

Hongos endófitos aislados de *Manilkara zapota* y su actividad antibacteriana y antifúngica

Endophytic fungi isolated from *Manilkara zapota* and their antibacterial and antifungal activity

Laura Navarro-de-la-Fuente, Alejandro Salinas-Castro, Ángel Trigos

Centro de Investigación en Micología Aplicada, Universidad Veracruzana. Médicos 5, Unidad del Bosque, CP 91010, Xalapa, Veracruz, México.

RESUMEN

Antecedentes: Los hongos endófitos aislados de plantas medicinales son una fuente importante de metabolitos secundarios con potencial biotecnológico.

Objetivos: Identificar los hongos presentes en hojas y frutos de *Manilkara zapota* y evaluar la actividad antimicrobiana de sus extractos.

Métodos: Se aislaron hongos endófitos de frutos y hojas de *M. zapota* y se cultivaron en medios de cultivo. Se evaluaron extractos crudos, obtenidos con una mezcla 1:1 de cloroformo-metanol, en ensayos de actividad antibacteriana con microorganismos patógenos. La concentración mínima inhibitoria, bactericida y el porcentaje de inhibición de crecimiento con bacterias patógenas, así como el porcentaje de inhibición fúngica frente a hongos fitopatógenos, fue evaluado para el extracto que arrojó la mayor actividad antibacteriana.

Resultados y conclusiones: Se obtuvieron 20 aislados y se identificaron nueve géneros de hongos endófitos en *M. zapota*: *Curvularia*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis*, *Sistotrema* y *Stereum*. El extracto de la biomasa de *Curvularia* sp. CIMA-116B mostró los mejores resultados de actividad antibacteriana, presentó actividad inhibitoria con *Clavibacter michiganensis*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* y baja actividad antifúngica con *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium solani*. Estos resultados evidencian la importancia de los hongos endófitos como productores de metabolitos bioactivos con actividad antimicrobiana.

Palabras clave: bioactividad, chicozapote, extractos fúngicos

ABSTRACT

Background: Endophytic fungi isolated from medicinal plants are an important source of secondary metabolites with biotechnological potential.

Objectives: To identify the fungi present in the leaves and fruits of *Manilkara zapota* and to evaluate the antimicrobial activity of their extracts.

Methods: Endophytic fungi were isolated from fruits and leaves of *M. zapota* and cultivated in growth media. Antibacterial activity of 1:1 chloroform-methanol crude extracts was evaluated in antibacterial assays with pathogenic microorganisms. The minimum inhibitory and bactericidal concentrations and the percentage of growth inhibition with pathogenic bacteria were calculated for the extract that showed the highest activity, as well as the percentage of fungal inhibition against phytopathogenic fungi.

Results and conclusions: Twenty endophytic fungal isolates were obtained, and nine different genera were identified associated with *M. zapota*: *Curvularia*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis*, *Sistotrema* and *Stereum*. The biomass extract of *Curvularia* sp. CIMA-116B showed the best results of antibacterial activity. Moreover, it showed inhibitory activity with *Clavibacter michiganensis*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* and low antifungal activity with *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani*. These results show the importance of endophytic fungi as a bioactive metabolites source with antimicrobial activity.

Keywords: bioactivity, sapodilla, fungal extracts

ARTICLE HISTORY

Received 13 July 2021 / Accepted 3 March 2022

Published on line: 21 July 2022

CORRESPONDING AUTHOR

✉ Ángel Trigos, e-mail: atrigos@uv.mx

ORCID: 0000-0001-6112-2288

INTRODUCCIÓN

Las plantas de uso medicinal se han convertido en una importante fuente de metabolitos secundarios con propiedades bioactivas de interés para la industria farmacéutica, la agricultura y la medicina (Joseph y Priya 2011, Gouda et al. 2016), lo que ha llevado en algunos casos, a la explotación masiva de los recursos y la consecuente pérdida de biodiversidad (Yin y Sun 2011, Ran et al. 2017). La producción de compuestos bioactivos por parte de las plantas se ve afectada por diversos factores como los antecedentes genéticos, los requerimientos nutricionales y las condiciones ambientales (Jia et al. 2016). Además, la presencia de hongos endófitos influye en la calidad y cantidad de metabolitos que producen las plantas, siendo en muchos casos los responsables de la producción de dichos compuestos bioactivos (Faeth y Fagan 2002, Jia et al. 2016). Los hongos endófitos son ubicuos y establecen complejas interacciones biológicas con la planta huésped, que pueden ser mutualistas o antagonistas pero muy rara vez parasíticas (Joseph y Priya 2011, Sánchez-Fernández et al. 2013, Gouda et al. 2016). Los hongos endófitos pasan todo o gran parte de su ciclo biológico colonizando los espacios inter e intracelulares de las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad y generalmente interactúan otorgándole beneficios significativos al huésped al producir metabolitos secundarios que sirven para adaptarse mejor a condiciones de estrés producidas por factores bióticos y abióticos (Petrini 1991, Gouda et al. 2016, Jia et al. 2016, Ratnaweera y de Silva 2017). Stierle et al. (1993) aislaron un compuesto con actividad anticancerígena conocido como taxol, producido por la planta *Taxus brevifolia* y por el hongo endófito *Taxomyces andreanae* aislado de la misma. A partir de ese descubrimiento, surgió un interés generalizado por la búsqueda de nuevos compuestos producidos por hongos endófitos presentes en las plantas medicinales (Strobel y Daisy 2003, Ran et al. 2017). Estudios posteriores han demostrado que los hongos endófitos pueden producir metabolitos secundarios con actividad biológica similar a los del huésped (Strobel y Daisy 2003, Sánchez-Fernández et al. 2013, Gouda et al. 2016), incluso se ha indicado que en muchas ocasiones son los responsables de la actividad que se le atribuía a la planta (Stierle et al. 1993, Ran et al. 2017). Este escenario ha generado

que los hongos endófitos hayan adquirido actualmente un rol importante en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos como productores de fenoles, quinonas, alcaloides, esteroides, saponinas, terpenoides y taninos con diversas actividades como antimicrobiana, antioxidante, antifebril, antifúngica, insecticida y antiproliferativa, entre otras (Cui et al. 2011, Chen et al. 2014, Gouda et al. 2016).

