



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae) útiles en agricultura”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Brenda Lorena Sánchez Ortiz

TUTOR

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Instituto de Química UNAM

Ciudad de México, Diciembre 2016

Jurado asignado

Presidente: Dr. Leovigildo Quijano

Vocal: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Vocal: Dra. María Adelina Jiménez Arellanes

Secretario: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 1-4 del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM.



CONGRESOS

Como ponente “Allelochemical effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto*”, QuimiUNAM 2015 del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM, del 22 al 24 de abril (con premio de tercer lugar).

Como expositora del cartel “Biological evaluation of the endophytic fungus PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae)”, Simposio Interno 2014 del Instituto de Química, UNAM, del 27 al 29 de enero.

Como expositora del cartel “Biological evaluation of the endophytic fungus PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae)”, X Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos, 2013 Oaxaca Oax., del 27 al 31 de octubre.

Como expositora del cartel “Evaluación del potencial biológico de los extractos orgánicos y metabolitos secundarios del hongo endófito PB3f3 aislado de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae)”, Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales Dra. Luisa Urania Román, 2013 Pachuca Hidalgo, del 29 al 31 de mayo.

Como expositora del cartel “Aislamiento, purificación y evaluación del potencial fitotóxico y antifúngico de los extractos orgánicos de hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae)”, Simposio Interno 2012 del Instituto de Química, UNAM, del 3 al 5 de diciembre.

ARTÍCULOS

B.L. Sánchez-Ortiz, R.E. Sánchez-Fernández, G. Duarte, P. Lappe-Oliveras and M.L. Macías-Rubalcava (2016) Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto*, *Journal of Applied Microbiology* 120:1313-1325.

Sánchez-Fernández R.E., **Sánchez-Ortiz B.L.**, Sandoval-Espinosa Y.K.M., Ulloa-Benítez Á., Armendáriz-Guillén B., García-Méndez M.C. y Macías-Rubalcava M.L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina, *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 16(2):132-146.

CAPITULO DE UN LIBRO

Macías-Rubalcava M.L., Ulloa-Benítez Á., Rojas-Tomé I.S., **Sánchez-Ortiz B.L.**, García-Méndez M.C., Sánchez-Fernández R.E. (2014). Hongos endófitos: Una fuente prometedora de agroquímicos y agentes de biocontrol. Editores: Ortiz Hernández ML, Sánchez Salinas E, Folch Mallol JL, Olivares Velona A, Dantan González. En: Los plaguicidas en México aspectos generales, toxicológicos y ambientales, 1ra ed. UAEM, Cuernavaca Morelos, México. 251-265 pp.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo el presente trabajo a través del proyecto 179194, y por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado con número de becario 227096.

Al Instituto de Química y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM, por mi formación profesional.

A mi tutora Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por su ayuda para sacar adelante este proyecto.

A los miembros de mi comité tutor la Dra. María Isabel Aguilar Laurents y el Dr. Manuel Jiménez Estrada por todo su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A mi jurado, Dr. Leovigildo Quijano, Dra. María Isabel Aguilar Laurents, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. María Adelina Jiménez Arellanes, Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar, por las aportaciones que hicieron al revisar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo y cariño que permitió forjar una amistad entrañable, gracias por todo lo que he aprendido con ustedes.

A mi familia y amigos por su cariño, apoyo, comprensión y tiempo, en cada momento de mi vida, los quiero mucho.

A la M. en C. Georgina Duarte de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química UNAM, por sus enseñanzas, gran apoyo y colaboración en el análisis por CG-EM.

A la Dra. Patricia Lappe Oliveras del Instituto de Biología, UNAM, por su colaboración en la identificación taxonómica de los hongos endófitos, mediante el empleo de métodos morfológicos y moleculares.

A la Q.F.B. Guadalupe Ibarra del Instituto de Química, UNAM, por su trabajo a nivel licenciatura que ayudó a complementar este proyecto de tesis, y por su amistad.

A los técnicos académicos del Instituto de Química, UNAM, el M. en C. Héctor Ríos Olivarez, la Dra. Beatriz Quiroz García, la Dra. Isabel Chávez, la M. en C. Elizabeth Huerta, la Q. María de los Ángeles Peña, el Ing. Q. Luis Velasco-Ibarra, el Dr. Francisco Javier Pérez Flores, la Q.F.B. Rocío Patiño y el M. en C. Simón Hernández Ortega, por la realización de los experimentos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X.

A las Dras. Bertha Tlapal Bolaños y Olga Gómez del Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, por la donación de los hongos fitopatógenos.

DEDICATORIA

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	I
Lista de abreviaturas	VII
Lista de Cuadros	X
Lista de Figuras.....	XIV
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	8
2.1. Problemática en la agricultura.....	8
2.2. Hongos endófitos	10
2.2.1. Interacción hongo endófito – planta hospedera.....	10
2.2.1.a. <i>Mecanismo directo</i>	11
2.2.1.b. <i>Mecanismo indirecto</i>	12
2.2.1.c. <i>Mecanismo ecológico</i>	13
2.2.2. Interacciones entre endófitos.....	14
2.2.3. Metabolitos secundarios bioactivos de hongos endófitos.....	16
2.3. El género <i>Xylaria</i>	31
2.4. El género <i>Aspergillus</i>	35
2.5. Estrategias de selección de hospederas útiles para el aislamiento de hongos endófitos	38
2.6. Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla	39
2.7. Planta hospedera <i>Haematoxylon brasiletto</i>	40
3. HIPÓTESIS	41
4. OBJETIVO.....	42

4.1. Objetivos Particulares	42
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	44
5.1. Colecta del material vegetal	44
5.2. Microorganismos de prueba	44
5.3. Plantas de prueba	44
5.4. Medios de cultivo	44
5.5. Aislamiento y purificación de hongos endófitos y fitopatógenos de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	45
5.6. Descripción macroscópica, microscópica y tasa de crecimiento de los hongos puros	46
5.7. Determinación de las condiciones óptimas de crecimientos de los hongos endófitos y fitopatógenos	48
5.8. Obtención de cultivos en mediana escala	48
5.8.1. Cultivo en CPD	48
5.8.2. Cultivo arroz.....	48
5.9. Obtención de los extractos orgánicos	48
5.10. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos y compuestos puros	49
5.11. Evaluación cuantitativa de actividad fitotóxica de los extractos orgánicos y compuestos puros.....	50
5.12. Bioensayo de antagonismo directo múltiple entre hongos de <i>Haematoxylon brasiletto</i> y fitopatógenos de importancia en la agricultura	52
5.13. Evaluación del potencial antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles de hongos endófitos de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	56
5.14. Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos orgánicos volátiles de hongos endófitos de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	57

5.15. Determinación de los compuestos orgánicos volátiles de hongos endófitos de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	58
5.16. Estudio químico	59
5.16.1. Métodos cromatográficos generales	59
5.17. Fraccionamiento químico biodirigido del hongo endófito <i>Aspergillus</i> sp.	60
5.17.1. Extracto del micelio del cultivo en pequeña escala	60
5.17.2. Extracto del micelio del cultivo en mediana escala	61
5.17.3. Fraccionamiento secundario de las fracciones activas.....	62
5.17.4. Obtención de la coriloxina (70).....	64
5.17.5. Obtención de la variecolina A (71).	64
5.18. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	64
5.19. Identificación taxonómica.....	65
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
6.1. Aislamiento y purificación de hongos endófitos y fitopatógenos de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	68
6.2. Descripción macroscópica, microscópica y tasa de crecimiento de los hongos puros	71
6.2.1. Hongos endófitos.....	72
<i>PBE1</i>	72
<i>PBE2</i>	73
<i>PBE3</i>	74
<i>PBE4</i>	75
<i>PBE5</i>	76
<i>PBE6</i>	77

<i>PBE7</i>	78
<i>PBE8</i>	79
<i>PBE9</i>	80
<i>PBE10</i>	81
<i>PBE11</i>	82
<i>PBE12</i>	83
<i>PBE13</i>	84
<i>PBE14</i>	85
<i>PBE15</i>	86
<i>PBE16</i>	87
<i>PBE17</i>	88
<i>PBE18</i>	89
<i>PBE19</i>	90
<i>PBE20</i>	91
<i>PBE21</i>	¡Error! Marcador no definido.
6.2.2. Hongos fitopatógenos	93
<i>PBF1</i>	93
<i>PBF2</i>	94
<i>PBF3</i>	95
<i>PBF4</i>	96
6.3. Cultivos y extractos en pequeña escala de hongos endófitos aislados de hojas de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	97
6.4. Determinación del potencial antifúngico	99
6.5. Determinación del potencial fitotóxico.	104
6.6. Potencial antagónico de los hongos endófitos aislados de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	110

6.6.1.	<i>Fusarium</i> sp. (PBE2) vs microorganismos fitopatógenos	113
6.6.2.	PBE8 vs microorganismos fitopatógenos	115
6.6.3.	<i>Fusarium</i> sp. (PBE9) vs microorganismos fitopatógenos	117
6.6.4.	<i>Xylaria</i> sp. (PBE11) vs microorganismos fitopatógenos	119
6.6.5.	<i>Acremonium</i> sp. (PBE12) vs microorganismos fitopatógenos	121
6.6.6.	PBE14 vs microorganismos fitopatógenos	123
6.6.7.	PBE16 vs microorganismos fitopatógenos	125
6.6.8.	PBE19 vs microorganismos fitopatógenos	127
6.6.9.	<i>Nodulisporium</i> sp. (PBE20) vs microorganismos fitopatógenos	129
6.6.10.	<i>Aspergillus</i> sp. (PBE21) vs microorganismos fitopatógenos	131
6.7.	Evaluación del potencial biológico de hongos endófitos selectos de <i>Haematoxylon brasiletto</i> , mediante bioensayos en caja de Petri dividida.....	135
6.8.	Identificación de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y su efecto fitotóxico, antifúngico y antiomiceto.	138
6.8.1.	Composición química de los VOCs producidos por el hongo endófito PBE16	138
6.8.2.	Composición química de los VOCs producidos por el hongo endófito <i>Nodulisporium</i> sp. (PBE20).....	141
6.9.	Identificación taxonómica de los hongos endófitos <i>Xylaria</i> sp. (PBE11)	143
6.10.	Potencial antifúngico, antioomiceto y fitotóxico del hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. (PBE11) aislado de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	146
6.10.1.	Bioensayos de antagonismo directo múltiple	146
6.10.2.	Bioensayos de antagonismo directo simple	148
6.10.3.	Bioensayos de antagonismo directo simple en caja dividida.....	150
6.10.4.	Determinación de la composición química de los VOCs producidos por el hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. (PBE11) aislado de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	153

6.11.	Efecto fitotóxico del (±)-2-metil-1-butanol y el 2-metil-1-propanol.....	159
6.12.	Efecto antifúngico de los extractos orgánicos del hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. (PBE11) aislado de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	160
6.13.	Cultivo en mediana escala del hongo endófito <i>Aspergillus</i> sp. (PBE21)	161
6.14.	Estudio químico biodirigido del hongo endófito <i>Aspergillus</i> sp. (PBE21)	164
6.15.	Caracterización de la (4S,5S,6S)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona o coriloxina (70)	165
6.16.	Caracterización de la variecolina A (71).....	169
6.17.	Evaluación de la actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica de los metabolitos aislados del hongo endófito <i>Aspergillus</i> sp. (PBE21)	185
7.	CONCLUSIONES	186
8.	PESPECTIVAS	190
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	191

Lista de abreviaturas

AA	Agar agua
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
CC	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno deuterado
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
COSY	Correlated spectroscopy (espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear)
CPD	Caldo papa-dextrosa
°C	Grados Celsius
d	Doblete
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer (experimento de desacoplamiento de hidrógenos)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eV	Electrón volts
g	Gramos
h	Horas
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C)
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C)
IA	Índice de antagonismo
IK	Índice de Kovats

IR	Infrarrojo
ITS	Regiones espaciadoras internas transcritas
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
L	Litro
m	Metro
<i>m/z</i>	Unidades de masa/carga
MA	Medio arroz
MeOH	Metanol
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mg	Miligramo
µg	Microgramo
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
µm	Micrómetro
mM	Milimolar
mm ²	Milímetro cuadrado
ng	Nanogramo
NIST	National Institute of Standards and Technology
NOESY	Espectroscopia de Efecto Nuclear Overhauser
OA	Agar avena
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa-dextrosa
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
p/v	Peso/volumen
REBIOSH	Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo

s	Singulete
SPME	Microextracción en fase sólida
TOF	Tiempo de vuelo
TAE	Tris-acetato-EDTA
VOCs	Compuestos Orgánicos Volátiles
vs	Contra
δ	Desplazamiento químico
V_{\max}	Frecuencia máxima

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos	17
Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo utilizados en la purificación y determinación de las condiciones óptimas de crecimiento.....	45
Cuadro 3. Tipo de interacciones entre microorganismos y valores numéricos asignados (modificado de Yuen 1999).	55
Cuadro 4. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del sólido cristalino derivado del extracto del cultivo en pequeña escala del endófito <i>Aspergillus</i> sp. (PBE2).	60
Cuadro 5. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto orgánico derivado del cultivo en mediana escala del endófito <i>Aspergillus</i> sp. (PBE21).....	61
Cuadro 6. Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta CC utilizando Sephadex de las fracciones primarias activas.	63
Cuadro 7. Aislamientos totales de hongos endófitos obtenidos de <i>Haematoxylon brasiletto</i> por hoja y por segmento.	69
Cuadro 8. Aislamientos puros totales de hongos endófitos y fitopatógenos obtenidos de hojas de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	69
Cuadro 9. Claves asignadas a los hongos endófitos y fitopatógenos puros, obtenidos de hojas de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	70
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	72
Cuadro 11. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos fitopatógenos aislados de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	93
Cuadro 12. Rendimiento de los extractos orgánicos del cultivo en pequeña escala de los hongos endófitos de <i>Haematoxylon brasiletto</i> (CH ₂ Cl ₂ /AcOEt).	98
Cuadro 13. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos obtenidos de los hongos endófitos aislados de <i>Haematoxylon brasiletto</i> sobre el crecimiento radial de <i>F. oxysporum</i> , <i>A. alternata</i> , <i>P. capsici</i> , <i>P. aphanidermatum</i> y <i>P. parasitica</i>	100

Cuadro 14. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos crudos obtenidos de los hongos endófitos aislados de <i>Haematoxylon brasiletto</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>S. lycopersicum</i>	106
Cuadro 15. Índice de antagonismo del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. (PBE2), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i>	114
Cuadro 16. Índice de antagonismo del hongo endófito PBE8, y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i>	116
Cuadro 17. Índice de antagonismo del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. (PBE9), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i>	118
Cuadro 18. Índice de antagonismo del hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. (PBE11), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i>	120
Cuadro 19. Índice de antagonismo del hongo endófito <i>Acremonium</i> sp. (PBE12), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i>	122
Cuadro 20. Índice de antagonismo del hongo endófito PBE14, y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i>	124
Cuadro 21. Índice de antagonismo del hongo endófito PBE16, y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i>	126

Cuadro 22. Índice de antagonismo del hongo endófito PBE19, y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i>	128
Cuadro 23. Índice de antagonismo del hongo endófito <i>Nodulisporium</i> sp. (PBE20), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i>	130
Cuadro 24. Índice de antagonismo del hongo endófito <i>Aspergillus</i> sp. (PBE21), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo <i>in vitro</i>	132
Cuadro 25. Clasificación de hongos endófitos aislados de <i>Haematoxylon brasiletto</i> , de acuerdo a su tipo de interacción antagónica.....	134
Cuadro 26. Potencial fitotóxico de los VOC's producidos por hongos endófitos antagónicos de <i>Haematoxylon brasiletto</i> a los días 1, 3, 5 y 10 de crecimiento, sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>S. lycopersicum</i>	137
Cuadro 27 VOCs identificados en el hongo endófito PBE16 cultivado durante 10 días.	140
Cuadro 28. VOCs identificados en el hongo endófito <i>Nodulisporium</i> sp. (PBE20) cultivado durante 10 días.	142
Cuadro 29. Comparación de las secuencias de ITS1-5.8-ITS2 y los porcentajes de similitud con las disponibles en la base de datos del GenBank.	145
Cuadro 30. VOCs identificados en el hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. (PBE11) cultivado durante 10, 20 y 30 días.....	156
Cuadro 31. Potencial antifúngico y antioomiceto del extracto orgánico del medio de cultivo y micelio obtenido del cultivo en mediana escala del hongo endófito <i>Aspergillus</i> sp. (PBE21), sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica.	163

Cuadro 32. Potencial fitotóxico del extracto orgánico del medio de cultivo y micelio obtenido del cultivo en mediana escala del hongo endófito <i>Aspergillus</i> sp. (PBE21), sobre la longitud de la raíz de dos semillas de prueba.	164
Cuadro 33. Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo endófito <i>Aspergillus</i> sp. (PBE21).	165
Cuadro 34. Datos espectroscópicos de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) y de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD), de la (4S,5S, 6S)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona.	169
Cuadro 35. Datos espectroscópicos de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₂ Cl ₂) y de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₂ Cl ₂), de la variecolina A.	183

Lista de Figuras

Figura 1. Planta colonizada por hongos endófitos (modificado de Partida y Heil 2011).....	10
Figura 2. Protección a factores bióticos y abióticos que genera el hongo endófito a la planta hospedera (modificado de Partida y Heil 2011).	11
Figura 3. Defensas de la planta hospedera por presencia del hongos endófitos (modificado de Partida y Heil 2011).	13
Figura 4. A y B. Bioensayo de antagonismo directo múltiple en <i>in vitro</i> entre los hongos endófitos de <i>Haematoxylon brasiletto</i> y los microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura. E: endófito. F: <i>F. oxysporum</i> , A: <i>A. solani</i> C: <i>P. capsici</i> y *Ap: <i>P. aphanidermatum</i> / *U: <i>Pythium ultimum</i>	53
Figura 5. Controles de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos competidores, empleados en los bioensayos de antagonismo directo múltiple <i>in vitro</i> con hongos endófitos del grupo uno, a los 3, 6, 9 y 12 días de bioensayo.	111
Figura 6. Controles de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos competidores, empleados en los bioensayos de antagonismo directo múltiple <i>in vitro</i> con hongos endófitos del grupo dos a los 3, 6 y 9 días de bioensayo. El oomiceto <i>P. aphanidermatum</i> fue incluido en el bioensayo a partir del día cinco de interacción antagónica.	112
Figura 7. Antagonismo directo múltiple entre el endófito <i>Fusarium</i> sp. (PBE2) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.	113
Figura 8. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE8 y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.....	115
Figura 9. Antagonismo directo múltiple entre el endófito <i>Fusarium</i> sp. (PBE9) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.	117
Figura 10. Antagonismo directo múltiple entre el endófito <i>Xylaria</i> sp. (PBE11) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.	119

Figura 11. Antagonismo directo múltiple entre el endófito <i>Acremonium</i> sp. (PBE12) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.....	121
Figura 12. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE14 y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.....	123
Figura 13. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE16 y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.....	125
Figura 14. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE19 y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.....	127
Figura 15. Antagonismo directo múltiple entre el endófito <i>Nodulisporium</i> sp. (PBE20) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica. * el microorganismo <i>P. aphanidermatum</i> fue incluido en el bioensayo a partir del día cinco de interacción antagónica.....	129
Figura 16. Antagonismo directo múltiple entre el endófito <i>Aspergillus</i> sp. (PBE21) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica. * el microorganismo <i>P. aphanidermatum</i> fue incluido en el bioensayo a partir del día cinco de interacción antagónica.	131
Figura 17. Potencial fitotóxico de los VOCs producidos por hongos endófitos antagónicos de <i>Haematoxylon brasiletto</i> al día diez de crecimiento, sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de <i>S. lycopersicum</i> y <i>A. hypochondriacus</i>	136
Figura 18. Hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. PBE11(PB3f3) cultivado en medio papa destroxa agar (PDA) incubada a 28°C con fotoperiodo luz-obscuridad 12-12 h. A-B Anverso y Reverso de la colonia después de tres semanas de crecimiento. C. Reverso de la colonia después de 12 semanas de crecimiento. Se observa una pigmentación rojiza.	144

Figura 19. Análisis Neighbor-Joining de las secuencias de GenBank con identidad más alta (>95%) con la secuencia del ITS1-5.8S-ITS2, del aislamiento PBE11 (PB3f3).....	144
Figura 20. Bioensayos de antagonismo directo múltiple entre el hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. (PBE11) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura. 1) <i>A. solani</i> , 2) <i>F. oxysporum</i> , 3) <i>P. capsici</i> y 4) <i>P. aphanidermatum</i> . A, después de tre días de interacción antagónica, y B después de 6 días de interacción.	147
Figura 21. Bioensayos de antagonismo directo simple, entre el hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. (PBE11) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura. Observaciones a los seis días de interacción antagónica.....	151
Figura 22. Efecto fitotóxico de los VOCs producidos por <i>Xylaria</i> sp. (PBE11) a los 10, 20, 30 y 40 días de cultivo. El crecimiento de la raíz de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> se registró después de 24 h y el de <i>S. lycopersicum</i> después de 72 h de exposición a los VOCs. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), $N = 4$	151
Figura 23 Potencial fitotóxico de los VOCs producidos por <i>Xylaria</i> sp. (PBE11) a los 10 (a), 20 (b), 30 (c) y 40 (d) días de cultivo, sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> (1a, 1b, 1c y 1d) y <i>S. lycopersicum</i> (2a, 2b, 2c y 2d).	152
Figura 24. Diagrama de Venn muestra el número de metabolitos volátiles compartidos en los días 10, 20 y 30 de desarrollo del hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. (PBE11).....	154
Figura 25. Compuestos orgánicos volátiles comunes en los días 10, 20 y 30 de desarrollo del hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. (PBE11). A) 2-pentil-furano, B) 4-nonano, C) ácido acético 2-etilhexil ester, D) <i>trans</i> - α -bergamoteno, E) tujopseno, F) 1,8-dimetil-4-(1-metil etenil)-spiro[4.5]-7-decano (acoradieno), G) 3,7,7-trimetil-11-metileno-spiro[5.5]-2-undecano, H) 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-dimetil-7-(1metil etenil)- azuleno.....	154

Figura 26. Espectro de RMN ¹³ C del 4S,5S,6S)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona (70) de <i>Aspergillus</i> sp. (100 MHz, CD ₃ OD).....	166
Figura 27. Espectro de RMN ¹ H del 4S,5S,6S)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona (70) de <i>Aspergillus</i> sp. (400 MHz, CD ₃ OD).....	167
Figura 28. (4S,5S,6S)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona	168
Figura 29. Espectro de RMN ¹³ C de la variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp. (100 MHz, CH ₂ Cl ₂).	172
Figura 30. Espectro parcial A de RMN ¹³ C de la variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp. (100 MHz, CH ₂ Cl ₂).	172
Figura 31. Espectro de RMN ¹ H de la variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp. (400 MHz, CH ₂ Cl ₂).....	173
Figura 32. Espectro parcial A de RMN ¹ H de la variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp. (400 MHz, CH ₂ Cl ₂).	173
Figura 33. Espectro parcial B de RMN ¹ H variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp. (400 MHz, CH ₂ Cl ₂).....	174
Figura 34. Espectro parcial C de RMN ¹ H de la variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp. (400 MHz, CH ₂ Cl ₂)	174
Figura 35. Espectro HMBC parcial A de la variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp.....	175
Figura 36. Espectro HMBC parcial B de la variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp.....	176
Figura 37. Espectro HMBC parcial C de la variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp.....	177
Figura 38. Espectro parcial HMBC D de la variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp.....	178
Figura 39. Espectro HMBC parcial E de la variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp.....	179
Figura 40. variecolina A.....	182
Figura 41. variecolina	182
Figura 42. Vista estereoscópica de la variecolina A (71) aislada de <i>Aspergillus</i> sp.	182



RESUMEN

La presente investigación se realizó con la finalidad de obtener metabolitos secundarios con potencial fitotóxico y antifúngico, a partir de los hongos endófitos más competitivos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae), contribuyendo así al posible desarrollo de nuevos agentes agroquímicos o de control biológico. Para el cumplimiento de este objetivo se comenzó con la obtención y evaluación de los extractos orgánicos a partir de cultivos en pequeña escala de los hongos endófitos, y se corroboró que, en general, todos los endófitos en estudio producen metabolitos secundarios antifúngicos y antioomicetos contra los fitopatógenos con importancia en la agricultura: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica* y *Pythium aphanidermatum*, así como actividad fitotóxica sobre el crecimiento de la raíz de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*. En ambos bioensayos los hongos endófitos *Xylaria* sp. (PBE11) y *Aspergillus* sp. (PBE21) destacaron al producir un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos, en un rango de 34.0 a 59.4%, y un potencial fitotóxico significativo, al inhibir más del 50% el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*.

En los bioensayos *in vitro* de antagonismo directo múltiple, los hongos endófitos *Aspergillus* sp. (PBE21) y *Xylaria* sp. (PBE11) producen una inhibición significativa entre el 22-60% sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos, en general ambos aislamientos mostraron inhibición a distancia por medio de compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, y en algunos casos crecieron sobre sus competidores (micoparasitismo), reduciendo completamente su crecimiento.

En consecuencia, se seleccionó al hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21) para su estudio biodirigido y a *Xylaria* sp. (PBE11) para la identificación de VOCs.

La actividad biológica y composición química de los VOCs de *Xylaria* sp. (PBE11) fue establecida mediante el uso de bioensayos de antagonismo directo simples y múltiple, y por el método de microextracción en fase sólida seguido de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Los resultados mostraron que *Xylaria* sp. (PBE11) inhibe significativamente el crecimiento de *P.*



aphanidermatum (78.3%), *P. capsici* (48.3%), *A. solani* (24,5%) y *F. oxysporum* (24.2%) en los bioensayos de antagonismo múltiple. Los VOCs producidos por *Xylaria* sp. (PBE11) a los 20 y 30 días de desarrollo inhibieron el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* (27.6%) y *S. lycopersicum* (53.2%). Se identificaron 40 VOCs a lo largo de los 10, 20 y 30 días de cultivo del hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11). Los compuestos con la mayor afinidad a la fibra fueron el 3-metil-1-butanol (24.33%) y el tujopseno (21.60%), a los 10 días de crecimiento, una amina no identificada (34.30%) y el 2-metil-1-butanol (33.28%) a los 20 días, y el 2-metil-1-propanol (25.43%) a los 30 días de cultivo.

Por otro lado, el estudio químico biodirigido del extracto orgánico de la especie *Aspergillus* sp. (PBE21) permitió el aislamiento de dos metabolitos secundarios descritos por primera vez para este microorganismo y que se caracterizaron como (4S,5S,6S)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5metil-2-ciclohexen-1-ona o coriloxina (**70**) y variecolina A (**71**), este último corresponde a un nuevo producto natural. Las estructuras químicas de ambos compuestos se establecieron usando métodos espectroscópicos y espectrométricos. El compuesto **70** inhibe significativamente el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* (77.0%) y *S. lycopersicum* (81.0%), y el compuesto **71** presenta un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba: *F. oxysporum* (52.0%), *A. solani* (30.0%), *P. aphanidermatum* (52.0%) y *P. parasitica* (63.0%). Asimismo, inhibe significativamente el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* en un 30.0 % y 57.0%, respectivamente.

Con base en los resultados obtenidos, los hongos endófitos *Xylaria* sp. (PBE11) y *Aspergillus* sp. (PBE21), así como sus metabolitos secundarios, constituyen candidatos para el desarrollo de agentes de control biológico de malezas y/o microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola.



ABSTRACT

ABSTRACT

The present work was developed to obtain secondary metabolites with phytotoxic and antifungal potential from the most competitive endophytic fungi isolated from the plant *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae), and to contribute for the development of new agrochemical agents or for the biological control.

For the achievement of this objective we attended with the evaluation of the organic extracts from small scale fermentations of the endophytic fungi, then it was corroborated that all the fungi produce antifungal and anti-oomycete secondary metabolites against some of the most important phytopathogens in agriculture like: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica* and *Pythium aphanidermatum*. Also, the phytotoxic activity over the root growth of *Amaranthus hypochondriacus* and *Solanum lycopersicum* was corroborated. In both tests, the endophytic fungi *Xylaria* sp. (PBE11) and *Aspergillus* sp. (PBE21) highlighted by inhibiting over the micellar growth of the pathogens in a range from 34.0 to 59.4%, and both fungi showed a significant phytotoxic potential, with more than 50% of inhibition on the root growth of *A. hypochondriacus* and *S. lycopersicum*.

In the *in vitro* multiple direct antagonism bioassay both fungi, *Xylaria* sp. (PBE11) and *Aspergillus* sp. (PBE21), demonstrated a significant inhibition (22-60%) against the phytopathogen microorganisms, both isolations mainly showed distant inhibition due to the volatile and non-volatile compounds produced, and in some cases even growth over their competitors (mycoparasitism) or completely abolishing their growth.

