



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA



**Estudio sobre las interacciones entre hongos endófitos
y hongos fitopatógenos de *Coffea arabica***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA

HÉCTOR ORLANDO ARIAS MEDINA

Directora de tesis:

Dra. Ana Luisa Anaya Lang

Laboratorio de Alelopatía, Instituto de Ecología, UNAM

Asesora interna:

Dra. Rosalva García Sánchez

Unidad de Investigación en Ecología Vegetal

México, D.F. Noviembre 2013

Agradecimientos

Primero que nada, le agradezco a Dios, por haberme dado vida, a mis padres por la crianza tan cariñosa, firme y recta que me han inculcado durante toda mi vida y que, aún continúan haciéndolo. A mí hermana por todo el apoyo moral y grandes ideas que me dio a lo largo de la carrera, con las cuales pude salir exitoso en más de unas ocasiones.

Para lo académico, gracias Dra. Ana Luisa, por aceptarme en este proyecto, hacer que puliera hasta el último de los detalles en la investigación y por mostrarme la manera de solventar los gastos a lo largo de este año.

También le doy las gracias a todas y cada una de las maravillosas personas del Laboratorio de Alelopatía y el Instituto de Ecología que me demostraron que los trabajos en el laboratorio pueden estar llenos de mucha diversión y aprendizaje.

Gracias Dra. Rosalva por continuar asesorándome en los temas después de más de tres años desde la primera vez que fui al Invernadero.

Gracias a cada uno de los sinodales: Dr. Arcadio, Dra. Balbina, Profesor Marco. Las correcciones que me hicieron en este trabajo fueron muy valiosas.

Finalmente gracias a todas las personas que creyeron en mí y que de alguna forma, ya sea directa o indirecta, contribuyeron a que yo pueda estar escribiendo estas palabras. No quiero meterme en problemas empezando a citar nombres, porque todas las personas que me apoyaron a lo largo de la carrera son tantas, que podría llena todo este libro solo con sus nombres y todas las grandiosas experiencias que hemos pasado juntos. Gracias a todos mis amigos, profesores, compañeros e incluso a cada amor no correspondido.

Dedicatorias

Para todas las personas que me ayudaron a lo largo de este camino lleno de aprendizaje y experiencias.

A mi madre, que siempre me enseñó a distinguir la hora para jugar y la hora para estudiar. Te quiero.

A mi padre, que me enseñó que los sueños hay que alcanzarlos.

A mi hermana con quien he compartido alegrías en toda mi vida y que nunca dejó de creer en mí aún en las más grandes frustraciones que me tocaron. Sé que no te lo digo muy seguido, pero te quiero.

Nuevamente, a todas las personas que creyeron en mí y contribuyeron a mi formación profesional y como persona.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
○ Generalidades de los hongos.....	2
○ Los hongos y sus interacciones con las plantas.....	2
- Los hongos endófitos.....	3
○ Grupos de hongos endófitos.....	6
- Mycelia Sterilia.....	8
○ Actividad biológica de los hongos endófitos.....	8
○ Bioensayos de antagonismo.....	10
- Índice de antagonismo.....	11
○ Hongos endófitos y fitopatógenos de <i>Coffea arabica</i>	11
○ Importancia del estudio.....	12
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES y MÉTODOS.....	14
1) Identificación de los hongos fitopatógenos de <i>Coffea arabica</i>	14
2) Evaluación de la bioactividad de los hongos fitopatógenos y selección de los más virulentos para los bioensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	15
3) Selección de los hongos endófitos para los bioensayos de antagonismo <i>in vitro</i> ..	16
4) Evaluación de las tasas de crecimiento de los hongos endófitos y de los hongos fitopatógenos seleccionados.....	18
5) Bioensayos de antagonismo <i>in vitro</i> entre hongos endófitos y fitopatógenos.....	18
6) Valoración del Índice de Antagonismo (IA) y pruebas estadísticas.....	19

RESULTADOS.....	22
• Identificación de los hongos fitopatógenos de <i>Coffea arabica</i>	22
• Evaluación de la bioactividad de los hongos fitopatógenos y selección de los más virulentos para los bioensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	24
• Selección de los hongos endófitos para los bioensayos de antagonismo <i>in vitro</i> ..	26
• Evaluación de las tasas de crecimiento de los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos seleccionados.....	28
• Bioensayos de antagonismo <i>in vitro</i> entre hongos endófitos y fitopatógenos.....	33
- Valoración del Índice de Antagonismo (IA).....	34
- Pruebas estadísticas.....	36
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	43
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	48
LITERATURA CONSULTADA.....	49
ANEXO DE DATOS ESPECÍFICOS.....	56

RESUMEN

Debido a la importancia económica del café (*Coffea arabica*) para México y del daño potencial que los fitopatógenos fúngicos pueden ocasionar a su cultivo y producción, el presente trabajo está dirigido a investigar el papel ecológico de las comunidades de hongos endófitos foliares de *C. arabica* como controles biológicos de los hongos fitopatógenos mediante bioensayos de antagonismo *in vitro* entre los hongos endófitos y fitopatógenos de esta planta. El cepario del Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM proporcionó los hongos utilizados en esta investigación: catorce aislamientos de hongos fitopatógenos foliares y once de hongos endófitos foliares que se obtuvieron originalmente de las hojas de *C. arabica* de un cafetal con manejo tradicional en Huatusco, Veracruz. Todos estos hongos se identificaron según sus características morfológicas; se llegó hasta género sólo en cuatro fitopatógenos y en los once endófitos. Mediante inoculaciones *in vivo* de los hongos fitopatógenos en hojas de *C. arabica* separadas de la planta, se seleccionaron aquellos que les causaron los síntomas más severos de enfermedad. Se midieron las velocidades de crecimiento de los hongos fitopatógenos y endófitos seleccionados, sembrándolos, separadamente, en condiciones estériles, en Papa-Dextrosa-Agar (PDA) solo y con extracto acuoso de hojas de café al 20%. Se realizaron los bioensayos de antagonismo *in vitro* enfrentando a los hongos fitopatógenos con los hongos endófitos, sembrándolos en PDA según su velocidad de crecimiento. Se volvieron a seleccionar sólo los hongos fitopatógenos y endófitos que mostraron la mayor capacidad antagónica; estos hongos se utilizaron en un segundo bioensayo de antagonismo, sembrándolos en PDA con extracto de hojas de café al 20%. Los hongos que crecieron más rápido durante las pruebas de antagonismo fueron los endófitos 1 al 7, pero presentaron baja resistencia ante los hongos fitopatógenos, lo que apoya la hipótesis de que los hongos de rápido crecimiento son menos antagónicos que los de lento crecimiento. En general, los hongos fitopatógenos resultaron más antagónicos que los endófitos, sin embargo, los hongos endófitos *Verticillium* sp. y *Guignardia mangiferae* fueron los más resistentes frente a los fitopatógenos, sin embargo el endófito 8, *Xylaria* sp., resultó el más antagónico de todos los hongos utilizados en los bioensayos. Según lo observado, algunos hongos endófitos foliares de *Coffea arabica* podrían desempeñar un papel defensivo, dentro del cafeto, contra el ataque de ciertos hongos fitopatógenos; estudios posteriores sobre el papel ecológico de los hongos endófitos de *Coffea arabica*, aportarán mayores conocimientos con el fin de considerar a los hongos endófitos de esta importante planta cultivada, como una alternativa prometedora para protegerla contra las enfermedades.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos eucariontes (poseen núcleo verdadero) pudiendo ser unicelulares (levaduriformes) o filamentosos, formados por hifas cuyo conjunto constituye el micelio. Son heterótrofos, se alimentan por absorción y tienen paredes celulares [Bergman, 2006; Bruns, 2006]. Los hongos se ubican dentro del reino Fungi, que se diferencia de otros reinos como el de las bacterias, debido a que éstas no poseen núcleo verdadero [Hogan, 2013], el de las plantas, debido a que éstas poseen cloroplastos y realizan fotosíntesis [Lewis y McCourt 2004], y el de los animales, debido a que éstos no presentan pared celular de ningún tipo [Davidson, 2005]. Generalmente, los hongos son filamentosos, su unidad celular básica se denomina hifa, la cual es un compartimiento tubular rodeado de una pared celular rígida que posee glucano, quitina y glicoproteínas [Bruns, 2006; Pontón, 2008], a diferencia de las plantas que contienen celulosa. La hifa se extiende por medio del crecimiento de su parte terminal, y se multiplica ramificándose y creando una fina red llamada micelio el cual constituye el cuerpo vegetativo de los hongos pluricelulares [Bruns, 2006; Ulloa y Hanlin, 2012]. Los hongos no son vasculares y suelen reproducirse por medio de esporas producidas sexualmente (meiosis) o asexualmente (mitosis), o pueden reproducirse sin formación de esporas (fragmentación); las esporas son usualmente diseminadas por el viento, dependiendo de las especies y condiciones ambientales [Webster y Weber, 2007]. Generalmente los hongos no son móviles, y como se mencionó, son organismos heterótrofos al igual que los animales [Bergman, 2006], pero a diferencia de éstos, los hongos realizan una digestión externa de sus alimentos, secretando enzimas y posteriormente las hifas absorben los nutrientes resultantes de la digestión [Hawksworth *et al.*, 1983; Ulloa y Hanlin, 2012].

Los hongos son ubicuos y cosmopolitas y habitan tanto ambientes terrestres como acuáticos [Agris, 1997]. Según su ecología, los hongos pueden clasificarse en cuatro grupos: saprobios, parásitos, patógenos y simbiontes mutualistas [Webster y Weber, 2007].

Los hongos y sus interacciones con las plantas

Los hongos pueden establecer diversos tipos de asociaciones con las plantas vasculares. Se encuentran asociados a las superficies y exudados vegetales, a las raíces de las plantas como hongos micorrizógenos, como parásitos biótrofos y necrótrofos, como colonizadores del tejido

vegetal muerto, o bien viviendo dentro de los distintos órganos de una planta como hongos endófitos (HE) [Agrios, 1997].

Los hongos endófitos

Los microorganismos endófitos son hongos o bacterias que en algún momento de su ciclo de vida invaden los tejidos de las plantas vivas y ocasionan infecciones asintomáticas dentro de éstos, es decir, sin producirles síntomas de enfermedad [Wilson, 1995]. Los HE han sido encontrados en todas las plantas estudiadas [López-Llorca, y Macía-Vicente, 2009], pero muchas de las relaciones que mantienen con las plantas aún no son conocidas en su totalidad, y por ello, estas relaciones se continúan investigando con el fin de tener un mayor conocimiento de todos los procesos involucrados en ellas [Faeth, 2002]. De igual manera el mecanismo por medio del cual las plantas controlan el acceso de los HE capaces de introducirse en sus hojas, es escasamente conocido. Varios reportes han sugerido que algunos HE invaden a las plantas a través de las heridas hechas por insectos y otros acceden a través de los estomas de la planta [Osono y Takeda, 1999; Oliveira *et al.*, 2004; Lemons *et al.*, 2005]. La composición de especies y su abundancia relativa dentro de las comunidades de HE, puede reflejar las distribuciones espaciales en los órganos de la planta hospedera así como los periodos de muestreo [Mueller *et al.*, 2004].

Los HE desempeñan un amplio rango de papeles ecológicos interactuando con las plantas hospederas en un continuum desde el mutualismo hasta el parasitismo y la patogenicidad [Saikkonen *et al.*, 1998], estas interacciones son versátiles y dinámicas. Los HE pueden ser patógenos en un hospedero e inoocuos en otro, no patógenos o patógenos que han reducido su patogenicidad o han incrementado sus periodos de latencia en las plantas hospederas, o bien pueden ser habitantes pasivos de un hábitat o nicho posible (la planta) esperando una oportunidad para propagarse [Schulz y Boyle, 2005; Backman y Sikora, 2008]. Este último caso permite que las defensas de las plantas hospederas se fortalezcan para reducir o detener el crecimiento de los patógenos [Paracer y Ahmadjian, 2000]. De hecho se considera que los HE mutualistas evolucionaron a partir de hongos parásitos o patógenos [Saikkonen *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2004]. Se ha postulado que la interacción hongo endófito-planta hospedera es un antagonismo balanceado que depende de un equilibrio entre la virulencia del hongo y las defensas de la planta; además, diversos factores como el estado fisiológico de la planta, las condiciones ambientales y

la etapa de vida en que la planta es colonizada por parte del HE, determinan el tipo de interacción [Schulz *et al.*, 1999; Redman *et al.*, 2001].

Si la relación HE-planta es favorable para ambos organismos, entonces constituye una simbiosis mutualista. Erróneamente se suele usar la palabra “simbiosis” como sinónimo de mutualismo. El concepto de simbiosis, palabra que deriva de los vocablos griegos *σύν* (syn “con” o “juntos”) y *βίωσις* (biosis “viviendo”), se define como: “la asociación entre dos o más organismos de diferente especie que pueden beneficiarse de esta asociación, ser dañados, o no ser afectados por ella” [Paracer y Ahmadjian, 2000]. Para los efectos de la presente investigación, el término “hongo endófito” (HE) hará referencia a un hongo que ha sido aislado de los tejidos de una planta, la cual no presenta síntomas aparentes de enfermedad en el momento de su aislamiento.

Los registros fósiles indican que las plantas han estado asociadas tanto con HE como con hongos micorrizógenos por lo menos desde hace 400 millones de años [Redecker *et al.*, 2000; Krings *et al.*, 2007]. Muy probablemente esta asociación ya existía cuando las plantas colonizaron el ambiente terrestre, desempeñando, por lo tanto, un largo e importante papel en la evolución de la vida terrestre [Rodríguez *et al.*, 2009].

Entre las relaciones mutualistas que los HE pueden establecer con sus plantas hospederas se encuentra la protección contra diversos tipos de estrés biótico y abiótico, como la defensa contra la herbivoría, la reducción de poblaciones de microorganismos fitopatógenos en los tejidos vegetales y la tolerancia a la sequía [Redman *et al.*, 2001]. Por otra parte, los HE también pueden producir metabolitos similares, en estructura y función, a los compuestos que la planta hospedera sintetiza [Strobel, 2002], como es el caso del HE *Taxomyces andreanae* que sintetiza un compuesto similar al taxol que produce el tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), su árbol hospedero [Stierle *et al.*, 1993; [Unterseher, 2011]. Asimismo los HE, pueden sintetizar hormonas vegetales, como las giberelinas, promoviendo el crecimiento de la planta hospedera [MacMillan, 2002]. Probablemente los HE foliares en los árboles forestales son los más frecuentemente asociados con el término ‘continuum endofítico’, debido a que representa el balance adecuado entre la virulencia del hongo y las defensas de la planta [Saikkonen *et al.*, 1998; Schulz y Boyle, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009]. En la Figura 1 se pueden observar algunos de los beneficios que los HE aportan a su planta hospedera.

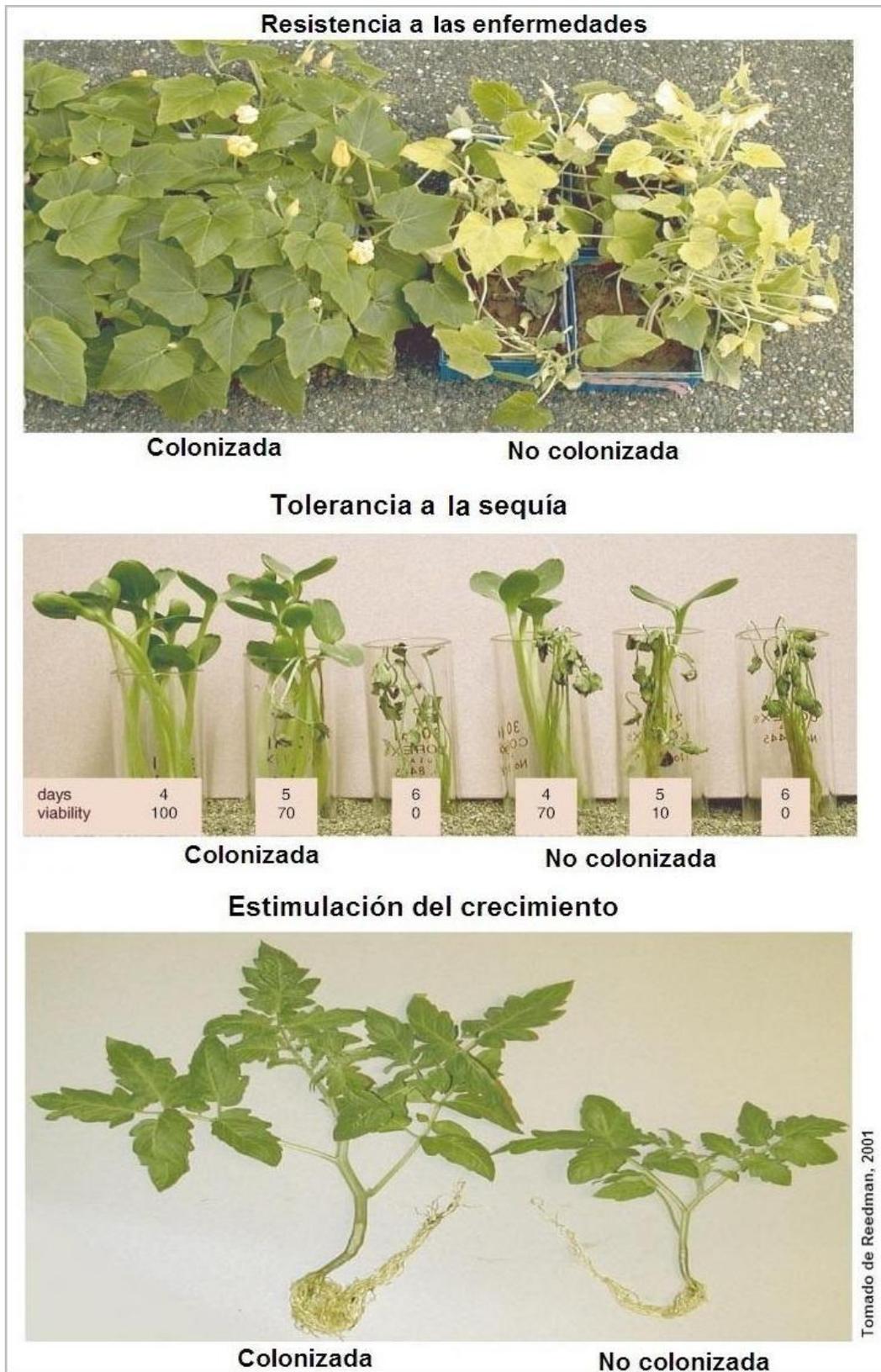


Figura 1. Algunos beneficios que produce la colonización de hongos endófitos mutualistas en sus plantas hospederas.

Grupos de hongos endófitos

Los hongos son considerados un grupo monofilético, no obstante, incluso en la actualidad, hay algunos taxa cuya filogenia no ha sido totalmente esclarecida [James *et al.*, 2006; Hibbett *et al.*, 2007; Blackwell *et al.*, 2012]. La clasificación más aceptada actualmente se muestra en la Figura 2.

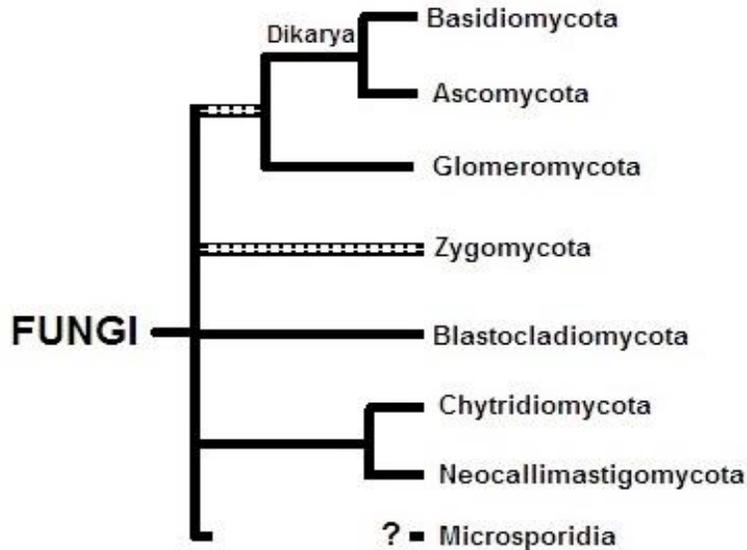


Figura 2. Filogenia del reino Fungi. Las líneas punteadas indican que la monofilia de estos grupos no ha sido totalmente confirmada, y el símbolo “?” significa que la ubicación de este grupo dentro del reino, aún no ha sido determinada. Filogenia modificada de James *et al.*, 2006, Hibbett *et al.*, 2007 y Blackwell *et al.*, 2012.

Dentro del subreino Dikarya se encuentran las divisiones taxonómicas (phyla) Ascomycota y Basidiomycota [Lutzoni *et al.*, 2004; James *et al.*, 2006], en las cuales se reconocen dos grandes grupos de HE: los clavicipitáceos (Clavicipetaceae) que colonizan mayoritariamente a los pastos de manera sistémica, y los no clavicipitáceos que colonizan a todos los demás linajes de plantas mediante una colonización horizontal localizada dentro de los tejidos vegetales [Faeth y Fagan, 2002; Rodríguez *et al.*, 2009].

Los HE clavicipitáceos pertenecen a la clase Sordariomycetes del phylum Ascomycota. Por su parte los HE no clavicipitáceos (cuya colonización no es sistémica) pertenecen a diversas clases, órdenes y familia de hongos y representan una gran diversidad de especies, la mayoría de las cuales también se encuentran dentro de los Ascomicetos y una minoría dentro de los Basidiomicetos [Rodríguez *et al.*, 2009].

La mayoría de los estudios sobre los HE han sido enfocados sobre los clavicipitáceos que habitan dentro de los pastos de zonas templadas [Clay, 1991; Saikkonen *et al.*, 1998; Malinowski y Belesky 1999], en cambio los HE asociados a todos los demás tipos de plantas, son menos conocidos a pesar de que éstos pueden ser altamente diversos dentro de una misma planta hospedera, especialmente en bosques tropicales y representan al menos cinco clases del phylum Ascomycota, a menudo con alrededor de 3 a 20 especies, coexistiendo como comunidades colonizadoras localizadas dentro de hojas individuales [Lodge *et al.*, 1996].

La particularidad de los miembros del subreino Dikarya es que carecen de flagelos, y, además, producen tanto hifas como células que albergan dos núcleos funcionales (células dicarióticas), y mantienen esta estructura mediante elongaciones de las hifas y particiones al final de éstas (báculos en Ascomycota y fibulas en Basidiomycota) [Herrera y Ulloa, 1990; Ulloa y Hanlin, 2012]. En los hongos del subreino Dikarya las hifas están seccionadas en células por paredes internas llamadas septos, los cuales están perforados (poros). Una característica importante que diferencia a ambas divisiones taxonómicas, es el diseño de los septos hifales, existen septos homogéneos y con bordes redondeados en Ascomycota y ‘doliporos’ (poro central rodeado por una dilatación de la membrana) en Basidiomycota [Moore, 1996]. En la Figura 3 se muestran algunas características distintivas de los hongos Ascomicetos y Basidiomicetos.

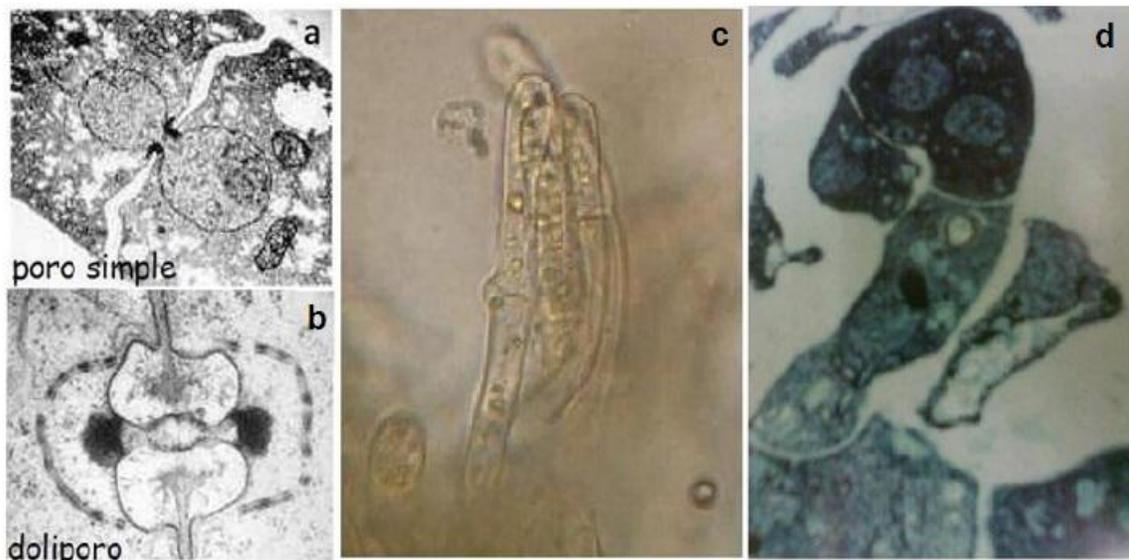


Figura 3. Características distintivas de Ascomicetos y Basidiomicetos: (a) septos hifales de ascomicetos, (b) septos hifales de basidiomicetos, (c) formación de fibulas en el basidiomiceto *Cantharellus cibarius*, (d) formación de báculos en el ascomiceto *Hypomyces* sp. Imágenes tomadas de: Cubas, 2007 (a) y (b), y Ulloa y Hanlin, 2012 (c) y (d).

Mycelia Sterilia

Un problema común al trabajar con cultivos de HE tropicales es que muchos de estos no esporulan y por ello no pueden identificarse [Hawksworth y Rossman, 1997; Arnold *et al.*, 2000]. La sistemática moderna de hongos está basada en la morfología de las esporas y sus estructuras reproductoras, entonces la ausencia de cualquiera de éstas hace que los hongos estudiados no puedan ser identificables usando métodos tradicionales de comparación morfológica para clasificarlos [Vinnere, 2004]. Si las condiciones no son adecuadas para identificar ciertos hongos estudiados, éstos pueden agruparse en morfoespecies, las cuales se basan en morfologías similares y tasas de crecimiento en medios de cultivo [Santamaría y Bayman, 2005].

Mycelia Sterilia (hongos estériles) es un grupo especial y artificial de hongos que incluye a todos aquellos que no producen ningún tipo conocido de esporas, ya sean sexuales o asexuales [Hawksworth *et al.*, 1983]. Originalmente los miembros de Mycelia Sterilia se ubicaban en otro grupo artificial, Deuteromycota (Fungi imperfecti), en el cual sus miembros no tienen fase sexual conocida. No obstante, en Deuteromycota es conocida la formación de esporas de origen asexual mientras que en Mycelia Sterilia no se conoce producción de esporas de ningún tipo [Vinnere, 2004].