El chicozapote, *Manilkara zapota* (L.) P. van Royen (Sapotaceae) es un cultivo tropical originario del sur de México y Centroamérica (Vázquez-Yanes et al. 1999), conocido mundialmente por su valor nutritivo y por sus amplias propiedades medicinales (Tulloch et al. 2020). Sus frutos, flores, semillas y corteza son utilizadas etno-farmacológicamente por sus actividades antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena, entre otras (Kanerria et al. 2009, Chanda y Nagani 2010, Osman et al. 2011, Khalek et al. 2015, Mewara et al. 2017). A pesar de esta evidencia, actualmente ningún estudio ha explorado la diversidad de hongos endófitos que se encuentran asociados a este cultivo. Algunos trabajos previos únicamente han descrito la presencia de hongos fitopatógenos tales como *Aspergillus niger*, *Cercospora* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Elsinoe lepagei*, *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium italicum*, *Pestalotia* spp., *Pestalotiopsis mangiferae*, *Phomopsis* sp., *Phyllosticta sapoticola*, *Phymototrichum omnivorum*, *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani*, *Scopella sapotae*, *Septoria* sp. y *Uredo sapotae* (CONAFOR s/f, Irigoyen 2005, Peiris 2010, Bhale et al. 2013, Crane y Balderi 2015, Madani et al. 2018). Bajo la evidencia de la actividad biológica que presenta este cultivo, los objetivos de este trabajo fueron: identificar los hongos presentes en frutos y hojas de *M. zapota* y evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos a partir de su crecimiento en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de muestras

Se realizó un muestreo dirigido en dos huertos productores de *M. zapota* ubicados en la región central del estado de Veracruz, México, uno en la localidad de Apazapan (19°20'16.49"N, 96°43'53.52"O) y otro en Plan de Río (19°24'5.83"N, 96°38'49.2"O). Se recolectaron muestras de frutos y hojas durante los

meses de mayo-junio de 2017. Durante ese mismo periodo también se obtuvieron frutos en un mercado local en Coatepec, Veracruz. Las muestras se etiquetaron y se llevaron al laboratorio del Centro de Investigación en Micología Aplicada (CIMA) de la Universidad Veracruzana, para el aislamiento e identificación de los hongos.

Aislamiento micelial

La superficie de los frutos y las hojas de chicozapote se lavaron con agua y se cortaron en cuadritos de aproximadamente 0.5 cm², los cuales se desinfectaron mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 2 % durante 30 s y se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Cinco muestras fueron depositadas sobre la superficie de placas de Petri con agar papa dextrosa (PDA) (Dibico) y 0.2 g/L de cloranfenicol. Las placas fueron incubadas durante 72-96 h a 25 ± 2 °C hasta el desarrollo del micelio.

Cultivos monospóricos

Para asegurar la pureza de los aislados fúngicos se realizaron cultivos monospóricos a partir de micelio fresco. Se cortaron las puntas de las hifas con la ayuda de un bisturí y una lupa estereoscópica (Leica EZ4), se cultivaron en una nueva placa de Petri con PDA y se incubaron durante 7 días a 25 ± 2 °C. En algunos aislamientos en los que no fue posible separar una sola hifa, se homogeneizó el micelio en 90 mL de agua destilada estéril y se transfirió 1 mL a un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, considerándose esta como la primera dilución (10⁻¹). A continuación, se realizaron una serie de diluciones seriadas hasta completar 10⁻⁵-10⁻⁶. Un volumen de 100 µL de las muestras homogeneizadas se sembraron en placas Petri con PDA y se incubaron en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Todos los aislados se preservaron a 4 °C hasta su identificación.

Caracterización morfológica

La identificación morfológica a nivel de género se llevó a cabo mediante la comparación de las estructuras reproductivas con las reportadas en las claves taxonómicas descritas por Barnett y Hunter (1998). Las muestras de micelio se colocaron en un portaobjeto con una gota de azul de lactofenol y se observaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania).

Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación

El ADN genómico se extrajo del micelio fresco utilizando el protocolo estándar descrito por Liu *et al.* (2000). La identificación molecular se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR directa (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de la región espaciadora interna del ADN ribosomal nuclear (ITS por sus siglas en inglés), utilizando los cebadores ITS1F (CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.* 1990, Gardes y Bruns 1993). Las ampliificaciones se realizaron en un termociclador (SureCycler 8800, Agilent Scientific Instruments) utilizando 5 µL de ADN molde en un volumen final de reacción de 50 µL con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, seguido de 34 ciclos a 94 °C por 45 s, 53 °C durante 45 s y 72 °C por 1 min, finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % a 95 V durante 60 min, seguido por una tinción con bromuro de etidio y revelado en un fotodocumentador con luz UV (Gel Doc XR+ Gel Documentation System, Bio Rad). Los amplicones se purificaron con el kit Wizard[®] SV Gel and PCR System Clean-Up (Promega, Madison, WI) y se enviaron al servicio de secuenciación Labsergen (Irapuato, México), donde se analizaron con un BigDye Terminator v.3.1 con sistema automático multicapilar de electroforesis en un analizador genético AB3770 con tecnología Sanger. Las secuencias se compararon con la base de datos de nucleótidos del GenBank (Benson *et al.* 2013), utilizando el software de búsqueda Blast para confirmar el género y el porcentaje de identidad. Las secuencias se depositaron en la base de datos del GenBank bajo los números de acceso proporcionados en la sección de resultados.

Obtención de extractos para ensayos de bioactividad

Con la finalidad de obtener un preinóculo de cada aislado fúngico, se cortaron muestras de micelio fresco (1cm²) cultivados en placas Petri con PDA durante 7 días a 25 ± 2 °C. Este micelio se inoculó en matraces Erlenmeyer (250 mL) con 50 mL de caldo de papa dextrosa (PDB) (Dibico), los cuales crecieron durante 10 días a 25 ± 2 °C en un agitador orbital (AGO 60-60) a 100 rpm. A continuación, 3 mL de este preinóculo previamente homogeneizado fue inoculado en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de PDB, incubándose durante 7 días a 25 ± 2 °C en un agitador

orbital (100 rpm), seguidos de 7 días de crecimiento estático. Se realizaron cinco réplicas de cada uno de ellos para obtener un cultivo a pequeña escala (Trigos et al. 2006).

Transcurridos los 14 días de crecimiento, la biomasa (B) fue separada del caldo de cultivo (C) mediante un sistema de filtración al vacío con un papel de filtro Whatman grado uno. Ambas fases se congelaron por separado y se deshidrataron en un liofilizador (Labconco FreeZone 6, Kansas City, MI) durante aproximadamente 4 días. Los liofilizados de la biomasa y el caldo de cultivo se maceraron tres veces con una mezcla de disolventes cloroformo-metanol (1:1) durante 2 días a temperatura ambiente. Los extractos crudos se concentraron en un evaporador rotatorio a presión reducida (BÜCHI Oibath B-485) a 45 ± 2 °C para utilizarlos posteriormente en los ensayos de bioactividad (Trigos et al. 2006).

Adicionalmente, extractos de frutos sanos de *M. zapota* (E-121B, E-121C) se obtuvieron a partir de 100 g de la pulpa sin epicarpio, homogeneizados en una licuadora con 100 mL de agua estéril, siendo procesados siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Evaluación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se llevó a cabo por el método de dilución en caldo establecido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012), con el protocolo M07-A9 con algunas modificaciones (Coyle 2005, Trigos et al. 2006). Inicialmente se realizó una bioprospección de la actividad de los extractos fúngicos y de los frutos obtenidos a partir de la biomasa y el caldo de cultivo a 1000 µg/mL, concentración de corte establecida por el CLSI. La evaluación se realizó en placas estériles de 96 pozos de poliestireno con fondo redondo de 6.4 mm de diámetro (Corning-Costar). A cada pozo se le añadió 50 µL de medio de cultivo líquido Müeller-Hinton (Dibico) y 50 µL de una solución stock de cada extracto crudo a una concentración de 3000 µg/mL, disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y agua desionizada (1:9). Finalmente se agregó 50 µL de un cultivo bacteriano crecido en medio Müeller-Hinton ajustado a una concentración de 1.5×10^6 UFC/mL, tomando como referencia el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland (1.5×10^8 UFC/mL). De este modo, los extractos fueron ensayados a una concentración final de 1000 µg/mL.