Afterward the endophytic fungi *Aspergillus* sp. (PBE21) was selected for its bioassay-guided study and *Xylaria* sp. (PBE11) for the identification of the volatile organic compounds (VOCs) and the biological activity and chemical composition of VOCs of *Xylaria* sp. (PBE11) were established by using simple and multiple antagonism bioassays, and by solid phase microextraction followed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry respectively. The results showed that *Xylaria* sp. (PBE11) inhibits the growth of *P. aphanidermatum* (78.3%), *P.*



ABSTRACT

capsici (48.3%), *A. solani* (24.5%) and *F. oxysporum* (24.2%) in the multiple antagonism assay. The VOCs produced by *Xylaria* sp. (PBE11) on the 20 and 30 days of development, inhibited the root growth of *A. hypochondriacus* (27.6%) and *S. lycopersicum* (53.2%). We identified 40 VOCs from *Xylaria* sp. (PBE11) over 10, 20 and 30 days of culture. The compounds with the highest affinity to the fiber were: 3-methyl-1-butanol (24.33%) and thujopsene (21.60%) during the first 10 days, an unidentified amine (34.30%) and 2-methyl-1-butanol (33.28%) in the next 10 days, finally, 2-methyl-1-propanol (25.43%) at the 30 days.

The analysis of the organic extract of *Aspergillus* sp. (PBE21) allowed for the first time the isolation and identification of two secondary metabolites characterized as (4S,5S,6S)-5,6-epoxy-4-hydroxy-3-methoxy-5methyl-2-cyclohexen-1-one or coriloxine (**70**) and variecolina A (**71**). The establishment of the structures were done using conventional spectrometric and spectroscopic methods. The compound (**70**) significantly inhibits the root growth of *A. hypochondriacus* (77.0%) and *S. lycopersicum* (81.0%) and the compound **71** showed a significant inhibitory effect over the growth of the four phytopathogens *F. oxysporum* (52.0%), *A. solani* (30.0%), *P. aphanidermatum* (52.0%), and *P. parasitica* (63.0%). It also has phytotoxic activity against *A. hypochondriacus* (30.0%) and *S. lycopersicum* (57.0%).

All the results obtained in this work with the endophytic fungi *Xylaria* sp. (PBE11) and *Aspergillus* sp. (PBE21) and their metabolites show their potential as candidates to be considered for the biological control of weeds and phytopathogen microorganisms with agricultural importance.



1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es una de las principales fuentes de la economía de México, la cual se puede ver afectada por diversos factores como son: problemas climáticos, daños por roedores e insectos herbívoros, la presencia de malezas en los campos de cultivo o el ataque de varios microorganismos fitopatógenos (Föster et al. 2007).

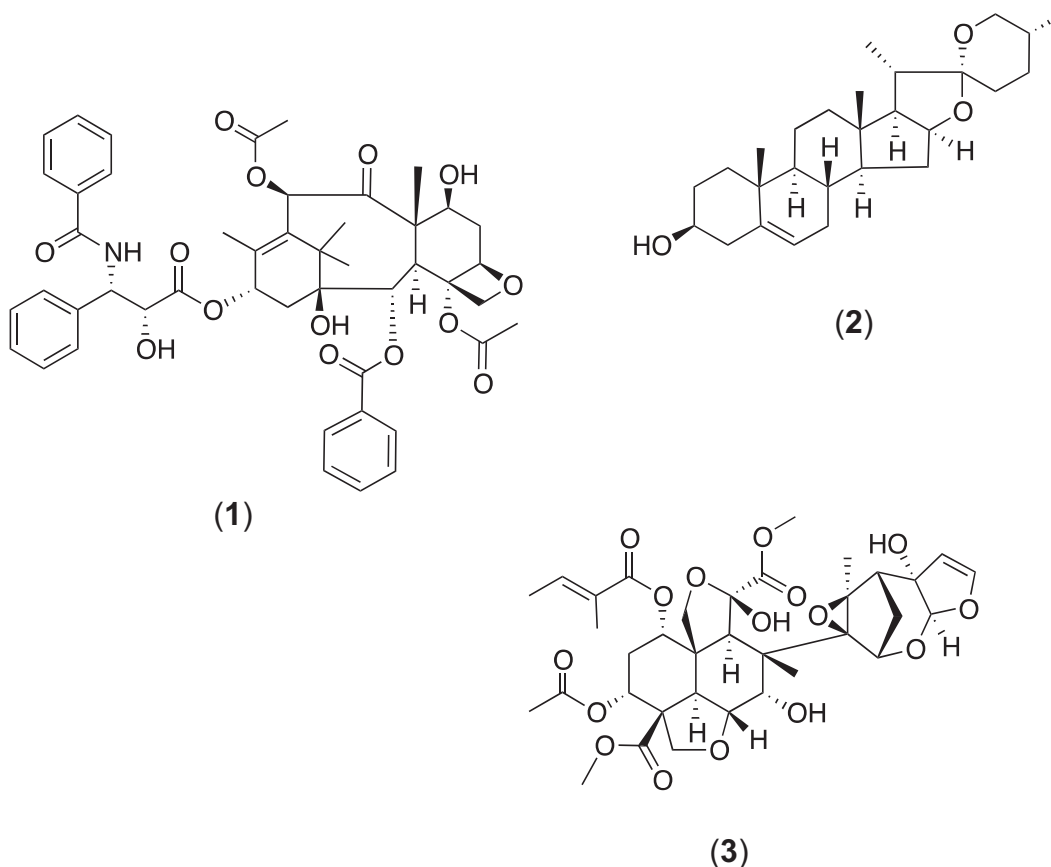
Con la finalidad de disminuir algunos de estos daños e incrementar la producción de alimentos, en la actualidad, se emplean una gran variedad de plaguicidas sintéticos (Albert 2005). Un plaguicida se define como una sustancia o mezcla de éstas destinadas a prevenir, controlar o destruir aquello que se considere una plaga. Las plagas incluyen especies de plantas o animales indeseables que causar algún tipo de perjuicio o interferencia en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de productos de origen agrícola y ganadero (INE 1996).

Los riesgos del uso indiscriminado de los plaguicidas son altos, a pesar de su importancia y beneficios en la agricultura, ya que su toxicidad es elevada (Ibarra et al. 2006). Los efectos negativos de los plaguicidas incluyen: la resistencia que desarrollan muchos insectos plaga, la reducción poblacional de animales y vegetales, la presencia de contaminantes en el agua, aire y suelo; además, afectan la fertilidad del suelo, la cual depende de los microorganismos y su interacción con los materiales orgánicos e inorgánicos del mismo. Además puede provocar la intoxicación de personas ocupacionalmente expuestas (Ibarra et al. 2006).

Actualmente, la búsqueda de agroquímicos alternativos para la protección de cultivos incluye no solo productos naturales derivados de plantas, sino que se han explorado otras alternativas como es el uso de bacterias, virus, nemátodos entomopatógenos, organismos marinos y hongos capaces de producir sustancias bioactivas (González et al. 2002). Un grupo de microorganismos que constituye un campo prometedor para el descubrimiento de productos naturales con actividad biológica sobre los patógenos de plantas son los hongos endófitos



(Suryanarayanan et al. 2009). Estos microorganismos producen una gran cantidad de metabolitos secundarios útiles en la industria, la medicina (Sette et al. 2006; Yu et al. 2010; Cui et al. 2011) y la agricultura (Suryanarayanan et al. 2009; Wang y Dai 2010). Además, en estudios recientes se estima que existen 1.5 millones de especies fúngicas de las cuales solo el 1% se ha estudiado desde el punto de vista químico (Suryanarayanan et al. 2009). Algunos de los metabolitos secundarios producidos por endófitos tienen en la actualidad una elevada importancia económica, como el anticancerígeno taxol (1), producido por el hongo endófito *Taxomyces andreanae*; la diosgenina (2), un compuesto generado por los hongos endófitos *Cephalosporium* sp. y *Paecilomyces* sp., y quien es precursor de la progesterona, y disminuye la concentración de colesterol; la azaridactina (3), que es empleada como insecticida natural y es obtenida del hongo endófito *Eupenicillium parvum* (Venugopalan y Srivastava 2015).



INTRODUCCIÓN



Con base en las consideraciones anteriores y tomando en cuenta que existen alrededor de 300 000 especies de plantas en la tierra colonizadas por una gran variedad de hongos endófitos (Strobel y Daisy 2003; Andrade y Franken 2013), es evidente que los microorganismos endófitos constituyen una fuente prometedora e inagotable para el descubrimiento de compuestos bioactivos, con una gran diversidad estructural y con posibles aplicaciones en la medicina, la industria química y la agricultura.

En este contexto, el presente proyecto estudia aspectos de la ecología química de hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae), y su potencial uso como una fuente de metabolitos secundario útiles en la agricultura. El estudio de estos hongos endófitos con potencial antagónico, constituye el primer reporte de microorganismos asociados a esta especie, además de que contribuye al conocimiento de nuevos compuestos con actividad biológica obtenidos de los endófitos *Xylaria* sp. y *Aspergillus* sp.



2. ANTECEDENTES

2.1. *Problemática en la agricultura*

A lo largo de la historia una gran variedad de plantas han sido domesticadas para mejorar el rendimiento y la calidad de los frutos que producen (Smith et al. 2012). Como consecuencia, dichas plantas han perdido su resistencia natural y silvestre contra numerosas enfermedades causadas por diversos microorganismos patógenos y a la invasión de malezas. Estas plagas disminuyen el rendimiento de los cultivos, así como la calidad de las cosechas y, en consecuencia, se genera escasez de alimentos y crisis económicas (Pérez-Jaramillo et al. 2016).

Asta la fecha, se emplean un gran número de pesticidas para garantizar un rendimiento satisfactorio y calidad en las cosechas. Sin embargo, su uso indiscriminado provoca daños en los cultivos, al ambiente e incluso en la salud de los agricultores y los consumidores. Otro problema que se ha generado con el uso excesivo de pesticidas es la resistencia por parte de una gran variedad de microorganismos y malezas (Pérez-Jaramillo et al. 2016). Estos riesgos ponen en evidencia la necesidad del empleo de diversas alternativas para el control de plagas como por ejemplo:

- Control genético: cultivo de diversas variedades de plantas que sean resistentes, tolerantes o menos susceptibles al ataque de plagas (Hammond Kosack y Parker 2003).
- Prácticas culturales: disminución de la poblacional de una plaga por medio de la preparación de suelo, manejo del agua, cultivos asociados, eliminación de hierbas hospederas perjudiciales, control de la época de siembra, etc. (Gepts 2003).
- Control mecánico y físico: construcción de barreras físicas, como el uso del fuego e instrumentos de labranza para abatir malezas.
- Control por confusión sexual: basado en la manipulación de feromonas, generalmente producidas por las hembras para atraer a los machos.
- Control químico: los insecticidas son y serán un elemento indispensable en



los programas de fitoprotección, pues son versátiles, fácil de aplicar, eficaces y comercialmente atractivos; sin embargo, su elevada toxicidad sobre el ambiente y la salud limitan su utilidad y demandan un manejo juicioso, aunado con el desarrollo de mecanismos de defensa otorgándoles resistencia frente a los insecticidas (Rusch et al. 2010).

- Control biológico: empleo de organismos vivos con el fin de regular la población de otros organismos indeseables (Chaudhary 2013).

En este último grupo están incluidos no solo los organismos vivos sino también los metabolitos secundarios que se pueden obtener a partir de ellos, que al ser de origen natural pueden presentar menor toxicidad, ser más específicos y tener menor bioacumulación en el ambiente o ser biodegradables (biopesticidas).

Durante varios años, se han obtenido una gran variedad de compuestos químicos de origen natural que se han empleado de forma directa por su potencial biológico o que han permitido, mediante su estructura, la síntesis de compuestos con diversas actividades biológicas. Existen por lo menos 200,000 productos naturales bioactivos (Berdy 2005), y entre los años 1981 y 2001, el 52% fue introducido al mercado. De los cuales, a finales del 2002, más de 20,000 metabolitos bioactivos se han aislado de microorganismos (Berdy 2005). Los hongos son el grupo más importantes de organismos eucariotas que se están explotando para obtener metabolitos bioactivos con diversas aplicaciones (Hu et al. 2003; Stadler y Keller 2008), dada su capacidad de utilizar una gran variedad de sustratos y hábitats que les permite tener una versatilidad sintética (Suryanarayanan et al. 2009). Así por ejemplo, es de destacar a los hongos endófitos que al formar parte de microhábitats colonizados por más de una especie endofítica y al tener una estrecha relación con su planta hospedera, producen metabolitos secundarios bioactivos como parte de sus estrategia de supervivencia. Algunos de estos metabolitos se han empleado dentro de la agricultura para el control de patógenos de cultivo (Cheng y Cheng 2015). De acuerdo con Hawksworth, en el 2004 sólo 7% de las especies estimadas en la tierra (1,5 millones de hongos) han sido cultivados y seleccionados para la producción moléculas bioactivas



(Suryanarayanan et al. 2009). Esto hace evidente que sólo se han descubierto un pequeño porcentaje de compuestos químicos, económicamente importantes producidos por estos microorganismos.

2.2. Hongos endófitos

Los hongos endófitos son microorganismos que colonizan los tejidos internos de las plantas sin causarles síntomas aparentes de enfermedad (**Figura 1**) (Aly et al. 2011). Los hongos endófitos son un grupo muy diverso y polifilético de microorganismos que habitan en diversas partes de las plantas. Algunos establecen relaciones mutualistas con las plantas hospederas, mientras que otros son agentes patógenos oportunistas (Fesel y Zuccaro 2016). La mayoría pertenecen al Phylum Ascomycota, aunque también se han encontrado en los Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota.



Figura 1. Planta colonizada por hongos endófitos (modificado de Partida y Heil, 2011).

2.2.1. Interacción hongo endófito – planta hospedera

Los hongos endófitos son conocidos por conferir una mejor adaptación a su planta hospedera al promover el crecimiento mediante la biosíntesis de hormonas vegetales, mejorar la adquisición de nutrientes y aumentar la resistencia a

ANTECEDENTES

diversos factores bióticos y abióticos, como salinidad, tolerancia a sequía, metales, enfermedad, calor y herbívoros (**Figura 2**) (Rodríguez et al. 2009). A cambio de estos beneficios, el hongo endófito mediante una relación mutualista, encuentra hábitat y alimento dentro de su hospedera. Las relaciones mutualistas que se establecen entre los endófitos y las hospederas están mediadas en alto grado por los metabolitos secundarios que producen ambas especies. En el caso de los endófitos algunos de ellos disminuyen la probabilidad de que la planta sea atacada por microorganismos patógenos e incrementan sus defensas químicas contra competidores y diversos factores adversos, a través de tres mecanismos:

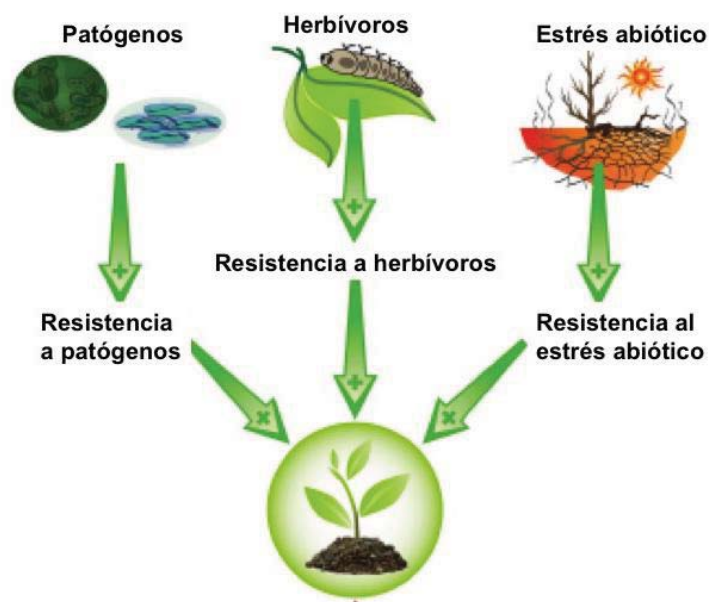


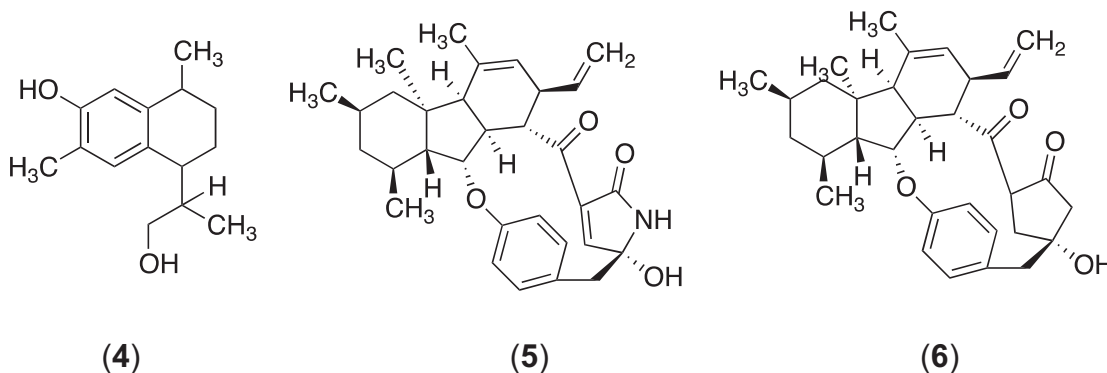
Figura 2. Protección a factores bióticos y abióticos que genera el hongo endófito a la planta hospedera (modificado de Partida y Heil 2011).

2.2.1.a. Mecanismo directo

El mecanismo directo está mediado por enzimas capaces de hidrolizar una gran variedad de compuestos como quitina, celulosa, proteínas, entre otros (Tripathi et al. 2008), y por metabolitos secundarios con actividad contra diversos patógenos, los cuales son producidos directamente por el hongo endófito. Por ejemplo, el 3,12-dihidroxicadaleno (**4**), producido por el hongo endófito *Phomopsis cassiae*,

ANTECEDENTES

aislado de la planta hospedera *Cassia spectabilis* (Leguminosae), tiene actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos de la planta hospedera; *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium sphaerospermum* (Silva et al., 2006). Las pirrocidinas A y B (**5** y **6**), aisladas del hongo endófito del maíz *Acremonium zeae* y poseen un potencial antifúngico significativo sobre el crecimiento de los fitopatógenos del maíz *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*. Además evaluaciones posteriores demostraron actividad inhibitoria sobre otros hongos patógenos de cultivos como *Fusarium graminearum*, *Nigrospora oryzae*, *Rhizoctonia zeae*, *Alternaria alternata* y *Curvularia lunata*, y la pirrolicidina (**6**) mostró una potente actividad antibacteriana contra *Clavibacter michiganense* bacteria patógena del maíz. Estos estudios pone en evidencia el potencial de los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos para la protección de sus hospederas (Wicklow y Poling 2009).



2.2.1.b. Mecanismo indirecto

Este mecanismo se da por medio de la inducción de resistencia a factores bióticos y abióticos, a través de la estimulación en la producción de los metabolitos secundarios y/o los mecanismos de defensa de la planta hospedera (**Figura 3**) (Rodríguez et al. 2009). Por ejemplo, la presencia de *Fusarium solani* en la raíz de *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) provoca la resistencia sistémica contra el patógeno foliar *Septoria lycopersici* (Kavroulakis et al. 2007). Por otra parte, la presencia del endófito *Neotyphodium lolii*, endófito de *Lolium perenne* (Poaceae), provoca el aumento en la producción de superóxido dismutasa y peroxidasa por parte de su planta hospedera y, en consecuencia reduce las lesiones causadas

ANTECEDENTES

por diversos patógenos en las hojas (Liu y Jiang 2010). Los endófitos de género *Fusarium* cepas E4 y E5, aislados de *Euphorbia pekinensis* (Euphorbiaceae), promueven el crecimiento de su planta hospedera por efecto de las fitohormonas que el hongo endófito produce e induce la producción diterpenos y triterpenos, fitoalexinas que le permiten a la planta hospedera defenderse contra otros microorganismos fitopatógenos (Dai et al. 2005). Finalmente, *Colletotrichum* sp., endófito de *Artemisia annua* (Asteraceae), produce sustancias similares al ácido indol acético que regulan el crecimiento de la planta hospedera (Wang et al. 2006).

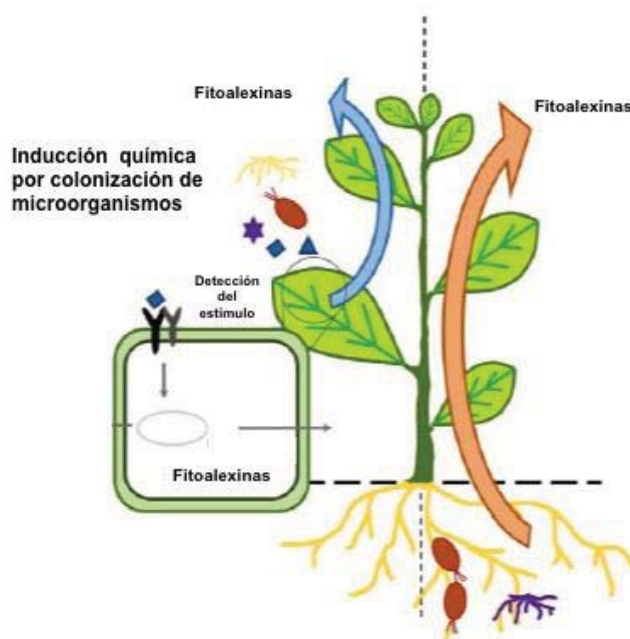


Figura 3. Defensas de la planta hospedera por presencia de los hongos endófitos (modificado de Partida y Heil 2011).

2.2.1.c. Mecanismo ecológico

Este mecanismo se lleva a cabo por ocupación del nicho ecológico, competencia por nutrientes, hiperparasitismo y predación, ya que la rápida colonización de los hongos endófitos en la hospedera no deja espacio y limita los nutrientes para los microorganismos patógenos, generando así, una protección hacia la planta hospedera. Un ejemplo de protección por hiperparasitismo y predación son los hongos endófitos del género *Trichoderma* que parasitan las hifas de microorganismos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* envolviéndolas, penetrándolas y liberando liasas para descomponer la pared celular del patógeno



para su posterior empleo como sustrato (Benhamou y Chet 1997; Grosch et al. 2006).

2.2.2. Interacciones entre endófitos

Los hongos endófitos pasan una gran parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos internos de su planta hospedera. (Fisher y Petrini 1992; Kharwar et al. 2009). En consecuencia no solo interactúan con su planta hospedera, si no también entre ellos por medio de interacciones interespecíficas mediadas a través de mecanismos físicos o directos o por mecanismos químicos o indirectos. Los mecanismos físicos o directos involucran a las interacciones entre hifas y a la interferencia hifal (micoparasitismo), en donde el hongo endófito parasita alrededor de las hifas del patógeno por diversos medios como torsión, penetrando las hifas de patógenos y/o secretando liasas para descomponer pared celular de estos. También incluyen el contacto de micelio inhibiendo el crecimiento de los competidores (Manczinger et al. 2002). Por ejemplo, el hongo endófito *F. verticillioides* mostró reducción en la enfermedad del carbón en el maíz, causada por *Ustilago maydis*, en estudios en invernadero por medio de co-cultivos colocando una suspensión de esporas del endófito y el fitopatógeno sobre las hojas observando una reducción moderada de los síntomas de la enfermedad, que los autores interpretan como consecuencia de la competencia entre el endófito y el patógeno o interferencia directa con el proceso de infección temprana (Rodriguez et al. 2012). En estudios *in vitro* e *in situ*, se observó la reducción de biomasa de *U. maydis* y un aumento de la biomasa de *F. verticillioides* cuando se cultiva de forma conjunta en comparación a los cultivos individuales, sin embargo, al analizar los perfiles de los metabolitos producidos por *F. verticillioides* no se encontró ningún metabolito secundario como candidato responsable del efecto antifúngico observado (Rodriguez et al. 2011; Rodriguez et al. 2012), lo que la inhibición del hongo endófito sobre el fitopatógeno posiblemente este siendo generada por hiperparasitismo entre las hifas.

Por otra parte, los mecanismos químicos o indirectos se dan por la producción de compuestos solubles, algunos metabolitos primarios, metabolitos secundarios,



ANTECEDENTES

enzimas o por compuestos volátiles efectivos a distancia que limitan el crecimiento de las hifas del competidor (Atmosukarto et al. 2005). Un ejemplo de este último mecanismo se ha observado en especies de hongos pertenecientes a los géneros *Muscodor*, *Trichoderma* e *Hypoxylon*, productores de una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), con un elevado potencial biológico, que los ha llevado a ser empleados como agentes de micofumigación o biofumigación (Daisy et al. 2002). Así las especies *Muscodor albus*, aislado de *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae) y de *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae) (Strobel 2006), *M. crispans* aislado de *Ananas ananassoides* (Bromeliaceae) (Ezra et al. 2004) y *M. yucatanensis* aislado de *Bursera simaruba* (Burseraceae) (Strobel et al. 2001), mostraron en estudios *in vitro* un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento y muerte de diversos hongos (*Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*) y oomicetos (*Aphanomyces cochlioides* y *Pythium ultimum*) (Stinson et al. 2003; Mercier y Jiménez 2004). Algunos de los VOCs mayoritarios identificados en estas especies corresponden al ácido metil butanoico, el 1-octeno-3-etil-guaiol, la *N*-(1 metilpropil), el naftaleno, el cariofileno, el feniletil alcohol, el acetato de 2-feniletilo, y varios derivados del ácido 2-metilpropanoico, entre otros (Stinson et al. 2003; Mercier y Jiménez 2004). Además, algunos endófitos del género *Muscodor* producen VOCs repelentes de insectos, como es el caso de *Muscodor vitigenus* aislado de *Paullinia paullinioides* (Sapindaceae), del cual se identificó como VOC principal al naftaleno con actividad repelente de insectos en pruebas *in vitro* sobre *Cephus cinctus* conocida como mosca sierra, la cual afecta los cultivos de trigo (Daisy et al. 2002). Otro ejemplo de hongo endófito productor de VOCs con potencial biológico es el hongo endófito *Hypoxylon* sp., aislado de *Persea indica* (Lauraceae), que produce VOCs como el 1,8-cineol, el 1-metil-1 y el 4-ciclohexadieno con actividad antimicrobiana contra *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinnamomi*, *Cercospora beticola* y *S. sclerotiorum*. Estos estudios sugieren que los VOCs pueden desempeñar algún papel en la biología del endófito y su supervivencia en su planta hospedera (Tomscheck et al. 2010). Otro ejemplo es *Phomopsis* sp. aislado como endófito de *Odontoglossum* sp. (Orchidaceae), que



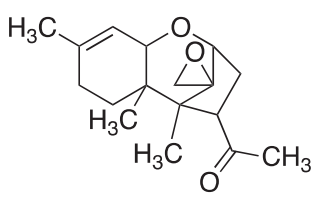
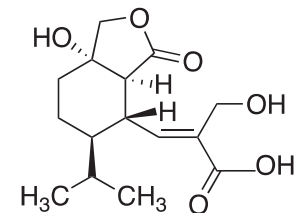
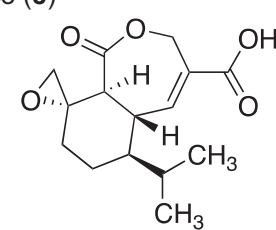
produce una mezcla de VOCs que incluyen al sabineno (un monoterpeno con un olor picante), el 1-butanol, el 3-metil-1-propanol y la 2-propanona con propiedades antifúngicas contra patógenos de plantas de los géneros *Pythium*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Verticillium* y *Colletotrichum* (Singh et al. 2011).

Es importante señalar que las interacciones interespecíficas han permitido evidenciar que en cultivos *in vitro* y al estar involucrados una gran cantidad de metabolitos secundarios constituyen una importante herramienta para la selección de especies útiles para el aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos que pueden ser útiles para la humanidad.

2.2.3. Metabolitos secundarios bioactivos de hongos endófitos

Los metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos presentan una amplia diversidad química que incluye alcaloides, péptidos, esteroides, terpenoides, isocoumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanos, fenoles, ácidos fenólicos, compuestos alifáticos, lactonas, entre otros (Herre et al. 2005; Hamayun et al. 2009; Saari y Faeth 2012). En el **Cuadro 1** se muestran ejemplos selectos de hongos endófitos productores de metabolitos secundarios bioactivos.

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos.

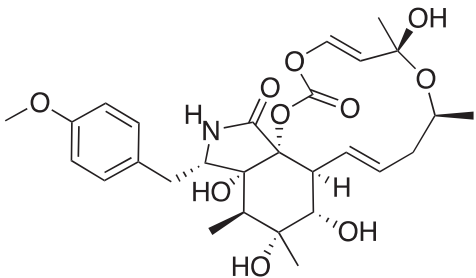
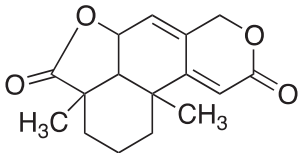
Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
 trichodermina A (7)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Ilex cornuta</i>	Antifúngica <i>Alternaria solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> Fitotóxica <i>Triticum aestivum</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Zea mays</i>	(Chen et al. 2007) (Cutler y LeFiles 1978)
 ácido hidroheptelidico (8)	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Abies balsamea</i>	Insecticida <i>Choristoneura fumiferana</i>	(Calhoun et al. 1992)
 ácido heptelidico (9)				



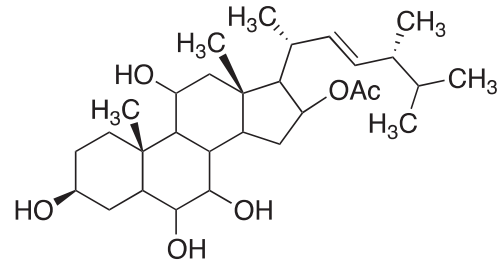
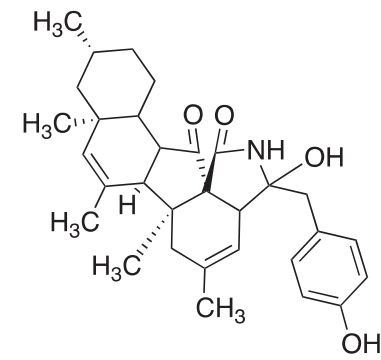
Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos (Continuación).

Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
<p>chocoles (10)</p>	<i>Epichloë typhina</i>	<i>Phleum pratense</i>	Antifúngica <i>Cladosporium phlei</i>	(Yoshihara et al. 1985)
<p>periconicina A R1=H (11) periconicina B R1=OH (12)</p>	<i>Periconia</i> sp.	<i>Taxus cuspidata</i>	Antibacteriana <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i>	(Kim et al. 2004) (Shin et al. 2005)

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos (Continuación).

Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
 escoparasina B (13)	<i>Eutypella scoparia</i> PSU-D44	<i>Garcinia dulcis</i>	Antifúngica <i>Microsporium gypseum</i>	(Pongcharoen et al. 2006)
 diterpene CJ-14445 (14)	<i>Botryosphaeria</i> sp. MHF	<i>Maytenus hookeri</i>	Antifúngica <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Penicillium avellaneum</i>	(Yuan et al. 2009)

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos
(Continuación).

Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
 penicisteroide A (15)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Alga roja marina del género <i>Laurencia</i>	Antifúngica <i>Aspergillus niger</i> <i>Alternaria brassicae</i>	(Gao et al. 2011)
 fomopsicalasina (16)	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Salix gracilostyla</i>	Antibacteriana <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella gallinarum</i> Antifúngica <i>Candida tropicalis</i>	(Horn et al. 1995)

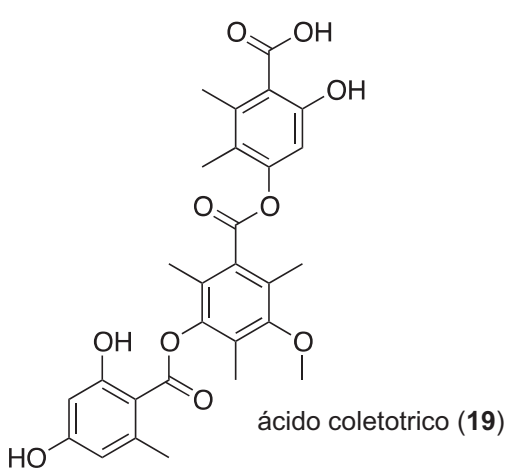
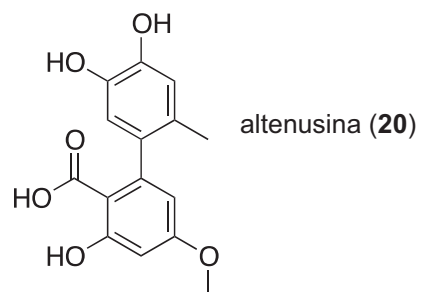


Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos (Continuación).

Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
<p>fomoenamida (17)</p>	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Garcinia dulcis</i>	Antibacteriana <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Rukachaisirikul et al. 2008)
<p>criptocina (18)</p>	<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Antifúngica <i>Pyricularia oryzae</i>	(Liu et al. 2009)



Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos (Continuación).

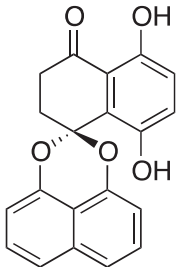
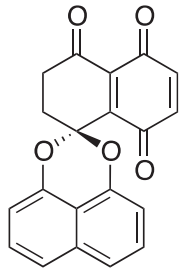
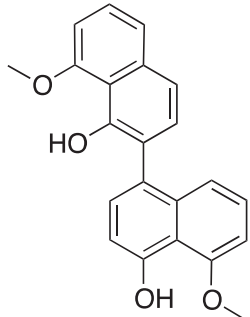
Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
 ácido coletotrico (19)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Artemisia mongolica</i>	Antibacteriana <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Sarcina lutea</i>	(Zou et al. 2000)
 altenusina (20)	<i>Alternaria</i> sp. (UFMGCB55)	<i>Trixis vauthieri</i>	Antifúngica <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(Cota et al. 2008) (Johann et al. 2012)



Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos
(Continuación).

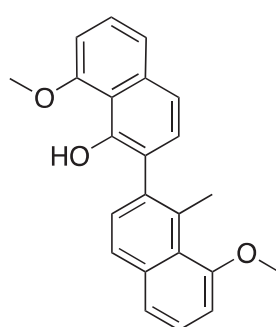
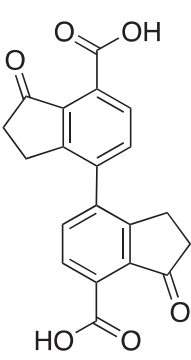
Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
<p>(R)-meleina (21)</p>	<i>Eupenicellium brefeldianum</i> , <i>Paecilomyces</i> sp. <i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Taxus mairei</i> <i>Torreya grandis</i>	Antifúngica <i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i> <i>Trichophyton rubrum</i>	(Harri et al. 1963) (Betina 1992) (Wang et al. 2007)
<p>brefeldina A (22)</p>	<i>Pezizula livida</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	Antibacteriana <i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i> Antifúngica <i>Ustilago violácea</i> <i>Eurotium repens</i>	(Schulz et al. 1995)

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos (Continuación).

Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
 palmarumicina CP17 (23)	<i>Edenia</i> sp.	<i>Petrea volubilis</i>	Antiparasitaria <i>Leishmania donovani</i>	(Martínez Luis et al. 2008)
 palmarumicina CP18 (24)				(Lazo et al. 2001)
 nodulisporina A (25)	<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Juniperus cedrus</i> <i>Erica arborea</i>	Antifúngica <i>Microbotryum violaceum</i> Antibacteriana <i>Bacillus megaterium</i>	(Dai et al. 2009) (Dai et al. 2006)

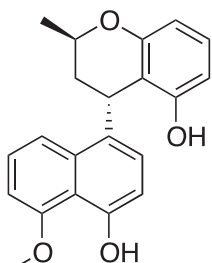
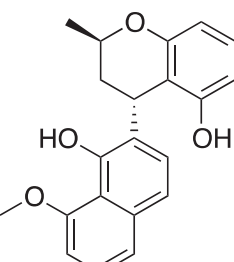
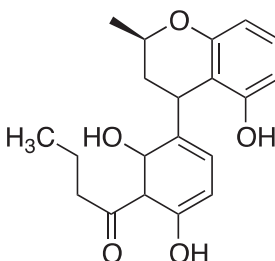


Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos (Continuación).

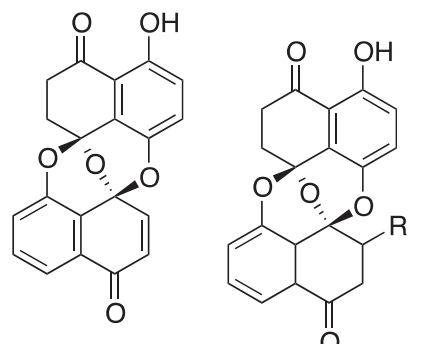
Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
nodulisporina B (26) 	<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Juniperus cedrus</i> <i>Erica arborea</i>	Antifúngica <i>Microbotryum violaceum</i>	(Dai et al. 2006;
nodulisporina C (27) 			Antibacteriana <i>Bacillus megaterium</i>	Dai et al. 2009)



Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos (Continuación).

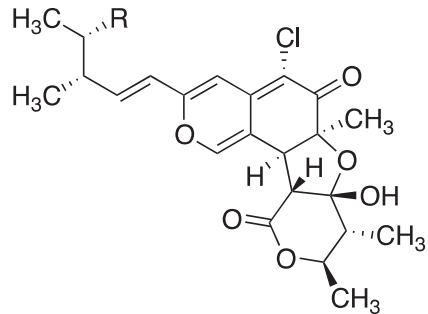
Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
 nodulisporina D (28)	<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Juniperus cedrus</i> <i>Erica arborea</i>	Antifúngica <i>Microbotryum violaceum</i>	(Dai et al. 2006; Dai et al. 2009)
 nodulisporina E (29)				
 nodulisporina F (30)				

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos (Continuación).

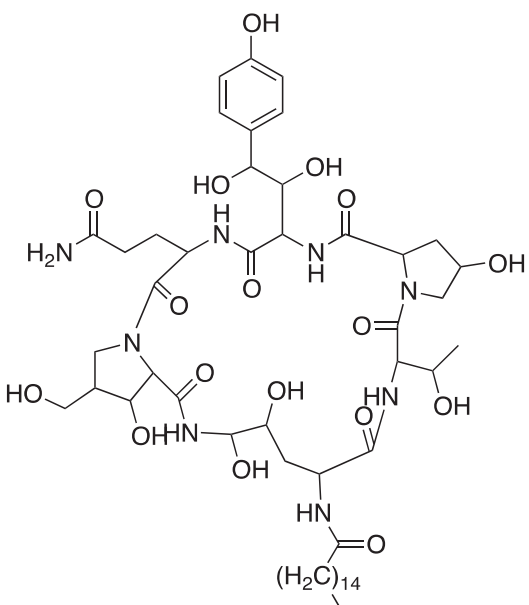
Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
<p>pleusomerina EG₁ (31)</p>  <p>pleusomerina EG₂ R=OH (32)</p> <p>pleusomerina EG₃ R=OCH₃ (33)</p> <p>pleusomerina EG₄ R=H (34)</p>	<p><i>Edenia gomezpompae</i></p>	<p><i>Callicarpa acuminata</i></p>	<p>Antifúngica <i>Phytophthora capsici</i> <i>Phytophthora parasitica</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Alternaria solani</i></p> <p>Fitotóxica <i>Amaranthus hypochondriacus</i> <i>Solanum lycopersicum</i> <i>Echinochloa crus-galli</i></p>	<p>(Macias Rubalcava et al. 2008)</p>



Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos (Continuación).

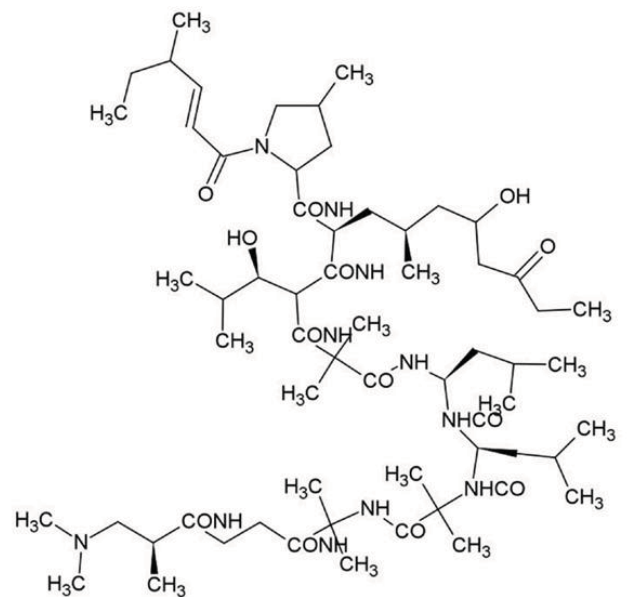
Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
 quetoglobosina A R=OH (35) quetoglobosina C R=O (36)	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	Antifúngica <i>Mucor miehei</i>	(Qin et al. 2009)

Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos (Continuación).

Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
 criptocandina (37)	<i>Cryptosporiopsis cf. quercina</i>	<i>Tripterigeum wilfordii</i>	Antifúngica <i>Candida albicans</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	(Strobel y Daisy 2003)



Cuadro 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de hongos endófitos (Continuación).

Metabolitos Secundarios	Endófito	Planta Hospedera	Actividad Biológica	Referencia
<p>leucinostatina A (38)</p> 	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Taxus baccata</i>	Antioomiceto <i>Pythium ultimum</i>	(Strobel et al. 1997)





2.3. El género *Xylaria*

El género *Xylaria* Hill (ex Schrank, 1789, Xylariaceae) comprende más de 300 especies fúngicas ubicuas en la naturaleza, que predominan en regiones tropicales y subtropicales (Fournier et al. 2010). Las especies pertenecientes a este género comúnmente son saprobias o parásitos de plantas leñosas, y muchas de ellas se han encontrado como endófitas, principalmente de plantas tropicales como cultivos de café, plátano, palmeras, orquídeas, bromelias y helechos.

Algunos hongos endófitos del género *Xylaria* producen una gran variedad de metabolitos secundarios con diferentes estructuras químicas, como son alcaloides, benzoquinonas, compuestos aromáticos, citocalacinas sesquiterpenoides, diterpenoides, cumarinas, triterpenos y policetidos, y poseen diversas actividades biológicas, particularmente como agentes fitotóxicos, antifúngicos y antibacterianos (Srinuan et al. 2007; Liu et al. 2008; Silva et al. 2010; Santos et al. 2011; Isaka et al. 2012; Ratnaweera et al. 2014; Wu et al. 2014). Cabe señalar que se estima que únicamente una tercera parte ha sido estudiada desde el punto de vista químico y biológico otros (Liu et al. 2008; Silva et al. 2010; Santos et al. 2011; Isaka et al. 2012; Ratnaweera et al. 2014; Wu et al. 2014). A continuación se mencionan los estudios de algunos ejemplos selectos.

La fomemona (**39**) producida por *Xylaria* sp. un hongo endófito asociado a *Piper aduncum* (Piperaceae) que tiene actividad antifúngica contra *C. cladosporioides* y *C. sphaerospermum* (da Silva y Parente 2010). Asimismo, este compuesto presenta una actividad fitotóxica que causa marchitamiento las hojas de jitomate e induce la pérdida de electrolitos y la disfunción de la permeabilidad de la membrana (Capasso et al. 1984).

El 1 α -10 α -epoxi-7 α -hidroxieremofil-11-en-12,8- β -olido (**40**), obtenido de *Xylaria* sp. BCC 21097, aislado de la palma *Licuala spinosa* (Arecaceae) posee actividad contra *Candida albicans* y el parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* (Isaka et al. 2010).



El diterpeno sordaricino (**41**) producido por el hongo endófito *Xylaria* sp. aislado de las hojas de *Garcinia dulcis* (Clusiaceae) mostró actividad antifúngica contra *Candida albicans* ATCC90028 en ensayos de difusión en agar, y contra *Candida glabrata*, inhibiendo el factor de elongación 2 (EF-2) que cataliza la translocación ribosomal durante la traducción de la síntesis de la proteína (Pongcharoen et al. 2008).

Los compuestos 19, 20-epoxicitocalasinas (**42**), 19, 20-epoxitocalasina C (**43**), D (**44**), N (**45**), y R (**46**) producidos por *Xylaria* sp. aislada de *Piper aduncum* (Piperaceae), mostraron actividad antifúngica sobre *C. cladosporioides* y *C. sphaerospermum*, y citotóxica contra líneas celulares HeLA (tumor de cuello uterino humano) y CHO (ovario de hámster chino) (da Silva y Parente 2010).

La 7-amino-4metilcunarina (**47**) producida por *Xylaria* sp. YX-28, aislada de *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), presenta actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia* sp. y *Shigella* sp., además de actividad antifúngica contra *C. albicans* (Liu et al. 2008).

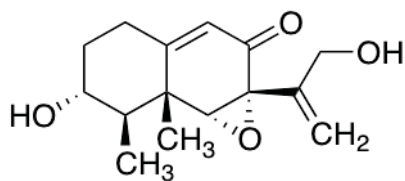
La decolorgriseofulvina (**48**) producida por *Xylaria* sp. F0010 aislada de *Abies holophylla* tiene actividad antifúngica contra los hongos patógenos de cultivos *F. oxysporum* y *P. capsici* (Park et al. 2005).

La (+)-fomalactona (**49**) y la 6-(1-propenil)-3,4,5,6-tetrahidro-5-hidroxi-4piran-2-ona (**50**), producidas por el hongo endófito *Xylaria* sp. Grev, aislado de *Siparuna* sp. (*Siparunaceae*), han mostrado actividad antimalárica contra *P. falciparum* y un efecto citotóxico sobre células Vero (Jimenez et al. 2008).

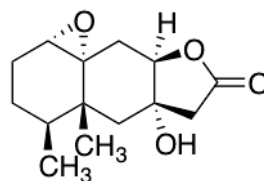
Las 3S,4R-(+)-4-hidroximeleina (**51**) y 3S,4S-(+)-4-hidroximeleina (**52**) producidas por el hongo endófito *Xylaria feejeensis* aislado de *Hintonia latiflora* (Rubiaceae), que inhiben a la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (α -GHY) con un valor de IC₅₀ de 441 \pm 23 y 549 \pm 2.5 μ M, respectivamente (Rivera-Chávez et al. 2015).



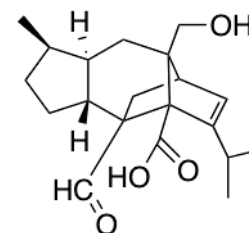
Finalmente los compuestos (4*S*,5*S*,6*S*)-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-5,6-epoxi-ciclohexen-2-ona o coriloxina (**53**), 2-hidroxi-5-metoxi-3-metil-ciclohexen-2,5-dien-1,4-diona (**54**) y 2,6-dihidroxi-5-metoxi-3-metil-ciclohexen-2,5-dien-1,4-diona (**55**), producidos por el hongo endófito *Xylaria feejeensis* aislamiento (SM3e-1b), obtenido de *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae), tienen actividad fitotóxica significativa sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y el consumo de oxígeno de las semillas de *Trifolium pratense*, *Medicago sativa*, *Panicum miliaceum*, y *A. hypochondriacus* (García Méndez et al. 2016).



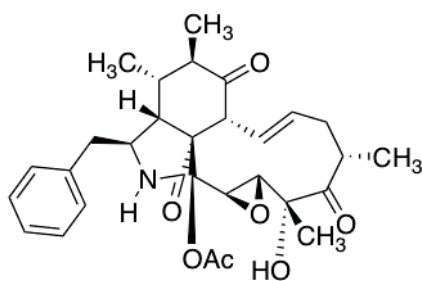
(39)



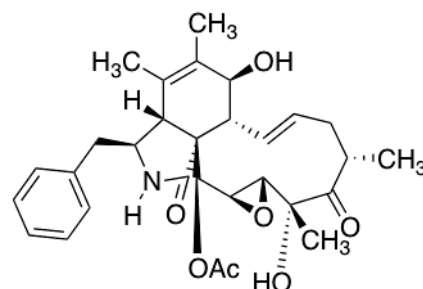
(40)



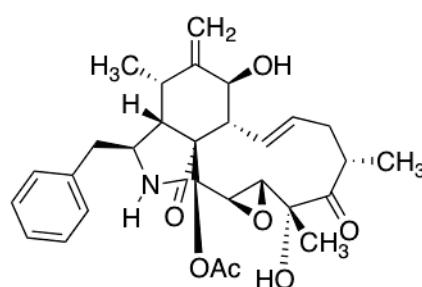
(41)



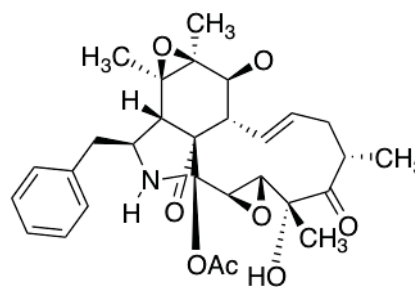
(42)



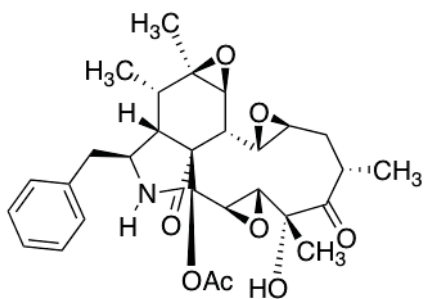
(43)



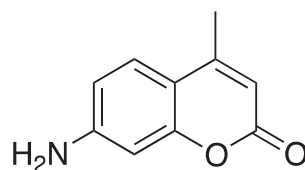
(44)



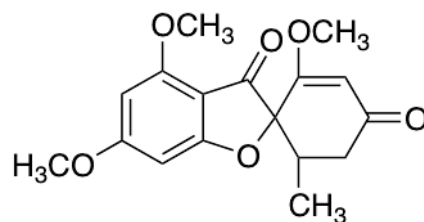
(45)



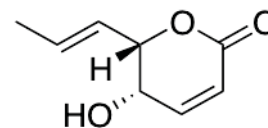
(46)



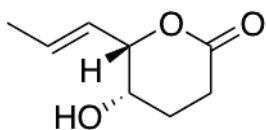
(47)



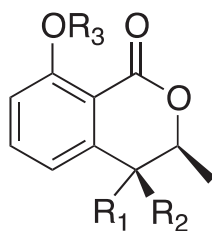
(48)



(49)

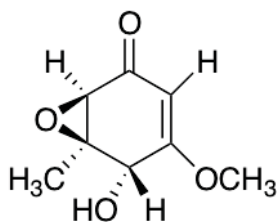


(50)

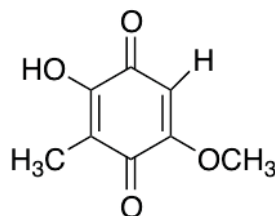


$R_1=OH, R_2=R_3=H$ (51)

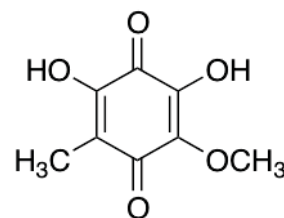
$R_1=R_3=H, R_2=OH$ (52)



(53)



(54)



(55)



2.4. El género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* (Trichocomaceae) lo comprenden alrededor de 185 especies de hongos filamentosos que poseen estructuras microscópicas con hifas septadas y conidióforos rodeados por fiálides en forma de botella, de donde se desprenden las esporas. Macroscópicamente, son hongos filamentosos que poseen distintos tonos de verde pardo, amarillo, blanco, gris y negro.

Los hábitats naturales de los hongos del género *Aspergillus* son el heno y el compostaje; sin embargo tiene la capacidad de crecer en diferentes temperaturas, en diferentes condiciones ambientales y nutricionales. Las especies de este género son ubicuos, y muchas de ellas saprobias, algunas parásitas y otras son tóxicas (Fennell et al. 2003).

El rango de temperatura de crecimiento de *Aspergillus* va de 0-5°C hasta 50-55°C, estando el óptimo entre 30-33°C para la mayoría de las especies. Algunos pueden ser patógenos oportunistas. Entre las patologías más frecuentes causadas por *A. fumigatus* se encuentran la aspergilosis pulmonar invasiva, la onicomycosis, la otomicosis y la sinusitis alérgica. Otras especies producen metabolitos secundarios tóxicos, como *A. flavus* que produce aflatoxinas que son hepatotóxicas para humanos, *A. fumigatus* y *A. caespitosus* generan fumitremógenos que son neurotóxicos y provocan temblores en el ganado que consume forraje contaminado (Fennell et al. 2003).

De acuerdo con la literatura, los hongos endófitos pertenecientes al género *Aspergillus* se caracterizan por producir compuestos químicos con diferentes estructuras químicas como benzofuranos, policétidos, diversos terpenos, alcaloides, entre otras, y que poseen diversas actividades biológicas, particularmente como agentes fitotóxicos, antifúngicos y antibacterianos. Por ejemplo, el asperfumoide (56) y la asperfumina (57), producidas por el hongo endófito *A. fumigatus* CY018, aislado de *Cynodon dactylon* (Gramineae) con actividad antifúngica contra *C. albicans*, *Tricophyton rubrum* y *A. niger* (Liu et al. 2004).



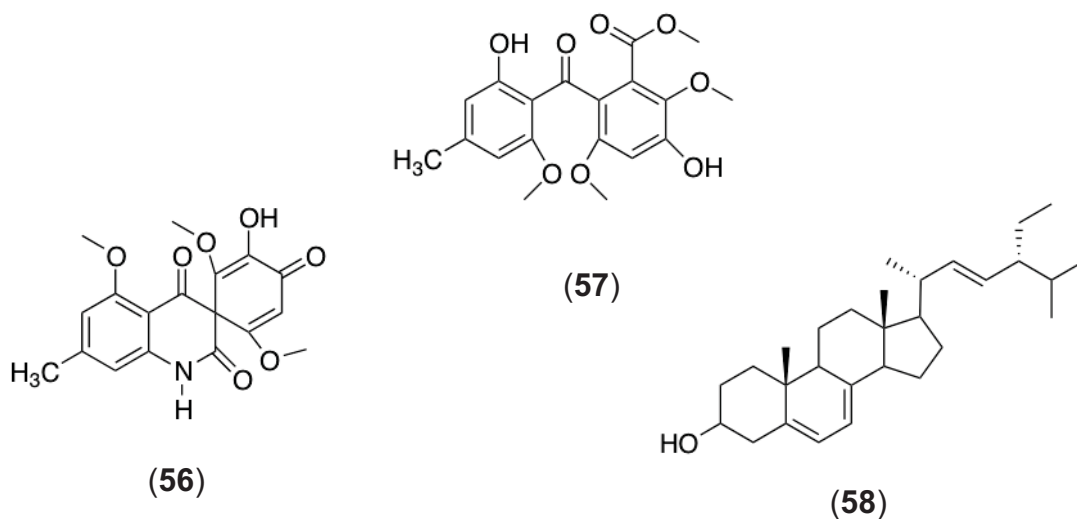
Los compuestos (22*E*,24*R*)-stigmasta-5,7,22-trien-3- β -ol (**58**), stigmast-4-ene-3-one (**59**), aspernolide F (**60**) producidos por el hongo endófito *Aspergillus terreus* aislado de *Carthamus lanatus* (Asteraceae), tienen actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Cryptococcus neoformans*: y actividad contra *Leishmania donovani* (Ibrahim et al. 2015).

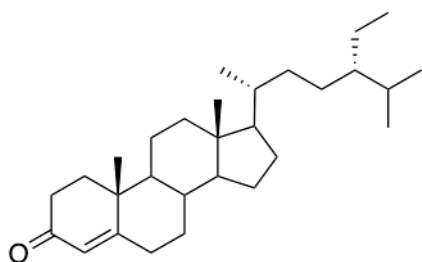
La fumitremorgina B (**61**), el verruculógeno (**62**), la fumitremorgina C (**63**), la ciclotriprostatina B (**64**), la troprostatina A (**65**) y la triprostatina B (**66**) producidas por el hongo endófito *A. tamarii* aislado de *Ficus carica* L. (Moraceae) presentan actividad antifúngica contra *P. oryzae*, *F. graminearum*, *B. cinerea* y *P. capsici* (Zhang et al. 2012).

El alcaloide fumigaclavina I (**67**) producido por el hongo endófito *A. terreus* LQ aislado de *Oryza sativa* (Gramíneas), tiene actividad citotóxica sobre líneas celulares SMMC-7721 hepatogarcinógenas (Shen et al. 2015).

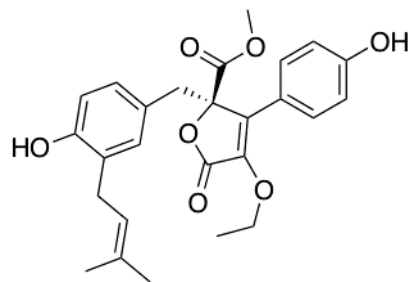
La flavipesina (**68**) producido por el hongo endófito *A. flavipes* ALL8 aislado de la planta *Acanthus ilicifolius* (Acanthaceae), posee actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Bai et al. 2014)

Finalmente la emodina (**69**), producidas por el hongo endófito *A. sydowii*, aislado de *Scapania ciliata* S. Lac (Scapaniaceae), muestra actividad inmunosupresora (Song et al. 2013).