Cuando se trabaja con hongos estériles, el investigador puede asignar los aislamientos obtenidos a las divisiones Ascomycota y Basidiomycota utilizando, como se mencionó, unas cuantas características disponibles del micelio [Vinnere, 2004], es decir:

- La estructura de los ‘poros’ de los septos en Ascomicetos y de los ‘doliporos’ en Basidiomicetos [Moore, 1996].
- Las estructuras dicarióticas: ‘fíbulas’ en Basidiomicetos [Alexopoulos *et al.*, 1996; Ulloa y Hanlin, 2012] y ‘báculos’ en Ascomicetos [Ulloa y Hanlin, 2012; Herrera y Ulloa, 1990].

Actividad biológica de los hongos endófitos

En diversas investigaciones se ha observado que la presencia de HE y el modo en que actúan dentro de la planta hospedera, están asociados con la disminución o eliminación del daño ocasionado por microorganismos patógenos [Arnold *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2003; Rubini *et al.*, 2005; Mejía *et al.*, 2008]. Se conocen dos formas por medio de las cuales los HE proporcionan resistencia a las plantas hospederas: 1) de forma directa, ya sea al interactuar con los microorganismos patógenos mediante antibiosis o micoparasitismo, determinado por enzimas

degradantes de la pared celular de los patógenos, o bien por exclusión competitiva del hábitat (competencia por el sustrato); y 2) de forma indirecta, al inducir respuestas intrínsecas de resistencia en la planta hospedera [Ganley *et al.*, 2008; Mejía *et al.*, 2008]. En algunos casos, estas dos formas de promover resistencia pueden actuar conjuntamente [Perez-Leblic *et al.*, 1982; Widden y Scuttolin, 1988; Whipps, 1992].

Es importante comprender la interacción no sólo entre HE y sus plantas hospederas, sino también entre HE y hongos fitopatógenos (HF) [Kurose *et al.*, 2012]. La competencia entre hongos, como entre otros organismos, se caracteriza por la lucha que se establece con el fin de adquirir recursos primarios, lograr el acceso inicial a algún recurso disponible, o por obtener recursos secundarios. De esta manera, Rayner y Webber [1984] mencionan que la capacidad competitiva de un hongo se refiere a la habilidad de éste para apropiarse de los recursos ya obtenidos. En el ambiente natural, la inhibición que un hongo produce sobre otro, podría ser el resultado de la competencia por nutrientes y espacio, o podría tratarse de la producción de antibióticos o de la interferencia directa entre las hifas [Shearer y Zare-Maivan, 1988].

En estudios de competencia *in vitro* entre HE, se ha observado que éstos pueden inhibir el crecimiento de otros microorganismos, de otros HE [Espinosa-García *et al.*, 1996; Arnold *et al.*, 2003] y de hongos fitopatógenos [Yue *et al.*, 2000]. Algunos ascomicetos endófitos son conocidos por la fuerte defensa que oponen ante el ataque de saprobios basidiomicetos [Rayner y Boddy, 1988]. Aunque aún no se ha aclarado si este tipo de relación ocurre en el interior de los tejidos, los estudios de antagonismo *in vitro* y producción de metabolitos secundarios de los HE, podrían ayudar a explicar la complejidad, variedad e importancia de las relaciones de los HE con otros organismos de su entorno [Carroll, 1995; Arnold y Herre, 2003; Stone *et al.*, 2004].

Es difícil establecer la importancia de las sustancias inhibidoras en las interacciones fúngicas, porque, además de la producción de estas sustancias, muchos otros factores están involucrados en aquellas interacciones relacionadas con la competencia (la eficiencia de germinación del inóculo, su tasa de crecimiento, los patrones de utilización del sustrato, etc.) En pruebas *in vitro*, excepto en casos donde la inhibición ocurre a distancia, es difícil determinar si la inhibición es por explotación (resultado de la competencia por nutrientes o espacio) o por antagonismo (antibiosis o interferencia hifal directa) [Shearer y Zare-Maivan, 1988].

En las plantas colonizadas con HE, se desconoce si el mecanismo de aumento de resistencia a las enfermedades en éstas, es atribuible a los compuestos bioactivos producidos por

los HE, a los compuestos producidos por la planta en respuesta a la colonización por estos hongos, a la competencia entre los hongos conviviendo dentro de la planta, o a algún mecanismo de exclusión física de los HF [Rodríguez *et al.*, 2009].

De acuerdo a los estudios *in vitro* realizados por Arnold y Herre [2003], las respuestas de especies particulares de HE foliares a los extractos de plantas hospederas específicas, indican que los HE son sensibles a la composición química de la hoja. Los HE capaces de vivir dentro de diversas especies de plantas hospederas, posiblemente resisten las condiciones químicas de las hojas de estas plantas, incluso a diferentes edades, puesto que se han adaptado, durante su evolución, a los metabolitos que las hojas producen, mientras que las diferencias químicas en las hojas de otras especies podrían interferir en el crecimiento de los HE.

En vista de que las plantas hospederas son el hábitat natural *in vivo* de los HE [Arnold *et al.*, 2000; Cannon y Simmons, 2002], se ha comprobado que la química de las hojas desempeña un importante papel en la formación de las comunidades endofíticas en los árboles de los bosques tropicales [Arnold *et al.*, 2000; Arnold y Herre, 2003]. Asimismo, se ha sugerido que la aparente plasticidad y diversidad de relaciones interespecíficas entre los HE, pueden contribuir a la defensa efectiva contra los patógenos en plantas leñosas. Si tomamos en cuenta las diversas y cambiantes asociaciones de fitopatógenos en las plantas de bosques tropicales, es posible que la defensa mediada por los HE aumente cuando existe alta diversidad, tanto de HF como de HE dentro de las hojas de las plantas hospederas [Arnold *et al.*, 2003].

Bioensayos de antagonismo

Cuando se realizan bioensayos de antagonismo *in vitro* para investigar las relaciones entre HE y HF, la siembra de ambos hongos es realizada de acuerdo a sus tasas de crecimiento, lo que quiere decir que podrían sembrarse frente a frente en diferentes tiempos, esto se hace con el fin de prevenir la prematura competencia por recursos primarios tales como espacio y nutrientes [Shearer y Zare-Maivan, 1988]. La extrapolación de los datos obtenidos de los bioensayos *in vitro* puede ser útil como una guía para saber qué es lo que sucede en condiciones naturales [Yuen *et al.*, 1999].

Independientemente que deben conocerse las tasas de crecimiento de los hongos, los inóculos de aquellos que se ponen a competir *in vitro*, deben ser del mismo tamaño (5 mm de diámetro) [Shearer y Zare-Maivan, 1988], de otra manera, el resultado final de la interacción

podría estar determinado no sólo por la capacidad de competencia o defensa de los endófitos sino también por la diferencia de tamaño del inoculo [Fukasawa *et al.*, 2009].

Índice de Antagonismo

Cuando se quiere determinar la habilidad de un hongo para competir o inhibir a sus competidores, se calcula su Índice de Antagonismo (IA). Durante los bioensayos para calcular el IA, la asignación de efectos, categorías y valores de las interacciones pueden variar dependiendo de lo que observe el investigador, pero básicamente la asignación está centrada en la inhibición o la resistencia de los hongos al enfrentarse con otros [Shearer y Zare-Maivan, 1988; Yuen *et al.*, 1999]. Si el IA de un hongo es bajo, esto significa que éste es más débil para interferir o inhibir el crecimiento de otras especies [Yuen *et al.*, 1999].

De acuerdo con Shearer y Zare-Maivan [1988], cuando se ponen a competir hongos *in vitro*, en el 96% de los casos, aproximadamente, se presenta una inhibición del crecimiento, ya sea sólo de uno de los hongos o de ambos. La habilidad de los hongos que inhiben marcadamente a otros al enfrentarlos, ya sea mediante la producción de metabolitos secundarios (antibióticos), por parasitismo o competencia por recursos, está correlacionado con la presencia de hongos con menor capacidad inhibitoria [Santamaría y Bayman, 2005].

Los hongos endófitos y fitopatógenos de *Coffea arabica*

Coffea arabica es una especie originaria del suroeste de Etiopía [Rice, 1999; Anthony *et al.*, 2002] que fue introducida a México a finales del siglo XVIII y se cultivó principalmente en las zonas montañosas medias y altas del país [Moguel y Toledo, 1996]. El cultivo, producción, comercialización y exportación del café tienen un papel muy importante para la economía nacional al generar ingresos monetarios anuales significativos, y por ser fuente de empleo, directo e indirecto, de varias decenas de miles de personas. En 2011 México ocupó el décimo lugar en la producción mundial de café [FAO, 2012], con una producción de 237,056 toneladas. Actualmente el café se cultiva en más de 12 estados de la República Mexicana, con la mayor producción en los estados de Oaxaca, Chiapas, Veracruz y Puebla [SAGARPA, 2012].

En México, los cafetales son de diversos tipos de acuerdo al patrón de cultivo (monocultivo o policultivo), la cobertura o ‘sombra del café’ (especies nativas de árboles o introducidas) existente en su área, así como a las cantidades de uso de diversos agroquímicos. Se denomina cafetal rústico o tradicional a aquel cuya cobertura vegetal de sombra es la original de

los árboles del bosque mesófilo de montaña o bien se trata de especies de árboles introducidas, generalmente del género *Inga*, y donde se utilizan escasamente los agroquímicos (Figura 4) [Moguel y Toledo, 2004; Hernández-Martínez *et al.*, 2009].



Figura 4. Cultivo de la planta del café (*Coffea arabica*). A la izquierda se observa un ejemplar con frutos durante la cosecha. A la derecha se muestra el patrón de cultivo de tipo rústico.

Los estudios de los hongos endófitos de *Coffea arabica* son escasos, a pesar de la importancia de las interacciones de estos microorganismos con las plantas de café. Los pocos estudios que se han realizado han sido dirigidos a la evaluación de la diversidad de estos hongos en bosques secundarios [Santamaría y Bayman, 2005] y en cultivos en distintas partes del mundo [Vega *et al.*, 2010], sin darle importancia al efecto del manejo del cafetal en la diversidad de HE y al posible papel de estos microorganismos en la planta hospedera, así como a las interacciones con fitopatógenos dentro de la planta.

Importancia del estudio

Debido a la importancia económica de *Coffea arabica* para México y al daño que los hongos fitopatógenos pueden ocasionar a su cultivo y producción, el presente trabajo está dirigido a investigar el posible papel ecológico de las comunidades de hongos endófitos foliares del cafeto en la incidencia de hongos fitopatógenos asociados a esta planta. Los hongos, endófitos y fitopatógenos, utilizados en este estudio, fueron previamente aislados durante una colecta en hojas de *C. arabica* en un cafetal con manejo rústico o tradicional en el municipio de Huatusco, Veracruz.

HIPÓTESIS

Si los hongos endófitos foliares de un cultivo rústico de *Coffea arabica* afectan la incidencia y/o desarrollo de hongos fitopatógenos en bioensayos de antagonismo *in vitro*, entonces los resultados obtenidos podrían indicar el posible papel ecológico de algunos hongos endófitos dentro de las hojas de *C. arabica* en el ambiente del cafetal.

Objetivo General

Evaluar las distintas relaciones que se establecen entre los hongos endófitos y fitopatógenos foliares de *Coffea arabica*, mediante bioensayos de antagonismo *in vitro*, utilizando distintos medios de cultivo con el fin de determinar el posible papel ecológico de los hongos endófitos estudiados durante los enfrentamientos que se producen entre ellos y los hongos fitopatógenos a las hojas del cafeto, en condiciones naturales.

Objetivos Particulares

- Identificar hasta género, las cepas de los hongos fitopatógenos seleccionados, con base en las características de su esporulación, utilizando claves taxonómicas. Las cepas de hongos fitopatógenos que no esporulen serán asignadas a morfotipos con base en sus características macroscópicas y tasas de crecimiento.
- Evaluar *in vivo* la patogenicidad de los hongos fitopatógenos mediante su inoculación en hojas desprendidas de *Coffea arabica* con objeto de seleccionar los morfotipos que ocasionen la mayor cantidad de síntomas evidentes de enfermedad.
- Seleccionar las especies de hongos endófitos foliares, ya identificadas morfológicamente, que fueron aisladas con mayor frecuencia de las hojas de los cafetos, con el fin de enfrentarlas a los hongos fitopatógenos, en los bioensayos de antagonismo.
- Realizar los bioensayos de antagonismo *in vitro* entre los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos seleccionados, a fin de evaluar la capacidad antagónica que unos y otros muestren en estos bioensayos.
- Determinar, a través de los bioensayos de antagonismo, el posible papel ecológico que desempeñan los hongos endófitos estudiados, durante su enfrentamiento, en condiciones naturales, con los hongos fitopatógenos a las hojas del cafeto.

MATERIALES y MÉTODOS

1) Identificación de los hongos fitopatógenos de *Coffea arabica*

Se seleccionaron catorce aislamientos de HF del cepario del Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM. Estos hongos fueron aislados previamente de lesiones foliares presentes en hojas de *Coffea arabica* de un cafetal rústico de Huatusco, Veracruz.

Estos catorce HF fueron sembrados bajo condiciones estériles, dentro de una campana de flujo laminar, en cajas de Petri con diferentes medios de cultivo estériles, con el fin de seleccionar aquel donde mejor crecían los HF:

- Papa-Dextrosa-Agar (PDA = papa 200 g., dextrosa 20 g., agar 15 g., 1 L agua destilada),
- Avena-Agar (AA = avena 20 g., agar 30 g., 1 L agua destilada),
- Medio V8 (Jugo V8 180 mL, CaCO₃ 2 g., agar 15 g., 1 L agua destilada),
- Agua-Agar (agar 20 g., 1 L agua destilada) y
- Agar Extracto de Malta (Merck) (Malta 30 g., agar 15 g., 1 L agua destilada).

Las cajas sembradas fueron selladas con parafilm y colocadas en una incubadora a 25 °C en la oscuridad, ya que la mayoría de las especies probadas en los estudios de crecimiento muestran la mayor tasa de crecimiento en estas condiciones [Shearer y Zare-Maivan, 1988]. Algunos hongos se expusieron a la luz cercana a UV con objeto de promover su esporulación [Vinnere, 2004].

El crecimiento del micelio de cada hongo fue evaluado a los 5 y 10 días, marcando, en cada ocasión, los diámetros observados en la parte posterior de la caja de Petri con un marcador indeleble. Se observaron a detalle los micelios tomando en cuenta todas sus características macroscópicas (textura, color, velocidad de crecimiento, producción de exudado o pigmentos) y, posteriormente, se clasificaron utilizando claves taxonómicas [Sutton, 1980; Barnett y Hunter, 1998]. Los hongos que no esporularon se clasificaron como *Mycelia Sterilia*. Para los fitopatógenos que esporularon se observaron, además, las características microscópicas (esporomas y medida de esporas) utilizando un microscopio Zeiss Axioskop 40 y el programa AxioVision Rel 4.6 con el fin de identificarlos hasta nivel de género.

2) Evaluación de la bioactividad de los hongos fitopatógenos y selección de los más virulentos para los bioensayos de antagonismo *in vitro*

Para evaluar la fitopatogenicidad de los HF, se realizaron bioensayos *in vivo*, en hojas de cafeto separadas de la planta, inoculándolas con cada uno de los catorce HF. Estos bioensayos se prepararon en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar. Los tipos de inóculos utilizados se prepararon de acuerdo a la producción de esporas o ausencia de éstas en los HF. Los inóculos que se prepararon de cada uno de los HF, se suspendieron en agua destilada estéril y fueron los siguientes:

- Para los HF que no produjeron esporas, se prepararon fragmentos del micelio superficial molidos en un mortero y diluidos a una concentración de 50 mg/mL (HF del 1 al 12).
- Para los HF que produjeron esporas, éstas se diluyeron a una concentración de 6.3×10^6 esporas/mL (HF 13 y 14).

Las hojas de *Coffea arabica* que se inocularon, se cortaron de plantas creciendo en condiciones asépticas en el invernadero del Instituto de Ecología de la UNAM, dentro de jaulas cubiertas con tela anti-áfidos. Estas plantas se obtuvieron a partir de semillas esterilizadas superficialmente para destruir esporas o cualquier microorganismo externo. Las hojas que se cortaron se escogieron de la zona media de la planta para que fueran de tamaños y edades similares. Estas hojas se colocaron en cámaras húmedas hechas con cajas de Petri, en condiciones estériles, dentro de una campana de flujo laminar, 24 horas antes de la inoculación de los HF. Ambos tipos de inóculo, se aplicaron separadamente en hojas individuales. Los inóculos preparados con fragmentos de micelio, se aplicaron sobre el envés de las hojas, utilizando un pincel. Los inóculos preparados con esporas, se aplicaron esparciéndolos sobre la superficie del envés, mediante una jeringa de insulina. Además, la aplicación de ambos inóculos se realizó bajo tres tratamientos, realizándose dos repeticiones de cada uno de ellos:

1. A la mitad de las hojas se le hicieron rasguños y perforaciones en el envés, con delgadas agujas de insulina estériles (hojas heridas).
2. La otra mitad de las hojas se dejó intacta, no se le hicieron rasguños o perforaciones (hojas intactas).

3. Dos tipos de control: hojas a las que se les aplicó agua destilada estéril en el envés, y hojas sin aplicarles nada.

Las cámaras húmedas se sellaron con parafilm y se incubaron a 25 °C en la oscuridad. La sintomatología de las hojas fue revisada cada tercer día durante un mes. Los HF que ocasionaron los mayores síntomas de enfermedad en las hojas de café fueron seleccionados para enfrentarlos con los HE en los bioensayos de antagonismo *in vitro*. Pequeños segmentos de las áreas con síntomas de enfermedad de las hojas infectadas, fueron resembrados en PDA para asegurarse que los hongos que causaban los síntomas, eran los mismos que fueron aplicados sobre las hojas (Figura 5).



Figura 5. Método de sembrado de los segmentos enfermos de las hojas inoculadas con hongos fitopatógenos.

3) Selección de los hongos endófitos utilizados para los bioensayos de antagonismo *in vitro*

Se seleccionaron 11 aislamientos de HE del cepario del Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM. Estos hongos fueron previamente aislados de hojas sanas de *Coffea arabica* de un cafetal rústico de Huatusco, Veracruz e identificados hasta nivel de género de acuerdo a sus características morfológicas macroscópicas (textura, color, producción de exudado o pigmentos), así como a sus características microscópicas (esporomas y medida de esporas). Los criterios para seleccionar a estos HE para los bioensayos de antagonismo *in vitro* fueron los siguientes:

- Hongos endófitos que se aislaron con mayor frecuencia de las hojas sanas de *C. arabica*.
- Hongos endófitos que se aislaron con menor frecuencia de las hojas sanas de *C. arabica*.

Estos once HE fueron sembrados bajo condiciones estériles, dentro de una campana de flujo laminar, en cajas de Petri con PDA, con el fin de verificar que fueran viables. Las cajas fueron selladas con parafilm y colocadas en una incubadora a 25 °C en la oscuridad.

Los hongos endófitos que presentaron los criterios señalados se muestran en la Figura 6.

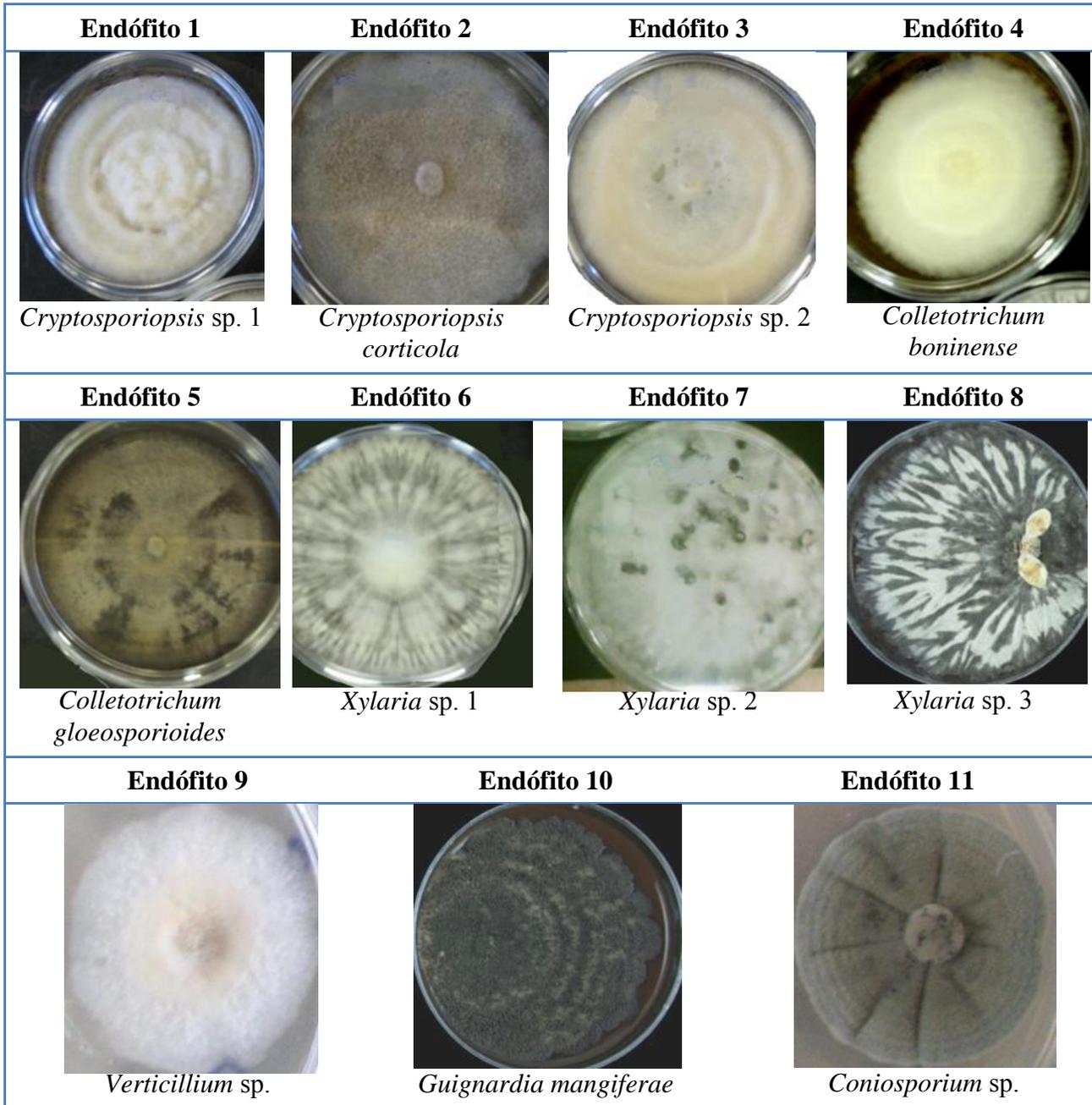


Figura 6. Hongos endófitos seleccionados para los bioensayos de antagonismo.

4) Evaluación de las tasas de crecimiento de los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos seleccionados

Con el fin de medir sus velocidades de crecimiento y, de acuerdo a las tasas de crecimiento respectivas, conocer las fechas adecuadas de siembra de los HE y los HF en los bioensayos de antagonismo *in vitro*, ambos tipos de hongos seleccionados fueron sembrados, por separado y bajo condiciones estériles, en cajas de Petri con los siguientes medios de cultivo estéril:

- ❖ PDA (Papa-Dextrosa-Agar).
- ❖ PDA adicionado con extracto acuoso de hojas de café al 20% (papa 200 g., hojas de café 200 g., dextrosa 20 g., agar 15 g., 1 L agua destilada). Este medio tenía la finalidad de simular, en lo posible, las condiciones naturales dentro de su hospedera.

El crecimiento del micelio de los hongos se midió diariamente durante diez días, marcando cada día, con un marcador indeleble, los diámetros observados en la parte posterior de la caja de Petri. Se observó el número de días en que cada hongo alcanzó un área de 10 cm² (velocidad de crecimiento) y se promedió la diferencia de cada medición con respecto a la anterior para obtener la tasa de crecimiento. Para compensar la diferencia en las velocidades se colocaron primero los hongos de crecimiento lento y posteriormente los de crecimiento rápido.

5) Bioensayos de antagonismo *in vitro* entre hongos endófitos y hongos fitopatógenos

Una vez que se determinaron los tiempos de siembra para todas las cepas de los hongos seleccionados, se realizaron dos bioensayos de antagonismo *in vitro* entre los HE y HF, efectuando tres repeticiones por cada par de hongos enfrentados:

Hongo fitopatógeno	vs.	Hongo endófito	Repeticion
X	vs.	Y	X vs. Y a
			X vs. Y b
			X vs. Y c

En el primer bioensayo, se utilizó como medio de cultivo PDA solo, conforme a la velocidad de crecimiento de cada hongo, se sembraron los inóculos de micelio de un HE y un HF en una caja de Petri de 9 cm de diámetro en condiciones estériles, colocando los inóculos

en los extremos opuestos de la caja, con una separación de 4 cm entre ellos, y alejados 2.5 cm del borde de la misma. Las cajas sembradas fueron selladas con parfilm y se colocaron en una incubadora a 25 °C en la oscuridad. La interacción de los hongos en estos bioensayos, se evaluó separadamente para cada hongo (cepa), cada 5 días durante un mes, a partir de la fecha en que cada hongo se sembró, marcando en la parte posterior de la caja de Petri, como se mencionó, los crecimientos de los diámetros de los micelios con un marcador indeleble.

En el segundo bioensayo, se utilizó PDA mezclado con extracto de hojas de café al 20% como medio de cultivo, siguiéndose el mismo procedimiento mencionado (Figura 7).

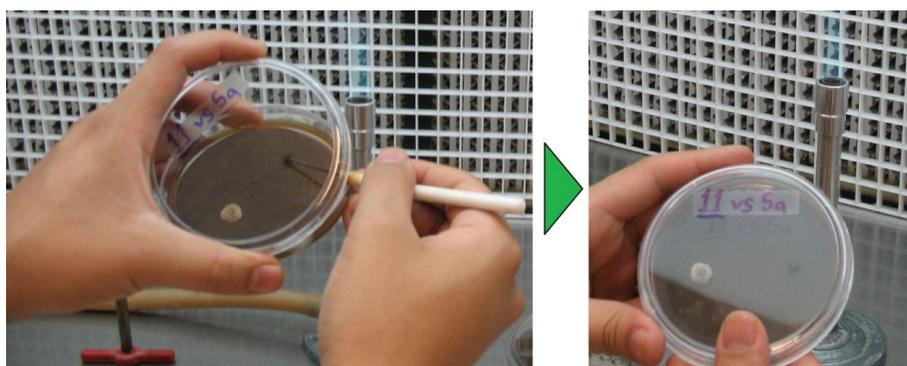


Figura 7. Siembra de un par de hongos para el bioensayo de antagonismo *in vitro*. En esta imagen, el fitopatógeno (inóculo a la izquierda) se colocó dos días antes que el endófito (inóculo a la derecha) debido a que crecía más lento.