Los extractos crudos se evaluaron con bacterias patógenas de humanos Gram negativas: *Escherichia coli*

(ATCC 25922), *E. coli* (ATCC 35218) y Gram positiva: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), pertenecientes a la colección del Centro de Investigación en Micología Aplicada (CIMA). También se evaluaron las bacterias fitopatógenas *Clavibacter michiganensis* (ID/46), *Pseudomonas syringae* (ID/17), *Rhizobium radiobacter* (ID/70) y *Xanthomonas albilineans* (ID/28), proporcionadas por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (SENASICA-SADER) y con *P. putida* proveniente de colección del CIMA. Cada placa contó con sus respectivos controles positivos (CP) de crecimiento bacteriano, control negativo (CN) y control del extracto (CE). Las placas inoculadas con bacterias patógenas de humano se incubaron durante 20 h a 37 ± 2 °C y las fitopatógenas durante 44 h a 25 ± 2 °C. Posteriormente, se agregó a cada pozo 30 µL de una solución de Cloruro de Trifenil Tetrazolium (TTC) al 2.0 % (p/v) y las placas se incubaron durante 30 min a 37 ± 2 °C. Mediante una reacción colorimétrica, el TTC mostró una coloración roja intensa en aquellos pozos donde las bacterias permanecieron metabólicamente activas. Los pozos en los que no se observó color rojo, fue indicativo de la inhibición de crecimiento de las bacterias a esa concentración del extracto. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado en cada ensayo y se realizaron tres repeticiones.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

El extracto que resultó bioactivo a 1000 µg/mL, fue posteriormente ensayado a diferentes concentraciones (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 µg/mL) para determinar la mínima concentración capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (CMI). Los resultados se interpretaron siguiendo los intervalos de corte establecidos por Popiołek et al. (2015) para extractos crudos, considerando como inactivo si la CMI fue >1000 µg/mL, actividad leve con valores de CMI entre 501-1000 µg/mL, moderada entre 126-500 µg/mL, buena de 26-125 µg/mL, fuerte de 10-25 µg/mL y CMI muy fuerte con valores < 10 µg/mL.

Concentración mínima bactericida (CMB)

A continuación, las placas de 96 pozos se incubaron nuevamente durante 4 h a 37 o 25 ± 2 °C para bacterias patógenas de humanos o fitopatógenas respectivamente. De aquellos pozos que permanecieron incoloros en el ensayo de CMI, se tomó una alícuota de 10 µL y se sembró en una placa Petri con medio de

cultivo Müeller-Hinton. Se incubaron durante 24 h en las condiciones indicadas anteriormente y se determinó la menor concentración en la cual no se observó crecimiento bacteriano (CMB).

Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano

El porcentaje de inhibición se evaluó a diferentes concentraciones (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 µg/mL) mediante la comparación de la absorbancia de la placa de 96 pozos a una longitud de onda de 620 nm según la fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 \times [A_{620}^{(CP)} - A_{620}^{(M)} / A_{620}^{(CP)} - A_{620}^{(CE)}]$$

donde A_{620} es la absorbancia a 620 nm, CP corresponde al crecimiento bacteriano (bacteria + medio de cultivo), M es la muestra (bacteria + medio de cultivo + extracto crudo) y CE es el control del extracto (medio de cultivo + extracto crudo) (Lozano y Cuca-Suárez 2008). El porcentaje de inhibición bacteriana del extracto se realizó por triplicado para cada una de las bacterias que fueron susceptibles a concentraciones inferiores a 1000 µg/L.

Evaluación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica solo se llevó a cabo con el extracto del hongo que mostró resultados positivos en la determinación de la CMI. Se utilizaron tres especies de hongos fitopatógenos de importancia agronómica, *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium solani*, pertenecientes a la colección de la entidad académica CIMA. El ensayo biológico se realizó siguiendo el método de dilución en caldo (Coyle 2005, Salhi et al. 2017) con modificaciones. Se preparó una solución stock del extracto crudo a una concentración de 5000 µg/mL, utilizando como disolvente DMSO y agua desionizada en relación 1:9. Se agregó 1 mL de esta solución a 4 mL de PDA y se vació en una placa Petri de 60 mm de diámetro, quedando el extracto a una concentración final de 1000 µg/mL. Con la ayuda de un sacabocados se cortaron discos de micelio fresco de 6 mm de diámetro, se sembraron en el centro de la placa y se incubaron durante 4 días a 25 ± 2 °C. El diámetro de los hongos se midió en mm con la ayuda de un vernier a los 2, 3 y 4 días de crecimiento. Como control, *C. musae*, *L. theobromae* y *F. solani* se sembraron en placas Petri con PDA sin el extracto fúngico. Se realizaron un total de 15 repeticiones.

El porcentaje de inhibición fúngica se calculó según la fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 \times (DC - DT) / DC$$

donde DC es el promedio del diámetro del control y DT es el promedio del diámetro del tratamiento (Salhi et al. 2017).

Análisis estadísticos

La comparación del porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano entre especies, y a diferentes concentraciones del extracto, fue realizada de manera independiente mediante análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, seguido de una comparación de medias con Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF). Un análisis similar se utilizó para comparar la inhibición de crecimiento fúngico entre las diferentes especies y entre los diferentes días para cada especie. Se utilizó el Software libre Jamovi v. 1.2.27 (2020) basado en R.

RESULTADOS

Caracterización morfológica y molecular de los hongos aislados de *M. zapota*

Se aislaron un total de 20 hongos de hojas y frutos de *M. zapota*, de los cuales siete se obtuvieron en el huerto de Apazapan, 11 en Plan del Río y dos fueron aislados de frutos provenientes del mercado de Coatepec (Tabla 1). Los hongos provenientes de cultivos monospóricos se identificaron morfológicamente utilizando claves taxonómicas y genéticamente mediante la comparación de las secuencias ITS del ADN ribosomal nuclear con las presentes en la base de datos del GenBank. Los hongos identificados correspondieron a 7 géneros diferentes de ascomicetos: *Curvularia*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis* y dos géneros de basidiomicetos: *Sistotrema* y *Stereum* (Tabla 1) Seis aislados (CIMA-103, 105, 110, 112, 114, 115) no fueron identificados morfológicamente a nivel de género debido a la ausencia de estructuras reproductivas. Estos cultivos, al no presentar actividad biológica, no se consideraron finalmente para su identificación molecular.

Con base en las características morfológicas y comparando las secuencias con la base de datos del GenBank, se identificaron los aislados: CIMA-101 como *Neopestalotiopsis saprophytica* (MT576586, 99.80 % de identidad), CIMA-102 con el género *Epicoccum* (KX928749, 97.29 % de identidad), CIMA-107 con el género *Daldinia* (MK752790, 98.68 %), CIMA-109 con la especie *G. candidum* (KY103456, 99.17 % de identi-

dad) y CIMA-118 con el género *Sistotrema* (GQ411514, 100 % de identidad). CIMA-106 fue identificada con el género *Diaporthe* (MH465233, 95.18 % identidad) y CIMA-113 con el género *Stereum* (MH268105, 94.54 %). Los aislados CIMA-108, CIMA-117 y CIMA-120 fueron identificados morfológicamente como *Pestalotiopsis* por sus conidios característicos del género. CIMA-111 y CIMA-119 se identificaron morfológicamente dentro de los géneros *Geotrichum*. y *Epicoccum* respectivamente (Tabla 1).