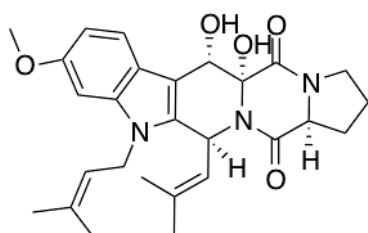




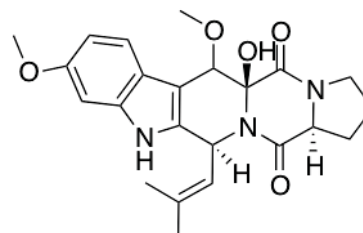
(59)



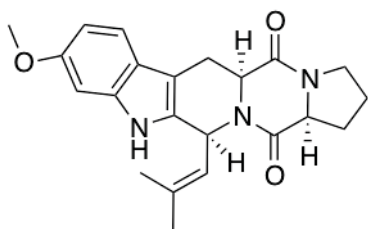
(60)



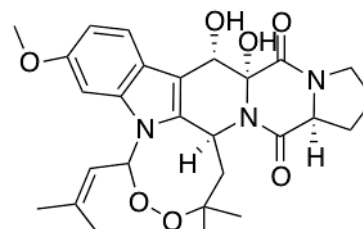
(61)



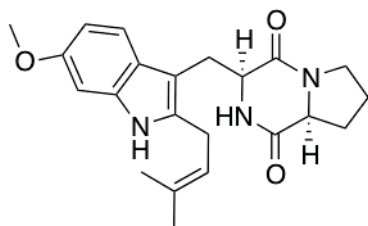
(62)



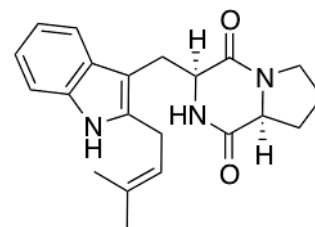
(63)



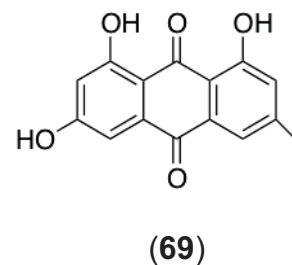
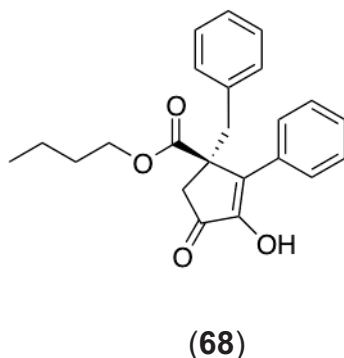
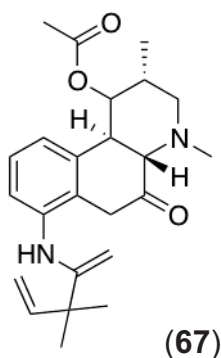
(64)



(65)



(66)



2.5. Estrategias de selección de hospederas útiles para el aislamiento de hongos endófitos

Existen algunas estrategias que permiten incrementar la posibilidad de aislar de hongos endófitos productores de metabolitos secundarios con actividad biológica a partir de fuentes naturales vegetales. Estas estrategias comprenden la selección de:

1. Plantas que tienen antecedentes etnobotánicos, como son las plantas con uso en la medicina tradicional (Ludwig 2015).
2. Plantas que crecen en ambientes únicos y que han desarrollado características especiales para su supervivencia (Sachin et al. 2013).
3. Plantas endémicas que han ocupado extensiones de tierra poco convencionales y que poseen una longevidad inusual (Strobel y Daisy 2003).
4. Plantas que crecen en áreas de alta biodiversidad y que, por lo tanto, pueden alojar endófitos igualmente biodiversos (Strobel y Daisy 2003).
5. Plantas sin síntomas de enfermedad o atacadas por herbívoros, las cuales pueden estar colonizadas por endófitos productores de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas e insecticidas (Tuntiwachwuttikul et al. 2006; Tuntiwachwuttikul et al. 2007).



2.6. Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla

La Reserva de la Biosfera de Huautla (REBIOSH) fue seleccionada como zona de estudio para realizar el muestreo de plantas hospederas, debido a su alta biodiversidad. La vegetación que caracteriza a la REBIOSH corresponde a bosque tropical caducifolio. Sin embargo, también se encuentran algunas áreas con selva mediana subcaducifolia (SBC), bosque de encino y una pequeña isla de pino. Las características fisonómicas principales de la SBC residen en su marcada estacionalidad climática, originando así, que la mayor parte de las especies vegetales pierdan sus hojas por periodos de cinco a siete meses en la época seca del año. Los árboles, en general, presentan una alturas de 4 a 10 m, y muy eventualmente hasta 15 m. La temperatura media anual es un factor determinante para definir la distribución de SBC, la cual oscila entre los 20 y 29 °C (Dorado et al. 2002; Durand y Vázquez 2011).

La REBIOSH se encuentra localizada en la provincia florística de la depresión del Balsas. En este sentido, la flora de esta área tiene una afinidad netamente neotropical. Se han registrado un total de 939 especies nativas de plantas vasculares, incluidas en 478 géneros y 130 familias. Las familias más abundantes en cuanto a número de especies son la Fabaceae, la Poaceae, la Asteraceae y la Burseraceae (Dorado et al. 2002; Durand y Vázquez 2011).

Existen varias especies que dominan el paisaje, siendo las más comunes *Conzattia multiflora* (Fabaceae), *Lysiloma acapulcense* (Fabaceae), *Larrea divaricata* (Fabaceae), *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae) y varias especies de los géneros *Bursera* (Buseraceae) y *Ceiba* (Bombacaceae). Las hojas compuestas son comunes, sobre todo en especies de las familias Fabaceae y Burseraceae. En las zonas alteradas se establecen asociaciones de vegetación secundaria formadas principalmente por arbustos espinosos mimosoideos (Fabaceae), con especies tales como *Acacia farnesiana*, *A. cochliacantha*, *A. pennatula*, *A. bilimekii*, *Mimosa polyantha*, *M. benthamii*, *Pithecellobium acatlensis* y *Prosopis laevigata*, entre otras (Dorado et al. 2002; Strobel y Daisy 2003; Durand y Vázquez 2011).



2.7. Planta hospedera *Haematoxylon brasiletto*

Haematoxylon brasiletto Karst. (Fabaceae) es un árbol de 10 a 15 m de altura y 40 cm de anchura. El tronco es irregular y muy acanalado, las hojas son compuestas, presenta racimos de flores, los frutos son largas y aplanadas y es muy abundante en el sureste de México. Este árbol se conoce comúnmente como "azulillo", "corteza de Brasil", "palo de Brasil", "palo de tinta" o "palo tinto" (Martinez 1979).

Como remedio casero, se emplea la infusión de la corteza para tratar padecimientos renales, hipertensión, trastornos de estómago, infecciones de boca, diarrea, úlceras gástricas y diabetes. La infusión de las flores se utiliza para aliviar dolores de espalda, tos, resfriado y, en algunos casos, para el control de diabetes y ataques epilépticos (Argueta et al. 1994.). Los estudios químicos realizados hasta la fecha han permitido el aislamiento de los compuestos aromáticos hematoxilina, brazilina, ácido caféico, galato de metilo, ácido gálico, ácido 4-hidroxicinámico, 5-metoxisolareno y floroglucinol (Rivero-Chávez 2008).



3. HIPÓTESIS

Los hongos endófitos producen una gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos que pueden contribuir, de manera importante a su sobrevivencia dentro de la hospedera, así como a los mecanismos de protección de la misma. El estudio químico de los hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae), colectada en una zona de alta biodiversidad, que constituye una fuente prometedora de metabolitos secundarios con posible aplicación como agentes de biocontrol o agroquímicos de origen natural.



4. OBJETIVO

Aislar y caracterizar metabolitos secundarios bioactivos, obtenidos de hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae) colectada en la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla, con el fin de contribuir al posible desarrollo de agroquímicos de origen natural y al conocimiento de las complejas relaciones endófito-fitopatógeno.

4.1. *Objetivos Particulares*

1. Aislar, purificar y conservar el mayor número de hongos endófitos y fitopatógenos de las hojas de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae).
2. Establecer, en lo posible, el género y la especie de los hongos endófitos y fitopatógenos puros, mediante la descripción de las características macroscópicas, microscópicas y el uso de técnicas moleculares.
3. Determinar las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos endófitos mediante la obtención de cultivos en pequeña escala, utilizando diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación.
4. Obtener los extractos orgánicos de los hongos endófitos, del medio de cultivo (por partición) y del micelio (por maceración).
5. Establecer cuantitativamente el potencial antifúngico de los extractos orgánicos obtenidos, sobre el crecimiento radial de cinco microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica* y *Pythium aphanidermatum*, empleando el método de dilución en agar.
6. Determinar cuantitativamente el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos obtenidos, sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*, utilizando el método de dilución en agar.
7. Determinar el potencial antagónico de los hongos endófitos con mayor actividad antifúngica a nivel de extracto, mediante la realización de



- bioensayos de antagonismo múltiple *in vitro* entre endófito-fitopatógeno con importancia económica.
8. Evaluar el potencial aleloquímico de los metabolitos secundarios volátiles producidos por al menos tres de los hongos endófitos, mediante bioensayos de antagonismo en cajas de Petri con división e identificar los compuestos volátiles, utilizando la técnica de microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases espectrometría de masas.
 9. Cultivar en mediana escala a los dos hongos endófitos con mayor actividad antifúngica y/o fitotóxica y obtener los extractos orgánicos, mediante un proceso de partición y/o maceración exhaustivo. Verificar la actividad biológica de los extractos orgánicos resultantes.
 10. Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios responsables de la actividad biológica, por medio de fraccionamientos químicos biodirigidos, utilizando diversos procedimientos cromatográficos y el método de dilución en caja de Petri para monitorear la actividad biológica.
 11. Evaluar el potencial antifúngico de los metabolitos secundarios mayoritarios aislados de las fracciones activas, sobre el crecimiento de diferentes microorganismos fitopatógenos con importancia económica.
 12. Determinar el potencial fitotóxico de los compuestos puros mayoritarios sobre la germinación, la longitud de la raíz y el proceso de respiración durante la germinación de las dos plantas blanco.
 13. Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios bioactivos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X.



5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. *Colecta del material vegetal*

Las hojas de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae) se colectaron en septiembre de 2010, empleando un criterio ecológico, en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH) ubicada en la localidad de Quilamula en el municipio de Tlalquitenango (8°30'4.1"N - 98° 51'52"O´ y 18°32'12.2"N - 99° 02'05"O 1080-1230 msnm), Estado de Morelos, México.

Para el aislamiento de hongos endófitos, se seleccionaron hojas sin síntomas de enfermedad, ni daños por herbivoría, de la parte media del árbol. De manera adicional se colectaron hojas con signos de enfermedad (sin daño de herbivoría), para el aislamiento de los hongos fitopatógenos.

5.2. *Microorganismos de prueba*

Se emplearon cinco fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, los oomicetos *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica* y *Pythium aphanidermatum*; y los hongos *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*. Las cepas fueron donadas por la Dra. Olga Gómez y la M. en C. Bertha Tlalpal Bolaños del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

5.3. *Plantas de prueba*

Se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) y de *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) adquiridas en el mercado de Tulyehualco CDMX y “Semillas Berentsen”, Celaya, Guanajuato, México, respectivamente .

5.4. *Medios de cultivo*

En el **Cuadro 2** se muestra la composición de los medios de cultivo empleados durante la purificación y caracterización de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *Haematoxylon brasiletto*, así como los empleados para la



determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de cada uno de los aislamientos puros.

Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo utilizados en la purificación y determinación de las condiciones óptimas de crecimiento.

Medio de cultivo*	Composición
Papa-Dextrosa Agar (PDA)	200 g de papas, 20 g de dextrosa, 15 g de agar en 1000 mL de agua destilada. Se hirvió durante 20 min la papa fresca previamente pelada y cortada en cubos, posteriormente, la infusión de papa se filtro a través de gasa y se le agregó la dextrosa y el agar, por último, se añadió agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL.
Agar-Agua (AA)	15 g de agar en 1000 mL de agua destilada.
Caldo Papa-Dextrosa (CPD)	200 g de papas, 20 g de dextrosa en 1000 mL agua destilada. Se hirvió durante 20 min la papa fresca pelada y cortada en cubos, posteriormente, la infusión de papa se filtró a través de gasa y se le agregó la dextrosa, por último, se añadió agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL.
Medio arroz	50 g arroz en 87 mL de agua destilada y 300 g arroz en 450 mL de agua destilada Se remojó el arroz una hora en 100 mL y 600 mL de agua destilada respectivamente, se filtró a través de gasa y posteriormente, se le agregaron 87 mL y 450 mL de agua destilada de acirdo a los gramos de arroz empleados.

*Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min.

5.5. Aislamiento y purificación de hongos endófitos y fitopatógenos de *Haematoxylon brasiletto*

Para el aislamiento de los hongos endófitos se emplearon seis hojas sanas de *Haematoxylon brasiletto*. El material vegetal se lavó con agua purificada y después con agua destilada estéril. Posteriormente, se esterilizó superficialmente con una secuencia de disoluciones, de etanol al 75% por 1 min, Clorox comercial al 65% (equivalente a 3.4% NaClO) durante 1 min, y etanol al 75% por 1 min, lavando con agua destilada estéril entre los tratamientos. Las hojas estériles se secaron con papel adsorbente estéril, y se cortaron en pequeños segmentos de 2 mm² de la



parte central de las hojas, con la ayuda de un bisturí esterilizado a la flama. Al azar se seleccionan 4 segmentos y se colocaron en cajas de Petri con Papa-Dextrosa-Agar (PDA) + cloranfenicol (500 mg/L) y otros cuatro segmentos en medio agar-agua destilada (AA) + cloranfenicol (500 mg/L), haciéndose cuatro repeticiones por medio de cultivo. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente, y en condiciones de luz fluorescente-oscuridad 12:12 h. Las cajas de Petri se revisaron periódicamente durante seis semanas y cada colonia que emergió de cada segmento de hoja se transfirió a cajas de Petri con PDA con el fin de obtener colonias puras. En seguida, cada aislado puro se almacenó en tubos con medio PDA, medio arroz y AA (Mier et al. 2013).

Para el aislamiento de los hongos fitopatógenos, se seleccionaron hojas que mostraban manchas o zonas dañadas. Las hojas se lavaron con agua corriente y después con agua destilada estéril. A continuación, se esterilizaron superficialmente con NaClO al 2% durante 2 min, y se lavaron con agua destilada estéril. Las hojas se colocaron en cámaras húmedas los fitopatógenos que fueron emergiendo se transfirieron a cajas con PDA + cloranfenicol (500 mg/L) y se sometieron al mismo proceso de incubación y preservación descrito para los hongos endófitos.

5.6. Descripción macroscópica, microscópica y tasa de crecimiento de los hongos puros

Las características macroscópicas se obtuvieron sembrando por triplicado en el centro de una caja Petri de 9 cm con medio PDA, un inóculo de 0.5 cm de diámetro del micelio de cada uno de los aislamientos puros en estudio, y se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodo 12:12 h luz fluorescente-oscuridad. Se realizaron observaciones periódicas, hasta que los hongos crecieron al límite de las cajas de Petri, empleando un microscopio estereoscópico marca Motic, y registrando las características del micelio: color en la parte superior (anverso) y posterior (reverso), textura, consistencia y tipo de crecimiento, así como, la presencia de estructuras de reproducción, la presencia de exudado y/o



pigmentos difusibles en el medio de cultivo (Sandoval 2014; Cano 2015; Martínez 2015)

De manera paralela y durante el desarrollo de los cultivos se estableció la tasa de crecimiento (cm^2) para cada aislamiento. Para ello se registro diariamente el crecimiento radial o irregular de las tres réplicas de cada microorganismo, hasta llegar al límite de la caja Petri. Esta información fue analizada por medio de escaneo de imágenes con ayuda del escáner CI 202 (Área Meter) permitiendo obtener el crecimiento en cm^2 por día. Las curvas de crecimiento se construyeron graficando el área en cm^2 vs tiempo en días, donde la pendiente indica la tasa de crecimiento.

Las características microscópicas se establecieron mediante la observación detallada de tinciones frescas de las hifas de los micelios teñidas con rojo congo y azul de lactofenol, realizadas a partir de microcultivos en PDA. Para ello, se cortaron cuadros de PDA de 1 cm^2 y con un grosor aproximado de 5 mm y se inocularon por picadura por los cuatro lados con ayuda de un asa estéril; una vez inoculado el cuadro de PDA se colocó entre dos portaobjetos estériles sobre un triángulo de vidrio y dentro de una caja de Petri, y se encubaron por una semana a temperatura ambiente con fotoperiodo 12:12 h de luz-obscuridad. Al término del periodo de incubación los porta objetos se separaron y se desechó el cuadro de PDA. Posteriormente, se realizó una tinción en fresco del micelio adherido en cada portaobjetos.

Las estructuras fueron apreciadas con ayuda de un microscopio óptico a $40\times$, marca Motic, (modelo BA410), registrándose el tipo de micelio (septado o cenocítico), estructuras reproductivas (esporangióforos, conidióforos, badisidióforos, ascas) y/o esporas (Mier et al. 2013). Finalmente, se obtuvieron diversas fotografías de las estructuras observadas, empleando una cámara digital, Moticam 2000 de 2.0 (Digital microscopy).



5.7. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógenos

Para determinar las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógenos se fermentaron en pequeña escala (1 L) en medio CPD en condiciones de incubación estáticas a una temperatura de 28 °C con un fotoperiodo 12:12 h luz-obscuridad. También, se realizaron cultivos en medio sólido usando arroz húmedo como medio de crecimiento (50 g en 87 mL de agua destilada) e incubando en condiciones estáticas con un fotoperiodo 12:12 h luz-obscuridad .

5.8. Obtención de cultivos en mediana escala

5.8.1. Cultivo en CPD

Para la obtención del cultivo en mediana escala (10 L) empleando CPD se utilizaron diez matraces Fernbach de 2800 mL. A cada uno se le adicionó un litro de medio de cultivo y se inocularon con cinco cuadros de agar de 1 cm² de un cultivo sólido del microorganismo previamente incubado en PDA por 8 días, una vez inoculados se incubaron de forma estática por un periodo de 30 días a 28 °C con un fotoperiodo de 12:12 h luz-obscuridad.

5.8.2. Cultivo arroz

Para la obtención del cultivo en mediana escala en medio sólido se utilizaron en total 1.5 Kg de arroz. El cultivo se llevó a cabo en cinco matraces Fernbach de 2800 mL, conteniendo cada uno 300 g de arroz en 450 mL de agua destilada. Cada matraz se inoculó con 5 cuadros de agar de 1 cm² de un cultivo sólido del microorganismo previamente incubado en PDA por 8 días, y se incubó por 30 días a 28 °C con un fotoperiodo 12:12 h luz-obscuridad.

5.9. Obtención de los extractos orgánicos

Una vez transcurrido el periodo de incubación, para los cultivos en CPD incubados bajo condiciones estáticas, se separó el medio de cultivo del micelio, mediante una



filtración utilizando gasa. El micelio húmedo obtenido se sometió a un proceso de maceración con CH_2Cl_2 (2 L \times 5). Inmediatamente después y con el mismo procedimiento se realizaron extracciones con AcOEt (2 L \times 5). Los extractos del medio de cultivo se obtuvieron realizando particiones sucesivas empleando también CH_2Cl_2 y AcOEt como disolventes de extracción.

En el caso de los cultivos en medio sólido de arroz, los extractos orgánicos se obtuvieron por maceración con CH_2Cl_2 (2 L \times 5). Inmediatamente después y con el mismo procedimiento se realizaron extracciones con AcOEt (2 L \times 5). La fase orgánica resultante se filtró y secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío con un rotavapor (Macías-Rubalcava et al. 2010).

Cada uno de los extractos obtenidos del micelio y del medio de cultivo generados a partir de los distintos cultivos se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF), para establecer su similitud cromatográfica y se determinó su rendimiento.

5.10. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos y compuestos puros

La determinación cuantitativa de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de los hongos endófitos, así como de los compuestos puros, se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, *F. oxysporum*, *A. solani*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*, utilizando el método de dilución en agar (Macías-Rubalcava et al. 2008).

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar la muestra se pesaron 20 mg de cada extracto y se disolvieron en 0.1-0.3 mL de metanol. Posteriormente, se adicionaron 40 mL de agua destilada estéril y 40 mL de PDA 2%, para obtener una concentración final de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En cada caja Petri se colocaron 5 mL de la disolución y se dejaron solidificar ($\sim 40\text{ }^\circ\text{C}$), en seguida, se colocó en el centro de cada caja un inóculo de 0.5 cm de diámetro del microorganismo de prueba previamente incubado en PDA por 8 días. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro



repeticiones. Las cajas se incubaron de 3 a 4 días, dependiendo del microorganismo de prueba, a 28 °C con fotoperiodo 12:12 h luz-oscuridad. Como controles negativos se utilizaron PDA (1%) y PDA (1%)/metanol (0.1-0.3 mL, y como controles positivos el Ridomil Gold 4E® (metalaxil-m) para los oomicetos *P. aphanidermatum* y *P. capsici*, y el fungicida comercial Prozycar® 50P.H (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato) para *F. oxysporum* y *A. solani*, ambos a una concentración de 250 µg/mL.

Para establecer las concentraciones inhibitoria medias (CI₅₀) de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en mediana escala y de los compuestos puros, sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, se diseñó una curva de concentración vs respuesta de cada uno de los extractos y compuestos puros. Se emplearon de cuatro a cinco concentraciones por tratamiento en el rango de 25-1000 µg/mL para extractos y de 3-500 µg/mL para compuestos puros. Asimismo, se utilizaron Prozycar® y Ridomil Gold 4E® como controles positivos, en un rango de concentración de 5-250 µg/mL, en ambos casos. Como controles negativos se emplearon los indicados anteriormente.

Al final del periodo de incubación se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro del micelio de cada repetición y de cada especie de hongo de prueba. Los promedios se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey (utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0) (Macías-Rubalcava et al. 2010).

5.11. Evaluación cuantitativa de actividad fitotóxica de los extractos orgánicos y compuestos puros

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos y compuestos puros, se llevó a cabo mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y la longitud de la raíz dos plantas modelo; *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* utilizando el método de dilución en agar en caja Petri (Macías-Rubalcava et al. 2010; 2014).



Los bioensayos de fitotoxicidad se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar las muestras se pesaron 4 mg de extracto y se disolvieron en 0.1-0.3 mL de metanol, posteriormente, se agregaron 20 mL de agua destilada y 20 mL de agar al 2 %, para obtener una concentración final de 100 µg/mL. Posteriormente, 5 mL de las disoluciones se vertieron en las cajas Petri y se dejaron solidificar por completo (~ 40 °C). A continuación, se colocaron 10 semillas por caja, de cada una de las especies modelo. Las cajas Petri se incubaron en la oscuridad a 28 °C y la actividad fitotóxica se registró contando el número de semillas germinadas y midiendo la longitud de las radículas después de 24 h para el caso de *A. hypochondriacus* y 72 h para *S. lycopersicum*. Paralelamente, se evaluaron los controles negativos: AA al 1 % y AA 1%/metanol (0.1-0.3 mL), y como control positivo se utilizó el herbicida comercial RIVAL® (Glifosato: sal monoamónica de *N*-(fosfometil) glicina) a dos concentraciones 100 µg/mL y 300 µg/mL.

Para los extractos orgánicos derivados de los cultivos en median escala y compuestos puros, se evaluó de manera adicional el efecto sobre la respiración durante el proceso de germinación de las plántulas de *A. hypochondriacus*, y *S. lycopersicum*, empleando para la evaluación del efecto fitotóxico 30 semillas de cada planta blanco. El efecto sobre la respiración se obtuvo mediante el registro del consumo de oxígeno utilizando un electrodo de Clark tipo O₂ conectado a un oxímetro YSI ® modelo 5300 a 27 °C. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las plántulas de cada una de las cajas de Petri se transfirieron a una celda de vidrio, y se adicionaron 5 mL de agua desionizada. El consumo de oxígeno se registró cada 5 segundos durante 3 minutos. El análisis mediante regresión lineal simple de cada una de las curvas permitió determinar cuantitativamente el oxígeno consumido por las plántulas de cada una de las semillas de prueba (Macías-Rubalcava et al. 2014).

Para establecer las concentraciones inhibitorias medias CI₅₀ de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en median escala y compuestos puros, sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación, de las semilla blanco, se diseñó una curva de concentración vs



respuesta (efecto fitotóxico) de cada uno de los extractos a partir el porcentaje de inhibición provocado a 100 $\mu\text{g/mL}$. Se emplearon de cuatro a cinco concentraciones por extracto o compuesto puro en el rango de 25-500 $\mu\text{g/mL}$ para extractos y 3-300 $\mu\text{g/mL}$. para compuestos puros. Se utilizó Glifosato® como control positivo a las concentraciones de 125, 250, 500. 750 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Como controles negativos se emplearon AA al 1% metanol (0.1-0.3 mL)

Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado bajo un diseño completamente al azar. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía, (ANOVA) modelo I ($\alpha= 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (Macías-Rubalcava et al. 2014).

5.12. Bioensayo de antagonismo directo múltiple entre hongos de *Haematoxylon brasiletto* y fitopatógenos de importancia en la agricultura

Los bioensayos de antagonismo directo múltiple se realizaron utilizando los hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* que a nivel de extracto orgánico, presentaron el mayor potencial antifúngico y/o fitotóxico frente a los microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba.

El bioensayo se realizó empleando cajas Petri de vidrio estériles de 15 cm de diámetro, conteniendo 50 mL de PDA. Cada microorganismo de prueba se sembró en el centro de la caja, utilizando cuatro inóculos de 0.5 cm de diámetro, de los micelios de los hongos previamente incubados en PDA por ~10 días, a una distancia de 3.5 cm entre cada inóculo. Los hongos competidores *F. oxysporum* y *A. solani*, y los oomicetos *P. aphanidermatum* y *P. capsici* se inocularon cuando el endófito de prueba presentaba un diámetro de ~3 cm. Para cada fitopatógeno se colocaron dos inóculos de 0.5 cm de diámetro de forma equidistante a los costados del hongo endófito a evaluar como se muestra en las **Figuras 4 A y B**.

De manera paralela se realizaron controles de crecimiento incubando a los microorganismos fitopatógenos sin la presencia del endófito. Las cajas de Petri se incubaron a 28 °C con fotoperiodo de luz fluorescente-obscuridad 12:12 h. Los

bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Todo el procedimiento experimental se efectuó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar vertical.

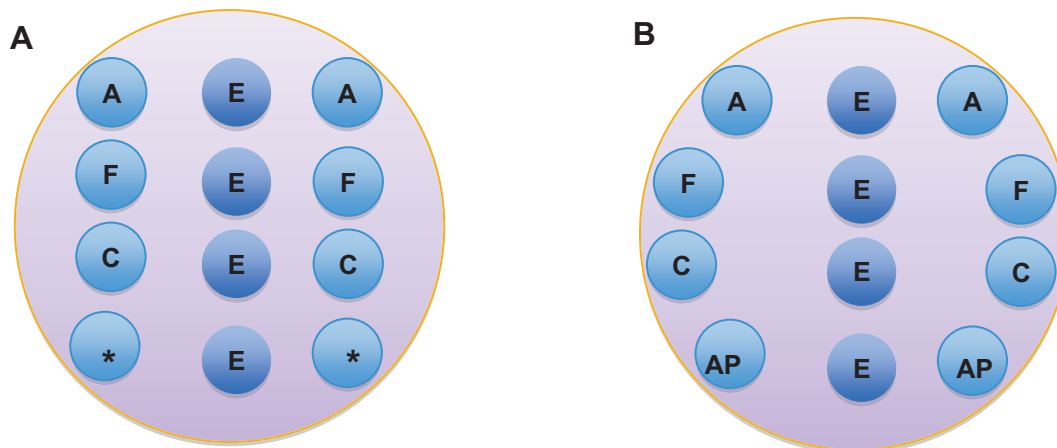


Figura 4. A y B. Bioensayo de antagonismo directo múltiple en *in vitro* entre los hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* y los microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura. **E:** endófito. **F:** *F. oxysporum*, **A:** *A. solani* **C:** *P. capsici* y ***Ap:** *P. aphanidermatum* / ***U:** *Pythium ultimum*.

Los resultados de crecimiento e interacción macroscópica entre los microorganismos, se registraron e interpretaron a partir de las primeras interacciones micelio-micelio entre el hongo endófito de prueba con algún o algunos de los fitopatógenos con importancia agrícola, o bien al observar a distancia la disminución del crecimiento del micelio de alguno de los fitopatógenos de prueba, estableciéndose como día uno de observación, y en general, se concluyó al día 14 de interacción antagónica. A lo largo del bioensayo se tomaron fotografías para evidenciar el antagonismo.

Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento de los diferentes competidores, comparando el crecimiento de los microorganismos con respecto a los controles de crecimiento mediante mediciones del diámetro de los micelios de cada uno de los hongos fitopatógenos, y sus respectivas repeticiones. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis t-Student pareada de dos



colas ($\alpha=0.05$) utilizando el programa GraphPad versión 5.0 (Sánchez Fernández et al. 2016).

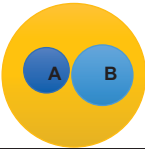
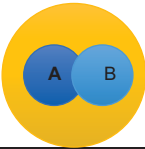
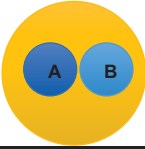
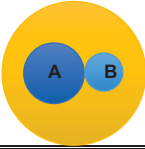
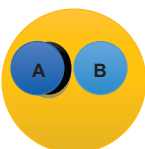
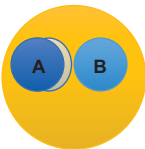
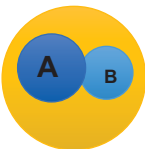
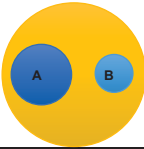
El tipo de interacción entre los hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* y sus competidores fitopatógenos se realizó de acuerdo con los valores numéricos señalados en el **Cuadro 3**. Una vez asignado un valor se calculó el índice de antagonismo (**IA**) de cada hongo endófito de prueba de la siguiente manera:

$$\text{IA} = A (n \times 0) + A_1 (n \times 0) + B (n \times 1) + B_1 (n \times 2) + C (n \times 2) + C_1 (n \times 2) \\ + D (n \times 3) + E (n \times 4)$$

Donde A, A₁, B, B₁, C, D o E corresponden a la categoría mostrada y *n* es el número de veces que el hongo presentó la categoría de antagonismo correspondiente (A, A₁, B, B₁, C, C₁, D o E) (modificado de Yuen 1999).