Los resultados obtenidos en el primer bioensayo (PDA solo), determinaron qué hongos tenían baja o alta capacidad antagónica y se seleccionaron sólo los más antagónicos para el segundo bioensayo.

6) Valoración del Índice de Antagonismo (IA) y pruebas estadísticas

Los efectos de las interacciones entre HE y HF se evaluaron cualitativamente con el IA. Para cada hongo se asignó un valor numérico de acuerdo al tipo de interacción con los otros hongos (HE o HF) y al puntaje que se muestra en la Tabla 1, donde se pueden observar los efectos entre cada par de hongos cuando se enfrentaron uno contra otro y las categorías que se les asignaron con base en dichos efectos: **inhibido**, **bloqueo mutuo** o **inhibidor**.

Tabla 1. Índice de Antagonismo (IA) en la interacción de cada par de hongos. En cada imagen el hongo fitopatógeno (especie 1) está a la izquierda y el hongo endófito (especie 2) está a la derecha.

EFECTOS OBSERVADOS		Valor
	A. El crecimiento de la especie 1 se detiene debido a que la especie 2 crece encima de ella.	-2
	B. El crecimiento de la especie 1 es detenido por la especie 2. Se asignó este valor si la especie 2 creció alrededor de la especie 1 (en la imagen), o si la especie 2 inhibió a distancia a la especie 1, o si la especie 2 formó un halo de inhibición sobre la especie 1.	-1
	C. Ambas especies, 1 y 2, detienen su crecimiento al entrar en contacto mutuo. Luego, ambas especies continúan creciendo hacia los lados o hacia atrás, pero ninguna inhibe a la otra y continúan igual hasta que ya no tienen más espacio para seguir creciendo. Las dos imágenes de la izquierda representan la misma interacción, cuando inicia (arriba) y cuando termina (abajo).	0
		
	D. La especie 1 detiene el crecimiento de la especie 2 (especie 1 crece alrededor de especie 2; especie 1 inhibe a distancia a especie 2; especie 1 forma un halo de inhibición sobre especie 2).	1
	E. La especie 1 crece sobre la especie 2, deteniendo drásticamente su crecimiento.	2

Cálculo del Índice de Antagonismo (IA)

$$IA = [nA (-2)] + [nB (-1)] + [nC (0)] + [nD (1)] + [nE (2)]$$

La fórmula es la suma de los efectos que cada hongo (endófito o fitopatógeno) mostró en los bioensayos de antagonismo al enfrentarse con todos los antagonistas correspondientes (fitopatógeno o endófito). Cada letra representa un valor asignado según el efecto observado, *n* es el número de veces que ocurre dicho efecto. Si uno de los efectos no se presenta, el valor de *n* será 0. El resultado final del IA indica qué categoría se le asigna a la especie 1: si el valor es negativo adquiere categoría de **inhibido**, si el valor es positivo adquiere categoría de **inhibidor** y si el resultado es 0, tanto la especie 1 como la 2 presentan **bloqueo mutuo**.

El número de veces (n) que un hongo obtuvo cada categoría se convirtió en porcentajes:

$$\% IA = \left(\frac{n \text{ (Inhibido)}}{\text{Total de enfrentamientos}} + \frac{n \text{ (Bloqueo mutuo)}}{\text{Total de enfrentamientos}} + \frac{n \text{ (Inhibidor)}}{\text{Total de enfrentamientos}} \right) \times 100$$

Para la evaluación cuantitativa, los diámetros de los micelios de los hongos se midieron con el programa ImageJ 1.46r y a estas mediciones se les aplicó un ANOVA factorial y pruebas de Tukey, utilizando el programa STATISTICA StatSoft 2006 Versión 7.

RESULTADOS

Identificación de los hongos fitopatógenos de *Coffea arabica*

Los catorce aislamientos de HF fueron sembrados en diferentes medios de cultivo estéril: PDA, Avena-Agar, Medio V8, Agua-Agar y Malta-Agar, bajo las condiciones indicadas en la metodología. De los catorce aislamientos de HF sembrados, sólo cuatro esporularon; los HF restantes, fueron clasificados como Mycelia Sterilia debido a que no esporularon, confirmando que bajo condiciones de laboratorio no todos los aislamientos de hongos logran esporular, según lo observado por Vinnere [2004]. Los morfotipos de los aislamientos de HF sembrados y sus caracterizaciones se muestran en la Tabla 2 (los detalles se encuentran en el Anexo I).

Tabla 2. Claves de morfotipos y clasificación de los hongos fitopatógenos

Morfotipo (cepa)	Aislamiento*	Clasificación
1	HBM	Mycelia Sterilia
2	HTC/HBM	Mycelia Sterilia
3	HTC	Mycelia Sterilia
4	HBC	Mycelia Sterilia
5	HBC	Mycelia Sterilia
6	HBM	Mycelia Sterilia
7	HBC	Mycelia Sterilia
8	HBM	<i>Colletotrichum</i> sp. 1
9	HTC	Mycelia Sterilia
10	HBM	Mycelia Sterilia
11	HBC	Mycelia Sterilia
12	HTC	<i>Colletotrichum</i> sp. 2
13	HBC	<i>Colletotrichum</i> sp. 3
14	HBM	<i>Pestalotiopsis</i> sp.

* Claves de la colección del cepario del Laboratorio de Alelopatía, tipo de hoja de café de la que se aislaron las cepas de hongos fitopatógenos:

HBM: Hoja variedad Bourbon con síntoma de Mycena.

HTC: Hoja variedad Típica con síntoma de Cercospora.

HBC: Hoja variedad Bourbon con síntoma de Cercospora.

Las cepas 8, 12, 13 y 14 se identificaron hasta género utilizando las características morfológicas de su micelio y de sus esporas. Los géneros identificados fueron: *Colletotrichum* sp. (HF 8, HF 12 y HF 13); y *Pestalotiopsis* sp. (HF 14). Los detalles se muestran en la Figura 8.

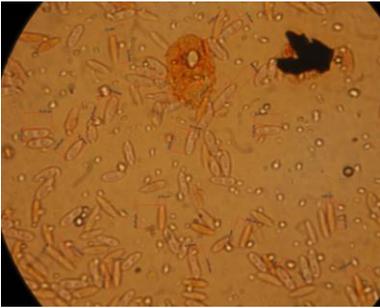
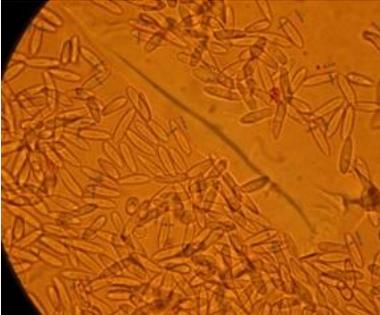
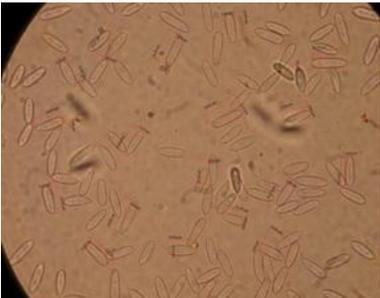
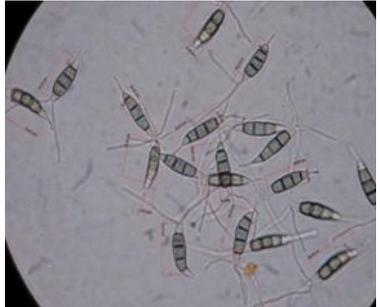
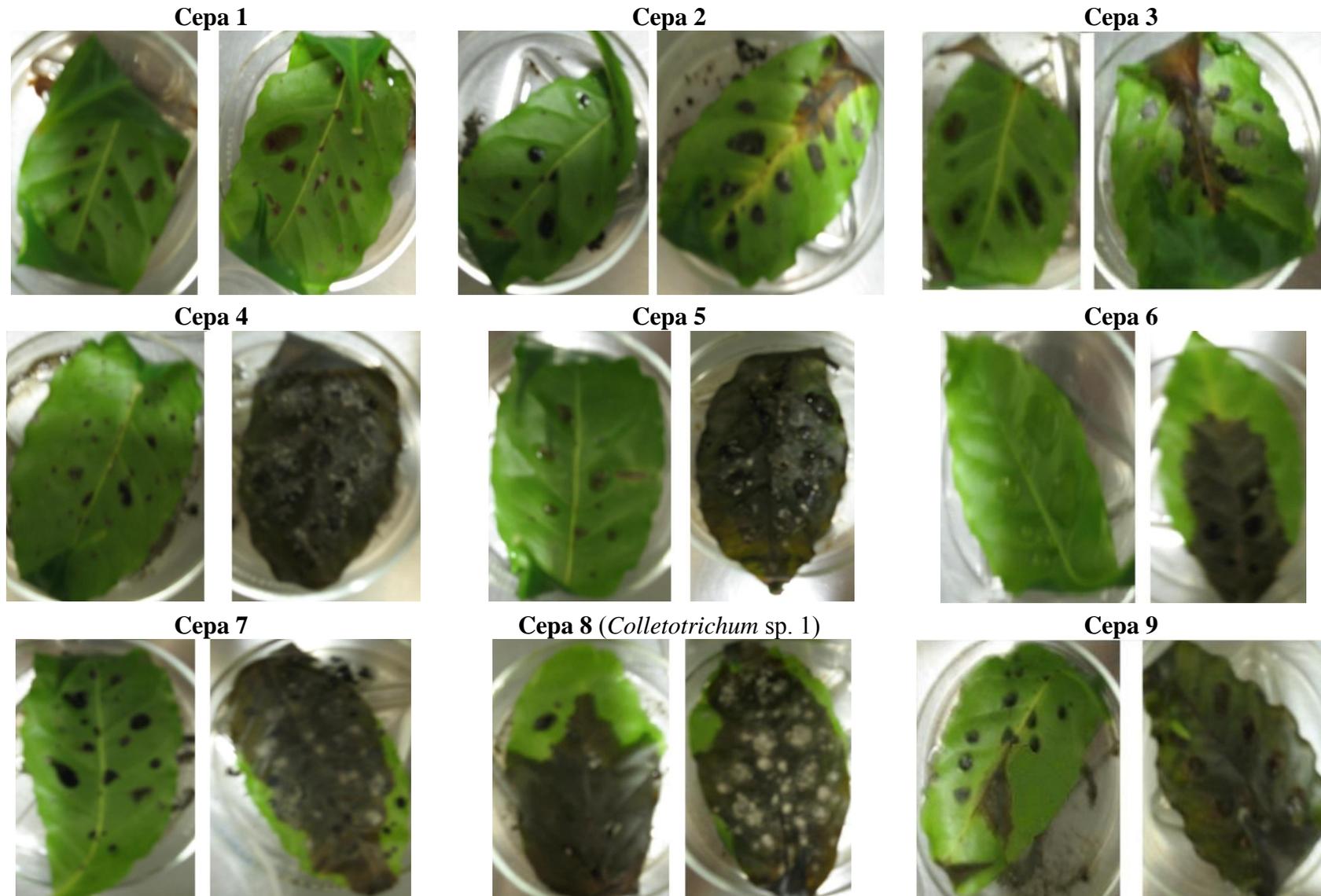
GÉNERO	ESPORAS	MEDIDA DE ESPORAS
 <p data-bbox="285 751 545 785"><i>Colletotrichum</i> sp. 1</p>		<p data-bbox="1027 495 1338 529">Largo: 9.07 – 17.02 μm.</p> <p data-bbox="1027 541 1240 575">Media 12.02 μm</p> <p data-bbox="1027 636 1338 669">Ancho: 2.51 – 5.38 μm.</p> <p data-bbox="1027 682 1224 716">Media 3.87 μm</p>
 <p data-bbox="285 1104 545 1138"><i>Colletotrichum</i> sp. 2</p>		<p data-bbox="1027 842 1354 875">Largo: 11.18 – 17.84 μm.</p> <p data-bbox="1027 888 1248 921">Media: 14.67 μm</p> <p data-bbox="1027 982 1338 1016">Ancho: 2.86 – 5.43 μm.</p> <p data-bbox="1027 1029 1230 1062">Media 3.92 μm.</p>
 <p data-bbox="285 1444 545 1478"><i>Colletotrichum</i> sp. 3</p>		<p data-bbox="1027 1199 1338 1232">Largo: 9.85 – 17.18 μm.</p> <p data-bbox="1027 1245 1263 1278">Media: 13.51 μm.</p> <p data-bbox="1027 1339 1338 1373">Ancho: 2.93 – 5.14 μm.</p> <p data-bbox="1027 1386 1230 1419">Media: 4.03 μm</p>
 <p data-bbox="302 1793 529 1827"><i>Pestalotiopsis</i> sp.</p>		<p data-bbox="1027 1539 1354 1572">Largo: 11.34 – 28.34 μm.</p> <p data-bbox="1027 1585 1256 1619">Media: 19.84 μm.</p> <p data-bbox="1027 1680 1338 1713">Ancho: 4.67 – 8.03 μm.</p> <p data-bbox="1027 1726 1240 1759">Media: 6.35 μm.</p>

Figura 8. Hongos fitopatógenos que esporularon, género asignado y medida de sus esporas

Evaluación de la bioactividad de los hongos fitopatógenos y selección de los más virulentos para los bioensayos de antagonismo *in vitro*

Un mes después de la inoculación de los catorce HF en las hojas de *Coffea arabica*, se seleccionaron los más antagónicos con base en los síntomas que causaron a las hojas: necrosis, decoloración, crecimiento del micelio (extendido o en colonias). En la Figura 9 se muestran los síntomas que los aislamientos (cepas) de HF provocaron en las hojas de café (con y sin heridas), después de un mes de su inoculación.



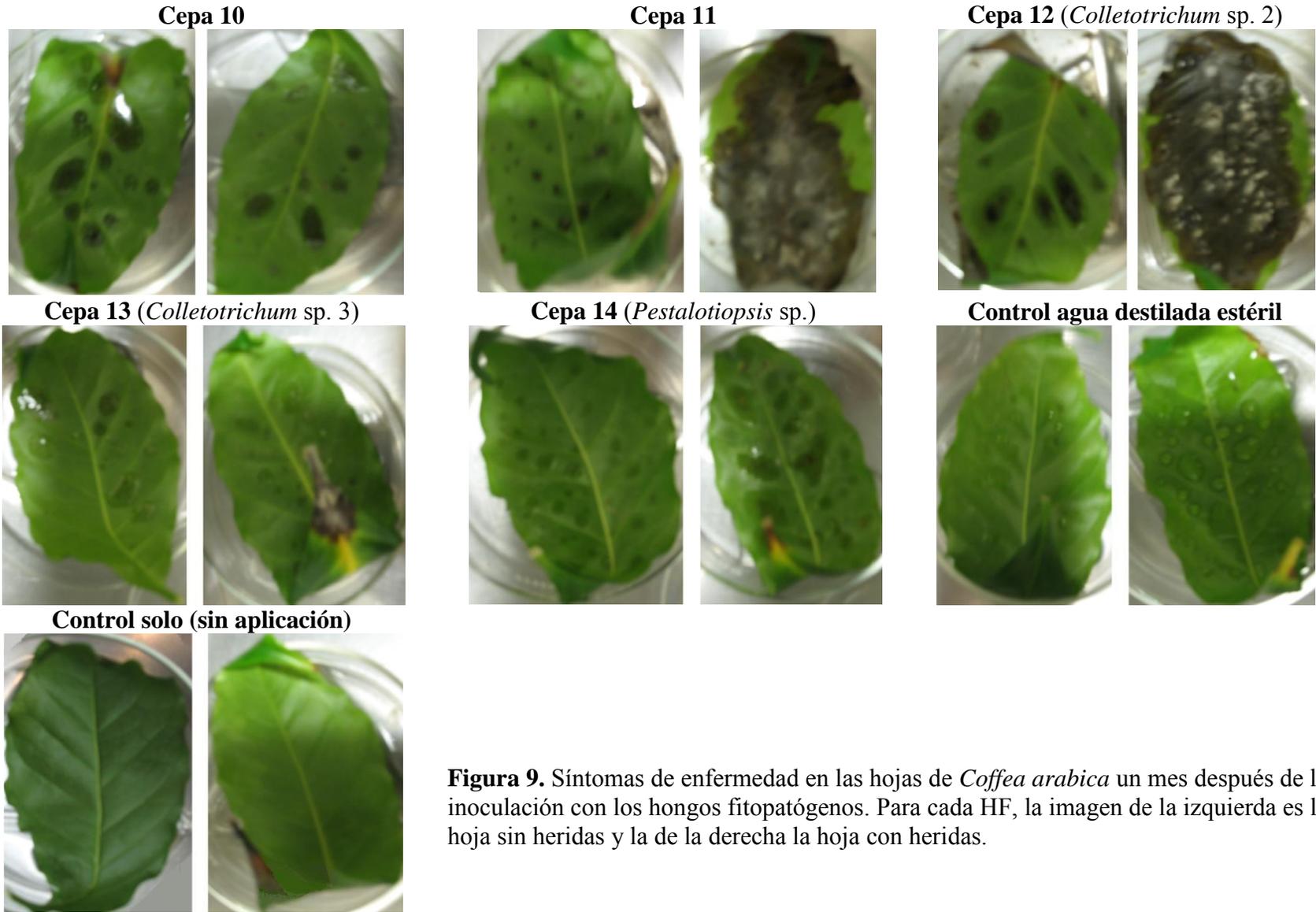


Figura 9. Síntomas de enfermedad en las hojas de *Coffea arabica* un mes después de la inoculación con los hongos fitopatógenos. Para cada HF, la imagen de la izquierda es la hoja sin heridas y la de la derecha la hoja con heridas.

Las imágenes mostradas en la Figura 9 indican que los HF entraron más fácilmente a las hojas a través de las heridas hechas en ellas, lo que coincide con las observaciones hechas por Oliveira *et al.* [2004] y Lemons *et al.* [2005].

Los resultados de los síntomas presentados en las hojas heridas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Síntomas en las hojas heridas de *Coffea arabica* un mes después de la inoculación de los catorce hongos fitopatógenos; (----) sin síntomas, (X) con síntomas.

Cepa fitopatógeno	Necrosis extendida	Necrosis en peciolo y ápice	Decoloración hoja (clorosis)	Micelio extendido	Colonias de micelio
1	----	----	----	----	X
2	----	X	----	X	----
3	----	----	X	X	----
4	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X
8	X	X	X	X	X
9	X	X	X	X	X
10	----	X	----	X	X
11	X	X	X	X	X
12	X	X	X	X	X
13	----	X	X	----	----
14	X	----	X	----	----
Control agua	----	----	----	----	----
Control solo	----	----	----	----	----

Control agua: Agua destilada estéril

Control solo: Sin ninguna aplicación

La razón por la cual en la Tabla 3 se muestran sólo los síntomas de enfermedad en las hojas heridas, se debe a que este tratamiento fue el que mostró resultados más claros en cuanto a los síntomas mencionados. Por su parte el tratamiento de inoculación de los HF en las hojas sin heridas dio pobres resultados de daño o enfermedad, muy pocas hojas presentaron un mínimo crecimiento de micelio de los hongos inoculados.

De las catorce cepas de HF utilizados inicialmente, solo ocho de ellos provocaron todos los síntomas a las hojas heridas, por ello, estos ocho HF fueron los que se seleccionaron para los bioensayos de antagonismo *in vitro* para enfrentar a los HE.

Los HF seleccionados fueron resembrados en cajas de Petri con dos medios de cultivo estériles (PDA solo y PDA con extracto de hojas de café al 20%) con el fin de obtener suficiente inóculo de cada hongo para los bioensayos de antagonismo enfrentando a los HE *in vitro*. En la Figura 10 se muestran los ocho HF seleccionados.

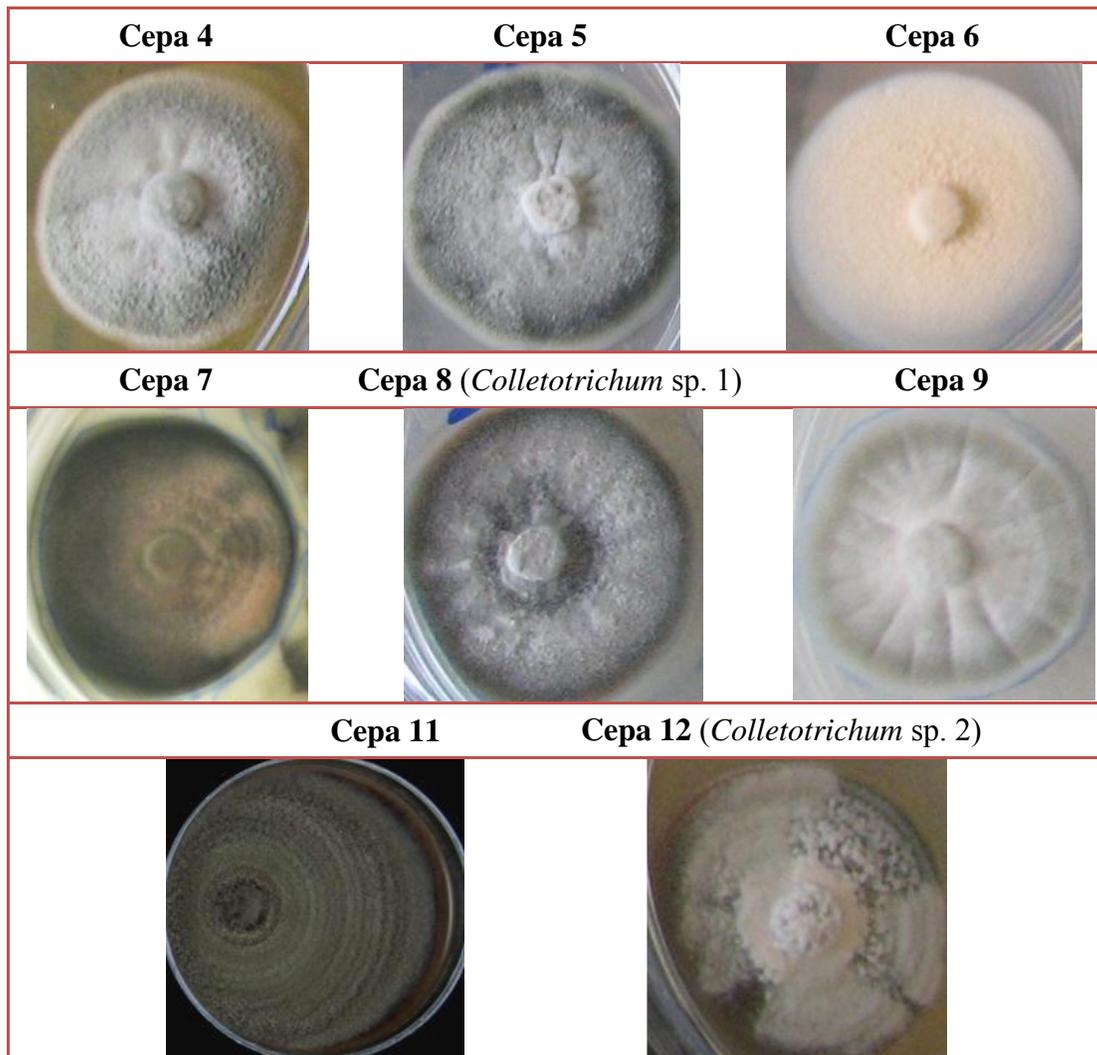


Figura 10. Hongos fitopatógenos seleccionados para los bioensayos de antagonismo *in vitro*.

Selección de hongos endófitos utilizados para los bioensayos de antagonismo *in vitro*

Las once cepas de HE seleccionados se sembraron en cajas de Petri con los dos medios de cultivo estériles (PDA y PDA con extracto de hojas de café al 20%) para obtener los inóculos de cada uno de ellos para los bioensayos de antagonismo *in vitro* contra los HF. Los HE seleccionados se enlistan en la Tabla 4

Tabla 4. Hongos endófitos seleccionados para los bioensayos de antagonismo.

Cepa endófito	Identificación
1	<i>Cryptosporiopsis</i> sp. 1
2	<i>Cryptosporiopsis corticola</i>
3	<i>Cryptosporiopsis</i> sp. 2
4	<i>Colletotrichum boninense</i>
5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
6	<i>Xylaria</i> sp. 1
7	<i>Xylaria</i> sp. 2
8	<i>Xylaria</i> sp. 3
9	<i>Verticillium</i> sp.
10	<i>Guignardia mangiferae</i>
11	<i>Coniosporium</i> sp.

Como se mencionó, los HE del 1 al 7 se seleccionaron por ser los más frecuentemente aislados de las hojas del cafeto. Los HE del 8 al 11 fueron seleccionados por haber sido aislados con menor frecuencia.

Evaluación de las tasas de crecimiento de los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos seleccionados

Los HE y HF fueron sembrados en los dos medios de cultivo estériles (PDA solo y PDA con extracto de hoja de café al 20%), con el fin de observar sus velocidades de crecimiento, y así determinar las fechas de inoculación para cada hongo. La siembra de todos estos hongos permitió que se tuviera el inóculo necesario para los bioensayos de antagonismo *in vitro*.

En las siguientes páginas se muestran las velocidades de crecimiento de todos los hongos en cada uno de los medios de cultivo utilizados durante un periodo de diez días y la tasa de crecimiento que cada uno mostró por día.

En la Figura 11 se muestran las velocidades de crecimiento durante 10 días, de los HE y los HF en PDA solo como medio de cultivo.