Los aislados CIMA-104 y CIMA-116 se identificaron dentro del género *Curvularia* por su crecimiento rápido, superficie lanosa aterciopelada, micelio de color blanco al principio, que posteriormente se volvió de color gris oscuro (CIMA-104) o marrón-grisáceo oscuro con tonalidades blancas (CIMA-116). Ambos presentaron los fragmoconidios típicamente curvos de color marrón, con una célula central más ancha y de color oscuro distintivos de este género. CIMA-104 fue iden-

tificada como *Curvularia lunata* (MK623264, 98.59 % de identidad) y CIMA-116 como *Curvularia cymbopogonis* (LT631338, 99,82 % de identidad). No obstante, para esta última especie se observaron pequeñas diferencias morfológicas en sus estructuras reproductivas que sugieren que podría tratarse de una especie diferente, por lo que CIMA-116 fue considerada en este trabajo como *Curvularia* sp.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se evaluaron un total de 40 extractos crudos correspondientes tanto a la biomasa (B) como el caldo de cultivo (C) de cada uno de los 20 hongos aislados. Además, se incluyeron dos extractos provenientes de frutos sanos de chicozapote (E-121B y E-121C). Los ensayos de bioprospección de la actividad antibacteriana a una concentración de 1000 µg/mL, indicaron que solo la biomasa de *Stereum* sp. (CIMA-113B) y ambos extractos de *Curvularia* sp. (CIMA-116B y CIMA-116C)

Tabla 1. Referencia, origen, fuente de aislamiento e identificación de los hongos endófitos aislados de *Manilkara zapota*. Se muestran los números de acceso de las secuencias subidas al GenBank

Aislamientos	Origen	Fuente	Género identificado	Referencia en GenBank
CIMA-101	Apazapan	Fruto	<i>Neopestalotiopsis</i>	MZ517177
CIMA-102	Apazapan	Fruto	<i>Epicoccum</i>	MZ517178
CIMA-103	Apazapan	Fruto	No identificado	-
CIMA-104	Apazapan	Hoja	<i>Curvularia</i>	MZ517179
CIMA-105	Apazapan	Hoja	No identificado	-
CIMA-106	Apazapan	Hoja	<i>Diaphorte</i>	MZ517180
CIMA-107	Apazapan	Hoja	<i>Daldinia</i>	MZ517181
CIMA-108	Mercado	Fruto	<i>Pestalotiopsis</i>	-
CIMA-109	Mercado	Fruto	<i>Geotrichum</i>	MZ517182
CIMA-110	Plan del Río	Fruto	No identificado	-
CIMA-111	Plan del Río	Fruto	<i>Geotrichum</i>	-
CIMA-112	Plan del Río	Hoja	No identificado	-
CIMA-113	Plan del Río	Hoja	<i>Stereum</i>	MZ517183
CIMA-114	Plan del Río	Hoja	No identificado	-
CIMA-115	Plan del Río	Fruto	No identificado	-
CIMA-116	Plan del Río	Fruto	<i>Curvularia</i>	MZ517184
CIMA-117	Plan del Río	Fruto	<i>Pestalotiopsis</i>	-
CIMA-118	Plan del Río	Fruto	<i>Sistotrema</i>	MZ517185
CIMA-119	Plan del Río	Fruto	<i>Epicoccum</i>	-
CIMA-120	Plan del Río	Fruto	<i>Pestalotiopsis</i>	-

y de *Sistotrema* sp. (CIMA-118B y CIMA-118C) fueron activos, inhibiendo el crecimiento bacteriano de *E. coli* (ATCC 35218) y *E. faecalis*. No obstante, estos fueron inactivos frente a *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* (Tabla 2). Los extractos de *Curvularia* sp. (CIMA-116B y CIMA-116C) fueron los únicos que inhibieron el crecimiento de *C. michiganensis* (Tabla 2). El resto de los extractos fúngicos, incluidos los obtenidos de frutos de *M. zapota* E-121B y E-121C fueron inactivos contra las bacterias patógenas de humanos *E. coli* (ATCC 25922 y ATCC 35218), *S. aureus* y *E. faecalis*, y con las fitopatógenas *C. michiganensis*, *P. putida*, *P. syringae*, *R. radiobacter* y *X. albilineans*.

Determinación de la CMI y CMB

Por su actividad antibacteriana, el extracto crudo de la biomasa de *Curvularia* sp. CIMA-116B fue seleccionado para continuar con la determinación de la CMI, CMB y los porcentajes de inhibición bacteriana. La CMI del extracto CIMA-116B varió entre 125 y 1000 µg/mL, mostrando buena actividad contra *E. faecalis*, moderada con *C. michiganensis* y leve bioactividad con *E. coli* (ATCC 35218) (Tabla 3). La CMB del extracto fue de 500 µg/mL contra *C. michiganensis* y *E. faecalis*, sin embargo, fue inactiva frente a *E. coli* (ATCC 35218) a la concentración más alta evaluada (1000 µg/mL) (Tabla 3, Figura 1).

Tabla 2. Actividad antibacteriana de los extractos crudos cloroformo-metanol de hongos endófitos aislados de *Manilkara zapota* frente a bacterias patógenas

Aislado fúngico	Actividad antibacteriana a 1000 µg/mL									
	Gram -						Gram +			
	<i>E. coli</i> ¹	<i>E. coli</i> ²	<i>P. syringae</i>	<i>P. putida</i>	<i>R. radiobacter</i>	<i>X. albilineans</i>	<i>C. michiganensis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	
CIMA-113	B	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIMA-116	B	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	C	-	+	-	-	-	-	+	+	-
CIMA-118	B	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	C	-	+	-	-	-	-	-	+	-

¹ *E. coli* (ATCC 25922), ² *E. coli* (ATCC 35218).

(-) inactivo, (+) activo.

Los extractos de la biomasa (B) y el caldo (C) de los aislados fúngicos CIMA-101, CIMA-102, CIMA-103, CIMA-104, CIMA-105, CIMA-106, CIMA-107, CIMA-108, CIMA-109, CIMA-110, CIMA-111, CIMA-112, CIMA-114, CIMA-115, CIMA-117, CIMA-119 y CIMA-120, así como los extractos de frutos E-121B y E-121C, fueron inactivos a 1000 µg/mL frente a todas las bacterias Gram + y Gram - evaluadas.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) del extracto crudo cloroformo-metanol de *Curvularia* sp. CIMA-116B

Bacterias	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
<i>Enterococcus faecalis</i>	125	500
<i>Clavibacter michiganensis</i>	250	500
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	1000	>1000*

* La mayor concentración utilizada resultó no ser bactericida para *E. coli*.

Porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano

El extracto crudo de la biomasa de *Curvularia* sp. CIMA-116B arrojó porcentajes de inhibición de crecimiento que variaron entre un 73 % y un 100 % a una concentración de 1000 µg/mL contra *C. michiganensis*, *E. coli* (ATCC 35218) y *E. faecalis* (Figura 2). El porcentaje de inhibición disminuyó un 49-56 % a 500 µg/mL, no observándose diferencias significativas entre las tres especies evaluadas ($\chi^2=1.31$; $df=2$; $p=0.519$) (Figura 2). Sin embargo, cuando el extracto crudo se evaluó a una concentración de 250 µg/mL, la inhibición de crecimiento fue mayor en *E. faecalis* y *C. michiganensis* en comparación con *E. coli* ($\chi^2=11.6$; $df=2$;

$p=0.003$) (Figura 2). Cuando el extracto se utilizó a 125 µg/mL, la inhibición de *E. faecalis* fue significativamente mayor que en *C. michiganensis* y *E. coli* ($\chi^2=1.12$; $df=2$; $p=0.002$) (Figura 2). A concentraciones de 62.5 y 31.25 µg/mL del extracto, solo se observó actividad inhibitoria superior al 10 % con *E. faecalis*, motivo por el cual estos resultados no fueron comparados estadísticamente.

Comparando la respuesta de las diferentes concentraciones del extracto de *Curvularia* sp. CIMA-116B contra una misma especie bacteriana se observa una disminución en el porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano a medida que disminuye la concen-

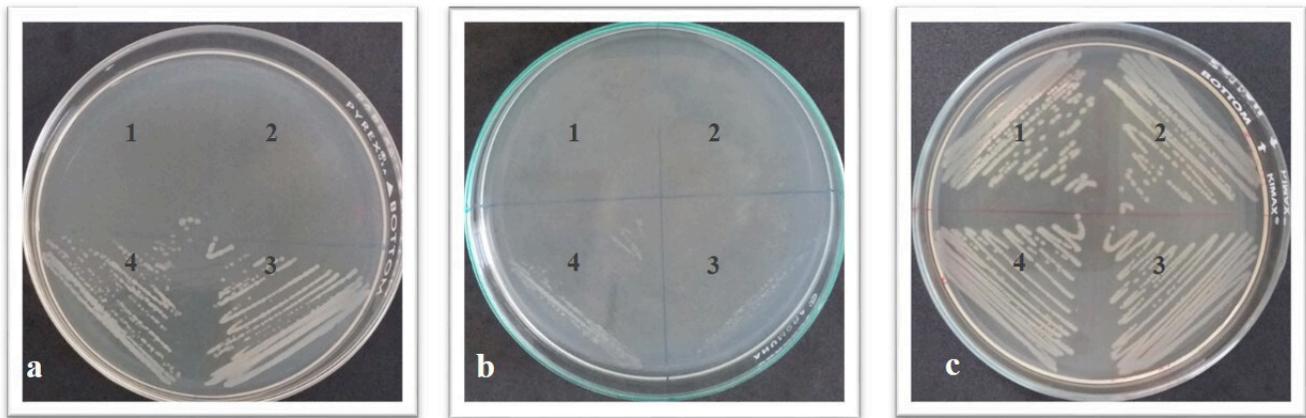


Figura 1. Concentración mínima bactericida (CMB) del extracto crudo de *Curvularia* sp. CIMA-116B con *Enterococcus faecalis* (a), *Clavibacter michiganensis* (b) y *Escherichia coli* (ATCC 35218) (c): 1= 1000 µg/mL, 2=500 µg/mL, 3=250 µg/mL y 4=125 µg/mL.

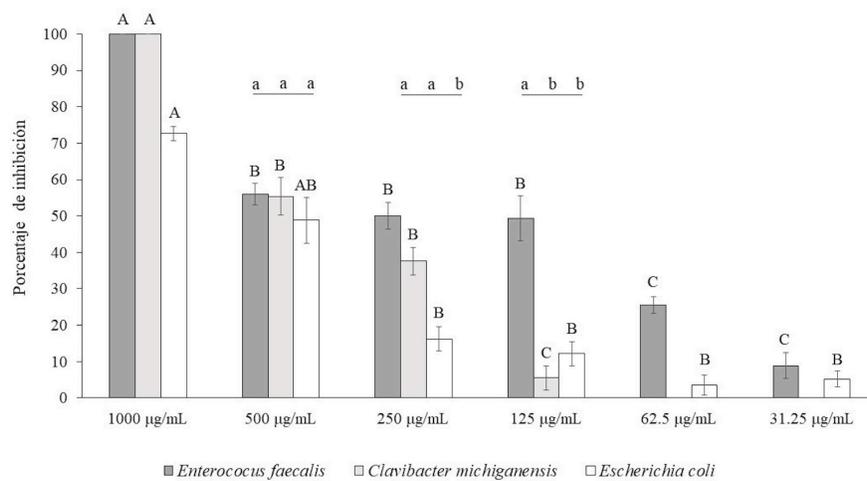


Figura 2. Promedio del porcentaje de inhibición (±EE) del crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones del extracto crudo de *Curvularia* sp. CIMA-116B frente a *Enterococcus faecalis*, *Clavibacter michiganensis* y *Escherichia coli*. Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$) para las diferentes concentraciones utilizadas con cada especie. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre especies ($p<0.05$) a una determinada concentración.

tración de éste, siendo significativa en *C. michiganensis* ($\chi^2=33.1$; $df=5$; $p<0.001$), *E. coli* ($\chi^2=27.9$; $df=5$; $p<0.001$) y *E. faecalis* ($\chi^2=29.6$; $df=5$; $p<0.001$) (Figura 2). Sin embargo, *E. faecalis* fue la especie que mostró mayor susceptibilidad frente al extracto crudo de *Curvularia* sp. CIMA-116B, inhibiendo el crecimiento bacteriano aproximadamente un 50 % a 500, 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 2).

Actividad antifúngica

La actividad antifúngica del extracto *Curvularia* sp. CIMA-116B a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ fue diferente en las tres especies fúngicas evaluadas a los 2 ($\chi^2=26.1$; $df=2$; $p<0.001$) y a los 3 días ($\chi^2=11.3$; $df=2$;

$p<0.003$) después de la inoculación, siendo en ambos casos mayor el porcentaje de inhibición de crecimiento en *C. musae* y *F. solani* en comparación con *L. theobromae* (Figuras 3 y 4). Aunque *L. theobromae* parece inicialmente más resistente al efecto inhibitorio del extracto, el porcentaje (29-35 %) se iguala en el día 4 con *C. musae* y *F. solani* ($\chi^2=3.92$; $df=2$; $p=0.141$) (Figura 3). La comparación del efecto inhibitorio del extracto a 1000 $\mu\text{g/mL}$ para cada especie fúngica, fue similar a los dos, tres y cuatro días en *C. musae* ($\chi^2=5.72$; $df=2$; $p=0.057$) y *F. solani* ($\chi^2=1.51$; $df=2$; $p=0.471$), sin embargo, fue estadísticamente diferente entre el día 2 y los días 3 y 4 para *L. theobromae* ($\chi^2=19.4$; $df=2$; $p<0.001$) (Figura 3).