Cuadro 3. Tipo de interacciones entre microorganismos y valores numéricos asignados (modificado de Yuen 1999).

Categorías	Tipos de interacción	Puntos
A	 <p>El crecimiento de la especie A es inhibido por B.</p>	0
A ₁	 <p>A y B entremezclan las hifas de su micelio sin que exista reducción en el crecimiento en ninguna de las dos especies.</p>	0
B	 <p>La especie A crece en contacto con B y el crecimiento de ambas cesa.</p>	1
B ₁	 <p>Ambas especies crecen en contacto y A cesa el crecimiento de B.</p>	2
C	 <p>La especie A forma un halo oscuro al estar en contacto con la especie B.</p>	2
C ₁	 <p>La especie A forma una barrera miceliar al estar en contacto con la especie B.</p>	2
D	 <p>La especie A crece sobre B disminuyendo su crecimiento.</p>	3
E	 <p>A inhibe a distancia el crecimiento de la especie B</p>	4



5.13. Evaluación del potencial antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles de hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto*

Los bioensayos se realizaron en cajas Petri de 9 cm con dos compartimentos, conteniendo cada uno 10 mL de PDA. Las cajas con división impiden la difusión de los compuestos solubles producidos por el hongo endófito de prueba, pero permiten el libre intercambio de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) (Sánchez Fernández et al. 2016).

El bioensayo se llevó a cabo colocando un inóculo de 0.5 cm de diámetro del hongo endófito en estudio en el centro de uno de los compartimentos de la caja Petri, tomado del micelio del hongo previamente incubado en PDA por ocho días, y se incubó a 28 °C en 12:12 h fotoperiodo de luz fluorescente-oscuridad durante 1, 3, 5, 10, 20 y 30 días antes de iniciar el bioensayo. Transcurrido el periodo de incubación, se colocó en el otro compartimento un inóculo de 0.5 cm de diámetro de alguno de los microorganismos fitopatógenos con interés agrícola: los hongos *A. alternata*, *F. oxysporum* y los oomicetos *P. aphanidermatum* y *P. capsici*. Las cajas Petri se sellaron con Parafilm® y se incubaron de nueva cuenta bajo las mismas condiciones. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Todo el procedimiento experimental se efectuó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar vertical. De manera paralela se realizaron controles de crecimiento incubando los fitopatógenos sin la presencia del endófito.

Los resultados de los bioensayos se expresaron en porcentajes de inhibición después de 3 y 10 días de interacción entre los microorganismos patógenos y los VOCs producidos por los endófitos. Los valores de porcentajes de inhibición se obtuvieron, tomando dos medidas perpendiculares del diámetro de las colonias de cada patógeno y comparando el crecimiento de los microorganismos con respecto a los controles (Sánchez Fernández et al. 2016).



Los promedios se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey (utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0) (Sánchez Fernández et al. 2016).

5.14. Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos orgánicos volátiles de hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto*

La evaluación de la actividad fitotóxica de los VOCs producidos por los hongos endófitos se realizó sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las plántulas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*.

Los bioensayos se llevaron a cabo en cajas de Petri de dos compartimentos, uno que contenía 10 mL PDA para el desarrollo del hongo endófito, y el otro conteniendo 10 mL AA para el desarrollo de las semillas. Un inóculo de 0.5 cm de diámetro del hongo endófito tomado de un cultivo previamente incubado en PDA por 8 días, se colocó en el compartimento con PDA, y se incubó a 28 °C con fotoperiodo de luz fluorescente-oscuridad 12:12 h, durante 1, 3, 5, 10, 20, 30 y 40 días antes de iniciar el bioensayo. Trascurrido cada tiempo de incubación, se colocaron treinta semillas de *A. hypochondriacus* o de *S. lycopersicum* en el compartimento con AA siguiendo un diseño completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento. Las cajas se sellaron con Parafilm® y se incubaron a 28 °C en la oscuridad, la actividad fitotóxica se registró contando el número de semillas germinadas, midiendo la longitud de las radículas y determinado el consumo de O₂ por las plántulas después de 24 h para el caso de *A. hypochondriacus* y 72 h para *S. lycopersicum*.

Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía, (ANOVA) modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (Sánchez Fernández et al. 2016; Sánchez Ortiz et al. 2016).



5.15. Determinación de los compuestos orgánicos volátiles de hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto*

Los VOCs se identificaron tentativamente empleando viales de 40 mL para microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) con septos recubierto de silicona/polipropileno. Se colocó un inóculo de 0.5 cm de diámetro del hongo endófito en estudio dentro de viales que contienen 15 mL de PDA. Los cultivos se realizaron por triplicado y se incubaron a 28 °C con fotoperiodo de luz fluorescente-oscuridad 12:12 h. Asimismo, se evaluaron tres viales no inoculados de PDA.

Los VOCs fueron obtenidos en la fase de vapor (HS, por sus siglas en inglés), empleando una fibra de Carboxen / PDMS DVB (2 cm, 50/30 micras (Supelco). La fibra se acondicionó antes de su uso durante 40 min a 300 °C. Para la adsorción de los VOCs la fibra se colocó dentro del vial durante 60 min. Pasado este tiempo a fibra se insertó en la entrada del cromatógrafo de gases (GC) Agilent 6890 N (Agilent Technology), a 300 °C. Los compuestos fueron desabsorbidos durante 2 min y se separaron en una columna capilar DB-5MS de 20 m x 0,18 mm x 0,18 µm, con una velocidad de flujo de gas helio de 1 mL/min y una programación de temperatura en el horno GC a 40 °C (3 min) aumentando 20 °C por minuto hasta la temperatura final de 300 °C por 5 min.

El GC se acopló a un espectrómetro de masas LECO de tiempo de vuelo (MS-TOF), acoplado al GC, operó a baja resolución, con una energía de ionización electrónica de 70 eV, con una velocidad de escaneo de 20 espectros/seg en un rango de masas m/z de 33 a 500Da. Las temperaturas utilizadas fueron: cámara de ionización a 200 °C y línea de transferencia a 250 °C.

Para la adquisición y procesamiento de datos se utilizó el sistema de software LECO ChromaTOF™ y para la identificación de los VOCs se realizó una comparación de los patrones de fragmentación de los espectros de masas con los disponibles en la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), y se calcularon los índices de retención Kovats en relación con los tiempos de retención de una serie de alcanos (C₈ - C₂₀), comparándose con los reportados



por Adams (2007). Solo se reportaron los compuestos que presentaran una similitud >80%. Los compuestos identificados en los viales de PDA no inoculados se eliminaron del análisis de datos. La cantidad relativa de cada compuesto se expresó como porcentajes resultantes de la media del área del pico de las tres repeticiones, en comparación con el área total. La identificación de algunos compuestos se confirmó por comparación de los índices Kovats y espectros de masas de los compuestos puros comerciales disponibles con $\geq 98\%$ de pureza (Sigma-Aldrich) (Sánchez Fernández et al. 2016; Sánchez Ortíz et al. 2016)

5.16. Estudio químico

5.16.1. Métodos cromatográficos generales

Los extractos orgánicos (CH_2Cl_2 y AcOEt) derivado de los cultivos en pequeña y mediana escala en condiciones estáticas del hongo endófito *Aspergillus* sp. se fraccionaron mediante cromatografía de adsorción en columna abierta (CC), empleando como adsorbente gel de sílice (Sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.2 mm, malla 70-230). El proceso de elución se efectuó con hexano, CH_2Cl_2 y MeOH en diferentes proporciones. Además, se realizó cromatografía en columna (CC), empleando como soporte Sephadex (Sephadex© LH-20). El proceso de elución se efectuó de forma isocrática empleando una mezcla 2:8 de CH_2Cl_2 -MeOH.

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Sílica Gel 60 GF₂₅₄ Merck de 0.25 mm de espesor), y empleando varios sistemas de eluyentes (Hex- CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 , y CH_2Cl_2 -MeOH en diversas proporciones). El revelado de las placas se efectuó con una disolución de ácido sulfúrico al 10% como agente cromógeno con calentamiento a 90 °C. La cromatografía preparativa en capa delgada se realizó empleando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice (Sílica Gel 60 GF₂₅₄ Merck) de 0.25 y 2.0 mm de espesor aplicando en cada cromatoplaaca aproximadamente 10 y 100 mg de muestra, respectivamente. Empleando como sistemas de elución una mezcla 2:96:2 Hexano- CH_2Cl_2 -MeOH.



5.17. Fraccionamiento químico biodirigido del hongo endófito *Aspergillus* sp.

5.17.1. Extracto del micelio del cultivo en pequeña escala

A partir del extracto del micelio obtenidos del cultivo en pequeña escala en CPD en condiciones estáticas del hongo endófito *Aspergillus* sp., precipitó espontáneamente un sólido cristalino (583 mg). El análisis por CCF de este sólido reveló que era una mezcla compleja de metabolitos secundarios. Posteriormente el sólido fue sometido a un fraccionamiento primario mediante una cromatografía CC. El proceso de elución se efectuó utilizando mezclas entre hexano, CH₂Cl₂ y MeOH en diferentes proporciones. De este fraccionamiento se obtuvieron 205 **eluat**os de 50 mL cada uno, y reuniéndose por CCF en 5 grupos de fracciones primarias (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del sólido cristalino derivado del extracto del cultivo en pequeña escala del endófito *Aspergillus* sp. (PBE2).

Sistema de Elución	Proporción	Eluatos	Eluatos reunidos	Clave	Peso (mg)
Hexano	100	1-8	1-40	I _p	65
Hexano-CH ₂ Cl ₂	50:50	9-24			
Hexano-CH ₂ Cl ₂	40:60	25-40			
Hexano-CH ₂ Cl ₂	30:70	41-57			
Hexano-CH ₂ Cl ₂	20:80	58-73	41-112	II _p	14
Hexano-CH ₂ Cl ₂	10:90	74-90			
CH ₂ Cl ₂	100	91-106			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	99-1	107-112	113-132	III _p	6
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	99-1	113-132			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98.5-1.5	133-141	133-141	IV _p *	281
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98.5-1.5	142-147			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98-2	148-164	142-205	V _p *	36
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	97-3	165-176			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98-2	177-190			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	99-1	192-205			

*Fracciones activas sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*



5.17.2. Extracto del micelio del cultivo en mediana escala

El extracto activo (9 g) derivado del cultivo del hongo endófito *Aspergillus sp.* (PBE21) en mediana escala (CPD) en condiciones estáticas, se sometieron a un fraccionamiento primario mediante una (CC) utilizando 900 g de gel de sílice, y obteniéndose 289 eluatos de 250 mL cada uno. Los cuales fueron reunidos con base en su similitud cromatográfica en 15 grupos de fracciones primarias (**Cuadro 5**). La actividad fitotóxica se concentró en las fracciones VII - XV, de acuerdo con los bioensayos en dilución en agar.

Cuadro 5. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto orgánico derivado del cultivo en mediana escala del endófito *Aspergillus sp.* (PBE21).

Sistema de Elución	Proporción	Eluatos	Eluatos reunidos	Clave	Peso (mg)
Hexano	100	1-12	1-12	I _M	30
		13-29			
Hexano-CH ₂ Cl ₂	90:10	30-49	13-69	II _M	52
Hexano-CH ₂ Cl ₂	80:20	50-69			
Hexano-CH ₂ Cl ₂	70:30	70-71	70-71	III _M	1134
		72-77			
Hexano-CH ₂ Cl ₂	60:40	78-92	72-107	IV _M	143
Hexano-CH ₂ Cl ₂	50:50	93-107			
Hexano-CH ₂ Cl ₂	40:60	108-119	108-129	V _M	54
		120-129			
Hexano-CH ₂ Cl ₂	30:70	130-136	130-147	*VI _M	236
		137-147			
Hexano-CH ₂ Cl ₂	20:80	148-149	148-151	*VII _M	528
		150-151			
Hexano-CH ₂ Cl ₂	10:90	152-157	152-157	*VIII _M	630
		158-164	158-164	*IX _M	730
		165-171	165-171	*X _M	493
		172-174	172-174	*XI _M	174
		175-178	175-178	*XII _M	319
CH ₂ Cl ₂	100	179-184	179-199	*XIII _M	522
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	99:1	185-197			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98:2	198-199	200-252	XIV _M	200
		200-210			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	97:3	211-224	200-252	XIV _M	200
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	96:4	225-241			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	242-252			



Cuadro 5. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto orgánico derivado del cultivo en mediana escala del endófito *Aspergillus sp.* (PBE21)(Continuación).

Sistema de Elución	Proporción	Eluatos	Eluatos reunidos	Clave	Peso (mg)
		253-254			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	90:10	254-261			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	80:20	262-268	253-289	XV _M	510
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	70:30	269-276			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	50:50	277-282			
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	40:60	283-289			

*Fracciones activas sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*

5.17.3. Fraccionamiento secundario de las fracciones activas

El análisis por CCF de las fracciones primarias reveló una complejidad metabólica muy importante y difícil de separar empleando sílica gel. En consecuencia, se decidió emplear Sephadex como fase estacionaria para la separación. Para favorecer la obtención de los compuestos mayoritarios las fracciones primarias activas fueron reagrupadas como se muestra a continuación: VI_M-VII_M(VI_M), VIII_M, IX_M, X_M-XI_M (X_M) y XII_M-XIII_M (XII_M) de acuerdo a lo observado en la CCF.

De la purificación de las fracciones activas VI_M a XII_M, se obtuvieron aproximadamente 30 eluatos por fracción y fueron agrupados en 5, 6 y/o 7 grupos cada uno de acuerdo a su similitud cromatográfica (**Cuadro 6**).



Cuadro 6. Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta CC utilizando Sephadex de las fracciones primarias activas.

Fracciones obtenidos	Fracciones primarias				
	Fracción VI _M	Fracción VIII _M	Fracción IX _M	Fracción X _M	Fracción XII _M
1					
2					
3	VI _M -1	VIII _M -1			XII _M -1
4	1 mg	1 mg			1 mg
5			IX _M -1	X _M -1	
6			1 mg	2 mg	
7					XII _M -2
8					17 mg
9	VI _M -2	VII _M -2			XII _M -3
10	98 mg	71 mg			120 mg
11			IX _M -2		XII _M -4
12			30 mg		100 mg
13		VIII _M -3			
14		152 mg			
15			*IX _M -3	X _M -2	XII _M -5
16			15 mg	187 mg	53 mg
17		VIII _M -4	*IX _M -4		
18	VI _M -3	373 mg	51 mg		
19	503 mg		*IX _M -5		
20			22 mg		
21			IX _M -6	X _M -3	XII _M -6
22			5 mg	131 mg	5 mg
23		VIII _M -5			
24		2 mg		X _M -4	
25	VI _M -4			272 mg	
26	57 mg				
27					
28				X _M -5	
29				102 mg	
30			IX _M -7		
31			5 mg		
32		VIII _M -6			XII _M -7
33	VI _M -5	2 mg			5 mg
34	3 mg			X _M -6	
35				33 mg	
36					
37				X _M -7	
38				4 mg	

*Fracciones activas sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*



5.17.4. Obtención de la coriloxina (70)

De la fracción primaria IV_p precipitó espontáneamente un sólido cristalino, el cual, tras sucesivos lavados con diferentes disolventes orgánicos (Hexano, CH₂Cl₂, AcOEt, Acetona y MeOH) y de una recristalización sucesivas con una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (98:2), se obtuvieron 20 mg de la (4S,5S,6S)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona (70) o coriloxina con un p.f. de 157-159°C.

5.17.5. Obtención de la variecolina A (71).

De la fracción V_p primaria del cultivo de pequeña escala precipitó espontáneamente un sólido cristalino soluble en CH₂Cl₂, el cual se purificó mediante recristalizaciones sucesivas con una mezcla entre CH₂Cl₂-MeOH (98:2) obteniéndose 5 mg de variecolina A (71).

Por otra parte, de las fracciones secundarias activas IX_M3-IX_M5 (88 mg) [Cuadro 6] derivadas del cultivo en mediana escala, precipitó un sólido cristalino incoloro, soluble en CH₂Cl₂, y tras sucesivos lavados con diferentes disolventes orgánicos (Hexano, CH₂Cl₂, AcEtO, Acetona y MeOH), y recristalizaciones sucesivas con una mezcla entre Hexano-CH₂Cl₂-MeOH (1:97:2), se obtuvieron 45 mg de del variecolina A (71), con un p.f. de 158-159 °C.

5.18. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se describen sin corregir. Los espectros en el IR fueron realizados en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27. Los espectros de resonancia magnética nuclear de (RNM¹H y de carbono-13 (RMN¹³C), fueron determinados en espectrómetro Bruker Avance 300 y Varian Unity 300 operados a 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C, y utilizando como disolventes metanol deuterado (CD₃OD) y cloruro de metileno deuterado (CD₂Cl₂). Los desplazamientos químicos (δ) se asignaron en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) empleado como referencia interna. El análisis de difracción de rayos X se efectuó en un difractor Nicolet R3m.



5.19. Identificación taxonómica

La caracterización morfológica de los aislamientos *Xylaria* sp. (PBE11) o aislamiento PB3f3 y *Aspergillus* sp. (PBE21) o aislamiento PB3l3 fue realizada en primera instancia con base en la descripción de las colonias en medio PDA y agar avena (OA) en cultivos de dos semanas incubados bajo fotoperiodo de luz-oscuridad 12:12 h a 28 °C. El color de la colonia y pigmentos fueron establecidos empleando el manual de colores Methuen (Kornerup y Wanscher 1978). En segundo término, se llevó a cabo la confirmación de la identidad taxonómica de los hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) o aislamiento PB3f3 mediante métodos moleculares en colaboración con la Dra. Patricia Lappe Oliveras, del Instituto de Biología, UNAM. A continuación, se describe la estrategia metodológica empleada:

La identidad taxonómica se estableció mediante la secuenciación de la región 5.8S DNA ribosomal y de dos regiones espaciadoras internas transcritas (ITS1, ITS2). El DNA genómico se extrajo empleando el kit FT71415 para aislamiento rápido de DNA genómico de hongos (bio basic Inc.), a partir del micelio de los hongos endófitos cultivados previamente en PDA por 7 días. Posteriormente, la región ITS1-5.8S fue amplificada con los oligonucleótidos universales; ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') y ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White 1990). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador Thermal Gernandt 2720 (Applied Biosystems) con un volumen de reacción de 50 µL, conteniendo 25 µL GoTaq® Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 2.5 µL de cada uno de los oligonucleótidos (10 pm/µL) y 5 ng de DNA genómico. El programa de PCR modificado de (Naumova et al. 2004) consistió como primer paso en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 min, seguida por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 58 °C, 1 min a 72 °C, y como paso final una etapa de extensión de 5 min a 72 °C. El producto de amplificación se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) (Invitrogen) teñido con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) en buffer 1X TAE (Tris-Acetato-EDTA) a 90 V durante 40 min, y se observó bajo un trasiluminador de doble intensidad (UVP Dual – Intensity). Las secuencias fueron obtenidas por el

DESARROLLO EXPERIMENTAL



Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología UNAM, y posteriormente, se editaron empleando el programa BioEdit v 7.0.5 (Hall 2005). Las secuencias editadas fueron alineadas en la base de datos GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando el programa BLASTN (Altschul et al. 1997), y se depositaron en el GenBank (Sánchez Ortiz et al. 2016).

Los cultivos secos en PDA y OA fueron depositados en el Herbario Nacional de México (MEXU), UNAM, con el número de colección MEXU 27-559.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de determinar el potencial antifúngico sobre microorganismos de importancia agrícola y el potencial fitotóxico sobre plantas de prueba, de los extractos orgánicos y metabolitos secundarios mayoritarios de hongos endófitos asociados a las hojas de *Haematoxylon brasiletto*. Por otra parte se estableció el potencial antagonístico de los hongos en estudio contra una serie de microorganismos fitopatógenos y así poder contribuir al conocimiento de las complejas relaciones entre las plantas hospedadoras y los hongos endófitos. Y al desarrollo de agroquímicos de origen natural y de gentes de biocontrol. Los resultados obtenidos se dividen en diez partes:

1. Aislamiento y la purificación de la mayor cantidad de hongos endófitos y fitopatógenos asociados a las hojas de *Haematoxylon brasiletto*.
2. Determinación de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados con la finalidad de identificar el posible género al que pertenecen
3. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos endófitos puros aislados, mediante su cultivo en pequeña escala empleando condiciones de incubación estáticas en medio de cultivo PDA y arroz.
4. Evaluación de la actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica de los extractos orgánicos de los hongos aislados.
5. Estudios de antagonismo directo múltiple entre los hongos endófitos de *H. brasiletto* con mayor potencial antifúngico, antioomiceto y/o fitotóxico frente a los microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura.
6. Estudio del potencial aleloquímico de los compuestos orgánicos volátiles de los hongos endófitos PBE11 (PB3f3), PBE20 y PBE16.



7. Obtención de los cultivos en mediana escala de los aislamientos PBE21 (PB3t2) y PBE11 (PB3f3) que mostraron la mayor la actividad biológica.
8. Identificación taxonómica mediante métodos moleculares de los aislamientos PBE21 (PB3t2) y PBE11 (PB3f3).
9. Estudio del potencial fitotóxico y antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles y no volátiles producidos por el hongo endófito PBE11 (PB3f3) identificado como *Xylaria* sp. Así como, la identificación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles generados por *Xylaria* sp.
10. Estudio químico biodirigido del hongo endófito PBE21 (PB3t2), identificado como *Aspergillus* sp., así como la evaluación biológica de los metabolito secundarios mayoritarios.

6.1. Aislamiento y purificación de hongos endófitos y fitopatógenos de *Haematoxylon brasiletto*

La colecta de las hojas del árbol de *Haematoxylon brasiletto* utilizadas para el aislamiento de los hongos endófitos objeto de estudio, se realizó en la 'Reserva de la Biosfera de Huautla (REBIOSH)' ubicada en la localidad de Quilamula en la estación biológica del municipio de Tlalquitenango, en el Estado de Morelos, México. Los criterios de selección de la planta hospedera fueron: 1) plantas que crecen en zonas de gran diversidad biológica, y 2) plantas que no presentan daños por patógenos o herbívoros (Santamaria y Bayman 2005). Adicionalmente, para el aislamiento de hongos fitopatógenos se tomaron en cuenta aquellas hojas que presentaran síntomas de enfermedad, exceptuando las que tuviera daño por herbívoros.

Cabe destacar que hasta el momento no existen reportes en la literatura acerca del aislamiento e identificación de los hongos endófitos y fitopatógenos asociados a las hojas de *Haematoxylon brasiletto*. Por lo que estos hongos representan una fuente novedosa para la obtención de compuestos químicos con posible aplicación agrícola.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En el **Cuadro 7** se muestra el número de aislamientos totales de hongos endófitos aislados de *H. brasiletto*, por hoja y por segmento. Mostrando claramente que *H. brasiletto* se encuentra colonizado por un amplio número de hongos endófitos, confirmando que los criterio de selección empleado, constituyen una buena estrategia para aislar una gran número de este tipo de microorganismos (Strobel et al. 2004; Kaul et al. 2014)

Cuadro 7. Aislamientos totales de hongos endófitos obtenidos de *Haematoxylon brasiletto* por hoja y por segmento.

Planta	Clave de la planta	Número de aislamientos totales	Número de aislamientos por hoja	Número de aislamientos por segmento
<i>Haematoxylon brasiletto</i>	PB	510	85	21

Por otra parte, en el **Cuadro 8** se muestra el número de aislamientos totales puros, en PDA y AA, y el número de morfotipos obtenidos de hongos endófitos y fitopatógenos.

Cuadro 8. Aislamientos puros totales de hongos endófitos y fitopatógenos obtenidos de hojas de *Haematoxylon brasiletto*.

Planta	Clave	Tipo de hongo	Número de aislamientos totales		Número de aislamientos puros		Número de morfotipos	
			PDA	AA	PDA	AA	PDA	AA
<i>Haematoxylon brasiletto</i>	PBE	endófito	57	453	0	30	0	21
	PBF	fitopatógeno	75		6		4	

PDA; papa dextrosa agar, AA, agar-agua.

A cada uno de los aislamientos puros se les asignó una clave durante su purificación, de acuerdo a lo siguiente: las primeras dos letra corresponde a las iniciales del nombre común de la planta hospedera (PB: Palo de Brasil) los siguientes caracteres representan las resiembras necesarias para lograr obtener a



los hongos endófitos y fitopatógenos puros (**Cuadro 9**). Con la finalidad de facilitar su manejo, estas claves se simplificaron conservando las letras PB e indicando en el tercer carácter si el microorganismo puro corresponde a un hongo endófito (E) o a un hongo fitopatógeno (F), adicionando al final un número consecutivo.

Cuadro 9. Claves asignadas a los hongos endófitos y fitopatógenos puros, obtenidos de hojas de *Haematoxylon brasiletto*.

Clave inicial	Clave simplificada
PB3b1	PBE1
PB2a1II	PBE2
PB2c4	PBE3
PB4b2I	PBE4
PB4b2IV	PBE5
PB4a2I	PBE6
PB5f1	PBE7
PB3i1I5	PBE8
PB2a3	PBE9
PB3f	PBE10
PB3f3	PBE11
PB3C1I	PBE12
PB5h2I	PBE13
PB5g1III	PBE14
PB3a3I	PBE15
PB3f1II	PBE16
PB5a1	PBE17
PB5h4	PBE18
PB3I2!	PBE19
PB3i3I1	PBE20
PB3l2	PBE21
PBe2III2	PBF1
PBb2I2	PBF2
PBe2III	PBF3
PBe1	PBF4



6.2. Descripción macroscópica, microscópica y tasa de crecimiento de los hongos puros

Las características macroscópicas de los 21 hongos endófitos y de los cuatro hongos fitopatógenos puros se determinaron mediante la observación detallada con un microscopio estereoscópico de los cultivos en PDA y estableciéndose el color, la textura, la consistencia de la superficie y el tipo de crecimiento del micelio, presencia de pigmentos y de exudado. Por otra parte, se estableció la tasa de crecimiento para cada aislamiento puro mediante la elaboración de curvas de crecimiento.

El análisis detallado de las características macroscópicas y microscópicas de los 21 hongos endófitos y cuatro fitopatógenos aislados de *H. brasiletto*, permitió confirmar la pureza y establecer la tasa de crecimiento de los aislamientos se ilustra en los **Cuadros 10 y 11**. Asimismo, se logró determinar que los aislamientos PBE6, PBE8 y PB21 posiblemente pertenecen al género *Aspergillus*; PBE2, PBE3, PBE9 y PBF2 al género *Fusarium*; PBE10 al género *Xylaria*; PBE12 al género *Acremonium*, PBE1 al género *Verticillium* y PBE20 al género *Nodulisporum* (Arnold et al. 2007).

6.2.1. Hongos endófitos

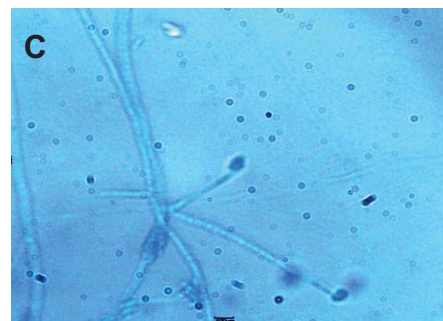
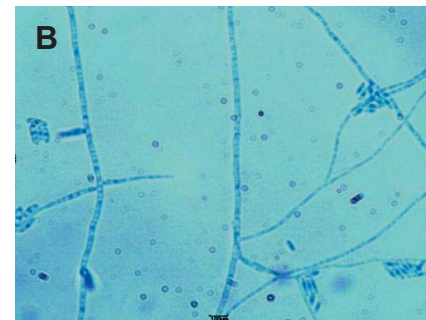
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto*.

PBE1



Se observa la formación de micelio plano inmerso de textura butirácea, y apariencia algodonosa en el centro, de consistencia suave y con bordes filamentosos. No presenta exudado. En el envés su micelio presenta coloración durazno. Su crecimiento es radial irregular.

Tasa de crecimiento: 1.84 cm²/ día.



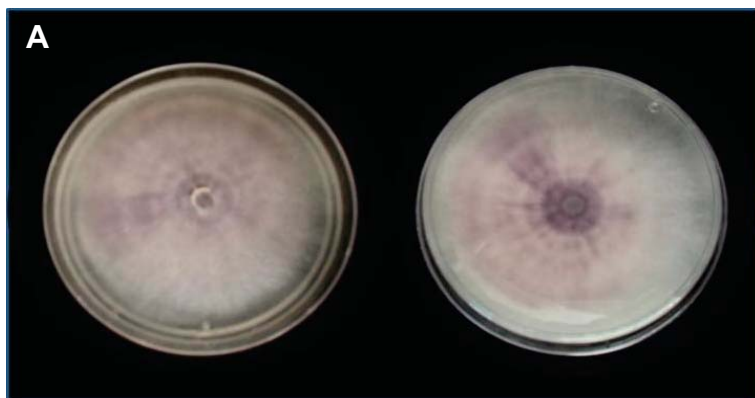
Se aprecian hifas septadas y fragmosporas sésiles. Las características microscópicas permitieron inferir que este hongo pertenece al género ***Verticillium*** (Dugan 2006).

Endófito PBE1. A) Crecimiento de 19 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.