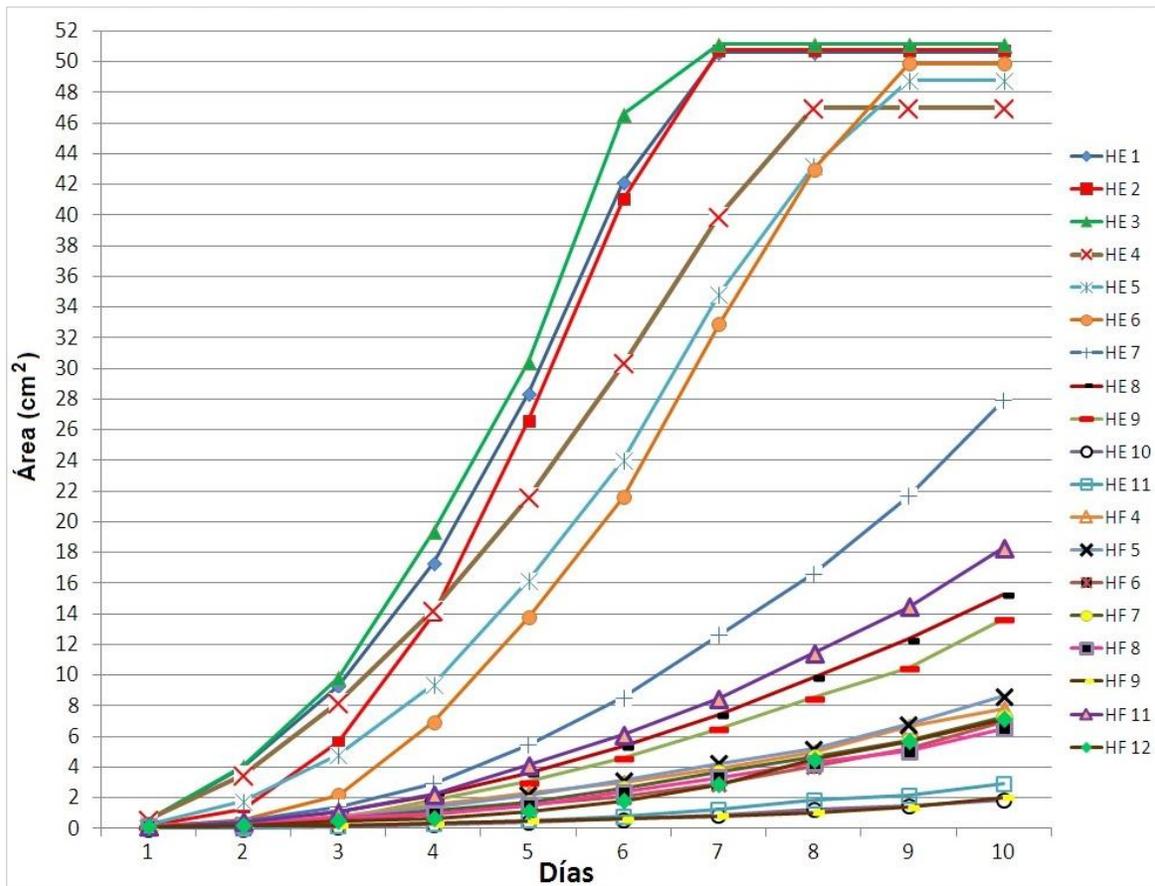


Figura 11. Velocidad de crecimiento durante diez días, de los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos creciendo en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar.

Al crecer en PDA, los HE del 1 al 6 mostraron, mayores velocidades de crecimiento, comparados con los demás hongos, les siguen en velocidad el HE 7, un grupo de tres hongos formado por, HF 11, HE 8 y HE 9, un grupo de cinco HF, del 4 al 8, y finalmente al grupo de los más lentos, HF 9, HE 10 y HE 11. En la Figura 10 se observa que los HE del 1 al 6 fueron capaces de superar el área de 10 cm en menos de seis días, mientras que la mayoría de los demás hongos tardaron más de siete días en alcanzar esa medida.

En la Figura 12 se muestran las velocidades de crecimiento de los HE y los HF en medio de cultivo PDA adicionado con 20% de extracto acuoso de hojas de café durante diez días.

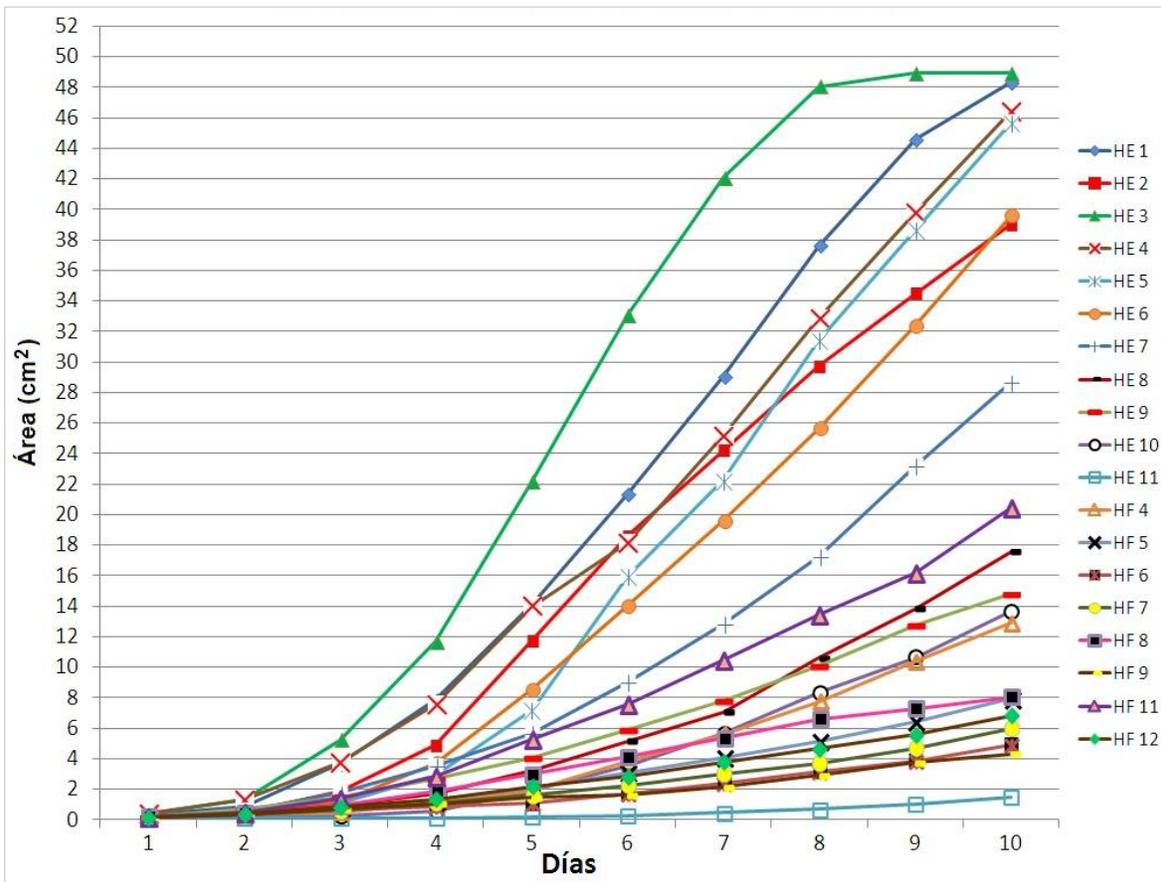


Figura 12. Velocidad de crecimiento de los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos durante 10 días en medio de cultivo PDA adicionado con extracto acuoso de hojas de café 20%.

En medio de cultivo PDA adicionado con 20% de extracto acuoso de hojas de café, la mayoría de los hongos presentaron alguna variación en su velocidad de crecimiento. Varios de los HE tardaron al menos un día más en alcanzar el mismo crecimiento que en PDA solo, con excepción del HE 10 que creció mucho más rápido. Las velocidades de crecimiento de la mayoría de los HF fueron parecidas a las obtenidas en PDA solo, el grupo de los hongos que crecieron más rápido estuvo formado por los HE 1 a 6, el HE 7 creció prácticamente igual, le siguió un grupo de cinco hongos, el HF 11, los HE 8, 9 y 10, y el HF 4, un grupo de seis HF el 8, 5, 12, 7, 6 y 9; y finalmente el hongo más lento fue el HE 11.

La diferencia en el crecimiento de micelio por día determinó la tasa de crecimiento de un hongo en cada medio de cultivo.

En la Figura 13 se presentan las tasas de crecimiento de los HE y los HF que crecieron en medio de cultivo PDA solo. Para diferenciar los HF de los HE, de aquí en adelante, el número correspondiente de cada HF estará marcado entre paréntesis.

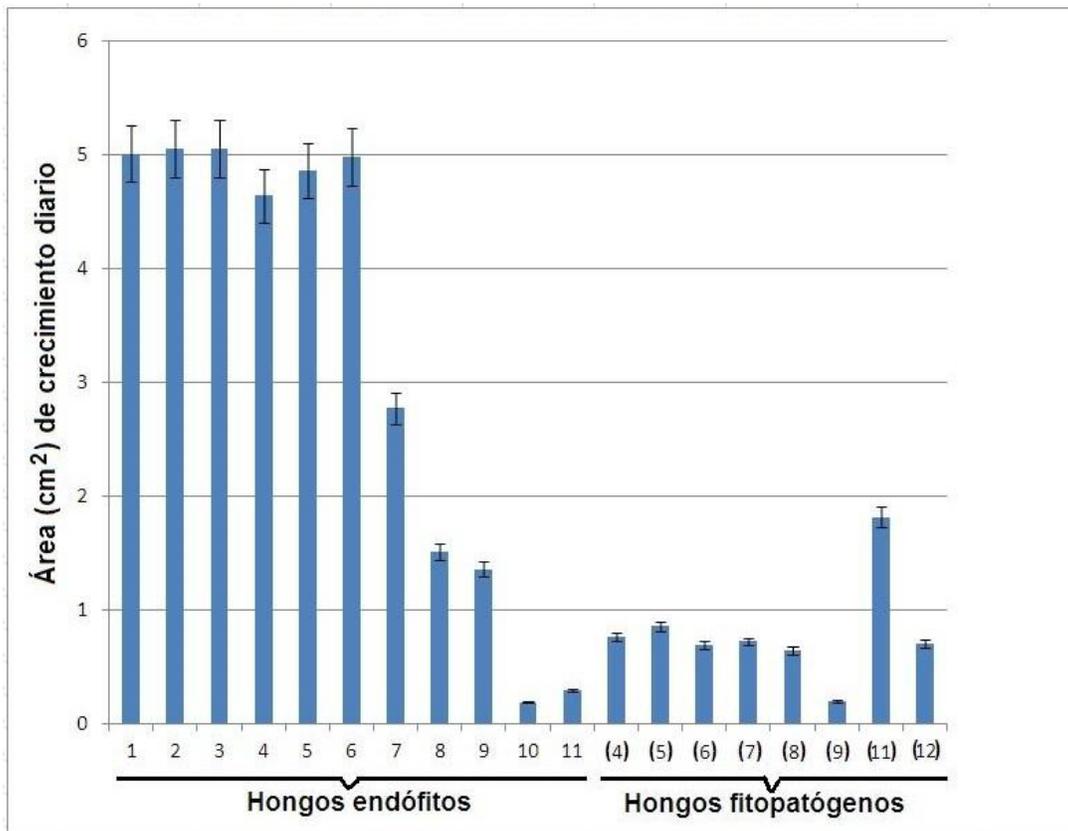


Figura 13. Tasas de crecimiento diario de los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos en medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar).

En medio de cultivo PDA los HE del 1 al 6 presentaron tasas de crecimiento por día de aproximadamente 5 cm^2 ; el HE 7 tuvo una tasa de casi 3 cm^2 diarios, y los HE 8 y 9 presentaron crecimientos entre $1\text{-}1.5 \text{ cm}^2$ por día. En cuanto a los HF, al igual que los HE 10 y 11, las tasas de crecimiento fueron menores a 1 cm^2 de crecimiento por día, con excepción del HF 11 el cual alcanzaba un crecimiento diario cercano a los 2 cm^2 .

En la Figura 14 se presentan las tasas de crecimiento de los HE y los HF que crecieron en PDA con extracto acuoso de hojas de café al 20%.

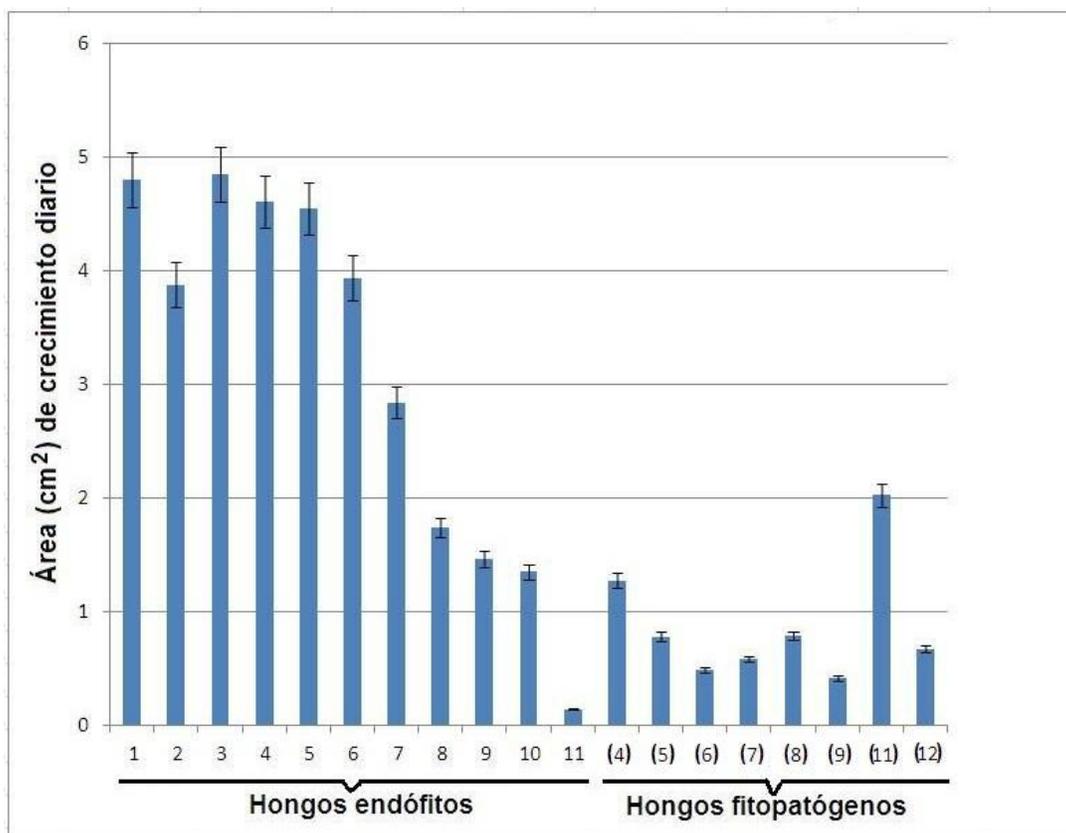


Figura 14. Tasas de crecimiento diario de los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos en medio de cultivo PDA adicionado con extracto acuoso de hojas de café al 20%.

Al crecer en PDA con extracto acuoso de hojas de café al 20% como medio de cultivo, tanto los HE como los HF mostraron diferencias de crecimiento en comparación con los que crecieron en PDA solo. Las tasas de crecimiento de la mayoría de los HE se redujeron ligeramente en PDA con extracto de hojas de café al 20%, mientras que las tasas de crecimiento de la mayoría de los HF no se redujeron, de hecho los HF 4, 9 y 11 aumentaron sus tasas de crecimiento, así como el HE 10 que aumentó su crecimiento casi al triple. Esto demuestra entonces que los HF y particularmente los HE son sensibles, positiva y negativamente, a la composición química de la hoja [Arnold *et al.*, 2000; Arnold y Herre, 2003].

Una vez conocidas las tasas de crecimiento de los HF y los HE se establecieron las fechas de siembra de cada uno y se iniciaron los bioensayos de antagonismo.

Bioensayos de antagonismo *in vitro* entre hongos endófitos y hongos fitopatógenos

Para los bioensayos de antagonismo, los HE frente a los HF se sembraron en cajas de Petri en las fechas determinadas por las velocidades de crecimiento de cada uno. La Figura 15 es un ejemplo de la forma en que se pusieron a crecer ambos tipos de hongos en el bioensayo de antagonismo en PDA como medio de cultivo.



Figura 15. Bioensayo de antagonismo *in vitro* de hongos fitopatógenos y endófitos en Papa-Dextrosa-Agar como medio de cultivo. En cada caja de Petri el hongo fitopatógeno está a la izquierda y el endófito a la derecha.

Cada bioensayo de antagonismo *in vitro* (PDA solo y PDA con extracto de hojas de café al 20%) tuvo una duración aproximada de 30 días, dependiendo de las velocidades de crecimiento de los hongos en cada medio de cultivo. El diámetro de cada hongo se marcó en la parte posterior de la caja de Petri con un marcador indeleble cada 5 días a partir de la fecha de siembra de cada hongo (Figura 16). Estos diámetros se utilizaron para las pruebas estadísticas.

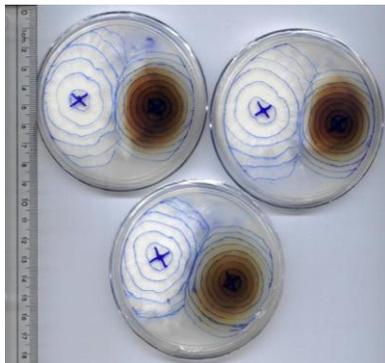


Figura 16. Medición del crecimiento de las tres repeticiones de un par de hongos durante el bioensayo de antagonismo *in vitro*. El hongo endófito se encuentra a la izquierda de cada caja.

Valoración del Índice de Antagonismo (IA)

Un mes después de establecido cada bioensayo de antagonismo *in vitro*, las interacciones entre HF y HE se evaluaron utilizando el Índice de Antagonismo. Las categorías antagonicas asignadas para todos los hongos fueron: **inhibido**, **bloqueo mutuo**, o **inhibidor**, y se asignaron de acuerdo al desempeño total que mostró un hongo particular contra todos los demás hongos a los que se enfrentó. En la Tabla 5 se observan los resultados del IA de cada hongo (HE y HF) en medio de cultivo PDA. Los detalles del IA en PDA se muestran en el Anexo III.

Tabla 5. Porcentajes del Índice de Antagonismo (IA) para las interacciones de hongos fitopatógenos y hongos endófitos en PDA. Las categorías son: inhibido (-), bloqueo mutuo (0) e inhibidor (+)

FITOPATÓGENOS				ENDÓFITOS			
Cepa	Valores (%)			Cepa	Valores (%)		
	-	0	+		-	0	+
(4)	9.10	18.18	72.72	1	75	12.5	12.5
(5)	9.10	0	90.90	2	100	0	0
(6)	9.10	36.36	54.54	3	100	0	0
(7)	9.10	18.18	72.72	4	75	25	0
(8)	9.10	27.27	63.63	5	87.5	12.5	0
(9)	0	27.27	72.72	6	62.5	25	12.5
(11)	9.10	54.54	36.36	7	75	25	0
(12)	18.18	18.18	63.63	8	0	50	50
				9	25	62.5	12.5
				10	25	62.5	12.5
				11	100	0	0

Estos resultados del primer bioensayo en PDA como medio de cultivo, determinaron cuáles hongos se continuarían utilizando para el segundo bioensayo en PDA con extracto de hojas de café al 20%. Se puede observar que los HE 2, 3 y 11 mostraron nula capacidad antagonica, por esta razón no se utilizaron en el segundo bioensayo. El HF 8 no fue débil en PDA, pero mostró valores antagonicos muy similares al HF 4 por lo que tampoco se utilizó en el segundo bioensayo (detalles en el Anexo III).

Para el segundo bioensayo (PDA con extracto de hojas de café al 20%) se utilizaron las mismas categorías antagonicas del IA consideradas para las interacciones entre los hongos. En la Tabla 6 se presentan los resultados del IA al enfrentarse los HE a los HF en este bioensayo.

Los detalles del IA y los enfrentamientos realizados se muestran en el Anexo III.

Tabla 6. Porcentajes del Índice de Antagonismo (IA) para las interacciones de hongos endófitos y fitopatógenos en PDA con extracto de hojas de café al 20%. Las categorías son: inhibido (-), bloqueo mutuo (0) e inhibidor (+)

FITOPATÓGENOS				ENDÓFITOS			
Cepa	Valores (%)			Cepa	Valores (%)		
	-	0	+		-	0	+
(4)	33.33	66.67	0	1	50	0	50
(5)	100	0	0	4	50	50	0
(6)	0	0	100	5	0	100	0
(7)	33.33	0	66.67	6	33.33	33.33	33.33
(9)	0	100	0	7	0	0	100
(11)	42.86	42.86	14.28	8	14.28	14.28	71.44
(12)	50	0	50	9	40	60	0
				10	80	20	0

En los dos bioensayos de antagonismo *in vitro* entre HE y HF, en la mayoría de las interacciones de cada par antagónico se observó la inhibición de uno o de ambos hongos, lo que concuerda con lo mencionado por Shearer y Zare-Maivan [1988], que al enfrentar a dos hongos en pruebas de antagonismo, en el 96% de los casos se inhibe uno o los dos hongos. En la Figura 17 se muestran ejemplos de las interacciones de hongos más observadas en ambos bioensayos.

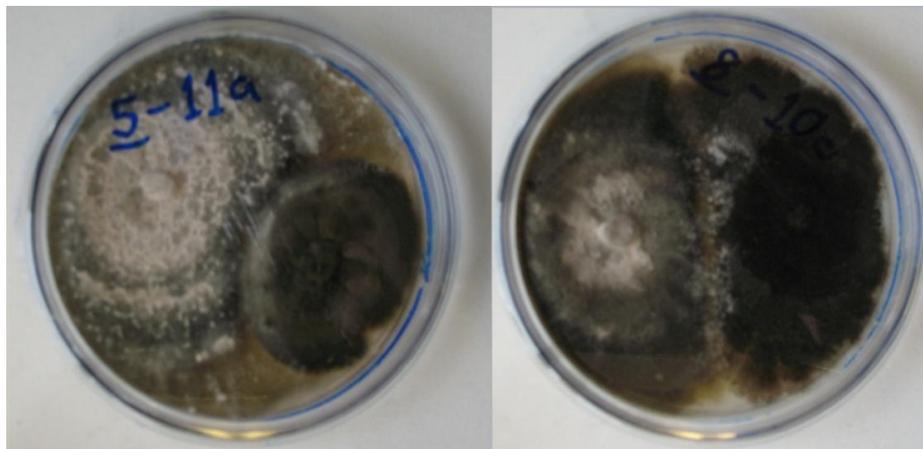


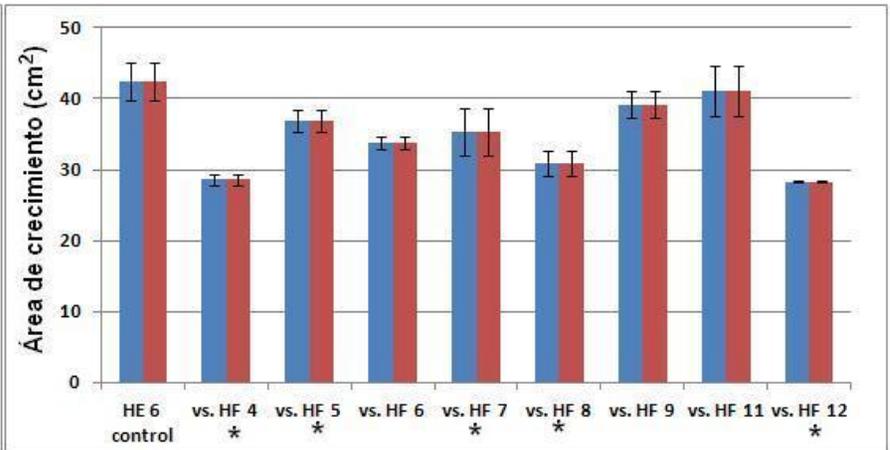
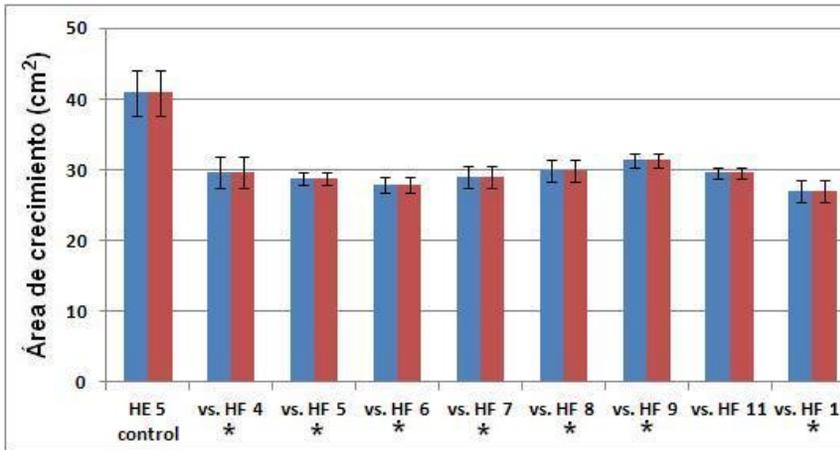
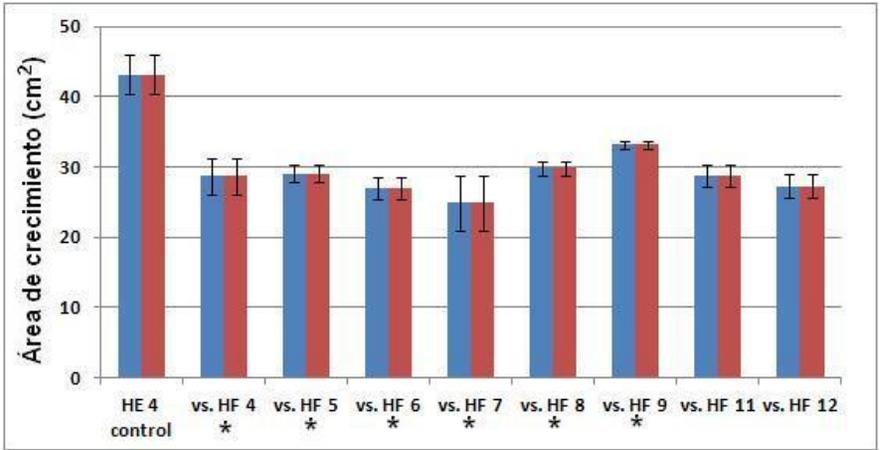
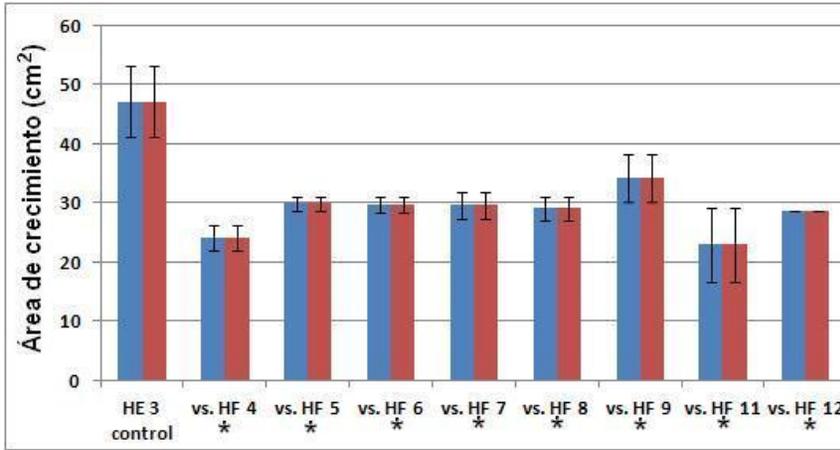
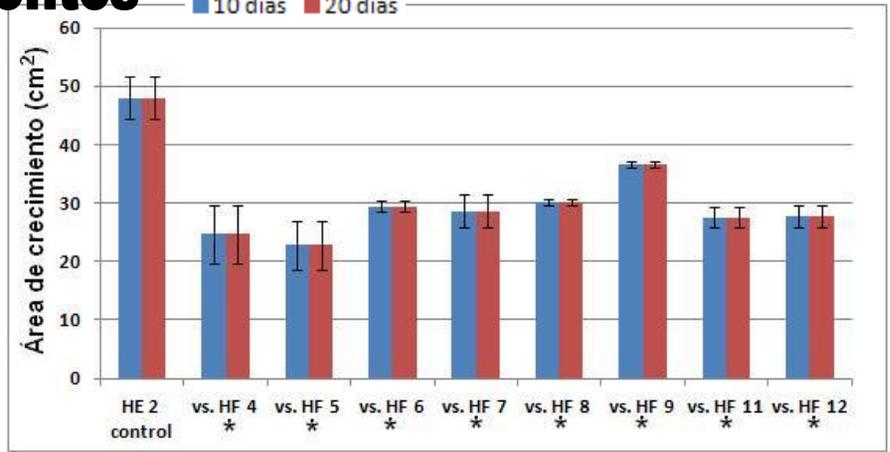
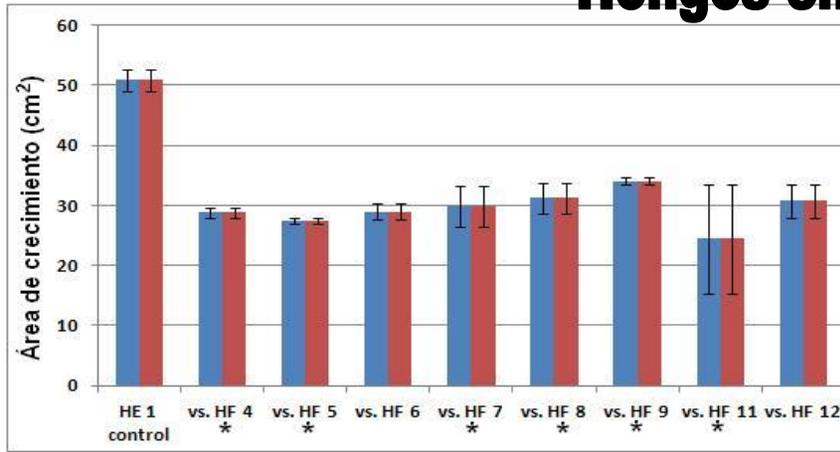
Figura 17. Ejemplos de los efectos más observados en los antagonismos *in vitro*. En la imagen de la izquierda, la especie fuerte está inhibiendo a la especie débil, y en la imagen de la derecha la inhibición es mutua aunque, ningún hongo domina al otro por completo. En las dos imágenes el hongo fitopatógeno está a la izquierda y el hongo endófito a la derecha.