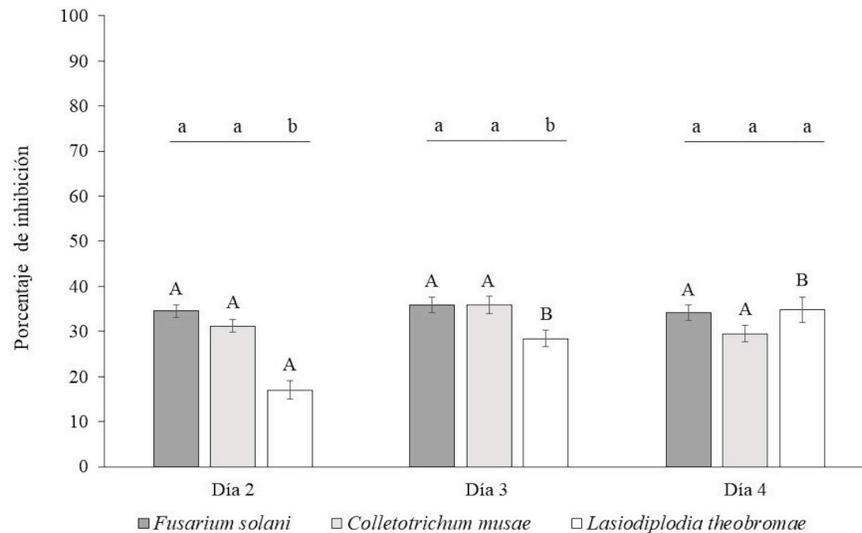


Figura 3. Promedio del porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico ($\pm\text{EE}$) de *Fusarium solani*, *Colletotrichum musae* y *Lasiodiplodia theobromae*, expuestos a 1000 $\mu\text{g/mL}$ del extracto crudo de *Curvularia* sp. CIMA-116B. Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre los días para cada especie. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre especies ($p<0.05$) en un determinado día de evaluación.

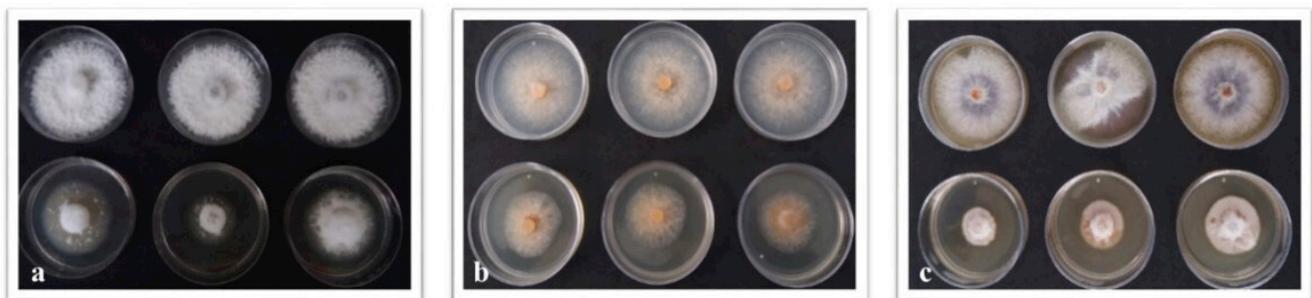


Figura 4. Crecimiento de *Fusarium solani* (a), *Colletotrichum musae* (b) y *Lasiodiplodia theobromae* (c). En la parte superior se observa el crecimiento de los hongos en placas Petri con PDA (control) y en la inferior con el extracto crudo de *Curvularia* sp. CIMA-116B a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

DISCUSIÓN

Los hongos endófitos están presentes en una gran variedad de ecosistemas, principalmente en bosques tropicales y templados (Suryanarayanan et al. 2009, Sánchez-Fernández et al. 2013, Gouda et al. 2016). La mayoría de estos hongos pertenecen al Phylum Ascomycota, aunque algunas especies de hongos endófitos han sido también incluidas dentro de Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota (Sánchez-Fernández et al. 2013). En este trabajo se obtuvieron 20 aislados diferentes y se identificaron por primera vez nueve géneros de hongos endófitos aislados de hojas y frutos de *M. zapota*, pertenecientes al Phylum Ascomycota: *Curvularia*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis*, y al Phylum Basidiomycota: *Sistotrema* y *Stereum*. Los únicos géneros identificados en este estudio, previamente reportados en la literatura en el cultivo de *M. zapota* son, *Geotrichum* y *Pestalotiopsis* responsables de la pudrición ácida y la podredumbre blanda de frutos respectivamente (Peiris 2010, Bhale et al. 2013, Madani et al. 2018), sin embargo, en este trabajo las muestras no mostraron síntomas aparentes de enfermedad. Un estudio previo reportó la presencia de los hongos endófitos *C. crasipes*, *F. solani*, *P. versicolor* y *Xylaria* spp. en hojas de *Manilkara bidentata* (Lodge et al. 1996). No obstante, este es el primer estudio que evalúa la presencia de endófitos en *M. zapota*, a pesar de la evidente actividad biológica registrada previamente para este cultivo (Mewara et al. 2017, Vandana-Garg et al. 2018).

La mayoría de los aislamientos fúngicos en este trabajo fueron identificados a nivel de género y solo tres de ellos se lograron identificar la especie, con base a sus características morfológicas y el porcentaje de identidad superior al 98.5 % con las secuencias ITS depositadas en el GenBank. El hecho de que muchos hongos endófitos presentan un crecimiento lento y no produzcan estructuras reproductivas en condiciones de laboratorio, dificulta muchas veces su identificación (Gamboa-Gaitán 2006). Además, la complejidad en la determinación a nivel de especie y la falta de datos moleculares para su comparación, ponen en evidencia la problemática existente a la hora de identificar muchas especies de hongos endófitos (Gamboa-Gaitán 2006, Marin-Felix et al. 2020). En este estudio seis aislados fúngicos no fueron identificados morfológicamente por no presentar estructuras reproductivas, ni

genéticamente por ser inactivos frente a los microorganismos evaluados. Por este motivo, es posible que existan otros géneros adicionales en *M. zapota* que no fueron incluidos en este trabajo y abre la posibilidad de ampliar la diversidad de hongos endófitos presentes en el cultivo de chicozapote.

Con base en los resultados de actividad antibacteriana realizados inicialmente con los 20 hongos aislados en este cultivo, sólo el extracto de la biomasa de *Curvularia* sp. CIMA-116B fue activo contra tres especies de bacterias. La CMI de este extracto (125 µg/mL y 49 % de inhibición de crecimiento en *E. faecalis*) es comparable con otros estudios previos realizados con diferentes especies del género *Curvularia* como *C. papendorffii* (Khiralla et al. 2020) y *C. tsudae* (Nischitha et al. 2020). No obstante, el extracto de la biomasa de *Curvularia* sp. CIMA-116B resultó ser inactivo contra las bacterias patógenas de humanos, *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* y con las fitopatógenas *P. putida*, *P. syringae*, *R. radiobacter* y *X. albilineans*. A diferencia de nuestros resultados, extractos de acetato de etilo extraído de *C. lunata*, reportaron alta efectividad contra *S. aureus* (Avinash et al. 2015) al igual que extractos de *C. oryzae* evaluados con bacterias Gram + y Gram -, como: *Bacillus sphaericus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *P. oleovorans* (Busi et al. 2009). Extractos de *Curvularia* sp. aislados de *Rauwolfia macrophylla* fueron también activos contra *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *P. agarici* y *S. warneri* (Kaaniche et al. 2019).