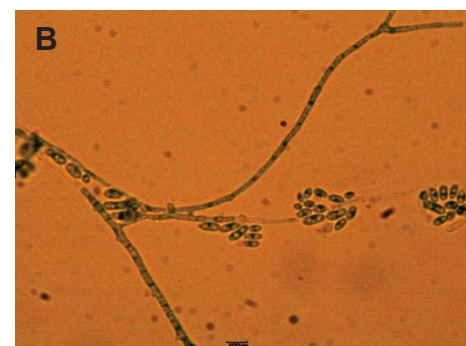
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE2



Este endófito presenta micelio plano inmerso de color púrpura y de textura butirácea, en el centro es de color blanco y textura algodonosa, presenta borde liso y consistencia suave. No presenta exudado. En el envés el micelio presenta coloración púrpura. Su crecimiento es radial irregular.

Las características macroscópicas permitieron inferir que este hongo pertenece al género *Fusarium* (Dugan 2006). Tasa de crecimiento: 1.63 cm²/ día.



Se aprecian hifas septadas hialinas y esporas aisladas.



Endófito PBE2. A) Crecimiento de 18 días en medio PDA anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación Microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.

Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

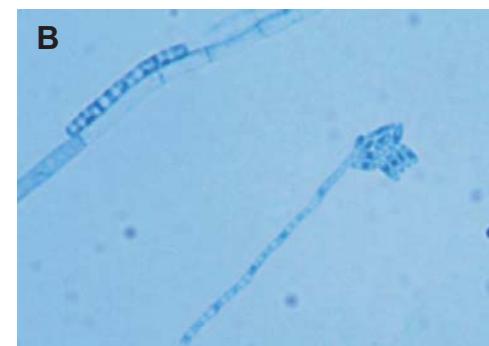
PBE3



Este microorganismo endófito forma micelio aéreo convexo de color blanco-púrpura y de textura vellosa-algodonosa, con bordes dentados y de consistencia suave. No presenta exudado. El envés el micelio es de coloración púrpura. Su crecimiento es radial irregular.

Las características macroscópicas permitieron inferir que este endófito pertenece al género *Fusarium* (Dugan 2006).

Tasa de crecimiento: 1.82 cm²/ día.



Se aprecian hifas septadas, cabezuelas mucosas y dimosporas.

Endófito PBE3. A) Crecimiento de 14 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.



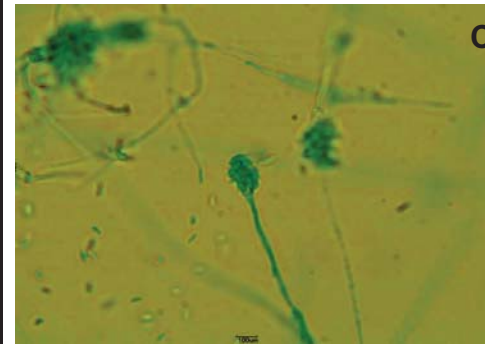
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE4



Este microorganismo forma micelio aéreo plano de color blanco, bordes lisos, de textura vellosa, lanosa y de consistencia suave. No se observa exudado. En el envés del micelio no se aprecia pigmentación. Su crecimiento es radial regular.

Tasa de crecimiento: 2.74 cm²/día.



Se aprecian conidióforos ramificados, hifas septadas y amerosporas dinucleadas.

Endófito PBE4. A) Crecimiento de 11 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C,) Observaciones microscópicas en 40 X, teñidas con colorante rojo congo y azul de lactofenol.



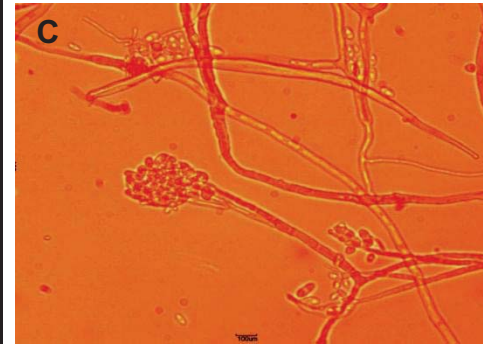
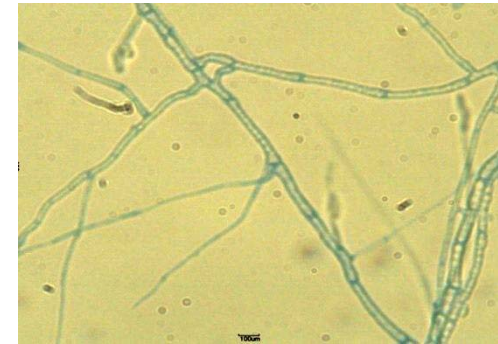
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE5



Este hongo endófito forma micelio aéreo vellosito de color blanco con bordes dentados y de consistencia suave. No se observa exudado. En el envés del micelio no se aprecia pigmentación. Su crecimiento es radial irregular.

Tasa de crecimiento: 1.19 cm²/día



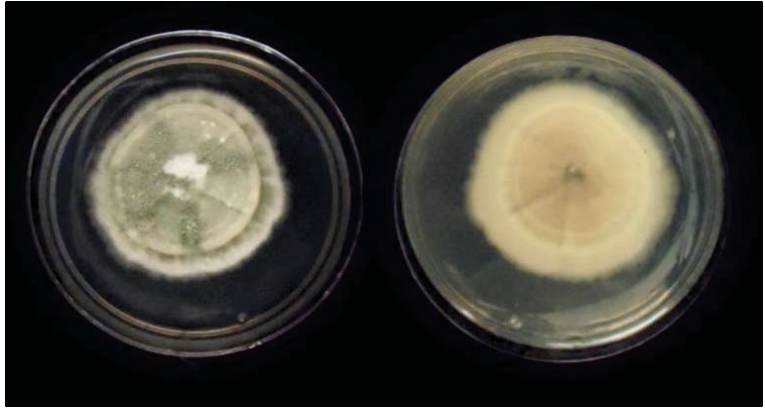
Se aprecian hifas septadas y de diferente grosor, las hifas delgadas, provienen de las más gruesas. También se observan conidióforos ramificados con amerosporas dinucleadas dispersas.

Endófito PBE5. A) Crecimiento de 19 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observaciones microscópicas en 40 X, teñida con colorante rojo congo y azul de lactofenol.



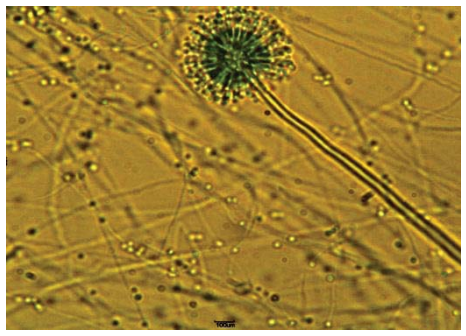
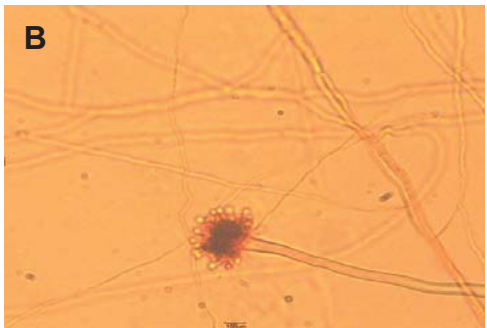
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE6



Se observa la formación de micelio aéreo polvoso de color verde con blanco con bordes ligeramente lobulados y de consistencia dura. No se observa exudado. En el envés del micelio no se aprecia pigmentación. Su crecimiento es radial irregular.

Tasa de crecimiento: 0.71 cm²/día.



Se aprecian hifas septadas, conidióforos de cabeza y vesículas globosas con fiálides.

Las características microscópicas permitieron inferir que este hongo corresponde al género ***Aspergillus*** (Dugan 2006)



Endófito PBE6. A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo y azul de lactofenol.

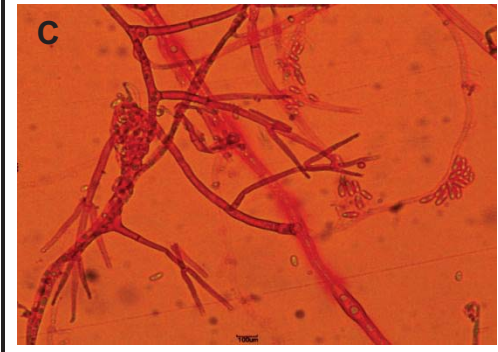
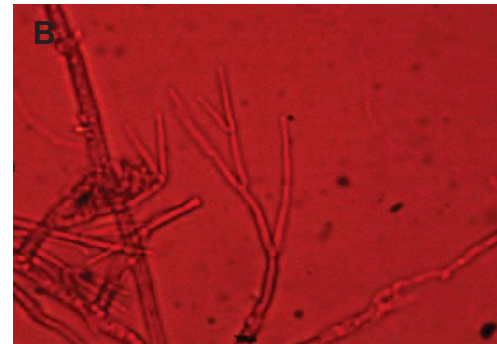
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE7



Este hongo presenta micelio aéreo de apariencia vellosa, lanoso y de color blanco, bordes dentados y de consistencia suave. Presenta exudado hialino y pigmentación ligeramente amarilla observable en el envés del micelio. Su crecimiento es radial irregular.

Tasa de crecimiento: 1.75 cm²/día



Se aprecian hifas septadas, conidióforos ramificados y amerosporas dinucleadas dispersas.



Endófito PBE7. A) Crecimiento de 20 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

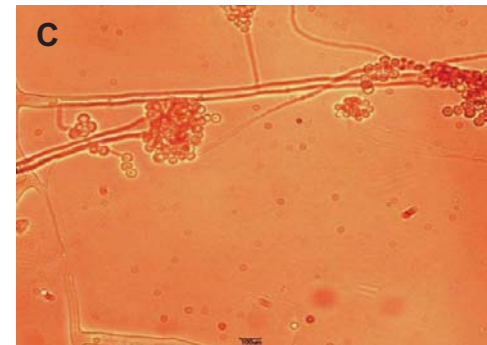
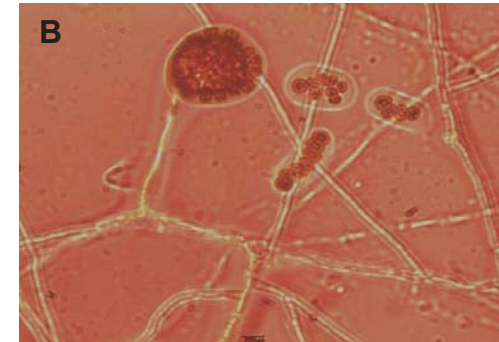
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE8



Este microorganismo desarrolla micelio aéreo vellosa, umbonado, de color blanco con tonalidades moradas en el centro y con los bordes de color verde, su textura es polvosa y su consistencia dura. Se observa exudado café claro. En el envés su micelio es anillado y de coloración púrpura. Su crecimiento es radial irregular.

Tasa de crecimiento: 1.04 cm²/día.



Se observan hifas septadas y esporangioforos.

Las características microscópicas permitieron inferir que este hongo pertenece al género *Aspergillus* (Duggan 2006).



Endófito PBE8. A) Crecimiento de 21 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, D) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE9



Este microorganismo desarrolla micelio aéreo plano inmerso de textura suave y de color púrpura, en los bordes presenta micelio de color blanco y textura vellosa. No se observa exudado. En el envés el micelio también es de color púrpura. Su crecimiento es radial irregular.

Las características macroscópicas permitieron sugerir que este hongo pertenece al género *Fusarium* (Dugan 2006).

Tasa de crecimiento: 2.5 cm²/día.



Se observan conidióforos ramificados, hifas septadas y amerosporas dispersas.



Endófito PBE9. A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B,C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.

Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

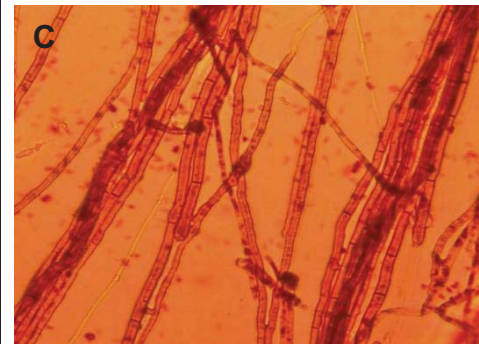
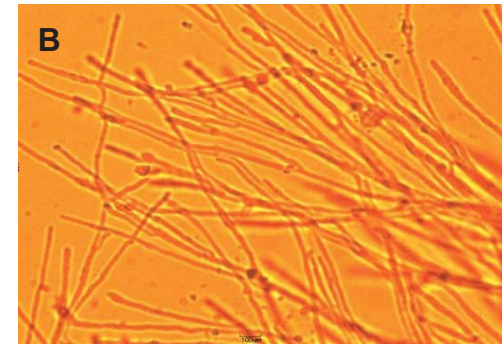
PBE10



Este microorganismo desarrolla micelio aéreo plumoso de color blanco y de textura fibrosa, con bordes lobulados y de consistencia dura. No se observa exudado. En el envés el micelio es de coloración café en el centro. Su crecimiento es radial irregular.

Las características macroscópicas permitieron sugerir que este hongo pertenece al género *Xylaria* (Dugan 2006)

Tasa de crecimiento: 1.12 cm²/día.



Se observan conidióforos ramificados e hifas septadas.



Endófito PBE10. A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B,C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

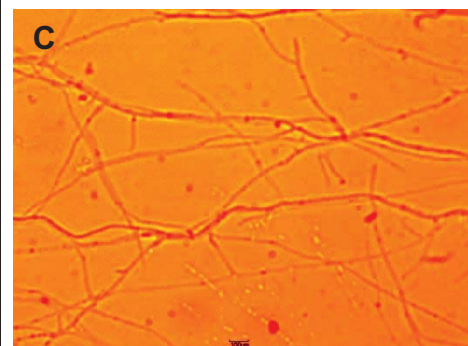
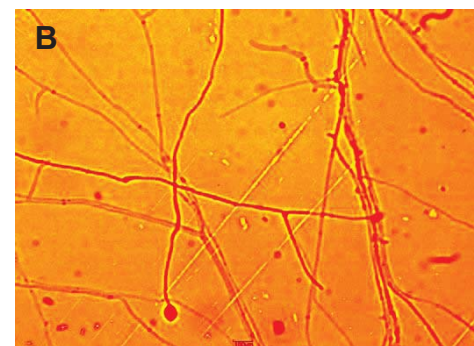
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE11



Este hongo presenta micelio aéreo de color blanco y de textura algodonosa, con bordes lisos y consistencia dura. Presenta exudado hialino y no se observa pigmentación en el envés del micelio. Su crecimiento es radial regular.

Tasa de crecimiento: 1.75 cm²/día.



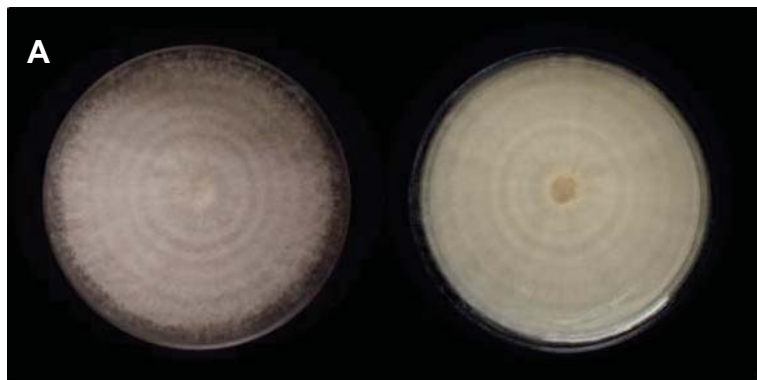
Se observan conidióforos simples e hifas septadas.

Endófito PBE11. A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B,C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.



Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

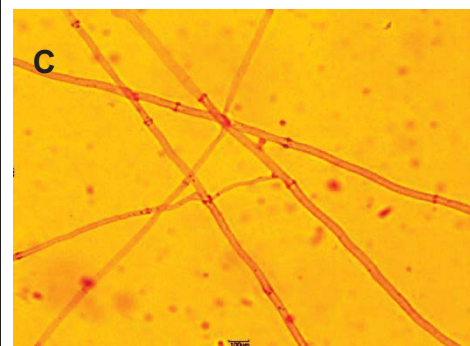
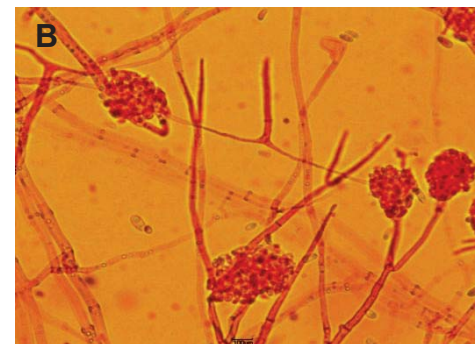
PBE12



Este hongo presenta micelio aéreo, de color blanco, textura vellosa y de consistencia suave. No presenta exudado. En el envés del micelio no se aprecia pigmentación. Su crecimiento es radial anillado.

Las características macroscópicas permitieron sugerir que este hongo pertenece al género ***Acremonium*** (Dugan 2006).

Tasa de crecimiento: 2.97 cm²/día.



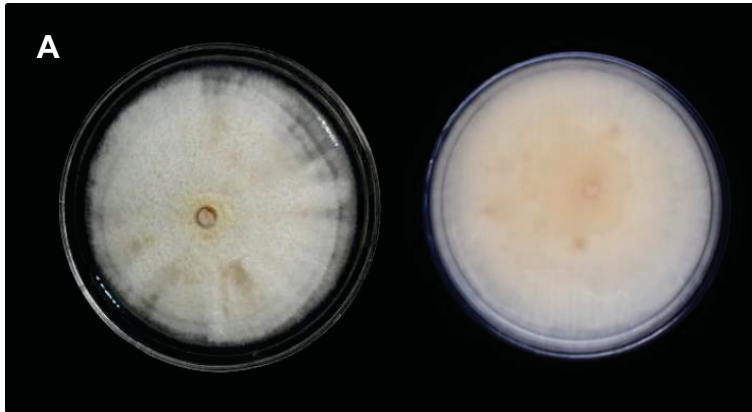
Se aprecian hifas septadas, amerosporas y también se observan conidióforos.

Endófito PBE12. A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.



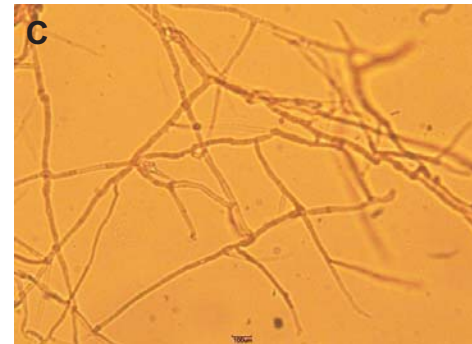
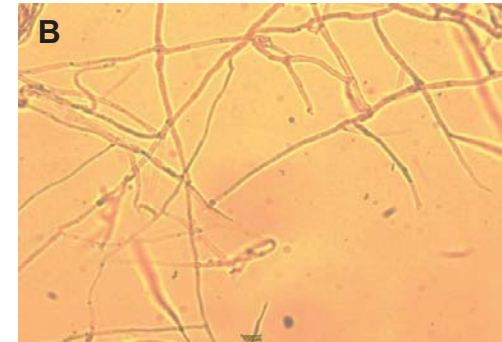
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE13



Este microorganismo desarrolla micelio aéreo de color blanco, y de consistencia blanda. Produce exudado hialino. En el envés del micelio se aprecia pigmentación de color amarillento. Su crecimiento es radial lobular.

Tasa de crecimiento: 1.60 cm²/día.



Se aprecian hifas septadas.

Endófito PBE13. A) Crecimiento de 14 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B. C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.



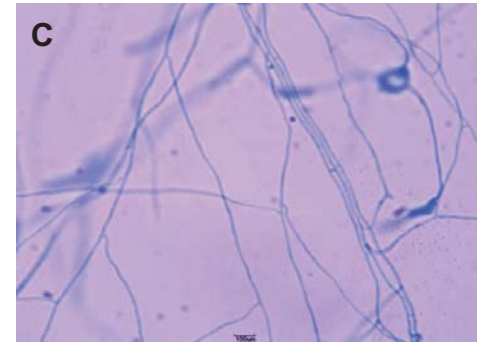
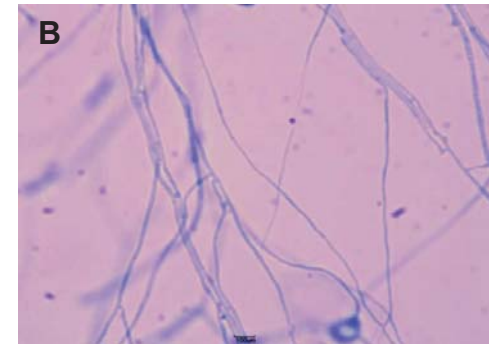
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE14



Este endófito muestra micelio aéreo, de consistencia dura, textura algodonosa y de color blanco. Presenta exudado hialino. En el envés del micelio se aprecia pigmentación café. Su crecimiento es radial irregular.

Tasa de crecimiento: 1.70 cm²/día.



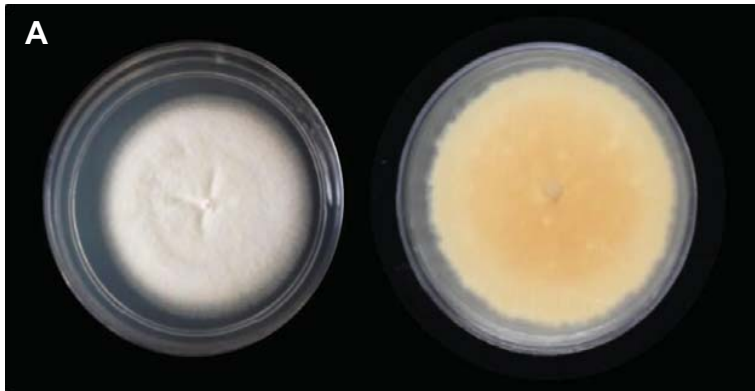
Se aprecian hifas septadas.

Endófito PBE14. A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.



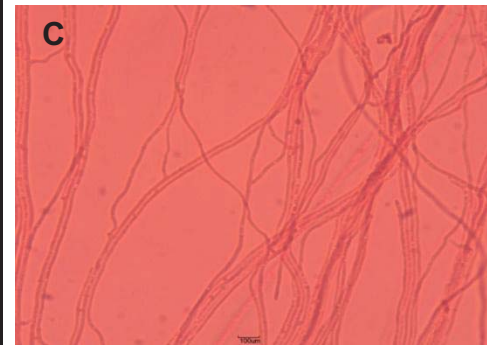
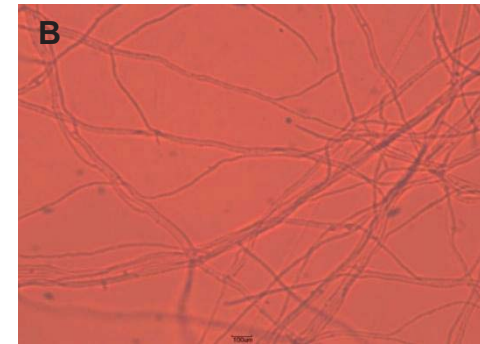
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE15



Este microorganismo desarrolla micelio aéreo, de color blanco, y de consistencia dura. Se observa producción de exudado hialino. En el envés del micelio se observa de color amarillo. Su crecimiento es radial regular.

Tasa de crecimiento: 1.14 cm²/día.



Se aprecian hifas septadas delgadas.

Endófito PBE15. A) Crecimiento de 32 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B,C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

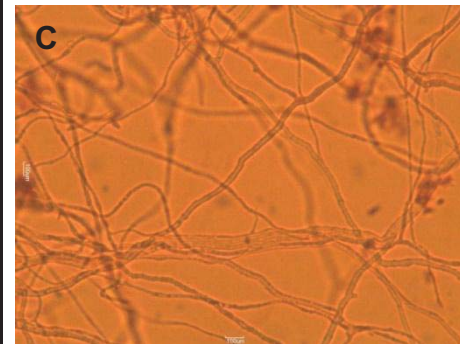
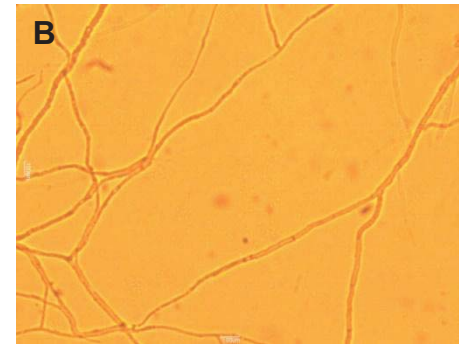
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE16



Se observa la formación de micelio aéreo, de color blanco, de textura vellosa y consistencia dura. No presenta producción de exudado. En el envés el micelio se observa una coloración rosa pálido. Su crecimiento es radial.

Tasa de crecimiento: 1.65 cm²/ día.



Se aprecian hifas septadas.

Endófito PBE16. A) Crecimiento de 13 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

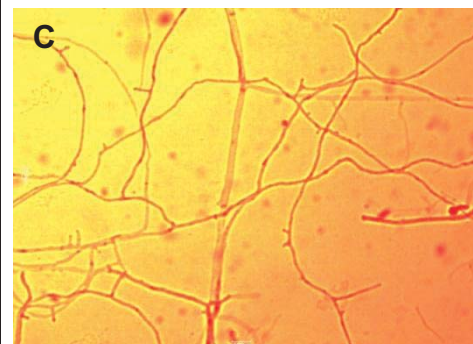
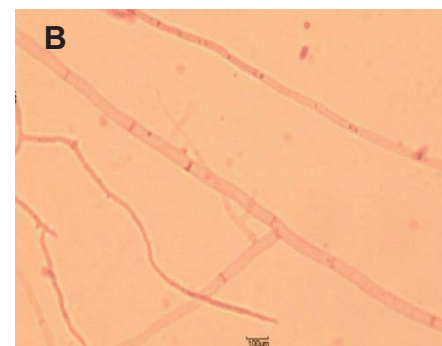
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE17



Este microorganismo forma micelio aéreo, de color blanco y de consistencia dura. En un inicio es de color blanco. Produce exudado hialino. En el envés el micelio se observa pigmento color rosa pálido. Su crecimiento es radial irregular.

Tasa de crecimiento: 1.70 cm²/ día.

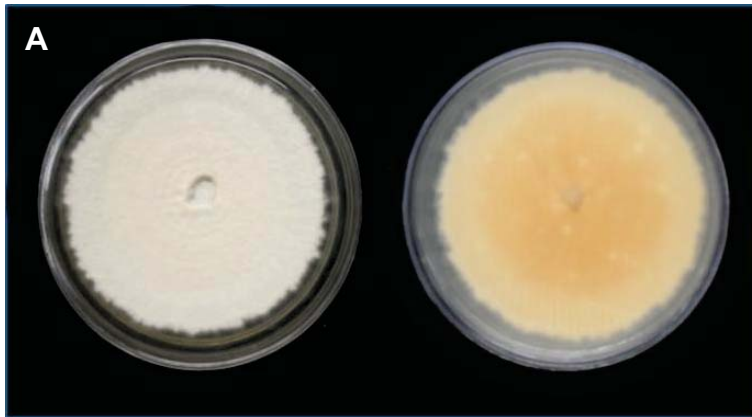


Se aprecian hifas septadas.

Endófito PBE17. A) Crecimiento de 22 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

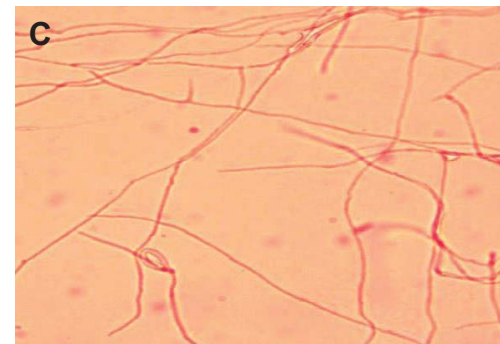
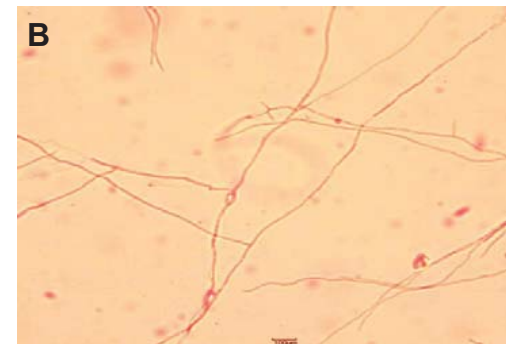
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE18



Este microorganismo desarrolla micelio aéreo de color blanco y de consistencia dura. No se observa exudado. En el envés del micelio se observa un color amarillo pálido. Su crecimiento es radial irregular.

Tasa de crecimiento: 1.50 cm²/día.



Se aprecian hifas delgadas septadas.

Endófito PBE18. A) Crecimiento de 26 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.