La imagen derecha de la Figura 17 ejemplifica una de las interacciones antagónicas que se observó con cierta frecuencia; ambas especies crecieron aparentemente sin problemas y al entrar en contacto detuvieron su crecimiento frontal, continuando el lateral, sin que ninguna especie dominara a la otra, siguiendo igual hasta que ya no tuvieron más espacio para crecer. La imagen de la izquierda de la Figura 17 es un ejemplo de la interacción antagónica más observada en la mayoría de los enfrentamientos, el crecimiento de una especie fue detenido por la otra especie, ya sea debido a que la especie más antagónica creció alrededor de la especie débil, o formó un halo de inhibición sobre ella, o la inhibió a distancia, aunque esta última fue la menos observada. Cuando ocurrió la inhibición a distancia, ésta fue sólo temporal y después de algunos días, la especie inhibida continuó creciendo aunque con dificultad. Esto coincide con lo observado en las investigaciones realizadas por Santamaría y Bayman [2005], los cuales mencionan que la presencia de un hongo que inhibe marcadamente a otro al enfrentarlo, se relaciona con la menor capacidad antagónica de este último.

Pruebas estadísticas

Los resultados de los bioensayos de antagonismo entre los HE y los HF, fueron sometidos a pruebas estadísticas para determinar cuáles interacciones eran significativas. La selección de los hongos con mayor capacidad antagónica, se basó en los resultados de las pruebas estadísticas. Los diámetros de crecimiento del micelio de los hongos, marcados en la parte posterior de las cajas de Petri, fueron medidos con el programa ImageJ 1.46r con el cual se obtuvieron las áreas de crecimiento de todos los hongos enfrentados en los bioensayos de antagonismo *in vitro*. Estas áreas se sometieron a un ANOVA factorial utilizando el programa STATISTICA StatSoft 2006 Versión 7. Para el bioensayo en PDA, las áreas de crecimiento de los micelios se evaluaron a los 10 y a los 20 días. En la Figuras 18 y 19 se muestran las áreas de crecimiento promedio de los micelios de HE y HF, en cada enfrentamiento, creciendo en medio de cultivo PDA. Los detalles estadísticos se muestran en el Anexo IV.

Hongos endófitos



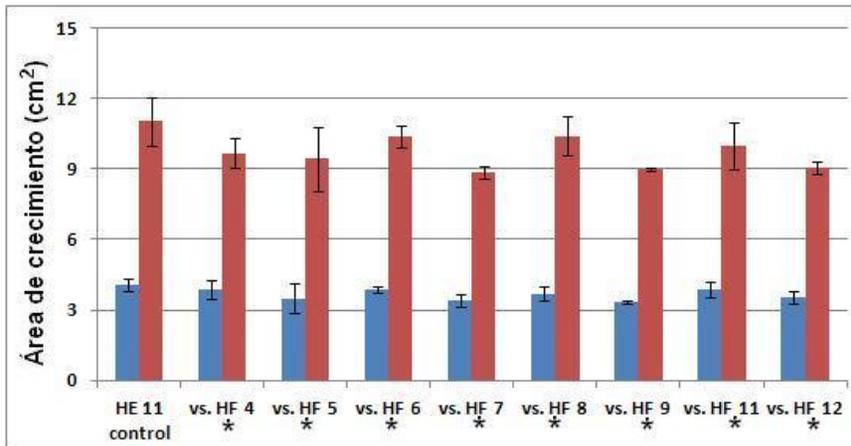
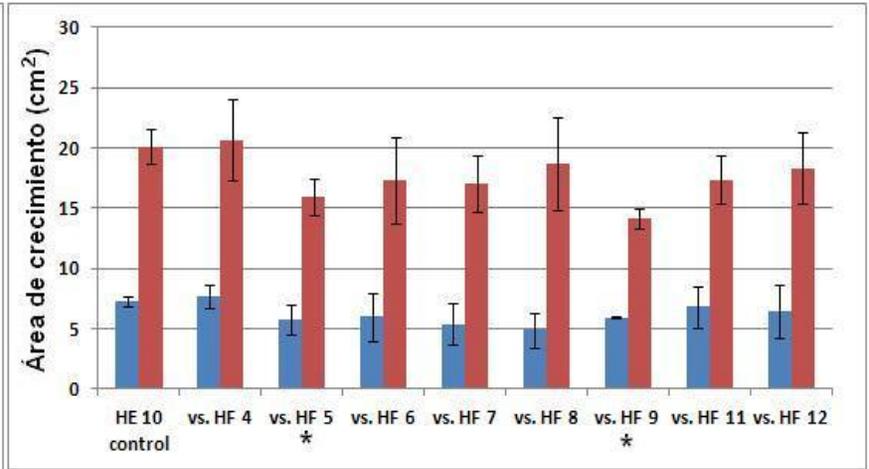
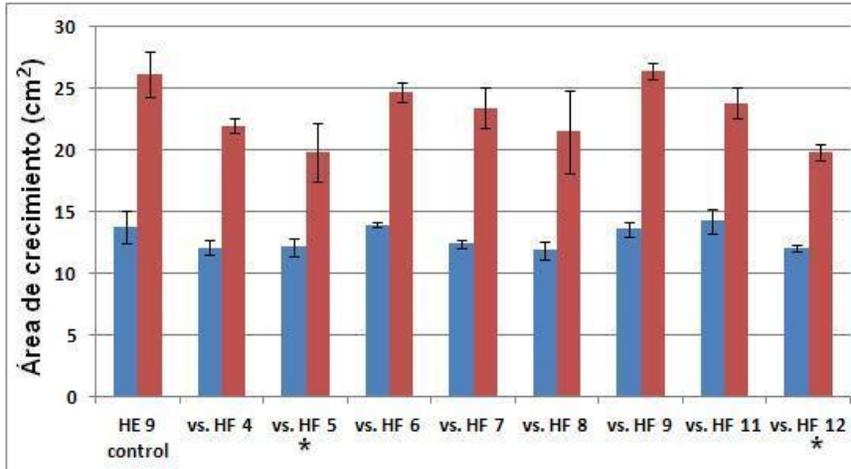
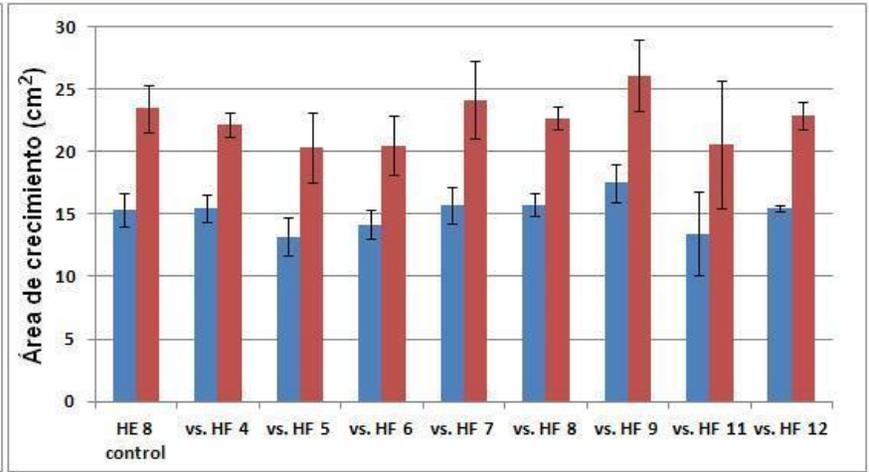
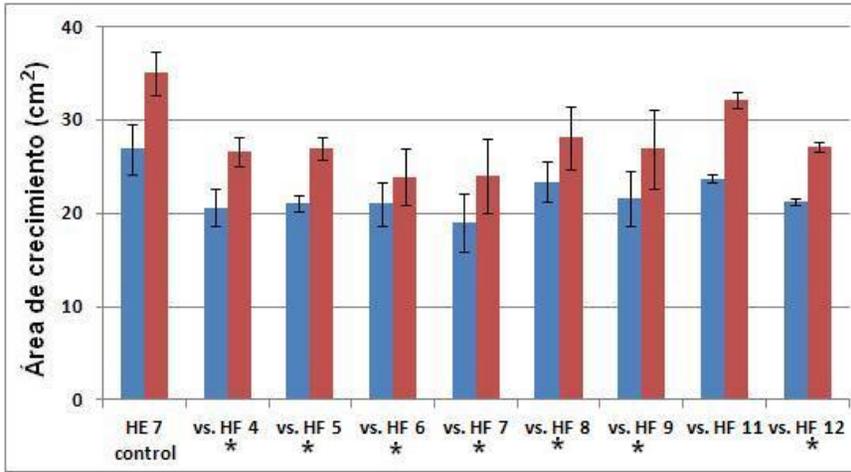
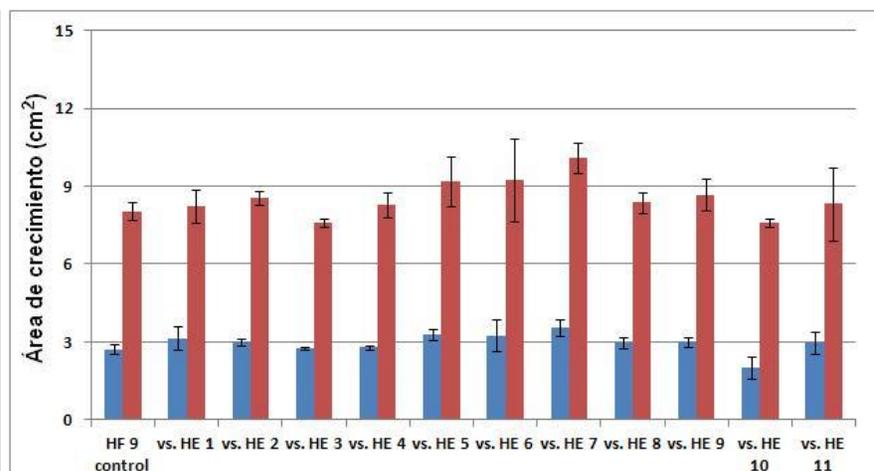
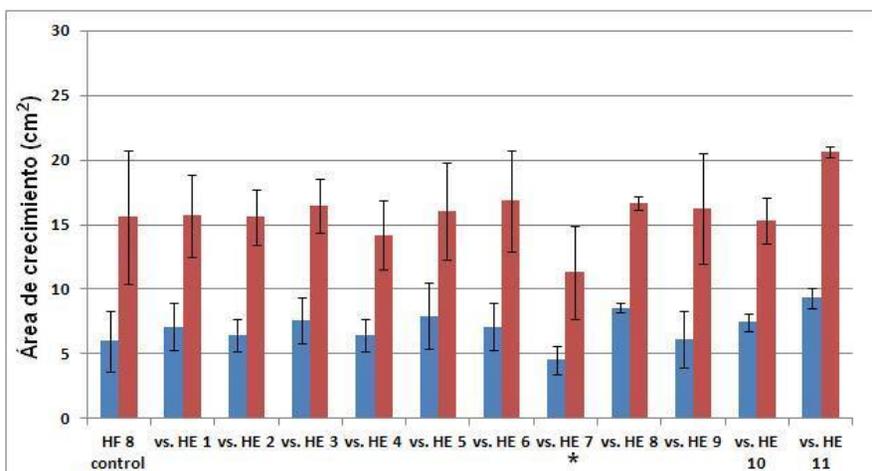
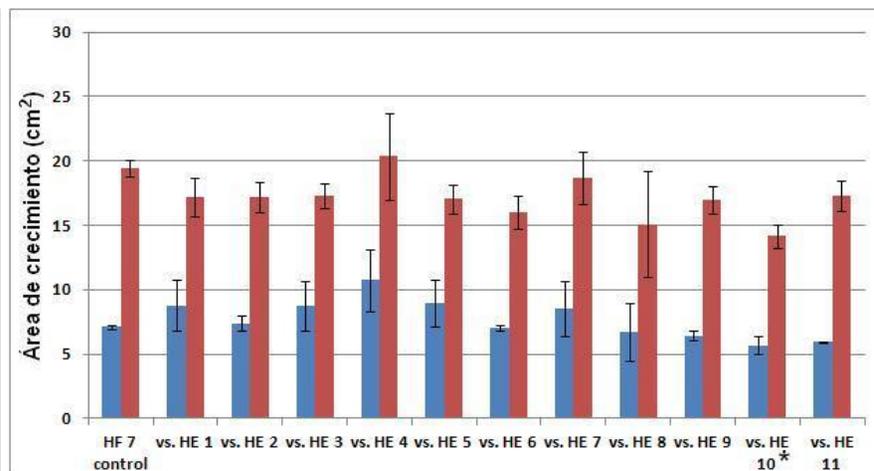
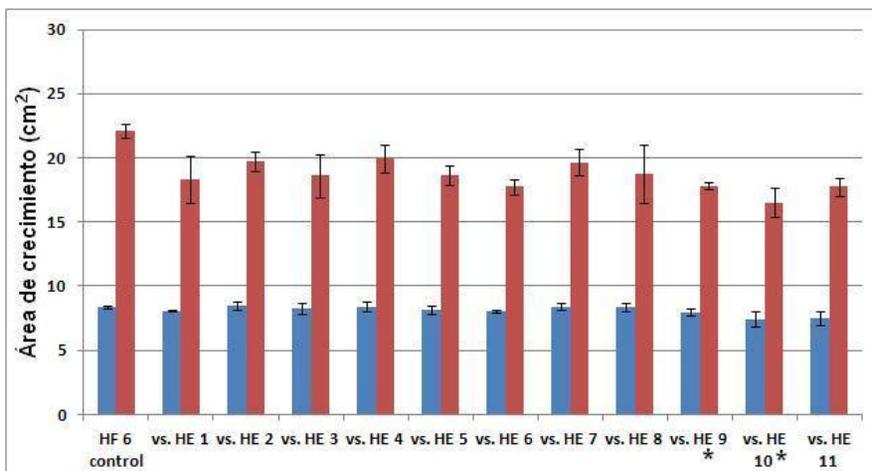
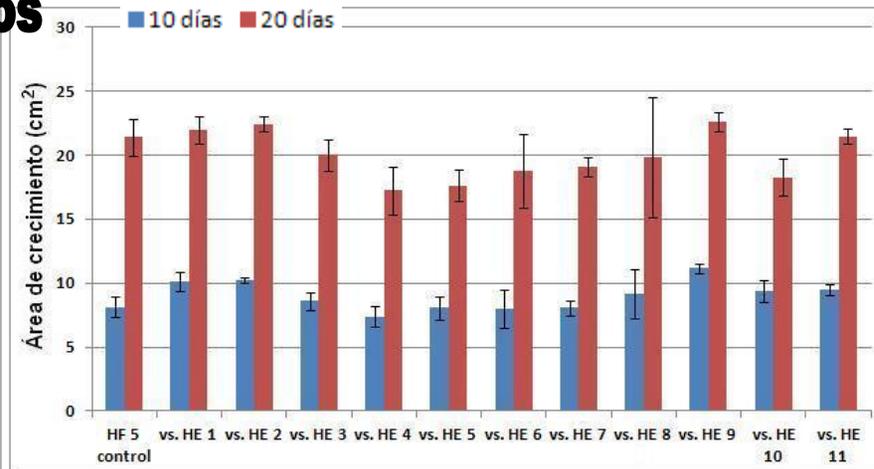
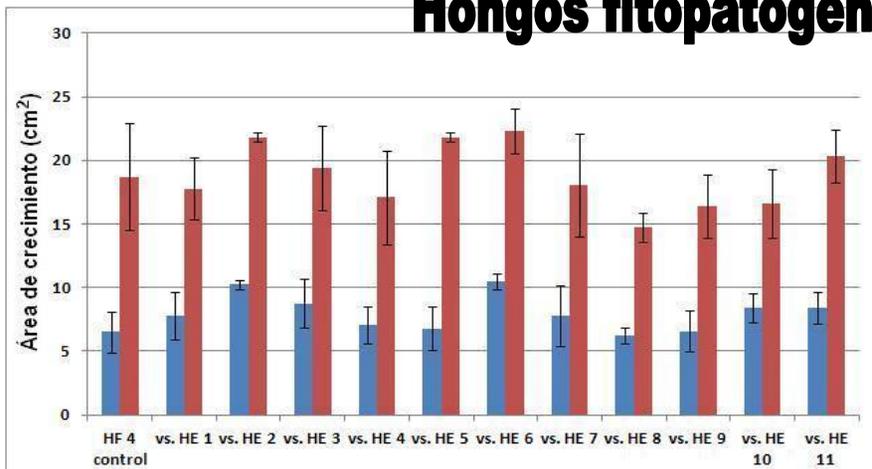


Figura 18. Crecimiento de los hongos endófitos al enfrentar a los hongos fitopatógenos en el bioensayo de antagonismo en PDA (n = 3). Las barras azules muestran el valor de las mediciones a los 10 días y las barras rojas el valor a los 20 días. Los “*” indican que los hongos endófitos fueron inhibidos en esa interacción.

Hongos fitopatógenos



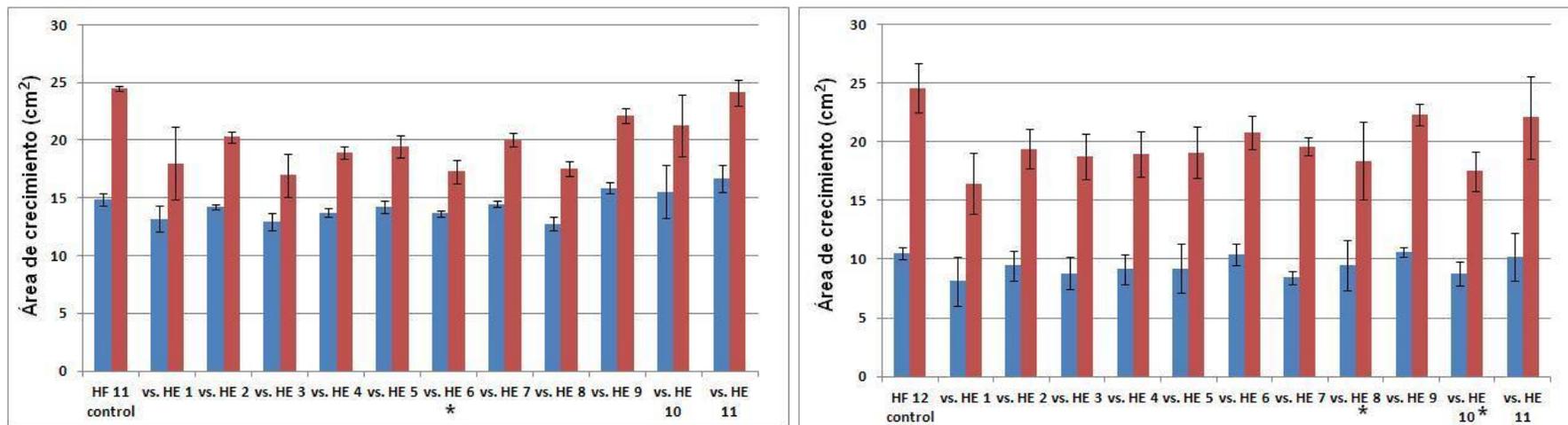


Figura 19. Crecimiento de los hongos fitopatógenos al enfrentar a los hongos endófitos en el bioensayo de antagonismo en PDA (n = 3). Las barras azules muestran el valor de las mediciones a los 10 días y las barras rojas el valor a los 20 días. Los “*” indican que los hongos fitopatógenos fueron inhibidos en esa interacción.

Los valores del IA así como los del crecimiento de los hongos en PDA, determinaron la selección de los hongos que se utilizaron en el bioensayo con PDA adicionado con extracto de hojas de café al 20%. Debe aclararse que aquellos pares de HE y HF que se enfrentaron en PDA, donde el crecimiento de los HE fue inhibido por los HF, no se incluyeron en el bioensayo de PDA con extracto de hojas de café. Esta decisión se tomó con el fin de eliminar a los HE más débiles, para continuar los bioensayos con los más antagonísticos. Los pares de HE y HF que se enfrentaron en PDA, donde el HE inhibió al HF y donde ninguno de ellos inhibió significativamente al otro, si se seleccionaron para realizar los bioensayos de antagonismo en PDA con extracto de hoja de café (detalles en el Anexo III).

Para el bioensayo de PDA con extracto de hoja de café, se realizó el mismo procedimiento de marcar en las cajas de Petri el crecimiento del micelio de los hongos y la medición de sus áreas. Al realizar el segundo bioensayo, el crecimiento del micelio de cada hongo se evaluó a los 5, 10, 15 y 20 días a partir de la fecha de su inoculación según su velocidad de crecimiento. En las Figuras 20 y 21 se muestran las áreas de crecimiento promedio de los micelios de HE y HF, en cada enfrentamiento en medio de cultivo PDA con extracto de hojas de café al 20%.

Hongos endófitos

■ 5 días ■ 10 días ■ 15 días ■ 20 días

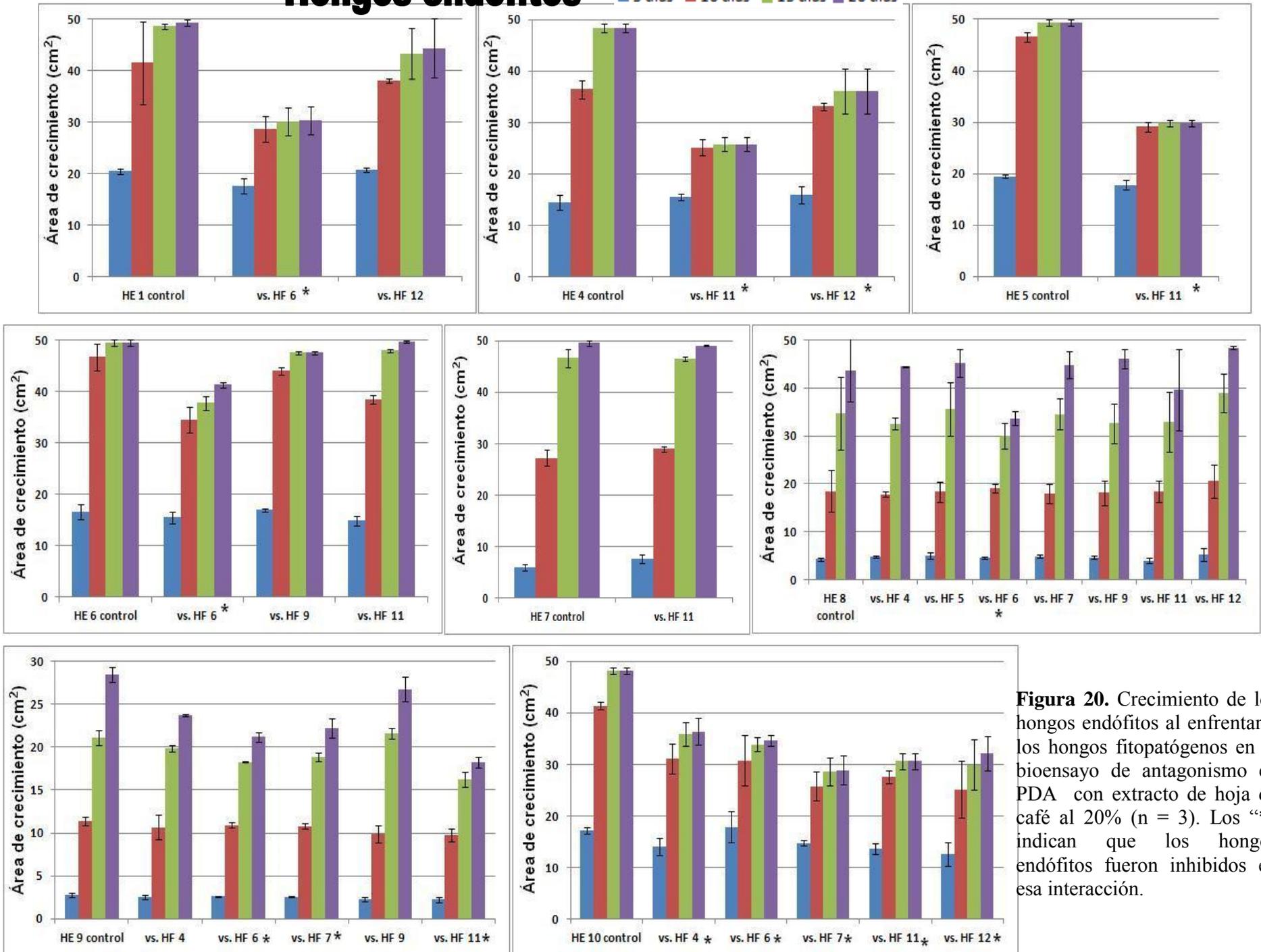


Figura 20. Crecimiento de los hongos endófitos al enfrentar a los hongos fitopatógenos en el bioensayo de antagonismo en PDA con extracto de hoja de café al 20% (n = 3). Los “*” indican que los hongos endófitos fueron inhibidos en esa interacción.