El extracto de *Curvularia* sp. CIMA-116B obtenido con cloroformo-metanol mostró baja actividad antifúngica contra *C. musae*, *F. solani* y *L. theobromae*, inhibiendo un 29-35 % a 1000 µg/mL, aunque estudios previos han demostrado actividad antifúngica en los extractos de hongos del género *Curvularia*. El extracto de acetato de etilo de *C. lunata* inhibió el crecimiento de *Chrysosporium merdarium*, *Trichophyton rubrum*, al igual que el extracto hexánico el crecimiento de *Candida albicans* (Avinash et al. 2015, Mensah et al. 2016). Igualmente, el extracto metanólico de *C. tsudae* presentó de moderada a alta actividad con *A. flavus*, *A. niger* y *F. oxysporum* (Nischitha et al. 2020). Estos resultados evidencian que los extractos crudos de diferentes especies del género *Curvularia*, presentan actividad antibacteriana y antifúngica, además, también muestran otras actividades biológicas como antioxidante, fitotóxica, antilarvaria, antipaludismo, antiproliferativa y leishmanicida (Busi et al. 2009, Avinash et al. 2015,

Samanthi et al. 2015, Couttolenc et al. 2016, Khiralla et al. 2018, 2020, Kaaniche et al. 2019).

Si bien los metabolitos secundarios específicos responsables de la actividad reportada por *Curvularia* sp. CIMA 116 no han sido estudiados, otros autores han reportado en este género compuestos bioactivos pertenecientes a diversos grupos químicos, entre los cuales se mencionan 46 policétidos, 13 alcaloides, 5 terpenos y 3 quinonas (Khiralla et al. 2018). Estos metabolitos pueden variar dependiendo del tipo de disolvente utilizado en la extracción, como ejemplo, se extrajeron terpenoides y cumarinas de extractos hexánicos de *C. lunata*, mientras que alcaloides, taninos, flavonoides, glucósidos, esteroides, antraquinonas, terpenoides y saponinas han sido aislados de extractos de acetato de etilo de la misma especie (Mensah et al. 2016). Cabe destacar también que los extractos de frutos sanos de chicozapote no fueron activos frente a las bacterias patógenas evaluadas. Estos resultados difieren con estudios previos en donde se menciona a este cultivo como fuente de producción de cumarinas, esteroides, flavonoides, glucósidos, terpenos, ácidos grasos, lignanos, antraquinonas y compuestos alifáticos con actividad biológica (Pingale y Dash 2015).

Este estudio refuerza la importancia del estudio de hongos endófitos asociados a plantas de uso medicinal, no solo con la finalidad de profundizar en el conocimiento de estas asociaciones hongo-planta, sino también como posibles productores de estructuras químicas novedosas y con potencial bioactivo en las áreas agrícola, industrial y farmacéutica.

CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvieron 20 aislados fúngicos diferentes y se identificaron nueve géneros de hongos endófitos presentes en hojas y frutos de *M. zapota*. Los géneros *Curvularia*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis*, *Sistotrema* y *Stereum*, son reportados como endófitos por primera vez en este cultivo. De todos ellos, solamente el extracto cloroformo-metanol de *Curvularia* sp. CIMA-116B exhibió buena, moderada y leve actividad antibacteriana con *E. faecalis*, *C. michiganensis* y *E. coli* (ATCC 35218) y baja actividad antifúngica con *C. musae*, *F. solani* y *L. theobromae*. Finalmente, este trabajo nos permitió seleccionar aislamientos de hongos endófitos bioactivos presentes en *M. zapota* y abre la

posibilidad de continuar con estudios químicos de éstos para aislar e identificar a los metabolitos responsables de dicha actividad, así como profundizar en su identificación taxonómica a nivel de especie y con ello resaltar la importancia de las asociaciones hongo-planta en la búsqueda de nuevos fármacos.

LITERATURA CITADA

- Avinash KS, Ashwini HS, Ramesh-Babu HN, Krishnamurthy YL. 2015. Antimicrobial potential of crude extract of *Curvularia lunata*, an endophytic fungi isolated from *Cymbopogon caesius*. *Journal of Mycology* 2015, 1-4. <https://doi.org/10.1155/2015/185821>
- Barnett HL, Hunter BB. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. American Phytopathological Society Press, Minnesota.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Research* 41, D36-D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Bhale UN, Wagh M, Rajkonda NJ. 2013. Antagonistic confrontation of *Trichoderma* spp. against fruit rot pathogens on Sapodilla (*Manilkara zapota* L.). *Journal of Yeast and Fungal Research* 41, 5-11. <https://doi.org/10.5897/JYFR12.029>
- Busi S, Peddikotla P, Upadyayula SM, Yenamandra V. 2009. Secondary metabolites of *Curvularia oryzae* MTCC 2605. *Records of Natural Products* 3, 204-208.
- Chanda SV, Nagani KV. 2010. Antioxidant capacity of *Manilkara zapota* L. leaves extracts evaluated by four *in vitro* methods. *Nature and Science* 8, 260-266.
- Chen L, Zhang QY, Jia M, Ming QL, Yue W, Rahman K, Qin LP, Han T. 2014. Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. *Critical Reviews in Microbiology* 42 (3), 454-473. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.959892>
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2012. Document M07-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. Wayne, Pennsylvania. 3-5, 12-20, 52-53.
- CONAFOR, s/f. Paquetes tecnológicos SIRE. <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/943Manilkara%20zapota.pdf> (Noviembre 02, 2021)
- Couttolenc A, Espinoza C, Fernández JJ, Norte M, Plata GB, Padrón JM, Shnyreva A, Trigos A. 2016. Antiproliferative effect of extract from endophytic fungus *Curvularia trifolii* isolated from the Veracruz Reef System in Mexico. *Pharmaceutical Biology* 54, 1392-1397. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1081254>
- Coyle MB. 2005. *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. Organización Panamericana de la Salud. American Society for Microbiology, Washington. Pp. 3-15, 53-70, 103, 119, 151, 171, 226.
- Crane JH, Balerdi CF. 2015. El chicozapote o nispero en Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences, Departamento de Ciencias Hortícolas, Florida. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/HS/HS27900.pdf> (Enero, 2021).
- Cui JL, Guo SX, Xiao PG. 2011. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*.