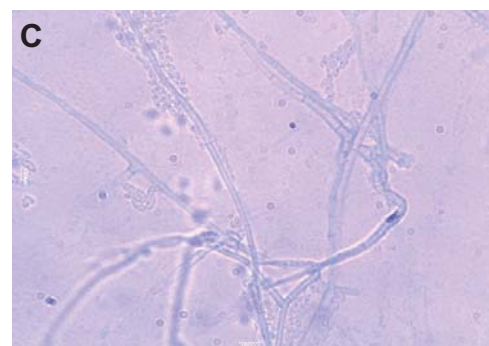
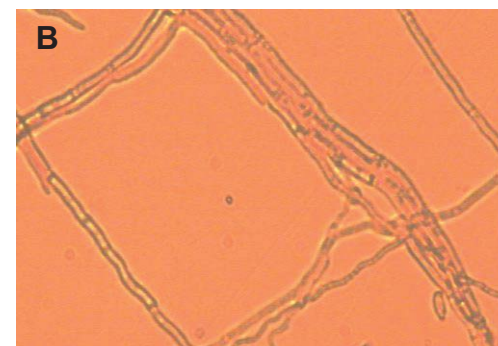
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE19



Este microorganismo desarrolla micelio aéreo de color café, y de apariencia polvosa y consistencia blanda. Presenta producción de exudado color marrón. En el envés del micelio se observa color café oscuro. Su crecimiento es radial irregular.

Tasa de crecimiento: 3.01 cm²/día.



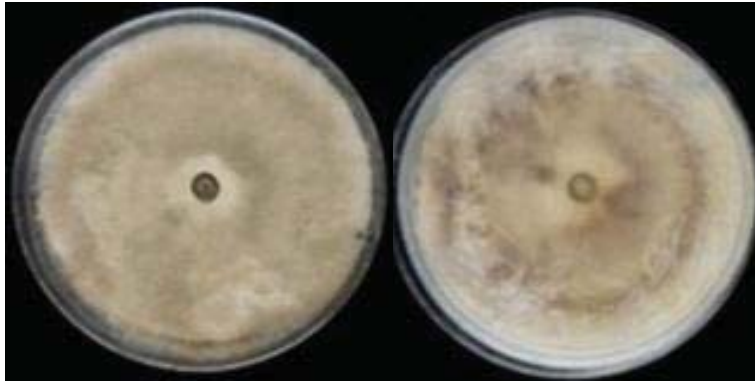
Se aprecian hifas septadas y amerosporas dinucleadas dispersas.

Endófito PBE19. A) Crecimiento de 10 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo y azul de lactofenol.



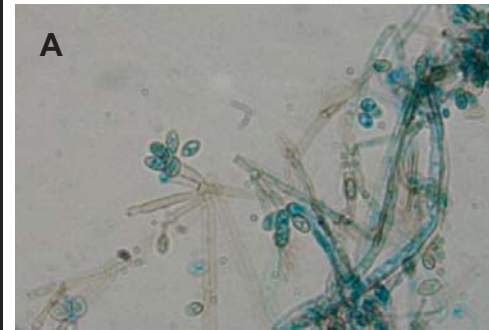
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE20



En el anverso el micelio es café con halos oscuros y claros alternados, de textura lanosa con crecimiento radial y con el borde filamentosos. No presenta exudado. En el envés del micelio se forman halos café oscuros y claros alternados.

Tasa de crecimiento: 4.84 cm²/día.



Las características microscópicas permitieron inferir que este hongo pertenece al género *Nodulisporum* (Dugan 2006).

Endófito PBE20. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B,C) Observaciones microscópicas en 40 X, teñidas con colorante rojo congo y azul de lactofenol.



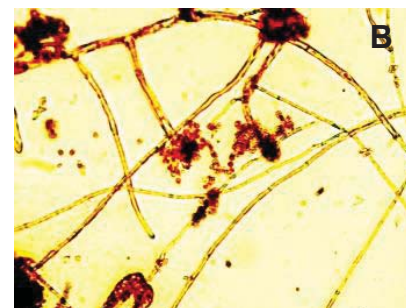
Cuadro 10. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBE21



Este microorganismo forma micelio algodonoso de color centro color gris, con halos blanco con gris, y esporas grises acumuladas en la orilla. Produce exudado amarillo. En el envés del micelio se observa de color gris, con halos café claro delgados, y café más oscuro. Su crecimiento es radial con bordes irregulares.

Tasa de crecimiento: 1.84 cm²/día.



Se aprecian conidióforos aspergiliares, hifas septadas, gruesas con vesículas, y esporas hialinas de forma redonda. Las características microscópicas permitieron inferir que este hongo pertenece al género ***Aspergillus*** (Dugan 2006).

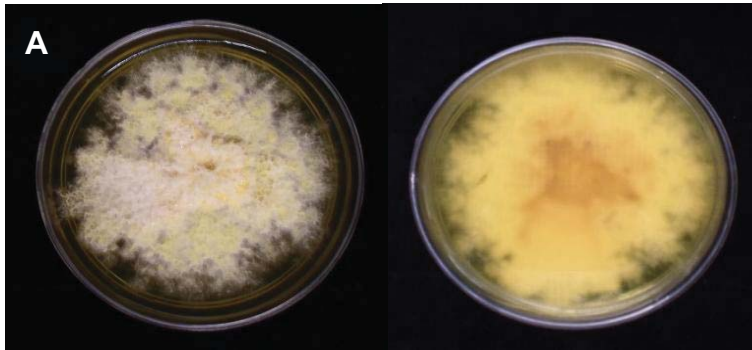
Endófito PBE21. A) Crecimiento de 18 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B,C) Observaciones microscópicas en 40 X, teñidas con colorante rojo congo y azul de lactofenol.

6.2.2. Hongos fitopatógenos

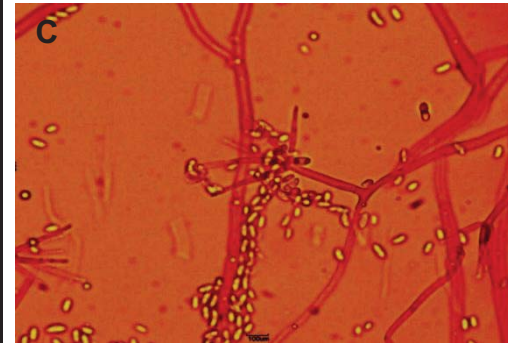
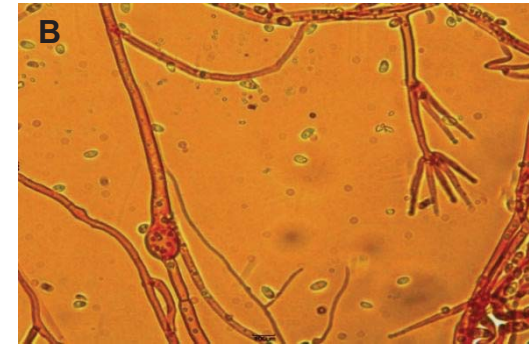
aislados de *Haematoxylon brasiletto*.

Cuadro 11. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos fitopatógenos

PBF1



Se observa la formación de micelio aéreo de color blanco y de aspecto vellosito, con borde dentado y de consistencia dura. Presenta producción de exudado color amarillo. En el envés del micelio presenta una coloración amarillo intenso. Su crecimiento es irregular. Tasa de crecimiento: 1.19 cm²/ día.



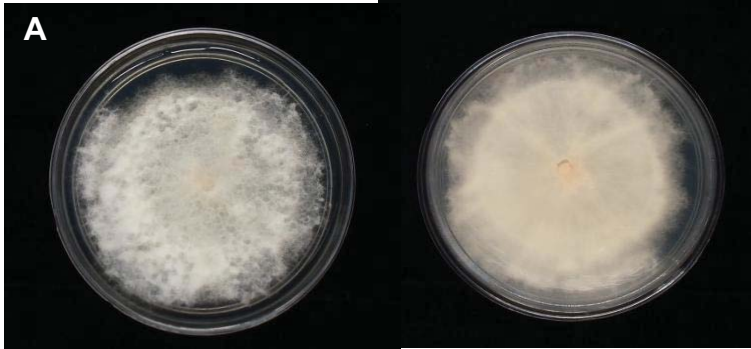
Se aprecian hifas septadas, conidióforos ramificados y amerosporas dinucleadas dispersas.

Endófito PBF1. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.



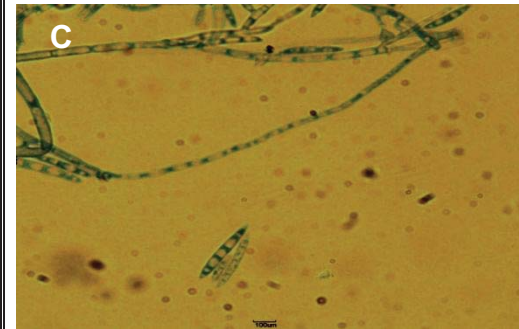
Cuadro 11. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos fitopatógenos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBF2



Este microorganismo forma micelio aéreo, lanoso con bordes dentados y de consistencia suave. Produce exudado hialino. En un inicio es de color blanco y durazno en el centro, con el paso del tiempo comienza a tornarse color café. Su crecimiento es irregular.

Tasa de crecimiento: 2.12 cm²/ día.



Se aprecian hifas septadas y macroconidios dispersos, curvados, pluriseptados y con una célula apical. Las características microscópicas permitieron inferir que este hongo pertenece al género *Fusarium* (Dugan 2006).

Endófito PBF2. A) Crecimiento de 15 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante azul de lactofenol.



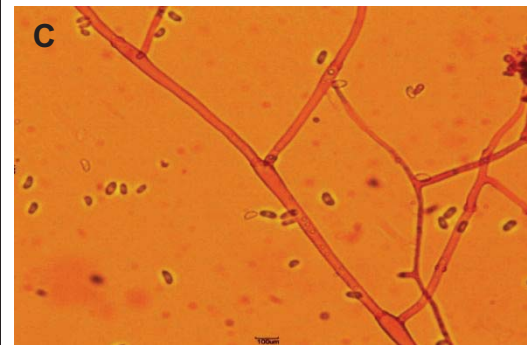
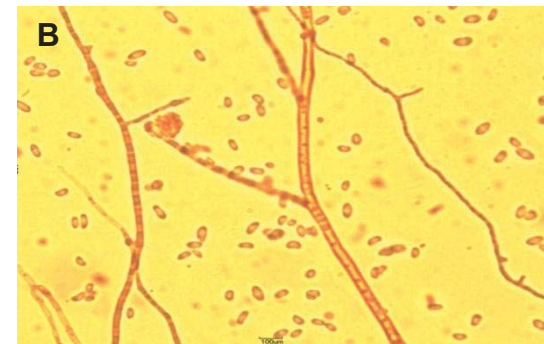
Cuadro 11. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos fitopatógenos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBF3



Se observa la formación de micelio aéreo de color blanco de textura vellosa, lanosa y de consistencia suave. Presenta producción de exudado color amarillo. En el envés del micelio se presenta una pigmentación amarillo intenso. Su crecimiento es radial irregular.

Tasa de crecimiento: 1.17 cm²/ día.

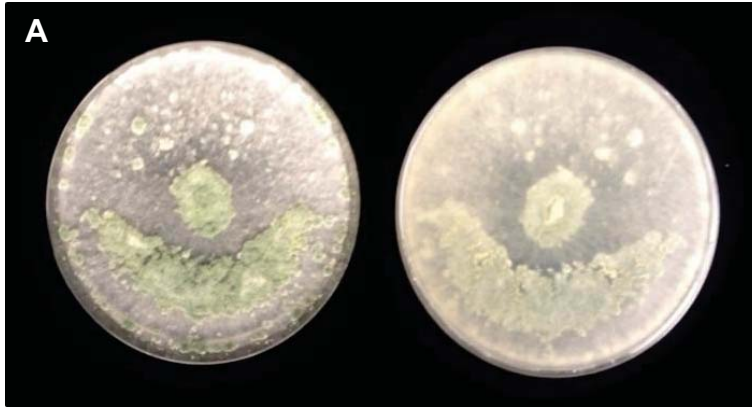


Se observan conidióforos con amersporas sésiles y también se aprecian hifas septadas.

Endófito PBF3. A) Crecimiento de 18 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.

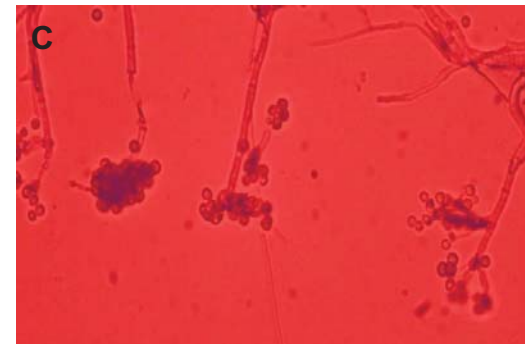
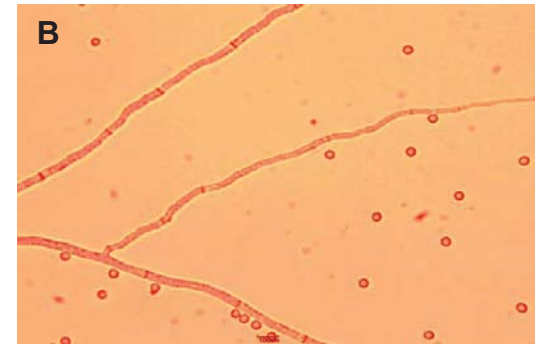
Cuadro 11. Características macroscópicas, microscópicas y tasa de crecimiento de los hongos fitopatógenos aislados de *Haematoxylon brasiletto* (Continuación).

PBF4



Se observa la formación de micelio escaso aéreo de color blanco, de textura vellosa y de consistencia suave. Al envejecer su micelio se torna color verde. No presenta producción de exudado. En el envés el micelio no se observa pigmentación. Su crecimiento es radial

Tasa de crecimiento: 5.69 cm²/ día.



Se aprecian hifas septadas, esporangios y amerosporas.

Endófito PBF4. A) Crecimiento de 6 días en medio PDA, anverso (izq.) y reverso (der.); B, C) Observación microscópica en 40 X, teñida con colorante rojo congo.





6.3. *Cultivos y extractos en pequeña escala de hongos endófitos aislados de hojas de Haematoxylon brasiletto*

Con el propósito de establecer las condiciones óptimas para el cultivo de los hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto*, se realizó el cultivo de todos los microorganismos en pequeña escala empleando como medio de crecimiento arroz y CPD en condiciones estáticas. Una vez transcurrido el periodo de fermentación, se obtienen los correspondientes extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio y los rendimientos se ilustran en el **Cuadro 12**. En general, se observó que los hongos endófitos en estudio crecen de manera óptima bajo las condiciones de fermentación estática en ambos medios de crecimiento, CPD y arroz.

Con excepción del extractos orgánico del micelio (1,5 g) del hongo endófito *Aspergillus* sp. (PB21), desarrollado en medio CPD, los mayores rendimientos de extractos fúngicos de los cultivos obtenidos fueron bajo las condiciones de cultivo estáticas en medio arroz.

La selección final de las condiciones óptimas de cultivo para cada hongo endófito aislado, se establecieron de acuerdo los resultados en la evaluación del potencial fitotóxico y antifúngico de dichos extractos orgánicos.



Cuadro 12. Rendimiento de los extractos orgánicos del cultivo en pequeña escala de los hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$).

Hongos endófitos	Cultivo en CPD en condición de incubación estático (30 días)		Cultivo en arroz en condición de incubación estático (30 días)
	Medio (mg/L)	Micelio (mg/L)	Medio y Micelio (mg/50 g arroz)
PBE1	190	80	202
PBE2	207	150	69
PBE3	108	188	495
PBE4	90	309	221
PBE5	107	258	449
PBE6	130	265	526
PBE7	47	352	464
PBE8	350	160	376
PBE9	170	90	133
PBE10	100	180	100
PBE11	470	210	300
PBE12	90	110	363
PBE13	240	200	327
PBE14	230	580	163
PBE15	180	209	448
PBE16	100	270	605
PBE17	400	300	159
PBE18	301	256	383
PBE19	167	190	370
PBE20	209	289	576
PBE21	310	1500	500



6.4. Determinación del potencial antifúngico

El potencial antifúngico de los extractos orgánicos crudos en medio de cultivo arroz y CPD, se estableció cuantitativamente mediante el estudio del efecto de los mismos sobre el crecimiento radial de cinco microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica* y *Pythium aphanidermatum*, empleando el método de dilución en agar en cajas de, Petri y una concentración de prueba de 250 $\mu\text{g/mL}$ (**Cuadro 13**). Como se puede observar, los extractos de los hongos endófitos *Fusarium* sp. (PBE2), PBE4, *Xylaria* sp. (PBE11), PBE13, PBE16 en medio arroz, presentan mayor actividad antifúngica en comparación con los extractos del medio de cultivo CPD, y siendo en todos los casos los oomicetos *P. capsici*, *P. aphanidermatum* y *P. parasitica* los microorganismos más afectados.

El extracto del hongo *Fusarium* sp. (PBE2) presenta mayor potencial antioomiceto inhibiendo el crecimiento de *P. capsici* y *P. aphanidermatum* en un 100% y 87%, respectivamente, a la concentración de prueba de 250 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de los hongos endófitos PBE18 y *Nodulisporium* sp. (PBE20), el extracto de medio de cultivo PDA presentó una inhibición significativa superior al 56 % sobre el crecimiento de *P. capsici* y del 37% sobre *P. aphanidermatum*.

Los extractos orgánicos obtenidos de hongos endófitos PBE8 y *Aspergillus* sp. (PBE21) desarrollados en medio de cultivo arroz y CPD, presenta una actividad inhibitoria significativa superior al 25%, sobre el crecimiento los cinco microorganismos fitopatógenos de prueba. Con base en el potencial antifúngico y antioomiceto obtenido y con la finalidad de establecer la CI_{50} de los extractos orgánicos que mostraron la mayor actividad biológica, se cultivaron en mediana escala los hongos endófitos *Xylaria* sp. (PBE11) y *Aspergillus* sp. (PBE21).

Cuadro 13. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos obtenidos de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici*, *P. aphanidermatum* y *P. parasítica*.

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición del crecimiento radial				
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. solani</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>P. parasítica</i>
PBE1	CA	11.0 ± 2.3*	16.0 ± 3.0*	0.0 ± 0.0	22.0 ± 2.8*	10.0 ± 2.8
	M	18.0 ± 1.5*	0.0 ± 0.0	21.3 ± 0.0*	0.0 ± 0.0	14.2 ± 1.7*
	Mi	0.0 ± 0.0	3.3 ± 0.9	18.7 ± 3.2*	0.0 ± 0.0	18.9 ± 3.5*
PBE2	CA	0.0 ± 0.0	20.5 ± 1.5*	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	87.0 ± 3.2*
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	45.3 ± 4.3*	55.2 ± 2.5*	28.3 ± 1.5*
	Mi	13.2 ± 3.1*	18.8 ± 2.9*	57.0 ± 4.7*	42.0 ± 3.0*	49.3 ± 2.4*
PBE3	CA	12.0 ± 2.5*	16.6 ± 2.0*	0.0 ± 0.0	14.0 ± 3.9*	10.4 ± 3.0*
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	23.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	9.8 ± 2.5	10.3 ± 1.6*	13.9 ± 1.5*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE4	CA	24.0 ± 5.4*	12.0 ± 3.0*	89.0 ± 2.6*	80.0 ± 3.2*	72.0 ± 6.2*
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE5	CA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	6.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Controles	Metalaxil	31.8 ± 2.1*	24.6 ± 1.3*	83.8 ± 5.8*	100.0 ± 0.0*	93.0 ± 0.0*
	Carbendazim	100.0 ± 0.0*	16.7 ± 1.9	4.4 ± 0.6	33.4 ± 3.1*	11.6 ± 1.1*

Extracto orgánico de: CA arroz, M medio de cultivo, Mi Micelio. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.



Cuadro 13. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos obtenidos de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici*, *P. aphanidermatum* y *P. parasítica* (Continuación).

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición del crecimiento radial				
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. solani</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>P. parasítica</i>
PBE6	CA	10.0 ± 3.1	12.0 ± 4.0*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	10.2 ± 3.2*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE7	CA	0.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.0 ± 1.0
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.0 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE8	CA	52.0 ± 2.3*	40.0 ± 2.8*	26.0 ± 1.9*	30.0 ± 3.7*	40.0 ± 3.2*
	M	38.0 ± 1.9*	49.0 ± 5.3*	15.0 ± 0.5*	42.3 ± 2.5*	29.7 ± 3.9*
	Mi	16.0 ± 1.5*	33.0 ± 3.6*	12.0 ± 1.0*	46.1 ± 1.8*	39.2 ± 5.2*
PBE9	CA	0.0 ± 0.0	29.0 ± 1.7*	100.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0	12.0 ± 2.8*
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	21.6 ± 3.0*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	6.6 ± 1.4	17.7 ± 2.2*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE10	CA	24.0 ± 3.0*	17.0 ± 2.0*	13.0 ± 2.1*	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
	M	0.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	18.0 ± 4.4*	31.0 ± 0.0*	16.2 ± 2.1*
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	19.0 ± 2.1*	27.0 ± 0.0*	20.8 ± 1.6*
Controles	Metalaxil	31.8 ± 2.1*	24.6 ± 1.3*	83.8 ± 5.8*	100.0 ± 0.0*	93.0 ± 0.0*
	Carbendazim	100.0 ± 0.0*	16.7 ± 1.9	4.4 ± 0.6	33.4 ± 3.1*	11.6 ± 1.1*

Extracto orgánico de: CA arroz, M medio de cultivo, Mi Micelio. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.



Cuadro 13. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos obtenidos de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici*, *P. aphanidermatum* y *P. parasítica* (Continuación).

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición del crecimiento radial				
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. solani</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>P. parasítica</i>
PBE11	CA	0.0 ± 0.0	12.0 ± 1.0*	15.0 ± 1.0*	40.0 ± 2.6*	34.0 ± 3.0*
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	59.4 ± 3.5*	37.2 ± 3.8*	18.8 ± 2.0*
	Mi	0.0 ± 0.0	3.3 ± 1.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	14.9 ± 1.5*
PBE12	CA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE13	CA	26.0 ± 2.3*	86.0 ± 3.1*	90.0 ± 4.0*	0.0 ± 0.0	22.0 ± 2.8*
	M	18.2 ± 2.8*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	13.5 ± 3.0*	6.6 ± 0.0	25.7 ± 2.2*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE14	CA	14.0 ± 2.0*	7.0 ± 1.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	14.2 ± 2.7*	0.0 ± 0.0	21.5 ± 1.9*
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	18.1 ± 3.8*	0.0 ± 0.0	18.2 ± 0.8*
PBE15	CA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	11.0 ± 1.8*	16.0 ± 2.0*	5.0 ± 0.4
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Controles	Metalaxil	31.8 ± 2.1*	24.6 ± 1.3*	83.8 ± 5.8*	100.0 ± 0.0*	93.0 ± 0.0*
	Carbendazim	100.0 ± 0.0*	16.7 ± 1.9	4.4 ± 0.6	33.4 ± 3.1*	11.6 ± 1.1*

Extracto orgánico de: CA arroz, M medio de cultivo, Mi Micelio. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.



Cuadro 13. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos crudos obtenidos de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici*, *P. aphanidermatum* y *P. parasítica* (Continuación).

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición del crecimiento radial				
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. solani</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>P. parasítica</i>
PBE16	CA	19.0 ± 1.0*	0.0 ± 0.0	11.0 ± 0.0*	26.0 ± 2.2*	37.0 ± 3.0
	M	0.0 ± 0.0	12.2 ± 3.6*	16.5 ± 2.9*	0.0 ± 0.0	56.3 ± 3.9*
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE17	CA	10.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	14.0 ± 1.5*	0.0 ± 0.0
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	23.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	6.6 ± 0.0	10.7 ± 2.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE18	CA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	M	13.9 ± 2.4*	10.0 ± 2.9*	57.7 ± 4.5*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	12.2 ± 3.2*	8.0 ± 3.0	16.8 ± 2.9*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE19	CA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.0 ± 2.0	0.0 ± 0.0	4.0 ± 1.3
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE20	CA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	11.0 ± 0.0
	M	0.0 ± 0.0	16.2 ± 3.6*	59.1 ± 4.5*	37.7 ± 3.2*	13.0 ± 0.9*
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	28.7 ± 1.0*	13.2 ± 1.9*	0.0 ± 0.0
PBE21	CA	46.0 ± 2.1*	46.0 ± 1.0*	42.0 ± 0.0*	63.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0
	M	41.0 ± 1.8*	51.0 ± 5.0*	10.0 ± 0.0	47.0 ± 0.0*	9.0 ± 0.0
	Mi	14.0 ± 0.5*	33.0 ± 3.2*	11.0 ± 1.0*	58.0 ± 0.0*	15.0 ± 0.0*
Controles	Metalaxil	31.8 ± 2.1*	24.6 ± 1.3*	83.8 ± 5.8*	100.0 ± 0.0*	93.0 ± 0.0*
	Carbendazim	100.0 ± 0.0*	16.7 ± 1.9	4.4 ± 0.6	33.4 ± 3.1*	11.6 ± 1.1*

Extracto orgánico de: CA arroz, M medio de cultivo, Mi Micelio. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.





6.5. Determinación del potencial fitotóxico.

La actividad fitotóxica de los extractos derivados de los cultivos en pequeña escala, se determinó cuantitativamente por medio del bioensayo de dilución en agar, utilizando cajas Petri y una concentración de prueba de 100 µg/mL sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración durante el proceso de germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*.(Cuadro 14)

La germinación de las semillas de ambas plantas de prueba fue inhibida significativamente por uno de los endófitos en estudio, *Fusarium* sp. (PBE2), siendo el extracto orgánico del cultivo en arroz el que presenta una inhibición del 100 % sobre ambas plantas de prueba.

En general, el crecimiento de la raíz fue el proceso más afectado en ambas especies de prueba, al ser inhibido significativamente por al menos uno de los tres extractos en estudio [medio arroz, micelio (CPD) y medio de cultivo (CPD)].

El extracto orgánico del cultivo en arroz de los endófito *Verticillium* sp. (PBE1), *Fusarium* sp. (PBE2), PBE4, *Aspergillus* sp. (PBE6), *Fusarium* sp. (PBE9), *Xylaria* sp. (PBE11), *Acremonium* sp. (PBE12), PBE13 y PB19 presentaron un efecto significativo sobre el crecimiento de la raíz de ambas plantas prueba en un rango que va de 20% hasta el 100% de inhibición.

En el caso de los hongos endófitos PBE15 y *Nodulisporium* sp. (PBE20) es el extracto de medio de cultivo CPD presentó inhibición significativa superior al 30% sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y superior al 52 % sobre el crecimiento de la raíz de *S. lycopersicum*.

Los extractos orgánicos de micelio y medio de cultivo obtenidos de hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21) desarrollado en medio de cultivo CPD, presentaron una actividad inhibitoria significativa superior al 78% y de 62% sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Ningún extracto muestra un efecto significativo sobre la respiración durante la germinación de ambas plantas de prueba.

Con base en los resultados expuestos en los **Cuadros 13 y 14**, se seleccionaron a los endófitos *Xylaria* sp. (PBE11) y *Aspergillus* sp. (PBE21) como candidatos idóneos para su estudio químico biodirigido y con el objetivo de obtener los metabolitos responsables de la actividad biológica se cultivaron en mediana escala.

Cuadro 14. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos crudos obtenidos de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición			
		<i>A. hypochondriacus</i>		<i>S. lycopersicum</i>	
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Germinación	Crecimiento de la raíz
PBE1	CA	0.0 ± 0.0	52.0 ± 3.4*	0.0 ± 0.0	33.0 ± 2.0*
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE2	CA	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*
	M	35.0 ± 2.8*	85.2 ± 2.2*	22.3 ± 3.4*	59.2 ± 2.1*
	Mi	44.0 ± 3.1*	45.3 ± 1.6*	26.0 ± 4.2*	44.0 ± 3.0*
PBE3	CA	2.0 ± 0.5	44.0 ± 2.1*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	M	1.0 ± 0.9	35.1 ± 2.6*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE4	CA	0.0 ± 0.0	46.0 ± 1.2*	3.2 ± 1.3	92.0 ± 5.0*
	M	0.0 ± 0.0	30.2 ± 1.9*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE5	CA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	M	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	3.1 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Controles	Glifosato	31.8 ± 2.1*	24.6 ± 1.3*	83.8 ± 5.8*	100.0 ± 0.0*

Extracto orgánico de: CA arroz, M medio de cultivo, Mi Micelio. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.



Cuadro 14. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos crudos obtenidos de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* (Continuación).

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición			
		<i>A. hypochondriacus</i>		<i>S. lycopersicum</i>	
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Germinación	Crecimiento de la raíz
PBE6	CA	2.8 ± 0.2	65.0 ± 2.3*	0.0 ± 0.0	25.0 ± 1.5*
	M	1.0 ± 0.0	40.2 ± 3.5*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE7	CA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	26.0 ± 3.0*
	M	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.5	0.0 ± 0.0	13.0 ± 0.9*
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE8	CA	1.1 ± 0.6	49.0 ± 2.1*	0.0 ± 0.6	51.0 ± 1.5*
	M	0.0 ± 0.0	40.2 ± 3.5*	0.0 ± 0.0	57.1 ± 2.5*
	Mi	0.0 ± 0.0	31.2 ± 2.0*	0.0 ± 0.0	43.2 ± 3.0*
PBE9	CA	0.0 ± 0.0	66.0 ± 4.0*	0.0 ± 0.0	85.0 ± 3.7*
	M	0.0 ± 0.0	35.1 ± 2.6*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE10	CA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.4 ± 0.5	26.0 ± 2.8*
	M	0.0 ± 0.0	36.2 ± 1.9*	0.0 ± 0.0	69.1 ± 0.8
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Controles	Glifosato	25.4.8 ± 1.1*	39.40 ± 1.1*	10.8 ± 1.3*	65.2 ± 1.5*

Extracto orgánico de: CA arroz, M medio de cultivo, Mi Micelio. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.