Hongos fitopatógenos

5 días 10 días 15 días 20 días

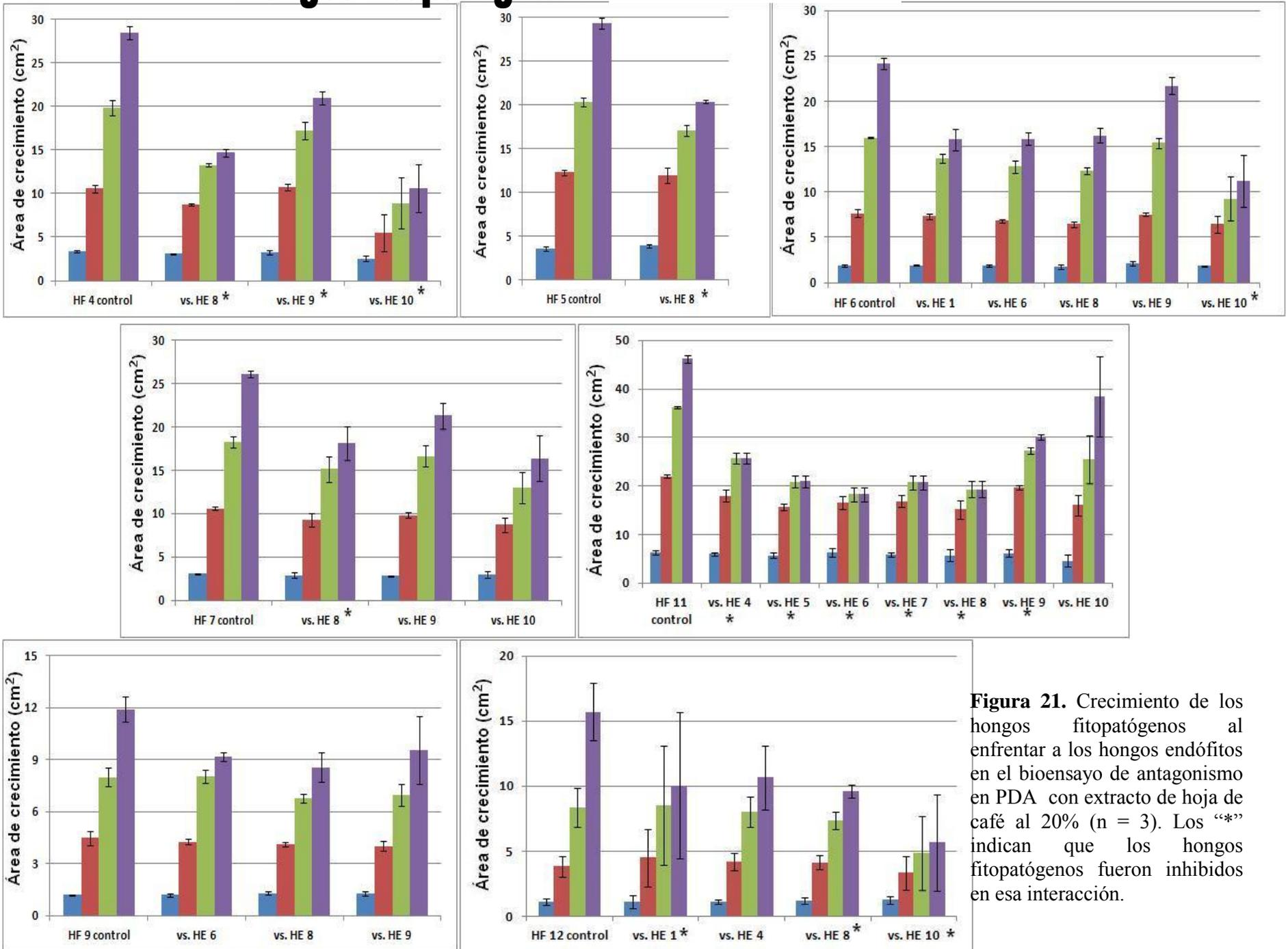


Figura 21. Crecimiento de los hongos fitopatógenos al enfrentar a los hongos endófitos en el bioensayo de antagonismo en PDA con extracto de hoja de café al 20% (n = 3). Los “*” indican que los hongos fitopatógenos fueron inhibidos en esa interacción.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las condiciones en las que se sembraron y crecieron los HE y los HF, seleccionados para llevar a cabo la presente investigación, permitieron el crecimiento adecuado de todos ellos en todos los bioensayos realizados, lo que confirma lo mencionado por Shearer y Zare-Maivan [1988], quienes indicaron que bajo estas mismas condiciones, en la mayoría de las especies probadas en diversos estudios, se observa la mayor tasa de crecimiento radial del micelio, la cual permite realizar bioensayos de antagonismo en no más de un mes. En el medio de cultivo de Papa-Dextrosa-Agar tanto los HE como los HF mostraron la mayor velocidad de crecimiento, por esa razón todas las pruebas posteriores se realizaron en este medio de cultivo.

A pesar de que los HF se cultivaron en las diversas condiciones y medios de cultivo utilizados en esta investigación, incluso la exposición a luz cercana a UV, los HF del 1 al 7 y del 9 al 11 no esporularon [Vinnere, 2004]; por esta razón fueron asignados, por el momento, al grupo taxonómico artificial Mycelia Sterilia que incluye a los hongos cuya producción de esporas (sexuales o asexuales) no se conoce todavía [Hawksworth *et al.*, 1983]. Esto no quiere decir que los HF utilizados carecen de la capacidad de esporular, simplemente no esporularon, bajo las condiciones experimentales utilizadas. Los trabajos de Vinnere [2004] señalan que la falta de conocimiento adecuado sobre los requerimientos biológicos fúngicos para que el proceso de esporulación se lleve a cabo, así como la óptima combinación de métodos y condiciones necesarias para ello, dificulta la identificación de algunos hongos al ser estudiados *in vitro*.

De acuerdo con las investigaciones realizadas por Mueller y colaboradores [2004], cuando se sellan las cajas de Petri con parafilm, se previene la deshidratación del medio, pero esto también puede inhibir la esporulación de los hongos cultivados. Según sus observaciones, la lenta desecación del medio con frecuencia puede promover la esporulación de muchos hongos, aunque esto no fue observado en el presente trabajo.

El problema de trabajar en condiciones *in vitro*, es que muchos Basidiomicetos y Ascomicetos son incapaces de producir esporas bajo condiciones de laboratorio [Vinnere, 2004]. Posiblemente, esto ocurrió con los HF seleccionados para la presente investigación. Sin embargo, Vinnere [2004] afirma que cuando se conocen los requerimientos biológicos de los hongos con los que se trabaja, la inducción de la esporulación en las muestras estériles puede lograrse en la mayoría de los casos.

Al inocular los HF en las hojas separadas de *Coffea arabica* a las que no se les hizo ninguna herida, el crecimiento de los HF fue muy escaso, en muy pocas hojas se presentó crecimiento de micelio, pero éste fue muy pequeño. Por otro lado, el tratamiento de inoculación de los HF en las hojas heridas, dio resultados más evidentes de crecimiento de estos hongos y de síntomas de enfermedad, coincidiendo con los reportes que indican que una de las formas en que los hongos invaden a las plantas es a través de las heridas hechas por insectos [Osono y Takeda, 1999; Oliveira *et al.*, 2004; Lemons *et al.*, 2005]. También se demostró que, dependiendo del estado fisiológico de la planta (hoja separada en este caso), muchos HE pueden vivir como inactivos dentro de su hospedera y en el momento en que ésta disminuye sus defensas los hongos pueden aprovechar su posible potencial, convirtiéndose en fitopatógenos o en saprófitos [Schulz *et al.*, 1999; Redman *et al.*, 2001].

Al momento de evaluar las tasas de crecimiento de los hongos (tanto HE como HF), se observaron notables diferencias en las velocidades de crecimiento al sembrarlos en los dos medios de cultivo utilizados (PDA solo y PDA con extracto de hojas de café). En PDA solo, la mayoría de los HE cubrían totalmente la caja de Petri en menos de diez días luego de su siembra. Los HE 10 y 11, así como la mayoría de los HF, tardaron más del doble de ese tiempo para cubrir media caja. No obstante, al colocar los hongos en PDA con extracto de hojas de café, el crecimiento de la mayoría de los HE se redujo (tardaron un día más en alcanzar el mismo tamaño que en PDA), mientras que la mayor parte de los HF conservó su misma velocidad de crecimiento, y una minoría la aumentó. Lo anterior coincide con los resultados de Arnold y Herre [2003] que indican que los HE son sensibles al complejo químico de la hoja. Todos los HE que se utilizaron en la presente investigación fueron aislados de las hojas de café, las cuales se convierten en su hábitat natural durante el tiempo en que la hoja donde habitan permanece viva; sin embargo, hay que considerar que, los hongos crecieron de manera *in vitro* en extracto acuoso de hojas de café al 20% donde la concentración de cafeína (420 mg/L) es mucho más alta que la normalmente encontrada una hoja madura del cafeto (2.1 mg/g) [Ashihara, 1996]. En el caso de los HF, se puede considerar que si la mayoría creció con la misma velocidad en ambos medios, probablemente quiere decir que tienen una mejor adaptabilidad al medio que los HE, aunque hay que considerar que la concentración de la cafeína fue elevada en el extracto de hojas de café utilizado en los bioensayos, lo que puede alterar el crecimiento de cualquier hongo, sea endófito o fitopatógeno.

Un caso particular de cambio en la velocidad de crecimiento en PDA con extracto de hojas de café al 20%, fue el HE 10 (*Guignardia mangiferae*), cuya tasa de crecimiento aumentó casi al triple en comparación con su velocidad de crecimiento en PDA solo. Esta diferencia tan notable de crecimiento del HE 10 podría deberse a la plasticidad que poseen las especies del género *Guignardia* y a la diversidad de relaciones interespecíficas que pueden establecer con las plantas, pudiendo ser tanto endófitos como fitopatógenos; en zonas tropicales y zonas templadas se han encontrado especies de *Guignardia* dentro de zonas podridas de diversas frutas [Mueller *et al.*, 2004].

Según lo observado, todos los HE parecen ser simbioses facultativos, esto es, que pueden crecer en cajas de Petri y no forzosamente requieren un hospedero *in vivo* (simbionte obligado). Sin embargo, el hecho que el HE 11 haya sido el de más lento crecimiento en ambos medios de cultivo, puede significar que está más adaptado al hábitat que generalmente ocupa, los tejidos vivos de la hoja de su hospedera, en este caso de las hojas de *Coffea arabica*, que en las condiciones artificiales utilizadas.

De acuerdo con Shearer y Zare-Maivan [1988], cuando se ponen a competir hongos *in vitro*, aproximadamente en el 96% de los casos se presenta una inhibición del crecimiento, ya sea sólo de uno de los hongos o de ambos, lo que coincide con lo observado en la presente investigación. Santamaría y Bayman [2005], observaron que la presencia de hongos que inhiben marcadamente a otros al enfrentarlos, ya sea mediante la producción de metabolitos secundarios (antibióticos), por parasitismo ó competencia por recursos, se correlacionó negativamente con los hongos que poseían menor capacidad inhibitoria. Esto también coincide con las observaciones realizadas en la presente investigación.

En la mayoría de las interacciones que se observaron cuando los hongos crecieron en PDA solo, los HF obtuvieron categorías antagónicas de inhibidores, algunos de bloqueo mutuo y muy pocos de inhibidos. Mientras que los HE mayoritariamente tuvieron categorías antagónicas de inhibidos, seguidos por bloqueo mutuo y, en muy pocas interacciones, obtuvieron categoría de inhibidores. Debido a su mayor velocidad al crecer, probablemente los HE del 1 al 7 sembrados después que los fitopatógenos, ya no tuvieron la oportunidad de captar los recursos primarios del medio de cultivo que ya habrían sido mayoritariamente captados por los fitopatógenos. Si fuera el caso, estos HE pudieran presentar mayor resistencia contra los ataques de los fitopatógenos si son colocados en el medio antes que ellos.

En PDA con extracto de hojas de café, los HF, en la mayoría de sus interacciones, obtuvieron categoría de bloqueo mutuo, y los HE aumentaron ligeramente su capacidad inhibitoria. En ambos medios de cultivo, el hongo que logró la categoría de inhibidor con mayor frecuencia, fue el HE 8 (*Xylaria* sp. 3) que fue muy antagónico en PDA solo, aunque encontró mayor resistencia por parte de los HF en PDA con extracto de hojas de café, continuo siendo inhibidor en la mayoría de sus enfrentamientos. Todos estos resultados son acordes con las observaciones de Arnold y Herre [2003] sobre la diversa sensibilidad de los hongos a la química del sustrato.

Se sabe que la química de las hojas desempeña un importante papel en la formación de las comunidades endofíticas en los árboles de los bosques tropicales [Arnold *et al.*, 2000; Arnold y Herre, 2003] y, sumado a que la defensa mediada por los HE posiblemente aumenta cuando existe alta diversidad, tanto de HF como de HE dentro de las hojas de las plantas hospederas [Arnold *et al.*, 2003], esto explica porque los HE 8 (*Xylaria* sp.), HE 9 (*Verticillium* sp.) y HE 10 (*Guignardia mangiferae*) fueron los más resistentes al enfrentar a los diversos HF, e incluso pudieron ser inhibidores (particularmente el HE 8) en varios casos.

CONCLUSIONES

- Los hongos fitopatógenos 1 al 7 y 9 al 11, a pesar de crecer en los diversos medios de cultivo utilizados en la presente investigación y sometidos a los otros tratamientos, temperatura, luz UV y oscuridad, no tuvieron la capacidad de esporular, debido a no haber encontrado las condiciones que requieren para producir esporas.
- La falta de esporulación de los HF mencionados impidió su clasificación utilizando las características morfológicas de sus esporas, como se hace comúnmente. Por esta razón se les clasificó como Mycelia Sterilia, por el momento.
- Los resultados de la inoculación de los HF en las hojas de *Coffea arabica* mostraron que para colonizar a las hojas del cafeto, los HF requieren que las hojas presenten alguna herida por donde puedan penetrar a ella. Entonces, la mayor susceptibilidad de la planta al ataque de hongos fitopatógenos está correlacionada con la edad y lo saludable de sus hojas.
- Los hongos endófitos que crecieron más rápido durante las pruebas de antagonismo presentaron baja resistencia ante los hongos fitopatógenos; concordando con la hipótesis de

que los hongos de rápido crecimiento son menos antagónicos que los de lento crecimiento. Esto pudo deberse también a que los hongos endófitos se sembraron después de los fitopatógenos, y no tuvieron oportunidad de aprovechar los recursos primarios del medio de cultivo que ya habían sido utilizados por éstos últimos.

- Una alta concentración de cafeína (420 mg/L), y de otros metabolitos secundarios, en el medio de cultivo hace más lento el crecimiento de los hongos endófitos pero promueve el crecimiento de algunos fitopatógenos, la reacción de los endófitos puede deberse también a que requieren concentraciones más bajas en las cuales puede variar su fisiología y su reacción frente a los fitopatógenos. Efectivamente, la química de la hoja afecta el crecimiento y fisiología de ambos tipos de hongos.
- De acuerdo con lo observado en la presente investigación, los hongos endófitos foliares de *Coffea arabica* podrían desempeñar un papel defensivo dentro de esta planta, contra el ataque de hongos fitopatógenos, estudios posteriores demostrarán que los hongos endófitos o las comunidades que forman dentro de los cafetos, pueden ser una alternativa prometedora para proteger este importante cultivo de las enfermedades, tanto en nuestro país como en otras partes del mundo.

RECOMENDACIONES

- La alteración química de las tasas de crecimiento es un factor a considerar al momento de asignar fechas para colocar inóculos de hongos a competir *in vitro* en medios de cultivo adicionados con extractos de plantas, ello para poder prever los momentos adecuados de la inoculación *in vivo* de los hongos endófitos en las plantas.
- Es importante continuar con las investigaciones sobre los hongos endófitos de *Coffea arabica*, y de otras plantas cultivadas y silvestres, para conocer cómo interactúan en presencia de fitopatógenos fúngicos dentro de los tejidos de las plantas.
- En la presente investigación, los enfrentamientos de HE *versus* HF realizados en PDA solo, en los cuales el HE fue inhibidor se repitieron en PDA con extracto de hojas de café; pero no los enfrentamientos donde el HE fue inhibido.
- Se pudo observar que aunque la velocidad de crecimiento de los hongos utilizados sea diferente en distintos medios de cultivo, no significa necesariamente que la capacidad antagonica también puede cambiar. Un ejemplo fue el comportamiento del hongo endófito 10, cuya resistencia frente a los fitopatógenos fue menguada en los bioensayos de antagonismo en PDA con extracto de hojas de café como medio de cultivo.

LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 1997. Plant Pathology. 4^a edición. Academic Press USA. 635p.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory Mycology. 4th edition. John Wiley & Sons, Inc., New York. 492-493.
- Anthony F, Combes MC, Astorga C, Bertrand B, Graziosi G, Lashermes P. 2002. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties reveals by AFLP and SSR markers. Theoretical and Applied Genetics 104: 894-900.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD, Kursar TA. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? Ecology Letters 3 (4): 267–274.
- Arnold AE and Herre EA. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). Mycologia 95 (3): 388–398.
- Arnold AE, Mejia LC, Kyllo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 100: 15649-15654.
- Ashihara H, Monteiro AM, Gillies FM, Crozier A. 1996. Biosynthesis of Caffeine in Leaves of Coffee. Plant Physiology. 111 (3): 747–753.
- Backman PA and Sikora RA. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. Biological Control 46: 1-3.
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th edition. American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 217pp.
- Bergman J. 2006. Heterotrophs. Windows to the Universe. National Earth Science Teachers Association, USA. Libro en línea, consultado el 4 de septiembre de 2013.
- Blackwell M, Vilgalys R, James TY, Taylor JW. 2012. Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc. Libro en línea, consultado el 20 de agosto de 2013
- Bruns T. 2006. Evolutionary biology: a kingdom revised. Nature 443 (7113): 758–61.
- Cannon PF and Simmons CM. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. Mycologia 94:210–220.
- Carroll GC. 1995. Forest endophytes: pattern and process. Canadian Journal of Botany 73 (1): 1316-1324.

- Clay K. 1991. Fungal endophytes, grasses and herbivores. In: Microbial Mediation of Plant and Plant-herbivore Interactions. Barbosa P, Krischik VA, Jones CG (editors). John Wiley and Sons, New York: 199-252.
- Cubas P. 2007. Curso de Botánica General: Sistemática de Hongos. Aula2punto.net. Curso en línea 25 de junio de 2013.
- Davidson MW. 2005. Animal Cell Structure. Molecular Expressions: Exploring the world of Optics and Microscopy. The Florida State University 4 de septiembre de 2013.
- Espinosa-García F, Rollinger J, Langenheim J. 1996. Coastal redwood leaf endophytes: their occurrence, interactions and response to host volatile terpenoids. Chapter 5: In Redlin, SC, LM. Carris (editors). Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematic, ecology and evolution. American Phytopathological Society Press, USA. Pp. 101-120.
- Evans HC, Holmes KA, Thomas SE. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. Mycological Progress 2 (2): 149-160.
- Faeth SH. 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? Oikos 98:25-36.
- Faeth SH and Fagan WF. 2002. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. Integrative and Comparative Biology 42:360-368.
- Fukasawa Y, Osono T, Takeda H. 2009. Effects of attack of saprobic fungi on twig litter decomposition by endophytic fungi. Ecological Research 24 (5): 1067-1073
- Ganley RJ, Sniezko RA, Newcombe G. 2008. Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. Forest Ecology and Management 255: 2751-2760.
- Hawksworth DL, Sutton BC, Ainsworth GC. 1983. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. Commonwealth Mycological Institute, UK.
- Hawksworth DL and Rossman AY. 1997. Where Are All the Undescribed Fungi? American Phytopathological Society. 87 (9): 888-891.
- Hernández-Martínez G, Manson RH, Contreras HA. 2009. Quantitative classification of coffee agroecosystems spanning a range of production intensities in central Veracruz, Mexico. Agriculture, Ecosystems and Environment 134: 89-98.
- Herrera T and Ulloa M. 1990. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. 1ra edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 244.

- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai Y-C, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson K-H, Lichtwardt R, Longcore J, Miądlikowska J, Miller A, Moncalvo J-M, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao Y-J, Zhang N. 2007. A higher level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological Research*. 111 (5): 509-547.
- Hogan CM. 2013. Bacteria. *The Encyclopedia of Earth*. Libro en línea, 5 de septiembre de 2013.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of *Fungi* using a six-gene phylogeny. *Nature* 443 (7113): 818-822.
- Krings M, Taylor TN, Hass H, Kerp H, Dotzler N, Hermsen EJ. 2007. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist* 174 (3): 648–657.
- Kurose D, Furuya N, Tsuchiya K, Tsushima S, Evans HC. 2012. Endophytic fungi associated with *Fallopia japonica* (Polygonaceae) in Japan and their interactions with *Puccinia polygoni-amphibii* var. *tovariae*, a candidate for classical biological control. *Fungal Biology* 116 (7): 785-91.

- Lemons A, Clay K, Rudgers JA. 2005. Connecting plant-microbial interactions above and belowground: a fungal endophyte affects decomposition. *Oecologia* 145: 595-604.
- Leong SL, Vinnere PO, Rice T, Hocking AD, Schnürer J. 2011. The extreme xerophilic mould *Xeromyces bisporus* – growth and competition at various water activities. *International Journal of Food Microbiology* 145: 57–63.
- Lewis LA and McCourt RM 2004. Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany* 91 (10): 1535–1556.
- Lodge DJ, Fisher PJ, Sutton BC. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. 1996. *Mycologia* 88 (5): 733–738.
- López-Llorca, LV and Macía-Vicente JG. 2009. Plant symbioses with fungal endophytes: perspectives on conservation and sustainable exploitation of Mediterranean ecosystems. *Mediterránea Servicio de Publicaciones. Universidad de Alicante* 20: 16-23.
- Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett D, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, Miadlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M, Shoemaker R, Sung GH, Lücking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim YW, Matheny B, Nishida H, Pfister D, Rogers J, Rossman A, Schmitt I, Sipman H, Stone J, Sugiyama J, Yahr R, Vilgalys R. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91 (10): 1446-1480.
- MacMillan J. 2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation* 20 (4): 387-442.
- Malinowski D and Belesky DP. 1999. *Neotyphodium coenophialum* endophyte infection affects the ability of tall fescue to use sparingly available phosphorus. *Journal of Plant Nutrition* 22 (4-5): 835–853.
- Mejía LC, Rojas EI, Maynard Z, Van Bael S, Arnold AE, Hebbbar P, Samuels GJ, Robbins N, and Herre EA. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46: 4-14.
- Moguel P y Toledo VM. 1996. El café en México, ecología, cultura indígena y sustentabilidad. *Ciencias* 43: 40-51.

- Moguel P y Toledo VM. 2004. Conservar produciendo: Biodiversidad, café orgánico y jardines productivos. CONABIO. Biodiversitas 55: 1-7.
- Moore RT. 1996. The dolipore/parenthesome septum in modern taxonomy. In *Rhizoctonia* species, Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G. (editors). University of Ulster at Coleraine Pp. 13-35.
- Mueller GM, Bills GF, Foster MS. 2004. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. Academic Press Pp. 241-268.
- Oliveira ALM, Canuto EL, Silva EE, Reis VMJ, Baldani I. 2004. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. Brazilian Journal of Microbiology 35: 295-299.
- Osono T and Takeda H. 1999. Decomposing ability of interior and surface fungal colonizers of beech leaves with reference to lignin decomposition. European Journal of Soil Biology 35 (2): 51-56.
- Paracer S and Ahmadjian V. 2000. Symbiosis: an introduction to biological associations. Second Edition, Oxford University Press, New York. 304: 6-10.
- Perez-Leblic MI, Reyes F, Lahoz R, Archer SA. 1982. Autolysis of *Penicillium oxalicum* with special reference to its cell walls. Canadian Journal of Microbiology 28: 1289-1295.
- Pontón J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Revista Iberoamericana de Micología 25: 78-82.
- Rayner ADM and Boddy L. 1988. Fungal Decomposition of Wood: Its Biology and Ecology. John Wiley and Sons: New York. 602p.
- Rayner ADM and Webber J. 1984. Interspecific mycelial interactions: an overview. Symposium series: British Mycological Society 8: 383-417.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000. Glomalean Fungi from the Ordovician. Science 15 (289): 1920-1921.
- Redman RS, Dunigan DD, Rodríguez RJ. 2001. Fungal Symbiosis from Mutualism to Parasitism: Who Controls the Outcome, Host Or Invader? New Phytologist 151: 705-716.
- Rice RA. 1999. A place unbecoming: The coffee farm of Northern Latin American. The Geographical Review 89: 554-579.
- Rodríguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytologist 182:314-330.

- Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWV, Maki CS, Araujo WL, dos Santos DR, Azevedo JL. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease. *International Journal of Biological Sciences* 1: 24-33.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ. 1998. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematic* 29: 319-343.
- Santamaría J and Bayman P. 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee Leaves (*Coffea arabica*). *Microbiology Ecology* 50: 1-8.
- Schulz B, Römmert AK, Dammann U, Aust HJ, Strack D. 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research* 103: 1275-1283.
- Schulz B and Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661-686.
- Shearer CA and Zare-Maivan H. 1988. *In vitro* Hyphal Interactions among Wood- and Leaf-Inhabiting Ascomycetes and Fungi Imperfecti from Freshwater Habitats. *Mycologia* 80 (1): 31-37.
- Stierle A, Strobel GA, Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260: 214-216.
- Stone JK, Polishook JD, White JF. 2004. Endophytic fungi. In *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. Mueller GM, Bills GF, Foster MS (editors). Academic Press, USA. Pp. 241-270.
- Strobel, GA. 2002. Microbial gifts from the rainforest. *Canadian Journal of Phytopathology* 24: 14-20.
- Sutton BC. 1980. The coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, England. 696 pp.
- Ulloa M and Hanlin RT. 2012. *Illustrated Dictionary of Mycology*. Second Edition. American Phytopathological Society, USA. Pp. 784.
- Unterseher M. 2011. Diversity of Fungal Endophytes in Temperate Forest Trees. In *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*, Forestry Sciences. Pirttilä AM, Frank AC (editors). 80: 31-40.
- Vega FE, Simpkins A, Aime C, Posada F, Peterson SW, Rehner S, Infante F, Castillo A, Arnold AE. 2010. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology* 3: 122-138.

