Ren, X. Tan.** (2006). Absolute Confi-guration of New Cytotoxic and Other Bioactive Trichothecene Macrolides. Chemistry - A European Journal 12:5596-5602
- Shweta, S.; Zuehlke, S.; Ramesha, T.B.; Priti, V. et al.** (2010). Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamp-tothecin and 9-methoxycamp-tothecin. Phytochemistry 71:117-122
- Silva, J.C. & Meyer, M.C.** (2006). Mancha de mirotécio em algodoeiro causada por *Myrothecium roridum*. Summa Phytopathol. 32:390-393
- Sivanesan, A.** (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological papers, N° 158. C.A.B. Internatinal Mycological Institute.
- Souza-Motta, C.M.; Cavalcanti, M.A.Q.; Fernandes, M.J.S.; Lima, D.M.M.; Coimbra, J.P.; Laranjeira, D.** (2003).

Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (*Helianthus annuus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulina. *Braz. J. Microbiol.* 34:273-280

Takesako, K.; Ikai, K.; Haruna, F.; Endo, M.; Shimanaka, K.; Sono, E.; Nakamura, T.; Kato, I.; Yamaguchi, H. (1991). Aureobasidins, new antifungal antibiotics. Taxonomy, fermentation, isolation and properties. *J. Antibiot.* 44:919-924

Tressens, S.; Keller, H.; Revilla, V. (2008) Las plantas vasculares de la reserva de uso múltiple guaraní, Misiones (Argentina) *Bol. Soc. Argent. Bot.* 43: 273-293

Tan, R.X. & Zou, W.X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Report.* 18:448-459

Tayung, K.; Barik, B. P.; Jagadev, P. N. & Mohapatra, U. B. (2011)

Phylogenetic investigation of endophytic *Fusarium* strain producing antimicrobial metabolite isolated from Himalayan Yew Bark Malaysian *Journal of Microbiology* 7:1-6

Trapp, S.C.; Hohn, T.S.; McCormick, S. & Jarvis, B.B. (1998). Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. *Mol. Gen. Genet.* 257:421-432

Turhan, G. & Grossmann, F. (1994). Antagonistic activity of five *Myrothecium* species against fungi and bacteria *in vitro*. *J. Phytopathol.* 140: 97-113

unesco.org.uy/educacion/fileadmin/templates/educacion/archivos/ManualdeUsodeHierbas-Py.pdf El uso de las plantas medicinales en América y en Paraguay. Pohã ñana jeropu America ha Paraguaipe.

Viikari, L.; Kantelinen, A.; Sundquist, J. & Linko, M. (1994). Xylanases in bleaching -from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:335-350.

Wang, W. F.; Jiao, H.R.; Cheng, A.B.; Tan, S.H.; Song, Y.C. (2007). «Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp.» *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:79-83

Wikipedia.org/wiki/Acanthospermum_australe

Worapong, J.; Sun, J. & Newcombe, G. (2009). First report of *Myrothecium roridum* from a gymnosperm. *North American Fungi* 4:1-6

Xu, J.; Takasaki, A.; Kobayashi, H.; Oda, T.; Yamada, J.; Mangindaan, R.E.; Ukai, K.; Nagai, H.; Namikoshi, M. (2006). Four new macrocyclic trichothecenes from two strains of marine-derived fungi of the genus *Myrothecium*. *J. Antibiot.* 59:451-455

Xu, L.; Zhou, L.; Zhao, J.; Li, J.; Li, X.; Wang, J. (2008). Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology.* 46: 68-72

Zalar, P.; Gostinčar, C.; de Hoog, G. S.; Uršič, V.; Sudhadham, M.; Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud. Mycol.* 61:21-38

Zhang, Peng.; Zhou, PengPeng. & Yu, LongJiang. (2009). An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current Microbiology* 59:227-232

Zhang, Z.B.; Qing, Gui. Zeng.; Ri, Ming. Yan.; Ya, Wang.; Zheng, Rong. Zou.; Du, Zhu. (2010). Endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* LF70 from *Huperzia serrata* produces Huperzine A. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* DOI: 10.1007/s11274-010-0476-6

Zuloaga, F.O. & Morrone, O. (1996). Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina. I. *Pteridophyta*, *Gymnospermae* y *Angiospermae* (*Monocotyledonae*), II. *Dicotyledonae*. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* pp.60-74