- Journal of Zhejiang University-Science B 12, 385-392. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1000330>
- Faeth S, Fagan W. 2002. Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology* 42, 360-368. <https://doi.org/10.1093/icb/42.2.360>
- Gamboa-Gaitán MA. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana* 11S, 3-20. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319028580001>
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Gouda S, Das G, Sen SK, Shin HS, Patra JK. 2016. Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology* 7, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01538>
- Irigoyen JN. 2005. Guía técnica del cultivo del nispero. Ministerio de Agricultura y Ganadería, El Salvador. <http://simag.mag.gob.sv/uploads/pdf/2013819141235.pdf> (Enero 10, 2021).
- Jamovi. 2020. Jamovi statistical software v. 1.2.27. <https://www.jamovi.org> (December 1, 2020).
- Jia M, Chen L, Xin HL, Zheng CJ, Rahman K, Han T, Qin LP. 2016. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in Microbiology* 7, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00906>
- Joseph B, Priya RM. 2011. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1, 291-309. <https://doi.org/10.3923/ajbmb.2011.291.309>
- Kaaniche F, Hamed A, Abdel-Razek AS, Wibberg D, Abdissa N, El-Euch IZ, Allouche N, Mellouli L, Shaaban M, Sewald N. 2019. Bioactive secondary metabolites from new endophytic fungus *Curvularia* sp. isolated from *Rauwolfia macrophylla*. *Plos One* 14(6), e0217627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217627>
- Kaneria M, Baravalia Y, Vaghasiya Y, Chanda S. 2009. Determination of antibacterial and antioxidant potential of some medicinal plants from Saurashtra region India. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 71, 406-412.
- Khalek MA, Khatun Z, Habib RM, Karim MR. 2015. Antitumor activity of *Manilkara zapota* (L.) fruits against Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Biologija* 61, 145-152. <https://doi.org/10.6001/biologija.v61i3-4.3206>
- Khiralla A, Spina R, Saliba S, Laurain-Mattar D. 2018. Diversity of natural products of the genera *Curvularia* and *Bipolaris*. *Fungal Biology* 33, 101-122. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.09.002>
- Khiralla A, Spina R, Varbanov M, Philippot S, Lemiere P, Slezack-Deschaumes S, Philippe A, Mohamed L, Yagi SM, Laurain-Mattar D. 2020. Evaluation of antiviral, antibacterial and antiproliferative activities of the endophytic fungus *Curvularia papendorfii*, and isolation of a new polyhydroxyacid. *Microorganisms* 8, 1-21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091353>
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pederse J. 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 471. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.1.471-471.2000>
- Lodge DJ, Fisher PJ, Sutton BC. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia* 8, 733-738. <https://doi.org/10.2307/3760967>
- Lozano JM, Cuca-Suárez LE. 2008. Propiedades antimicrobianas *in vitro* de metabolitos secundarios aislados de *Peltostigma guatemalense*, una especie colombiana de Rutaceas contra el parásito *Plasmodium falciparum* y contra cepas bacterianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* 37, 164-176.
- Madani B, Mirshekari A, Yahia E, Golding JB. 2018. Sapota (*Manilkara achras* Forb.): factors influencing fresh and processed fruit quality. In: Warrington I (ed.) *Horticultural Reviews* 45. Wiley and Sons, Inc., Nueva Jersey, 105-141. <https://doi.org/10.1002/9781119431077.ch4>
- Marin-Felix Y, Hernández-Restrepo M, Crous PW. 2020. Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress* 19, 559-588. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01576-6>
- Mensah JK, Kwoseh C, Akuoko Y, Bawah RA, Tawiah S, Anamoah C, Borigu M. 2016. Assessment of the antimicrobial and antioxidant activities of the secondary metabolites produced by pure cultured *Curvularia lunata*, *Aspergillus parasiticus* and *Mucor* spp. *Current Science Perspectives* 2, 95-104.
- Mewara D, Tamakuwala H, Desai B. 2017. Antifungal activity and phytochemical screening from leaf extract of *Manilkara zapota* and *Averrhoa carambola*. *BMR Phytomedicine* 3, 1-9.
- Nischitha R, Vasanthkumari MM, Kumaraswamy BE, Shivanna MB. 2020. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical profiling of *Curvularia tsudae* endophytic in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. *3 Biotech* 10, 300. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02250-0>
- Osman MA, Rashid MM, Aziz MA, Habib MR, Karim MR. 2011. Inhibition of Ehrlich ascites carcinoma by *Manilkara zapota* L. stem bark in Swiss albino mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1, 448-451. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60098-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60098-1)
- Peiris KHS. 2010. Sapodilla, *Manilkara zapota* L. van Royan. In: Pushpakumara DKNG, Gunasena HPM, Singh VP (eds.) *Underutilized fruit trees in Sri Lanka*. World Agroforestry Centre, South Asia Office, Nueva Delhi. 183-224.
- Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews JH, Hirano SS (eds.) *Microbial ecology of leaves*. Brock Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, Nueva York, 179-197. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9
- Pingale R, Dash GK. 2015. Pharmacognostic evaluation of *Manilkara zapota* (L.) P. Royen Root. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 7, 405-408.
- Popiótek Ł, Biernasiuk A, Malm A. 2015. Synthesis and *in vitro* antimicrobial activity of nalidixic acid hydrazones. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 53 (5), 1-6. <https://doi.org/10.1002/jhet.2468>

- Ran X, Zhang G, Li S, Wang J. 2017. Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminata*. African Health Sciences 17, 566-574. <https://doi.org/10.4314/ahs.v17i2.34>
- Ratnaweera PB, de Silva ED. 2017. Endophytic fungi: A remarkable source of biologically active secondary metabolites. In: Maheshwari D, Annapurna K. (eds.) Endophytes: Crop productivity and protection. Sustainable development and biodiversity. Springer, Cham. 16, 191-212. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66544-3_9
- Salhi N, Saghir SA, Terzi V, Brahmi I, Ghedairi N, Bissati S. 2017. Antifungal activity of aqueous extracts of some dominant Algerian medicinal plants. BioMed Research International, ID 7526291, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2017/7526291>
- Samanthi KA, Wickramarachchi S, Wijeratne EM, Paranagama PA. 2015. Two new bioactive polyketides from *Curvularia trifolii*, an endolichenic fungus isolated from *Usnea* sp., in Sri Lanka. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka 43, 217-224. <http://doi.org/10.4038/jnsfr.v43i3.7950>
- Sánchez-Fernández RE, Sánchez-Ortiz BL, Sandoval-Espinosa YK, Ulloa-Benítez Á, Armendáriz-Guillén B, García-Menéndez M., Macías-Rubalcaba ML. 2013. Hongos endófitos: Fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. Revista Especializada en Ciencias Químicas Biológicas 16, 132-146.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. Science 260, 214-216. <http://doi.org/10.1126/science.8097061>
- Strobel G, Daisy B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67, 491-502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>
- Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Sasse F, Jansen R, Murali TS. 2009. Fungal endophytes and bioprospecting. Fungal Biology Review 23, 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.07.001>
- Trigos Á, Castellanos-Onorio O, Salinas A, Espinoza C, Yáñez-Morales MJ. 2006. Antibiotic activity of several phytopathogenic fungi. Micología Aplicada Internacional 18, 3-6.
- Tulloch A, Goldson-Barnaby A, Bailey D, Gupte S. 2020. *Manilkara zapota* (Naseberry): medicinal properties and food applications. International Journal of Fruit Science 20, 1-7. <https://doi.org/10.1080/15538362.2019.1687071>
- Vandana-Garg A, Dhiman A, Dutt R, Ranga S. 2018. The genus *Manilkara*: An update. The Pharma Innovation Journal 7, 316-318.
- Vázquez-Yanes C, Batis-Muñoz AI, Alcocer-Silva MI, Gual-Díaz M, Sánchez-Dirzo C. 1999. Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084, CONABIO/Instituto de Ecología, UNAM. Distrito Federal. 1-15.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J.J. White TJ (eds.) PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Nueva York. 315-322. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yin H, Sun YH. 2011. Vincamine-producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*. Phytomedicine 18, 802-805. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2011.01.005>