- Vinnere O. 2004. Approaches to Species Delineation in Anamorphic (mitosporic) Fungi: A Study on Two Extreme Cases. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology. Pp 36, 38-40, 42, 52.
- Webster J and Weber R. 2007. Introduction to fungi. 3^a Edición. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 841p.
- Whipps M. 1992. Status of biological disease control in horticulture. Biocontrol Science and Technology 2 (1): 3-24.
- Widden P and Scuttolin V. 1988. Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. Mycologia 80 (6): 795-803.
- Wilson D. 1995. Endophyte – the evolution of the term, a clarification of its use and definition. Oikos 73: 274-276.
- Yue Q, Miller CJ, White JF and Richardson MD. 2000. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epicloë festucae*. Journal of Agricultural Food Chemistry 48: 4687-4692.
- Yuen TK, Hyde KD, Hodgkiss IJ. 1999. Interspecific Interactions among Tropical and Subtropical Freshwater Fungi. Microbial Ecology, Hong Kong. 37: 257–262.

PÁGINAS WEB CONSULTADAS

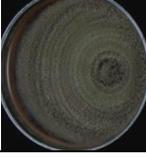
- Food and Agriculture Organization of the United Nations FAOSTAT, 2012: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> 25 de mayo de 2013
- SAGARPA, 2012. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/cafe.aspx> 25 de abril de 2013
- Site101 Mycelia Sterilia. <http://suite101.com/article/mycelia-sterilia-a83114> 30 de abril de 2013
- Aula2pontonet http://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Curso_Botanica.htm 25 de junio de 2013.
- The Tree of Life Web Project. <http://tolweb.org/Fungi/2377/2012.01.30> 20 de agosto de 2013
- Molecular Expressions: Exploring the world of Optics and Microscopy. <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/animalcell.html> 4 de septiembre de 2013.
- Windows to the Universe. <http://www.windows2universe.org/> 4 de septiembre de 2013.
- The Encyclopedia of Earth <http://www.eoearth.org/view/article/150368> 5 de septiembre de 2013

ANEXOS DE DATOS ESPECÍFICOS

ANEXO I: Características de hongos fitopatógenos aislados

Los medios de cultivo utilizados fueron Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Avena-Agar (AA). Se realizaron dos repeticiones de hongo en cada medio de cultivo.

Mycelia Sterilia (hongos sin esporas)		
Aislamiento	Características del micelio	
1	HMB 2-1 	En PDA el micelio superficial es algodonoso, color naranja claro a oscuro, con el centro color rosa y el perímetro rojizo. La cara inferior es de color naranja moderado a intenso rojo oscuro. Más o menos se observan formaciones de círculos de crecimiento.
	HMB 2-2	En AA el micelio superficial es rasante y menos algodonoso que en PDA, de color amarillo a naranja al frente y en la parte posterior el color es semejante pero más pálido.
2	HCT 3 	En ambos medios, el micelio superficial es de apariencia lobular aterciopelada. En PDA el micelio es de color gris, la cara inferior es estriada. En AA el color superficial es más oscuro y grueso, y el perímetro es verdoso. El medio se tiñó ligeramente de amarillo.
	HMBt-1	En ambos medios de cultivo, el micelio (cara superior e inferior) es similar al aislamiento de la descripción anterior aunque bastante más algodonosos y con colores más oscuros.
3	HCTq 	En PDA el micelio superficial es aterciopelado, gris claro al centro y más oscuro en la periferia. La cara inferior tiene estrías moderadamente visibles, es más oscura al centro y de color azul marino en el perímetro; presentó una pigmentación naranja en un extremo. En AA el micelio superficial es membranoso casi rasante, de color verde con algunas zonas abultadas de micelio blanco algodonoso. La cara inferior presenta colores similares y círculos de crecimiento más o menos visibles.
	HCBj 	En ambos medios, la apariencia del micelio superficial es esponjosa. En PDA es blanco en el centro y tiende a tornarse verde al alejarse de éste, la cara inferior es estriada. El micelio tiñe de amarillo al medio (bastante). En AA el color superficial es blanco en casi toda la superficie del hongo, las orillas son verdes. La cara inferior presenta algo de micelio sumergido.
5	HCBt 	En PDA el micelio superficial es de color verde aterciopelado con manchas blanquecinas dispersas. La cara inferior es estriada. El medio se tiñe bastante de amarillo. En AA el micelio superficial es de color rosa muy pálido, el perímetro es verde; presenta manchas blancas dispersas.

6	<p>HMB 5</p> 	<p>En PDA el micelio superficial es un poco algodonoso/aterciopelado, color naranja muy pálido. La cara inferior es oscura al centro y más clara al alejarse de éste, presenta círculos poco perceptibles, del centro a la periferia, el penúltimo es naranja y el último es blanco ligeramente estriado.</p> <p>En AA el micelio superficial rasante, con apariencia de tierra seca y una pigmentación naranja cerca del centro pero no en las orillas. La cara inferior tiene círculos casi imperceptibles (menos que en PDA).</p>
7	<p>HCBe</p> 	<p>En ambos medios, el micelio superficial es de apariencia aterciopelada y de color verde oscuro con algunas manchas blanquecinas.</p> <p>En PDA la superficie del micelio presenta algunas zonas de color rosa; el medio se tiñe ligeramente de amarillo y la cara inferior del micelio es estriada y de color gris oscuro.</p> <p>En AA el micelio superficial es verde aterciopelado más pálido, y tiene escasas manchas blanquecinas y muchas de color rosa. La cara inferior es estriada y oscura.</p>
8	<p>HMBv</p> 	<p>En PDA el micelio superficial es aterciopelado, algo rugoso y verde, con pequeñas manchas rosas, en el centro, el micelio es blanco y algodonoso. La cara inferior es estriada. El medio se tiñó moderadamente de amarillo.</p> <p>En AA el micelio superficial es verde con algunas zonas blancas esparcidas. La cara inferior presenta círculos color oscuro.</p>
9	<p>HCT 13</p> 	<p>En PDA el micelio superficial es azul-verde, ligeramente algodonoso y sobresale en varias zonas. El perímetro es blanco y grueso, con una segmentación pobremente marcada. La cara inferior es semejante pero presenta una pobre segmentación y el perímetro es más delgado.</p> <p>En AA el micelio superficial es rosa muy pálido, con algunas zonas verde pálido, y ligeramente algodonoso. La cara inferior es semejante.</p>
10	<p>HMB 5-5</p> 	<p>En PDA el micelio superficial tiene una apariencia ligeramente algodonosa de color gris olivo. El micelio es globoso, con una superficie segmentada y contorno blanco. La cara inferior muestra círculos de crecimiento y ejes de simetría muy bien definidos. Los círculos son de color verde, blanco y naranja pálido.</p> <p>En AA el crecimiento del micelio fue rasante (plano), ligeramente membranoso, de color gris oscuro (casi negro). La cara inferior con los mismos colores que la cara superior.</p>
11	<p>HCBd</p> 	<p>En PDA el micelio superficial tiene apariencia polvosa de color negro y blanco en el perímetro. La cara inferior es oscura y muestra anillos de crecimiento y líneas que van al centro.</p> <p>En AA el crecimiento de micelio rasante, ligeramente polvoso, color pistache que cambia hacia café al centro y es verde en las orillas. La cara inferior es semejante.</p>

Hongos fitopatógenos sometidos a luz cercana a UV

Estas pruebas se llevaron a cabo solamente con los hongos fitopatógenos (HF) que no esporularon en las primeras siembras. Se sometieron estos HF a la luz cercana a UV con el objetivo de inducir su esporulación. Se utilizaron medios de cultivo de PDA, Avena Agar (AA), Agua-Agar y Malta-Agar. Se sembraron dos hongos de cada aislamiento en cada medio (uno en la oscuridad a 25°C y otro expuesto a luz cercana a UV). Los micelios de los HF que crecieron en AA y PDA y en la oscuridad, presentaron las mismas características descritas para ellos en la tabla de Mycelia Sterilia. Todos los aislamientos que crecieron en Agua-Agar generalmente mostraron un micelio plano, de apariencia vellosa y transparente, con un débil color café hacia el centro. La mayoría de los HF que crecieron en Malta-Agar mostraron características muy semejantes a los que crecieron en PDA. En la siguiente tabla se muestran los micelios de los hongos que crecieron en medios de Malta-Agar y Agua-Agar no expuestos a luz cercana UV.

Aislamiento	Características del micelio no expuesto a luz cercana a UV
HMB 2-1/ HMB 2-2	Agua-Agar: El micelio es rasante con escasa zonas que sobresalen. Malta-Agar: El micelio tiene colores más pálidos que el que creció en PDA.
HCT 3/ HMBt-1	Agua-Agar: El micelio es parecido al que creció en AA pero ligeramente más oscuro. Malta-Agar: El micelio no presenta ninguna diferencia con el que creció en PDA, pero si tiñó el medio un poco más.
HCTq	Agua-Agar: El micelio presenta algunas floculaciones blancas cerca de la zona central. Malta-Agar: El micelio es de color blanco más intenso que el que creció en PDA. El medio se tiñó moderadamente de amarillo.
HCBj	Agua-Agar: El micelio es ligeramente algodonoso y ligeramente flocuoso. Malta-Agar: El micelio es más esponjo que el que creció en PDA, también es de color blanco, tiñe de amarillo intenso el medio. La cara inferior es estriada.
HCBt	Agua-Agar: El micelio es rasante con escasa zonas que sobresalen. Malta-Agar: El micelio es más algodonoso que el que creció en PDA.
HMB 5	Agua-Agar: El micelio presenta una pobre segmentación circular de crecimiento. Malta-Agar: El micelio es de color naranja, aunque algunas zonas son de micelio blanco, por lo demás es parecido al que creció en PDA.
HCBc	Agua-Agar: El micelio es ligeramente algodonoso de color blanco pálido. Malta-Agar: El micelio es más aterciopelado que el que creció en PDA. La cara inferior es estriada.

HMBv	Agua-Agar: El micelio es totalmente plano y con apariencia muy pobremente vellosa. Malta-Agar: El micelio es muy parecido al que creció en PDA.
HCT 13	Agua-Agar: El micelio es rasante. Malta-Agar: El micelio es ligeramente más oscuro que el que creció en PDA.
HMB 5-5	Agua-Agar: El micelio presenta una pobre segmentación circular de crecimiento. Malta-Agar: El micelio es aterciopelado y de color más grisáceo que el que creció en PDA. El medio se tiñó de naranja pálido.
HCBd	Agua-Agar: El micelio es de color café pálido, plano y sin segmentación de crecimiento. Los colores y las estructuras semejantes en la cara inferior. Malta-Agar: El micelio es de color gris con algunas estrías en la cara inferior, presenta círculos, de adentro hacia fuera, de color negro, café, naranja y blanco. El medio se tiñó de color naranja claro.

En la siguiente tabla se muestran los micelios de los hongos que crecieron en los cuatro medios de cultivo (PDA, AA, Agua-Agar y Malta-Agar) expuestos a luz cercana a UV.

Aislamiento	Características del micelio expuesto a luz cercana a UV
HMB 2-1/ HMB 2-2	UV PDA: El micelio fue similar al no expuesto. UV AA: El micelio fue similar al no expuesto. UV Agua-Agar: El micelio no presentó ninguna diferencia al compararlo con el no expuesto. UV Malta-Agar: El micelio no presentó ninguna diferencia al compararlo con el no expuesto.
HCT 3/ HMBt-1	UV PDA: El micelio no presentó ninguna diferencia al compararlo con el no expuesto. UV AA: El micelio fue similar al no expuesto. El perímetro verde es más claro. UV Agua-Agar: El micelio fue similar al no expuesto pero con varias áreas no pigmentadas. UV Malta-Agar: El micelio no presentó ninguna diferencia al compararlo con el no expuesto.
HCTq	UV PDA: El micelio fue similar al no expuesto. UV AA: El micelio fue similar al no expuesto, flocuosidades más abundantes. UV Agua-Agar: El micelio fue similar al no expuesto. UV Malta-Agar: El micelio fue similar al no expuesto con círculos concéntricos. También tiñó el medio de amarillo moderado.
HCBj	UV PDA: El micelio fue similar al no expuesto a UV, pero tiñó menos el medio. UV AA: El micelio fue similar al no expuesto. La cara inferior es de color verde pálido. UV Agua-Agar: El micelio fue similar al no expuesto pero más oscuro y simétrico. UV Malta-Agar: El micelio fue similar al no expuesto aunque menos algodonoso.

HCbt	<p>UV PDA: El micelio es menos esponjoso y de color verde más claro que el no expuesto.</p> <p>UV AA: El micelio fue similar al no expuesto pero con varias zonas sin pigmentar.</p> <p>UV Agua-Agar: El micelio no presentó ninguna diferencia al compararlo con el no expuesto.</p> <p>UV Malta-Agar: El micelio es menos algodonoso que él no expuesto.</p>
HMB 5	<p>UV PDA: El micelio fue similar al no expuesto, ligeramente menos aterciopelado.</p> <p>UV AA: El micelio fue similar al no expuesto, ligeramente más colorido.</p> <p>UV Agua-Agar: El micelio fue similar al no expuesto.</p> <p>UV Malta-Agar: El micelio fue similar al no expuesto, ligeramente más plano. Tiñó el medio de amarillo intenso.</p>
HCBe	<p>UV PDA: El micelio fue similar al no expuesto. La cara inferior es estriada.</p> <p>UV AA: El micelio es algodonoso y flocuoso. La cara inferior es estriada y oscura.</p> <p>UV Agua-Agar: El micelio fue similar al no expuesto pero más pálido.</p> <p>UV Malta-Agar: El micelio fue similar al no expuesto pero es más aterciopelado.</p>
HMBv	<p>UV PDA: El micelio no presenta ninguna diferencia al compararlo con el no expuesto.</p> <p>UV AA: El micelio no presentó ninguna diferencia al compararlo con el no expuesto.</p> <p>UV Agua-Agar: El micelio fue similar al no expuesto, pero menos micelio sobresaliente.</p> <p>UV Malta-Agar: El micelio es algodonoso fino con círculos grisáceos y anillos blancos y leves líneas naranjas (muy parecido a HCBw y HCBe).</p>
HCT 13	<p>UV PDA: El micelio es más pálido que él no expuesto y ligeramente menos algodonoso.</p> <p>UV AA: El micelio es rasante y con los colores del no expuesto pero más pálido.</p> <p>UV Agua-Agar: El micelio no presentó ninguna diferencia al compararlo con el no expuesto.</p> <p>UV Malta-Agar: El micelio es menos algodonoso que él no expuesto.</p>
HMB 5-5	<p>UV PDA: El micelio fue similar al no expuesto. Es más perceptible la segmentación anillada cerca del perímetro en la cara inversa.</p> <p>UV AA: El micelio no presentó ninguna diferencia al compararlo con el no expuesto.</p> <p>UV Agua-Agar: El micelio es más pálido, más compacto y con círculos no tan perceptibles al compararlo con el no expuesto.</p> <p>UV Malta-Agar: El micelio fue similar al no expuesto, de color gris más oscuro, la cara inferior es estriada y presenta círculos de crecimiento. El medio se tiñó de naranja pálido.</p>
HCbd	<p>UV PDA: El micelio es menos esponjoso que él no expuesto.</p> <p>UV AA: El micelio es ligeramente más vellosa que él no expuesto.</p> <p>UV Agua-Agar: El micelio fue similar al no expuesto, presentó círculos concéntricos.</p> <p>UV Malta-Agar: El micelio fue similar al no expuesto. La cara inferior mostró los mismos círculos y colores, aunque más pálidos.</p>

Hongos que formaron esporas

Colletotrichum sp. (Aislamiento HMBv)

Características del micelio	En PDA el micelio superficial es aterciopelado, algo rugoso y verde, con pequeñas manchas rosas, en el centro, el micelio es blanco y algodonoso. La cara inferior es estriada. El medio se tiñó moderadamente de amarillo. En AA el micelio superficial es verde con algunas zonas blancas esparcidas. La cara inferior presenta círculos color oscuro.	
Características de las esporas	Único aislamiento que esporuló expuesta a luz cercana a UV. Forma ovoide con ápice redondeado y base ligeramente en punta. Varias son gutuladas.	
Medida de las esporas	Largo: 9.07 – 17.02 μm . Media 12.02 μm	Ancho: 2.51 – 5.38 μm . Media 3.87 μm

Colletotrichum sp. (Aislamiento HCT 1)

Características del micelio	En PDA el micelio superficial es rugoso y con apariencia aterciopelada, color blanco muy abundante, y el perímetro color verde oscuro. La cara inferior es oscura con pocas estrías. En AA el micelio superficial es rasante, de color verde-café pálido, hacia el centro es más sobresaliente de color rosa. La cara inferior es similar pero con colores más opacos.	
Características de las esporas	Forma ovoide con ápice redondeado y base ligeramente en punta. La mayoría son gutuladas.	
Medida de las esporas	Largo: 11.18 a 17.85 μm . Media: 14.67 μm .	Ancho: 2.86 a 5.43 μm . Media: 3.92 μm

Colletotrichum sp. (Aislamientos HCBw y HCBC)

Características del micelio	En PDA el micelio superficial es color gris olivo, moderadamente algodonoso, presenta un poco de micelio sumergido color naranja más o menos perceptible. La cara inferior presenta micelio oscuro con apariencia plumosa. En AA el micelio es flocuoso, con aglomeraciones algodonosas muy pequeñas pero abundantes. El color es más pálido que el aislamiento sembrado en medio PDA.	
Características de las esporas	Forma ovoide con ápice redondeado y base ligeramente en punta. La mayoría son gutuladas.	
Medida de las esporas	Largo: 9.85 a 17.18 μm . Media: 13.51 μm .	Ancho: 2.93 a 5.14 μm . Media: 4.03 μm

Pestalotiopsis sp. (Aislamientos HMB 1 y HMB12)

Características del micelio	En PDA el micelio superficial es de apariencia cremosa de color blanco y la cara inferior es amarillenta con algo de micelio sumergido. En AA el micelio es algo más flocuoso, no tan abundante como en PDA pero la textura parece ser la misma.	
Características de las esporas	Esporas grises divididas de 3 a 4 segmentos, color gris y con estructuras similares a flagelos, dos en un extremo y uno en el otro.	
Medida de las esporas	Largo: 11.34 a 28.34 μm . Media: 19.84 μm .	Ancho: 4.67 a 8.03 μm . Media: 6.35 μm .

ANEXO II: Preparación de inóculo y evaluación de patogenicidad.

Los morfotipos de HF 13 (HCBw/HCBc) y HF 14 (HMB 12/HMB 1) fueron los únicos utilizados para la inoculación por esporas. De cada morfotipo se raspó, con espátulas, un poco de micelio superficial, éste se diluyó, en agua destilada estéril dentro de tubos de ensaye y se homogeneizó utilizando un aparato vortex. Se tomó una gota de esta dilución y se examinó al microscopio. El número de esporas por cuadrante se cuantificó utilizando una cámara de Neubauer con el fin de obtener la concentración deseada de 6.3×10^6 esporas/mL.

Los morfotipos de HF del 1 al 12 no esporularon, el inóculo de estos hongos se realizó con fragmentos de micelio. De cada morfotipo se raspó, con espátulas, todo el micelio superficial y se molió en morteros de porcelana hasta obtener una pasta. Esto se colocó en tubos de ensaye y se disolvió en 10 mL de agua destilada estéril, homogeneizando la mezcla con un vortex hasta obtener una concentración final de 50 mg/mL.

Las hojas que se cortaron de los cafetos, se escogieron de la zona media de la planta para que fueran de tamaños y edades similares. El procedimiento seguido con estas hojas se realizó en condiciones estériles. Las hojas se lavaron con agua destilada estéril y se secaron con tiras de algodón manejándose todo con pinzas de disección. Las hojas se colocaron con el envés hacia arriba en cámaras húmedas previamente elaboradas (cajas de Pétri estériles con 8 mL. de agua destilada y triángulo de cristal para elevar las hojas), la mayoría de las hojas se doblaron de los extremos para entrar mejor en las cámaras.

ANEXO III: Bioensayos de antagonismo

Para los bioensayos se utilizaron dos medios de cultivo:

PDA (Papa-Dextrosa-Agar)

PDA + extracto acuoso de hoja de café (20%) = papa 200 g., hojas de café 200 g., dextrosa 20 g., agar 15 g., 1 L agua destilada.

En una caja de Petri con el medio de cultivo se inoculó un trozo de micelio de cada hongo de un tamaño de 5 mm cada hongo competidor, extraídos de los bordes finales de las colonias [Shearer y Zare-Maivan, 1988]. En una caja de 9 cm de diámetro, la separación entre inóculos fue de 4 cm. Las cajas fueron selladas con parafilm e incubadas en la oscuridad a 25 °C.

La forma para enfrentarlos fue la siguiente:

Hongo fitopatógeno	vs.	Hongo endófito	Repetición
X		Y	X - Y a
			X - Y b
			X - Y c

Y para calcular el Índice de Antagonismo (IA) se observó cuantas veces en las tres repeticiones se presentaron los efectos ya mencionados en la Sección de Materiales y Métodos.

Ejemplo: fitopatógeno 5 (especie 1) vs endófito 10 (especie 2)

$$IA = [n (A)] + [n (B)] + [n (C)] + [0 (D)] + [0 (E)]$$

$$IA = [0 (-2)] + [1 (-1)] + [0 (0)] + [2 (1)] + [0 (2)] = 1$$

En cero de tres repeticiones ocurrió el efecto **A**.

En una de tres repeticiones ocurrió el efecto **B**.

En cero de tres repeticiones ocurrió el efecto **C**.

En dos de tres repeticiones ocurrió el efecto **D**.

En cero de tres repeticiones ocurrió el efecto **E**.

Por lo tanto el HF 5 tiene categoría de **inhibidor** frente al HE 10

RESULTADOS DE INDICE DE ANTAGONISMO (IA) EN PDA

Los valores del IA para cada hongo se expresan como porcentajes según el número de todas sus interacciones.

$$\% IA = \left(\frac{n(\text{Inhibido})}{\text{Total de enfrentamientos}} + \frac{n(\text{Bloqueo mutuo})}{\text{Total de enfrentamientos}} + \frac{n(\text{Inhibidor})}{\text{Total de enfrentamientos}} \right) \times 100$$

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO												RESULTADO		
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D	+		n	E
F	HE 1	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
I	HE 2	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
T	HE 3	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
O	HE 4	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	2
P	HE 5	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
A	HE 6	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
T	HE 7	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
O	HE 8	0	2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
G	HE 9	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
	HE 10	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
4	HE 11	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1
		IA				Inhibido				Bloqueo mutuo				Inhibidor		
		Valores (%)				9.10				18.18				72.72		

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO												RESULTADO		
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D	+		n	E
F	HE 1	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	2
I	HE 2	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
T	HE 3	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
O	HE 4	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1
P	HE 5	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
A	HE 6	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1
T	HE 7	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1
O	HE 8	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
G	HE 9	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
	HE 10	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1
5	HE 11	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
		IA				Inhibido				Bloqueo mutuo				Inhibidor		
		Valores (%)				9.10				0				90.90		

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO					
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E	
F	HE 1	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0	
I	HE 2	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1	
T	HE 3	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2	
O	HE 4	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3	
P	HE 5	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3	
A	HE 6	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0	
T	HE 7	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1	
O	HE 8	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0	
G	HE 9	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2	
	HE 10	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0	
6	HE 11	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1	
		IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor									
		Valores (%)		9.10		36.36		54.54									

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO					
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E	
F	HE 1	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1	
I	HE 2	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3	
T	HE 3	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1	
O	HE 4	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2	
P	HE 5	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2	
A	HE 6	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1	
T	HE 7	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1	
O	HE 8	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1	
G	HE 9	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0	
	HE 10	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0	
7	HE 11	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1	
		IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor									
		Valores (%)		9.10		18.18		72.72									

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO					
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E	
F	HE 1	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1	
I	HE 2	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2	
T	HE 3	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1	
O	HE 4	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2	
P	HE 5	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2	
A	HE 6	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1	
T	HE 7	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0	
O	HE 8	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0	
G	HE 9	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0	
	HE 10	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1	
8	HE 11	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2	
		IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor									
		Valores (%)		9.10		27.27		63.63									

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E
F	HE 1	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
I	HE 2	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
T	HE 3	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
O	HE 4	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
P	HE 5	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
A	HE 6	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
T	HE 7	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
O	HE 8	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
G	HE 9	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HE 10	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1
9	HE 11	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	2
		IA					Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor			
		Valores (%)					0			27.27			72.72			

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E
F	HE 1	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
I	HE 2	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
T	HE 3	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
O	HE 4	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
P	HE 5	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
A	HE 6	1	-2	+	1	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-3
T	HE 7	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
O	HE 8	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
G	HE 9	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HE 10	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
11	HE 11	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
		IA					Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor			
		Valores (%)					9.10			54.54			36.36			

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E
F	HE 1	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
I	HE 2	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
T	HE 3	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
O	HE 4	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
P	HE 5	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
A	HE 6	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
T	HE 7	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1
O	HE 8	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
G	HE 9	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
	HE 10	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
12	HE 11	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
		IA					Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor			
		Valores (%)					18.18			18.18			63.63			

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E
E	HF 4	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
N	HF 5	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-2
D	HF 6	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
O	HF 7	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
	HF 8	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
1	HF 9	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
	HF 11	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
	HF 12	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
		IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor								
		Valores (%)		75		12.5		12.5								

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E
E	HF 4	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
N	HF 5	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
D	HF 6	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
O	HF 7	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
	HF 8	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
2	HF 9	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
	HF 11	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
	HF 12	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
		IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor								
		Valores (%)		100		0		0								

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E
E	HF 4	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
N	HF 5	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
D	HF 6	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
O	HF 7	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
	HF 8	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
3	HF 9	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
	HF 11	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
	HF 12	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
		IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor								
		Valores (%)		100		0		0								

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO											RESULTADO			
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D		+	n	E
E	HF 4	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-2
N	HF 5	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
D	HF 6	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
O	HF 7	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
	HF 8	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
4	HF 9	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 12	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
		IA			Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor					
		Valores (%)			75			25			0					

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO											RESULTADO			
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D		+	n	E
E	HF 4	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
N	HF 5	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
D	HF 6	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
O	HF 7	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
	HF 8	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
5	HF 9	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 12	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
		IA			Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor					
		Valores (%)			87.5			12.5			0					

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO											RESULTADO			
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D		+	n	E
E	HF 4	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
N	HF 5	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
D	HF 6	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
O	HF 7	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
	HF 8	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
6	HF 9	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	1	1	+	1	2	3
	HF 12	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
		IA			Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor					
		Valores (%)			62.5			25			12.5					

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO											RESULTADO			
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D		+	n	E
E	HF 4	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
N	HF 5	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
D	HF 6	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
O	HF 7	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
	HF 8	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
7	HF 9	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 12	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
		IA					Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor			
		Valores (%)					75			25			0			

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO											RESULTADO			
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D		+	n	E
E	HF 4	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
N	HF 5	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
D	HF 6	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
O	HF 7	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1
	HF 8	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
8	HF 9	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 12	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
		IA					Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor			
		Valores (%)					0			50			50			

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO											RESULTADO			
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D		+	n	E
E	HF 4	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
N	HF 5	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
D	HF 6	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
O	HF 7	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 8	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
9	HF 9	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 12	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
		IA					Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor			
		Valores (%)					25			62.5			12.5			

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO											RESULTADO			
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D	+	n	E	
E	HF 4	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
N	HF 5	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
D	HF 6	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
O	HF 7	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
	HF 8	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
10	HF 9	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 12	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
		IA					Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor			
		Valores (%)					25			62.5			12.5			

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO											RESULTADO			
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D	+	n	E	
E	HF 4	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
N	HF 5	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
D	HF 6	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
O	HF 7	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
	HF 8	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
11	HF 9	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-2
	HF 11	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
	HF 12	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
		IA					Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor			
		Valores (%)					100			0			0			

Una vez obtenidos los **IA** de cada uno de los hongos en PDA, se pudo establecer cuáles eran los de mayor capacidad antagonica para utilizar en el bioensayo de PDA adicionado con extracto de café al 20%. Ya se mencionó en la **Valoración del Índice de Antagonismo** en el apartado de **Resultados** que algunos hongos fueron omitidos por mostrar baja capacidad antagonica en PDA. Del mismo modo las interacciones en PDA en las que el HF obtuvo categoría de inhibidor no se repitieron en PDA con extracto de hoja de café al 20%.

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D	+	n	E	
F	HE 6	1	-2	+	0	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	0
I																
T	HE 8	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
O																
	HE 9	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
9																
		IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor								
		Valores (%)		0		100		0								

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D	+	n	E	
F	HE 4	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
I	HE 5	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
T	HE 6	3	-2	+	0	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-6
O	HE 7	3	-2	+	0	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-6
	HE 8	2	-2	+	0	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-4
11	HE 9	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HE 10	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
		IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor								
		Valores (%)		42.86		42.86		14.28								

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n	D	+	n	E	
F	HE 1	1	-2	+	1	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-2
I	HE 4	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	2	1	+	0	2	2
T	HE 8	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
O	HE 10	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
12																
		IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor								
		Valores (%)		50		0		50								

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n A	+	n B	+	n C	+	n D	+	n E						
E																
N	HF 6	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
D																
O	HF 12	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	1	1	+	1	2	2
1																
		IA				Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor				
		Valores (%)				50			0			50				

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n A	+	n B	+	n C	+	n D	+	n E						
E																
N	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
D																
O	HF 12	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
4																
		IA				Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor				
		Valores (%)				50			50			0				

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n A	+	n B	+	n C	+	n D	+	n E						
E																
N																
D	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
O																
5																
		IA				Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor				
		Valores (%)				0			100			0				

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n A	+	n B	+	n C	+	n D	+	n E						
E	HF 6	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
N																
D	HF 9	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	0	1	+	1	2	0
O	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	0	1	+	3	2	6
6																
		IA				Inhibido			Bloqueo mutuo			Inhibidor				
		Valores (%)				33.33			33.33			33.33				

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E
E N D O	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	0	1	+	3	2	6
			IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor							
			Valores (%)		0		0		100							

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E
E N D O	HF 4	0	-2	+	0	-1	+	0	0	+	3	1	+	0	2	3
	HF 5	0	-2	+	1	-1	+	0	0	+	2	1	+	0	2	1
	HF 6	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
	HF 7	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
	HF 9	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	1	0	+	0	1	+	2	2	4
8	HF 12	0	-2	+	0	-1	+	2	0	+	1	1	+	0	2	1
			IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor							
		Valores (%)		14.28		14.28		71.44								

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E
E N D O	HF 4	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
	HF 6	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
	HF 7	0	-2	+	2	-1	+	0	0	+	1	1	+	0	2	-1
	HF 9	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
	HF 11	0	-2	+	0	-1	+	3	0	+	0	1	+	0	2	0
9			IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor							
			Valores (%)		40		60		0							

ESPECIE 1	ESPECIE 2	INDICE DE ANTAGONISMO										RESULTADO				
		n	A	+	n	B	+	n	C	+	n		D	+	n	E
E N D O	HF 4	0	-2	+	1	-1	+	1	0	+	1	1	+	0	2	0
	HF 6	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
	HF 7	0	-2	+	2	-1	+	1	0	+	0	1	+	0	2	-2
	HF 11	0	-2	+	3	-1	+	0	0	+	0	1	+	0	2	-3
	HF 12	0	-2	+	1	-1	+	2	0	+	0	1	+	0	2	-1
10			IA		Inhibido		Bloqueo mutuo		Inhibidor							
			Valores (%)		80		20		0							

ANEXO IV: Pruebas estadísticas

Tabla de Crecimiento promedio \pm desviación estándar del área de los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos en las pruebas de antagonismo en PDA ($n = 3$) $P = 0.000$. Los valores de las casillas claras pertenecen a los HE y los de las casillas oscuras a los HF. La primera fila de casillas claras (en negritas) contiene los valores de los controles de los endófitos y el número del endófito correspondiente. La primera columna de casillas oscuras (en negritas) contiene los valores de los controles de los fitopatógenos y el número del fitopatógeno correspondiente. El primer renglón en cada casilla muestra el valor de las mediciones a los 10 días y el segundo a los 20 días. Las casillas con sólo un renglón indican que los hongos crecieron hasta su máximo antes de los 20 días. Las casillas con “*” indican inhibición significativa del hongo respectivo.

HE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
HF	50.86 \pm 1.74	48.01 \pm 3.69	47.08 \pm 5.98	43.17 \pm 2.77	40.94 \pm 3.23	42.37 \pm 2.70	26.91 \pm 2.68	15.35 \pm 1.36	13.79 \pm 1.32	7.20 \pm 0.41	4.08 \pm 0.28
(4)	7.82 \pm 1.88 17.79 \pm 2.46	10.24 \pm 0.40 21.83 \pm 0.37	8.77 \pm 1.92 19.42 \pm 3.34	7.06 \pm 1.48 17.11 \pm 3.68	6.77 \pm 1.71 21.83 \pm 0.37	10.48 \pm 0.65 22.34 \pm 1.76	7.77 \pm 2.39 18.05 \pm 4.07	6.25 \pm 0.58 14.74 \pm 1.13	6.60 \pm 1.57 16.38 \pm 2.51	8.37 \pm 1.14 16.58 \pm 2.70	8.43 \pm 1.26 20.35 \pm 2.08
6.51 \pm 1.63 18.71 \pm 4.21	*28.84 \pm 0.83	*24.70 \pm 5.01	*24.12 \pm 2.18	*28.71 \pm 2.58	*29.69 \pm 2.12	*28.57 \pm 0.82	*20.59 \pm 1.98 26.62 \pm 1.54	15.49 \pm 1.12 22.14 \pm 0.95	12.10 \pm 0.65 21.96 \pm 0.55	7.68 \pm 0.93 20.68 \pm 3.42	*3.88 \pm 0.40 9.69 \pm 0.61
(5)	10.11 \pm 0.71 21.95 \pm 1.07	10.24 \pm 0.25 22.43 \pm 0.60	8.60 \pm 0.68 20.02 \pm 1.24	7.40 \pm 0.76 17.22 \pm 1.83	8.06 \pm 0.87 17.62 \pm 1.21	8.00 \pm 1.52 18.72 \pm 2.87	8.07 \pm 0.57 19.09 \pm 0.77	9.18 \pm 1.88 19.87 \pm 4.69	11.15 \pm 0.39 22.62 \pm 0.72	9.40 \pm 0.87 18.25 \pm 1.43	9.47 \pm 0.43 21.46 \pm 0.58
8.15 \pm 0.77 21.39 \pm 1.43	*27.45 \pm 0.54	*22.82 \pm 4.18	*29.84 \pm 1.17	*29.08 \pm 1.20	*28.84 \pm 0.85	*36.89 \pm 1.62	*21.06 \pm 0.91 26.88 \pm 1.20	13.20 \pm 1.55 20.33 \pm 2.85	*12.11 \pm 0.67 19.79 \pm 2.40	*5.78 \pm 1.25 15.93 \pm 1.57	*3.5 \pm 0.64 9.44 \pm 1.36
(6)	8.07 \pm 0.06 18.33 \pm 1.85	8.50 \pm 0.36 19.71 \pm 0.76	8.26 \pm 0.40 18.60 \pm 1.68	8.42 \pm 0.37 19.96 \pm 1.08	8.19 \pm 0.30 18.68 \pm 0.75	8.06 \pm 0.15 17.76 \pm 0.59	8.42 \pm 0.31 19.64 \pm 1.03	8.36 \pm 0.30 18.77 \pm 2.23	*7.98 \pm 0.24 17.84 \pm 0.22	*7.44 \pm 0.58 16.54 \pm 1.13	7.48 \pm 0.55 17.75 \pm 0.73
8.37 \pm 0.08 22.10 \pm 0.52	29.01 \pm 1.29	*29.46 \pm 1.01	*29.76 \pm 1.29	*27.08 \pm 1.54	*27.93 \pm 1.12	33.69 \pm 0.88	*20.99 \pm 2.33 23.86 \pm 3.01	14.18 \pm 1.17 20.50 \pm 2.36	13.93 \pm 0.21 24.61 \pm 0.79	5.99 \pm 1.99 17.29 \pm 3.60	*3.88 \pm 0.15 10.38 \pm 0.45
(7)	8.80 \pm 1.93 17.21 \pm 1.49	7.41 \pm 0.62 17.18 \pm 1.20	8.76 \pm 1.89 17.27 \pm 0.98	10.77 \pm 2.41 20.36 \pm 3.40	8.96 \pm 1.80 17.06 \pm 1.10	7.02 \pm 0.22 16.06 \pm 1.28	8.51 \pm 2.12 18.72 \pm 2.02	6.72 \pm 2.20 15.11 \pm 4.15	6.41 \pm 0.38 17.00 \pm 1.04	*5.69 \pm 0.68 14.16 \pm 0.87	5.93 \pm 0.06 17.31 \pm 1.14
7.10 \pm 0.12 19.43 \pm 0.63	*29.79 \pm 3.36	*28.64 \pm 2.85	*29.58 \pm 2.15	*24.95 \pm 3.94	*29.01 \pm 1.54	*35.41 \pm 3.35	*19.02 \pm 3.07 23.98 \pm 4.02	15.73 \pm 1.50 24.15 \pm 3.14	12.37 \pm 0.34 23.39 \pm 1.65	*5.39 \pm 1.67 17.04 \pm 2.31	*3.40 \pm 0.27 8.87 \pm 0.26
(8)	7.10 \pm 1.82 15.68 \pm 3.22	6.42 \pm 1.25 15.60 \pm 2.12	7.58 \pm 1.78 16.42 \pm 2.08	6.45 \pm 1.29 14.20 \pm 2.66	7.93 \pm 2.57 16.07 \pm 3.73	7.11 \pm 1.83 16.84 \pm 3.90	*4.56 \pm 1.10 11.32 \pm 3.58	8.56 \pm 0.39 16.65 \pm 0.50	6.11 \pm 2.18 16.26 \pm 4.29	7.44 \pm 0.67 15.35 \pm 1.78	9.34 \pm 0.78 20.62 \pm 0.45
6.00 \pm 2.35 15.59 \pm 5.19	*31.21 \pm 2.55	*30.18 \pm 0.55	*29.10 \pm 2.05	*29.82 \pm 1.10	*29.86 \pm 1.59	*30.93 \pm 1.82	*23.39 \pm 2.14 28.11 \pm 3.35	15.77 \pm 0.89 22.70 \pm 0.90	11.84 \pm 0.75 21.48 \pm 3.36	4.87 \pm 1.49 18.70 \pm 3.89	*3.69 \pm 0.29 10.41 \pm 0.84
(9)	3.15 \pm 0.45 8.24 \pm 0.63	3.00 \pm 0.13 8.54 \pm 0.26	2.75 \pm 0.07 7.59 \pm 0.16	2.80 \pm 0.09 8.30 \pm 0.48	3.29 \pm 0.21 9.19 \pm 0.96	3.26 \pm 0.62 9.25 \pm 1.60	3.55 \pm 0.30 10.09 \pm 0.60	2.97 \pm 0.23 8.38 \pm 0.40	3.00 \pm 0.19 8.68 \pm 0.59	2.03 \pm 0.42 7.59 \pm 0.16	2.95 \pm 0.42 8.32 \pm 1.42
2.73 \pm 0.21 8.04 \pm 0.33	*34.10 \pm 0.65	*36.71 \pm 0.57	*34.12 \pm 4.00	*33.16 \pm 0.46	*31.35 \pm 0.90	39.15 \pm 1.90	*21.52 \pm 2.92 26.90 \pm 4.23	17.48 \pm 1.56 26.07 \pm 2.87	13.57 \pm 0.58 26.39 \pm 0.65	*5.93 \pm 0.06 14.16 \pm 0.87	*3.32 \pm 0.07 8.98 \pm 0.06
(11)	13.16 \pm 1.12 18.01 \pm 3.16	14.23 \pm 0.23 20.30 \pm 0.49	12.93 \pm 0.73 16.98 \pm 1.86	13.72 \pm 0.39 18.90 \pm 0.55	14.21 \pm 0.51 19.42 \pm 0.95	*13.63 \pm 0.26 17.27 \pm 1.02	14.47 \pm 0.26 20.01 \pm 0.57	12.75 \pm 0.61 17.54 \pm 0.63	15.86 \pm 0.48 22.11 \pm 0.66	15.55 \pm 2.28 21.31 \pm 2.67	16.71 \pm 1.19 24.11 \pm 1.11
14.86 \pm 0.53 24.45 \pm 0.19	*24.46 \pm 9.03	*27.60 \pm 1.76	*22.95 \pm 6.35	28.76 \pm 1.57	29.58 \pm 0.70	41.16 \pm 3.51	23.74 \pm 0.41 32.09 \pm 0.87	13.43 \pm 3.33 20.54 \pm 5.13	14.21 \pm 0.94 23.78 \pm 1.28	6.81 \pm 1.73 17.37 \pm 2.00	*3.85 \pm 0.34 9.99 \pm 0.99
(12)	8.14 \pm 2.10 16.46 \pm 2.56	9.46 \pm 1.25 19.42 \pm 1.72	8.78 \pm 1.37 18.74 \pm 1.91	9.13 \pm 1.25 18.97 \pm 1.94	9.22 \pm 2.06 19.11 \pm 2.23	10.43 \pm 0.90 20.82 \pm 1.40	8.42 \pm 0.57 19.62 \pm 0.75	*9.46 \pm 2.15 18.39 \pm 3.32	10.60 \pm 0.44 22.32 \pm 0.96	*8.79 \pm 1.02 17.51 \pm 1.67	10.23 \pm 2.04 22.10 \pm 3.50
10.51 \pm 0.47 24.60 \pm 2.09	30.79 \pm 2.80	*27.63 \pm 1.89	*28.72 \pm 0.03	27.27 \pm 1.64	*26.99 \pm 1.57	*28.31 \pm 0.18	*21.25 \pm 0.42 27.11 \pm 0.48	15.46 \pm 0.28 22.85 \pm 1.10	*12.07 \pm 0.24 19.80 \pm 0.67	6.43 \pm 2.18 18.30 \pm 2.98	*3.54 \pm 0.27 9.07 \pm 0.28

Tabla de Crecimiento promedio \pm desviación estándar del área de los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos en las pruebas de antagonismo en PDA con extracto de hoja de café (20%) (n = 3) P = 0.000. Los valores de las casillas claras pertenecen a los HE y los de las casillas oscuras a los HF. La primera fila de casillas claras (más ancha y en negritas) contiene los valores de los controles de los endófitos y el número del endófito correspondiente. La primera columna de casillas oscuras (más ancha y en negritas) contiene los valores de los controles de los fitopatógenos y el número del fitopatógeno correspondiente. El primer renglón en cada casilla muestra el valor de las mediciones a los 5 días y el segundo a los 10 días. Las casillas con “*” indican inhibición significativa del hongo respectivo. Las casillas con líneas punteadas indican que esos enfrentamientos no se realizaron.

HE	1	4	5	6	7	8	9	10
HF	20.48 \pm 0.56 41.49 \pm 8.03	14.44 \pm 1.47 36.45 \pm 1.74	19.43 \pm 0.31 46.56 \pm 0.92	16.56 \pm 1.46 46.72 \pm 2.57	5.91 \pm 0.60 27.22 \pm 1.58	4.29 \pm 0.39 18.47 \pm 4.34	2.75 \pm 0.29 11.36 \pm 0.52	17.11 \pm 0.63 41.37 \pm 0.73
(4)	---	---	---	---	---	3.08 \pm 0.09 8.79 \pm 0.12	3.26 \pm 0.24 10.75 \pm 0.42	*2.56 \pm 0.26 5.47 \pm 2.13
3.40 \pm 0.14 10.55 \pm 0.47	---	---	---	---	---	4.72 \pm 0.22 17.86 \pm 0.50	2.53 \pm 0.26 10.65 \pm 1.42	*14.10 \pm 1.60 31.11 \pm 2.91
(5)	---	---	---	---	---	3.96 \pm 0.19 11.99 \pm 0.85	---	---
3.62 \pm 0.27 12.30 \pm 0.29	---	---	---	---	---	5.02 \pm 0.59 18.33 \pm 2.14	---	---
(6)	1.92 \pm 0.09 7.33 \pm 0.32	---	---	1.87 \pm 0.13 6.82 \pm 0.19	---	1.73 \pm 0.23 6.44 \pm 0.33	2.10 \pm 0.28 7.51 \pm 0.22	1.84 \pm 0.07 6.43 \pm 0.92
1.92 \pm 0.13 7.64 \pm 0.47	*17.64 \pm 1.51 28.64 \pm 2.42	---	---	*15.48 \pm 1.09 34.47 \pm 2.47	---	4.58 \pm 0.27 19.06 \pm 0.89	2.62 \pm 0.07 10.93 \pm 0.36	*17.89 \pm 2.99 30.72 \pm 4.88
(7)	---	---	---	---	---	2.85 \pm 0.32 9.30 \pm 0.78	2.82 \pm 0.06 9.83 \pm 0.31	2.93 \pm 0.40 8.70 \pm 0.88
3.08 \pm 0.07 10.58 \pm 0.22	---	---	---	---	---	4.87 \pm 0.36 17.99 \pm 2.09	2.55 \pm 0.06 10.81 \pm 0.29	*14.78 \pm 0.47 25.80 \pm 2.83
(9)	---	---	---	1.21 \pm 0.10 4.27 \pm 0.14	---	1.29 \pm 0.10 4.13 \pm 0.11	1.28 \pm 0.15 4.03 \pm 0.27	---
1.19 \pm 0.05 4.48 \pm 0.41	---	---	---	16.95 \pm 0.37 43.98 \pm 0.72	---	4.68 \pm 0.29 18.13 \pm 2.53	2.26 \pm 0.21 9.91 \pm 0.97	---
(11)	---	*6.05 \pm 0.37 17.96 \pm 1.22	*5.74 \pm 0.57 15.67 \pm 0.69	*6.31 \pm 0.89 16.55 \pm 1.32	*5.94 \pm 0.46 16.90 \pm 1.26	*5.72 \pm 1.19 15.15 \pm 1.85	6.18 \pm 0.74 19.71 \pm 0.35	*4.64 \pm 1.30 16.04 \pm 2.14
6.28 \pm 0.40 22.04 \pm 0.24	---	*15.56 \pm 0.62 25.19 \pm 1.51	*17.83 \pm 0.93 29.17 \pm 0.93	*14.88 \pm 0.98 38.44 \pm 0.91	*7.67 \pm 0.85 28.94 \pm 0.46	3.99 \pm 0.52 18.44 \pm 2.31	2.23 \pm 0.31 9.73 \pm 0.72	*13.73 \pm 1.05 27.56 \pm 1.22
(12)	1.14 \pm 0.50 4.52 \pm 2.20	1.12 \pm 0.15 4.22 \pm 0.65	---	---	---	1.20 \pm 0.23 4.14 \pm 0.54	---	1.26 \pm 0.27 3.33 \pm 1.28
1.11 \pm 0.25 3.84 \pm 0.79	20.68 \pm 0.45 38.00 \pm 0.34	15.97 \pm 1.66 33.16 \pm 0.69	---	---	---	5.24 \pm 1.29 20.60 \pm 3.52	---	*12.60 \pm 2.36 25.16 \pm 5.55

En la Tabla siguiente se muestran las áreas de crecimiento promedio de los micelios de HE y HF, a los 15 y 20 días, en cada enfrentamiento en medio de cultivo PDA con extracto de hojas de café al 20%.

Tabla de Crecimiento promedio \pm desviación estándar del área de los hongos endófitos y los hongos fitopatógenos en las pruebas de antagonismo en PDA con extracto de hoja de café (20%) (n = 3) P = 0.000. Los valores de las casillas claras pertenecen a los HE y los de las casillas oscuras a los HF. La primera fila de casillas claras (más ancha y en negritas) contiene los valores de los controles de los endófitos y el número del endófito correspondiente. La primera columna de casillas oscuras (más ancha y en negritas) contiene los valores de los controles de los fitopatógenos y el número del fitopatógeno correspondiente. El primer renglón en cada casilla muestra el valor de las mediciones a los 15 días y el segundo a los 20 días. Las casillas con “*” indican inhibición significativa del hongo respectivo. Las casillas con líneas punteadas indican que esos enfrentamientos no se realizaron

HE	1	4	5	6	7	8	9	10
HF	48.56 \pm 0.53 49.17 \pm 0.64	48.42 \pm 0.90 48.42 \pm 0.90	49.41 \pm 0.65 49.41 \pm 0.65	49.48 \pm 0.58 49.48 \pm 0.58	46.63 \pm 1.79 49.56 \pm 0.59	34.79 \pm 7.60 43.70 \pm 6.59	21.14 \pm 0.84 28.47 \pm 0.87	48.22 \pm 0.58 48.22 \pm 0.58
(4)	---	---	---	---	---	*13.26 \pm 0.18 14.68 \pm 0.46	*17.20 \pm 1.00 21.00 \pm 0.75	*8.89 \pm 2.92 10.64 \pm 2.75
19.83 \pm 0.88 28.41 \pm 0.74	---	---	---	---	---	32.60 \pm 1.27 44.46 \pm 0.09	19.86 \pm 0.39 23.74 \pm 0.18	*35.99 \pm 2.30 36.40 \pm 2.64
(5)	---	---	---	---	---	*17.10 \pm 0.60 20.39 \pm 0.21	---	---
20.32 \pm 0.51 29.29 \pm 0.63	---	---	---	---	---	35.54 \pm 5.61 45.25 \pm 2.90	---	---
(6)	13.69 \pm 0.45 15.79 \pm 1.17	---	---	12.81 \pm 0.69 15.86 \pm 0.66	---	12.35 \pm 0.39 16.22 \pm 0.83	15.40 \pm 0.55 21.70 \pm 0.90	*9.27 \pm 2.40 11.20 \pm 2.89
15.96 \pm 0.06 24.13 \pm 0.66	*30.09 \pm 2.78 30.27 \pm 2.75	---	---	*37.83 \pm 1.35 41.33 \pm 0.48	---	*29.98 \pm 2.67 33.69 \pm 1.40	*18.29 \pm 0.07 21.22 \pm 0.56	*33.91 \pm 1.27 34.59 \pm 1.03
(7)	---	---	---	---	---	*15.17 \pm 1.47 18.09 \pm 1.93	16.62 \pm 1.23 21.35 \pm 1.48	12.96 \pm 1.78 16.35 \pm 2.64
18.22 \pm 0.63 26.12 \pm 0.39	---	---	---	---	---	34.54 \pm 3.20 44.81 \pm 2.79	*18.83 \pm 0.49 22.23 \pm 1.13	*28.67 \pm 2.72 28.84 \pm 2.81
(9)	---	---	---	8.05 \pm 0.37 9.17 \pm 0.23	---	6.75 \pm 0.25 8.55 \pm 0.58	6.97 \pm 0.65 9.55 \pm 1.95	---
8.00 \pm 0.53 11.92 \pm 0.71	---	---	---	47.55 \pm 0.28 47.55 \pm 0.28	---	32.61 \pm 4.10 46.10 \pm 2.05	21.60 \pm 0.67 26.76 \pm 1.41	---
(11)	---	*25.78 \pm 1.17 25.78 \pm 1.17	*20.87 \pm 1.27 20.97 \pm 1.17	*18.31 \pm 1.40 18.31 \pm 1.40	*20.76 \pm 1.49 20.76 \pm 1.49	*19.37 \pm 1.66 19.37 \pm 1.66	*27.31 \pm 0.67 30.06 \pm 0.59	25.44 \pm 4.91 38.40 \pm 8.20
36.26 \pm 0.29 46.20 \pm 0.77	---	*25.80 \pm 1.36 25.80 \pm 1.36	*29.78 \pm 0.66 29.78 \pm 0.66	48.00 \pm 0.31 49.71 \pm 0.18	46.50 \pm 0.45 49.11 \pm 0.12	32.98 \pm 6.22 39.55 \pm 8.51	*16.24 \pm 0.91 18.26 \pm 0.66	*30.61 \pm 1.57 30.61 \pm 1.57
(12)	*8.54 \pm 4.57 10.05 \pm 5.64	8.02 \pm 1.14 10.68 \pm 2.45	---	---	---	*7.38 \pm 0.68 9.62 \pm 0.49	---	*4.88 \pm 2.83 5.66 \pm 3.70
8.37 \pm 1.48 15.71 \pm 2.20	43.27 \pm 4.89 44.31 \pm 5.73	*36.03 \pm 4.38 36.03 \pm 4.38	---	---	---	38.95 \pm 4.11 48.42 \pm 0.30	---	*29.89 \pm 4.90 32.17 \pm 3.32