Cuadro 14. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos crudos obtenidos de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* (Continuación).

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición			
		<i>A. hypochondriacus</i>		<i>S. lycopersicum</i>	
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Germinación	Crecimiento de la raíz
PBE11	CA	0.0 ± 0.0	31.3 ± 3.2*	2.9 ± 0.8	26.0 ± 3.1*
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	50.3 ± 2.4*
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	28.1 ± 1.5*
PBE12	CA	0.0 ± 0.0	22.1 ± 0.1*	3.3 ± 0.5	50.0 ± 0.0*
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE13	CA	5.3 ± 0.7	83.0 ± 6.1*	3.1 ± 0.5	43.0 ± 4.1*
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE14	CA	3.6 ± 0.5	63.0 ± 2.8*	0.0 ± 0.0	14.0 ± 1.5*
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	21.1 ± 2.2*
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE15	CA	3.0 ± 0.5	20.0 ± 1.0*	3.3 ± 0.2	16.0 ± 3.9*
	M	0.0 ± 0.0	30.1 ± 2.6*	0.0 ± 0.0	66.5 ± 3.3*
	Mi	0.0 ± 0.0	39.0 ± 1.3*	1.6 ± 0.5	63.8 ± 2.8*
Controles	Glifosato	25.4.8 ± 1.1*	39.40 ± 1.1*	10.8 ± 1.3*	65.2 ± 1.5*

Extracto orgánico de: CA arroz, M medio de cultivo, Mi Micelio. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.



Cuadro 14. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos crudos obtenidos de los hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* (Continuación).

Hongo endófito	Extracto	% Inhibición			
		<i>A. hypochondriacus</i>		<i>S. lycopersicum</i>	
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Germinación	Crecimiento de la raíz
PBE16	CA	6.2 ± 0.4	24.0 ± 1.6*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE17	CA	2.8 ± 0.4	21.0 ± 2.2*	4.5 ± 0.8	27.0 ± 2.5*
	M	0.0 ± 0.0	5.2 ± 1.5	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.9
	Mi	0.0 ± 0.0	4.9 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE18	CA	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	28.2 ± 1.9*
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PBE19	CA	4.2 ± 0.5	38.0 ± 4.3*	3.4 ± 0.9	46.0 ± 3.7*
	M	0.0 ± 0.0	21.2 ± 0.5*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Mi	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	34.0 ± 0.0*
PBE20	CA	3.0 ± 0.0	46.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0	38.0 ± 0.0*
	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	86.2 ± 2.5*
	Mi	2.0 ± 0.0	47.2 ± 2.1*	0.0 ± 0.0	53.0 ± 3.0*
PBE21	CA	2.0 ± 0.5	70.0 ± 2.1*	0.0 ± 0.0	51.0 ± 3.9*
	M	0.0 ± 0.0	80.1 ± 2.6*	17.0 ± 2.0*	62.4 ± 1.9*
	Mi	0.0 ± 0.0	78.7 ± 1.9*	10.9 ± 1.5*	76.2 ± 2.3*
Controles	Glifosato	25.4.8 ± 1.1*	39.40 ± 1.1*	10.8 ± 1.3*	65.2 ± 1.5*

Extracto orgánico de: CA arroz, M medio de cultivo, Mi Micelio. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), representan el promedio de cuatro repeticiones.





6.6. *Potencial antagónico de los hongos endófitos aislados de Haematoxylon brasiletto*

Los hongos endófitos *Fusarium* sp. (PBE2), PBE8, *Fusarium* sp. (PBE9), *Xylaria* sp. (PBE11), *Acremonium* sp. (PBE12), PBE14, PBE16, PBE19, *Nodulisporium* sp. (PBE20) y *Aspergillus* sp. (PBE21), quienes presentaron la mayor actividad antifúngica y antioomiceto a nivel de extractos orgánicos, fueron seleccionados para la realización de los bioensayos de antagonismo directo múltiple *in vitro* con la finalidad de establecer su potencial para el desarrollo de agentes de control biológico; así como contribuir al conocimiento de las complejas interacciones inter específicas que se establecen dentro de las comunidades fúngicas (Sandoval 2014; Martínez 2015; Sánchez Fernández et al. 2016).

El potencial antagónico de los endófitos seleccionados se estableció mediante bioensayos de antagonismo entre hongos endófitos y microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura. Para el registro de las interacciones establecidas y del cálculo del índice de antagonismo (IA) se utilizaron como referencia las categorías y tipos de interacción entre microorganismos indicadas en el **Cuadro 3**. Los bioensayos de antagonismo directo múltiple se dividieron en dos grupos: En el grupo 1 se incluyó a los endófitos *Fusarium* sp. (PBE2), PBE8, *Fusarium* sp. (PBE9), *Xylaria* sp. (PBE11), *Acremonium* sp. (PBE12), PBE14 y PBE19 como microorganismos competidores contra los fitopatógenos *F. oxysporum*, *A. solani*, *P. capsici* y *P. ultimum*. Las imágenes que se presentan pertenecen en la **Figura 5** representan a las interacciones antagónicas observadas a los 3, 6, 9 y 12 días de bioensayo. Por otra lado el grupo 2 corresponde a los endófitos PBE16, *Nodulisporium* sp. (PBE20) y *Aspergillus* sp. (PBE21), y como microorganismos competidores se utilizaron a los fitopatógenos *F. oxysporum*, *A. solani*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum*. Las imágenes que se muestran en la Figura 6 representan a las interacciones antagónicas observadas a los 3, 6 y 9 días de bioensayo. En este grupo se utilizó el oomiceto *P. aphanidermatum* en lugar de *P. ultimum*. En los bioensayos realizados con *P. Aphanidermatum*, sólo se realizó el registró del

potencial antagónico provocado por los endófitos hasta el día 9 de bioensayo debido a que su tasa de crecimiento muy rápida.

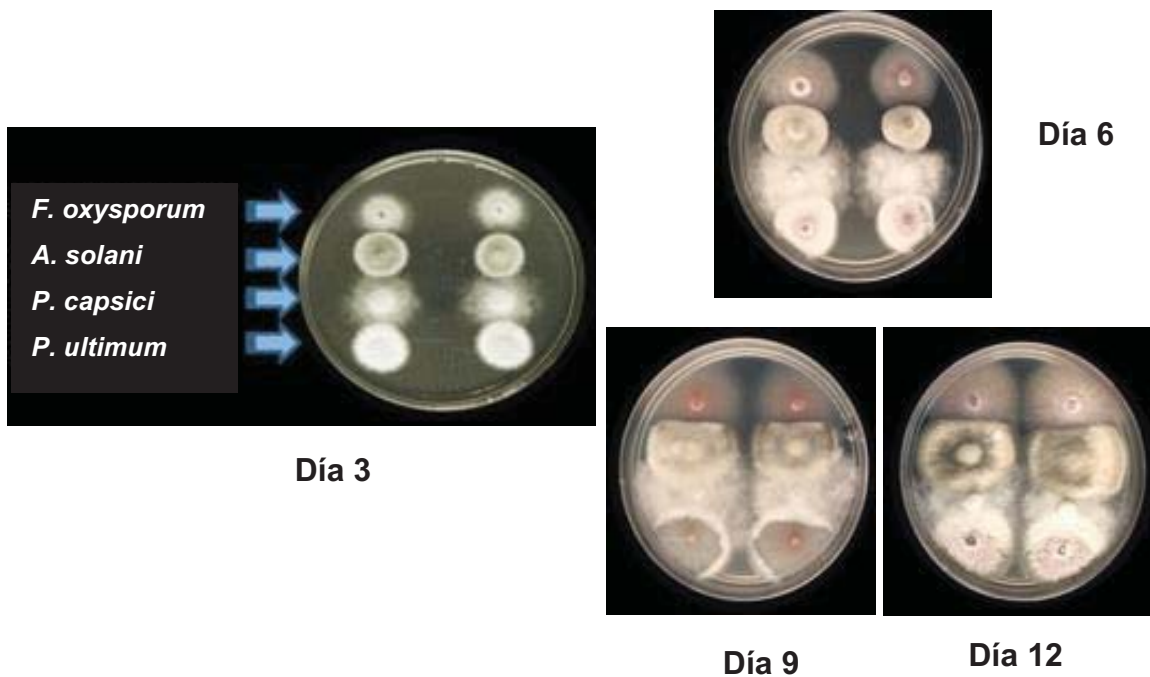


Figura 5. Controles de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos competidores, empleados en los bioensayos de antagonismo directo múltiple *in vitro* con hongos endófitos del grupo uno, a los 3, 6, 9 y 12 días de bioensayo.

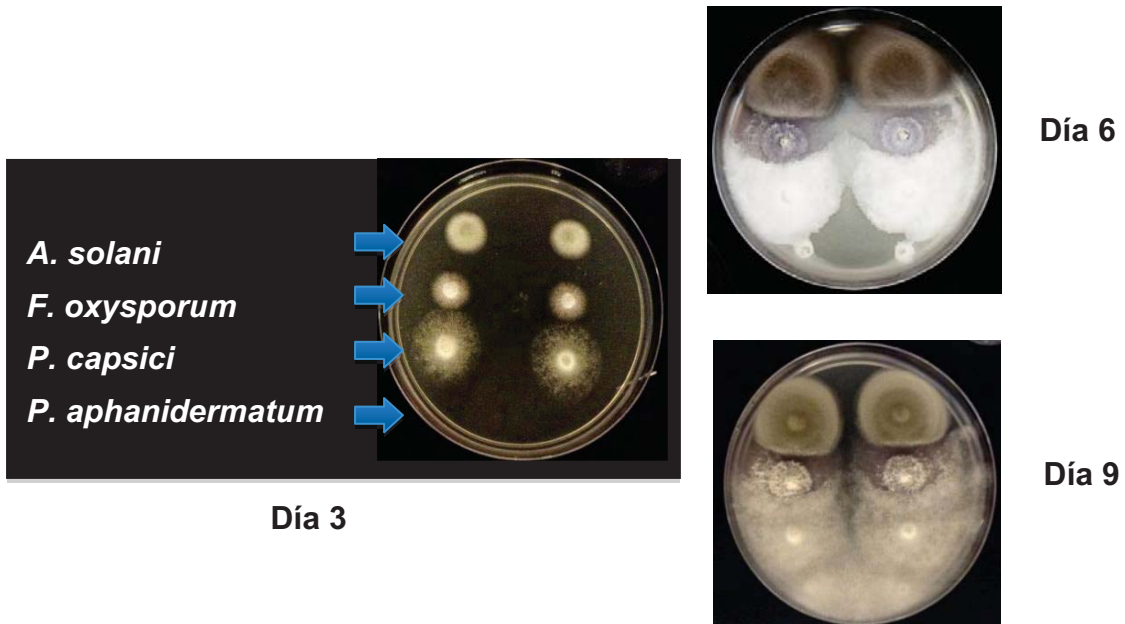


Figura 6. Controles de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos competidores, empleados en los bioensayos de antagonismo directo múltiple *in vitro* con hongos endófitos del grupo dos a los 3, 6 y 9 días de bioensayo. El oomiceto *P. aphanidermatum* fue incluido en el bioensayo a partir del día cinco de interacción antagónica.

6.6.1. *Fusarium* sp. (PBE2) vs microorganismos fitopatógenos

En la interacción antagónica entre el endófito *Fusarium* sp. (PBE2) y los fitopatógenos de prueba (**Figura 7**) se puede observar que *A. solani* es el hongo más afectado mostrando una inhibición del 100% a lo largo de todo el bioensayo y a través de una interacción tipo E, donde el endófito inhibe a distancia el crecimiento del competidor. (**Cuadro 15**). En el caso de los otros microorganismos competidores, el oomiceto fitopatógenos *P. capsici* también presentó una inhibición de 100% a los tres y seis días de interacción antagónica con una interacción tipo E, sin embargo esta inhibición disminuye hasta un 40.2% al día 12 de bioensayo. Por su parte, *F. oxysporum* y *P. ultimum* mostraron los menores porcentajes de inhibición a través de interacciones tipo B, en donde el endófito *Fusarium* sp. (PBE2) crecen en contacto con los fitopatógenos a lo largo de todo el bioensayo y cesa el crecimiento de ambas especies.

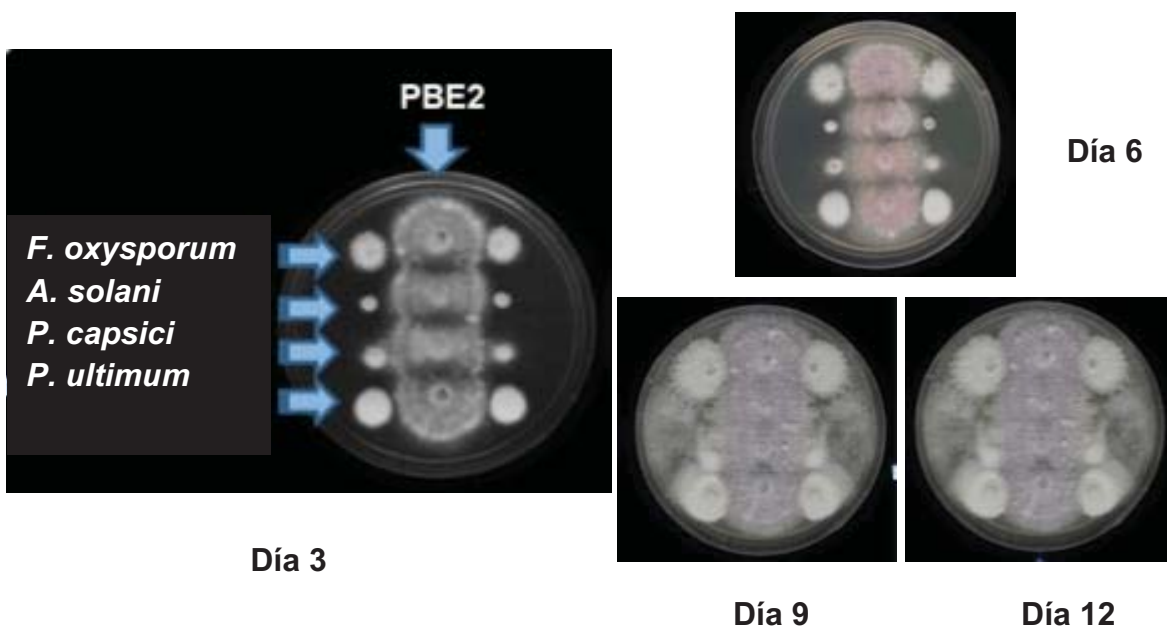


Figura 7. Antagonismo directo múltiple entre el endófito *Fusarium* sp. (PBE2) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.



Con base en las observaciones asignadas de acuerdo al **Cuadro 15** el hongo endófito *Fusarium* sp. (PBE2) muestra un índice de antagonismo **IA** de diez a los 3 y 6 días de interacción antagónica, y de seis a los 9 y 12 días.

Cuadro 15. Índice de antagonismo del hongo endófito *Fusarium* sp. (PBE2), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo *in vitro*.

Hongos fitopatógenos.	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	19.9 ± 2.0	38.7 ± 2.5*	37.4 ± 2.3*	41.0 ± 4.0*
<i>A. solani</i>	100.0 ± 0.0.*	100.0 ± 0.0.*	100.0 ± 0.0.*	100.0 ± 0.0.*
<i>P. capsici</i>	100.0 ± 0.0.*	100.0 ± 0.0.*	41.79 ± 2.9*	40.2 ± 1.5*
<i>P. ultimum</i>	36.7 ± 4.0*	38.2 ± 2.6*	38.7 ± 3.4*	38.0 ± 1.3*
IA	10	10	6	6

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$). Se presenta el promedio de seis repeticiones.

6.6.2. PBE8 vs microorganismos fitopatógenos

En la **Figura 8**, se puede observar que desde el día tres hasta el día 12 de interacción antagónica entre el endófito PBE8 y los microorganismos competidores, se aprecia una inhibición a distancia sobre el crecimiento de los 4 fitopatógenos, con una interacción tipo E (**Cuadro 16**). Los oomicetos fitopatógenos *P. ultimum* y *P. capsici* son los más afectados al día 3 de interacción, inhibiendo su crecimiento en un 100% y 54.8%, respectivamente, sin embargo, al finalizar el bioensayo, *P. ultimum* es inhibido significativamente en un 40%. Los microorganismos *F. oxysporium*, *A. solani* y *P. capsici* son inhibidos de manera dependiente del tiempo de bioensayo mostrando porcentajes de inhibición de 68.7%, 66.4% y 86.2% respectivamente, al día 12 de interacción (**Cuadro 16**).

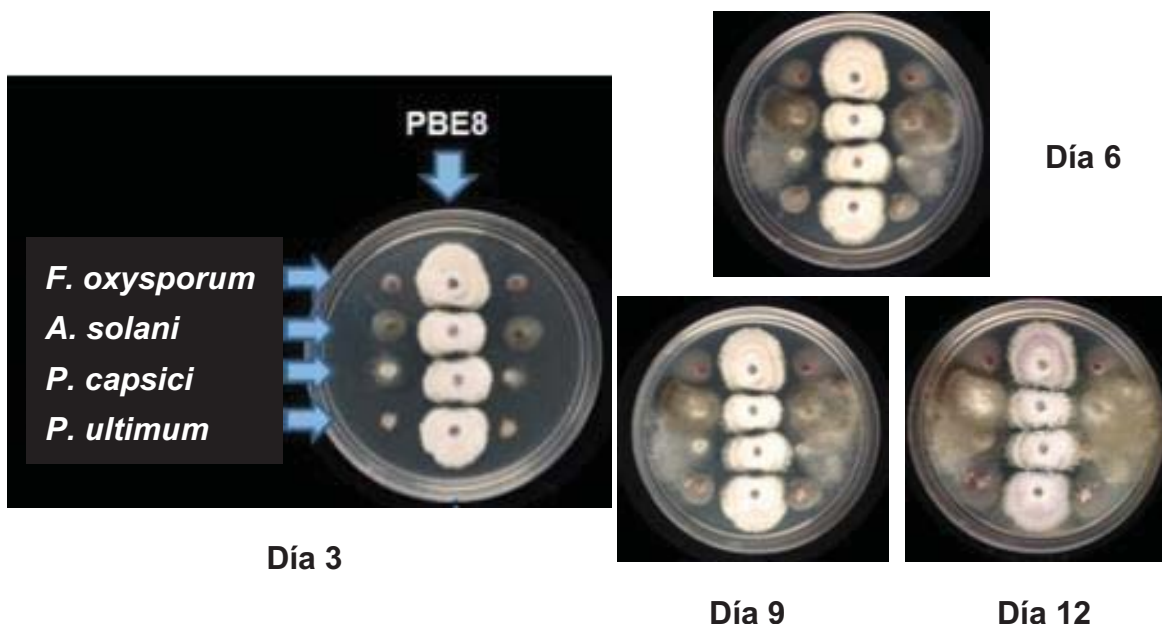


Figura 8. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE8 y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.

La inhibición a distancia, observada sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos, podría ser generada por la presencia de metabolitos secundarios difundidos en el medio de cultivo, con actividad antimicrobiana o bien, por



compuestos orgánicos volátiles (VOCs), los cuales comprenden una amplia gama de compuestos químicos bioactivos que están involucrados en las respuestas de defensa de las plantas y los microorganismos (Stadler y Keller 2008; Cheng y Cheng 2015).

El endófito PBE8 muestra un **IA** de 16 que se mantiene a lo largo de todo el bioensayo, siendo este valor el máximo esperado, en consecuencias este hongo endófito posee un elevado potencial antagonico.

Cuadro 16. Índice de antagonismo del hongo endófito PBE8, y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo *in vitro*.

Hongos fitopatógenos.	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	41.0 ± 5.0*	44.2 ± 4.9*	56.5 ± 2.0*	68.7 ± 2.8*
<i>A. solani</i>	49.2 ± 5.1*	57.1 ± 5.1*	60.9 ± 5.9*	66.4 ± 2.6*
<i>P. capsici</i>	54.8 ± 6.0*	75.9 ± 4.5*	76.0 ± 2.5*	86.2 ± 1.1*
<i>P. ultimum</i>	100.0 ± 2.0*	54.5 ± 0.0*	41.6 ± 3.3*	40.0 ± 0.0*
IA	16	16	16	16

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$). Se presenta el promedio de seis repeticiones.

6.6.3. *Fusarium* sp. (PBE9) vs microorganismos fitopatógenos

En la **Figura 9** se puede observar que a partir del día tres de interacción antagónica el endófito *Fusarium* sp. (PBE9), se mantiene una interacción tipo B frente a sus competidores, donde ambas especies crecen en contacto cesando su crecimiento, por lo tanto su **IA** es de cuatro, y se mantuvo a lo largo de todo el bioensayo.

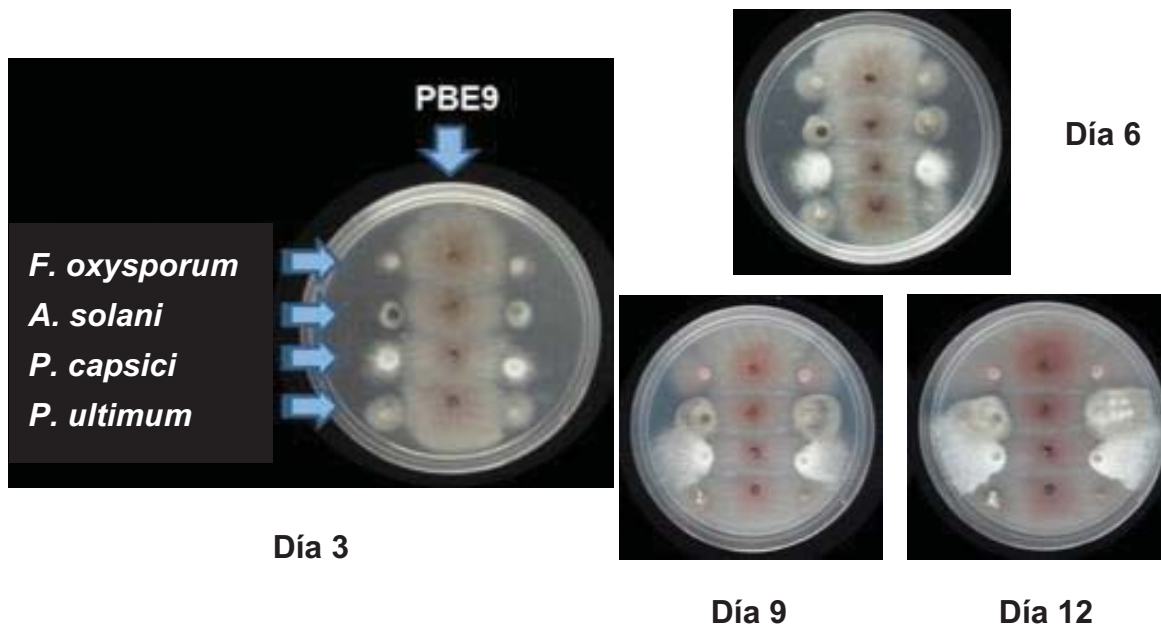


Figura 9. Antagonismo directo múltiple entre el endófito *Fusarium* sp. (PBE9) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.

Los fitopatógenos que resultaron más afectados por la presencia del endófito PBE9 al día 12 de interacción antagónica son *A. solani* y *P. capsici*, inhibiendo significativamente su crecimiento en un 62.5% y 43.6%, respectivamente, seguidos de *P. ultimum* (39.7%) y *F. oxysporum* (39.5%) (**Cuadro 17**).



Cuadro 17. Índice de antagonismo del hongo endófito *Fusarium* sp. (PBE9), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo *in vitro*.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	31.4 ± 2.0*	37.6 ± 0.6*	38.4 ± 2.2*	39.5 ± 1.9*
<i>A. solani</i>	44.4 ± 1.2*	46.3 ± 4.7*	47.4 ± 2.3*	62.5 ± 1.1*
<i>P. capsici</i>	31.9 ± 3.4*	39.5 ± 2.6*	39.9 ± 1.3*	43.6 ± 3.2*
<i>P. ultimum</i>	5.5 ± 0.2	13.2 ± 2.3	28.5 ± 1.8*	39.7 ± 1.2*
IA	4	4	4	4

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$). Se presenta el promedio de seis repeticiones.

6.6.4. *Xylaria* sp. (PBE11) vs microorganismos fitopatógenos

En la **Figura 10** se puede observar que a partir del día 3 y hasta el día 12 de interacción antagónica del hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) produce una interacción tipo E, es decir, una inhibición a distancia sobre el crecimiento de *A. solani* y *P. capsici* (**Cuadro 18**), la cual podría estar mediada por VOCs y/o por la difusión de metabolitos secundarios a través del sustrato (Harold et al. 2005; Harris y Boddy 2005; Heilmann Clausen y Boddy 2005). También se observó que a partir del día 6 se produce una interacción tipo D entre el endófito y el fitopatógeno *F. oxysporum*, en la cual el endófito crece sobre su competidor. Estas observaciones indican que posiblemente el endófito *Xylaria* sp. (PBE11) sea un micoparásito de *F. oxysporum*, y, en consecuencia, este microorganismo podría constituir un agente de control biológico sobre esta especie (Cao 2009). En el caso del oomiceto *P. ultimum* se presenta una interacción tipo B, donde ambas especies crecen en contacto cesando su crecimiento (**Cuadro 18**).

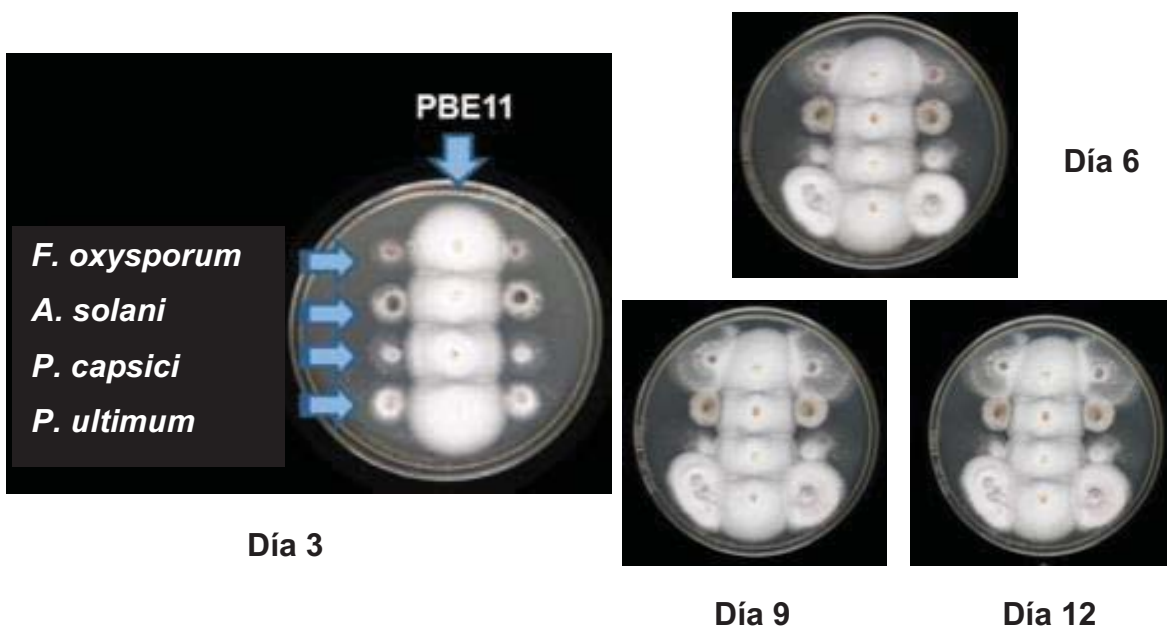


Figura 10. Antagonismo directo múltiple entre el endófito *Xylaria* sp. (PBE11) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En el **Cuadro 18** se aprecia que en general, los microorganismos fitopatógenos son inhibidos significativamente por la presencia del *Xylaria* sp. (PBE11), mostrando mayores porcentajes de inhibición al día 12 de interacción antagónica, siendo *A. solani* (61.4%) y *P. capsici* (60.1%) las especies más afectadas. El endófito *Xylaria* sp. (PBE11) muestra un **IA** de diez puntos al día tres de interacción y de 12 puntos y a partir del día 6 hasta el día 12.

Cuadro 18. Índice de antagonismo del hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo *in vitro*.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	26.6 ± 2.3*	44.0 ± 3.5*	51.2 ± 0.8*	51.2 ± 1.2*
<i>A. solani</i>	12.8 ± 1.0	56.2 ± 0.7*	61.4 ± 2.0*	61.4 ± 1.3*
<i>P. capsici</i>	42.1 ± 4.3*	58.8 ± 2.2*	59.5 ± 4.3*	60.0 ± 2.4*
<i>P. ultimum</i>	21.9 ± 1.5*	36.7 ± 1.9*	45.9 ± 3.2*	46.0 ± 2.1*
IA	10	12	12	12

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$). Se presenta el promedio de seis repeticiones.

6.6.5. *Acremonium* sp. (PBE12) vs microorganismos fitopatógenos

En la **Figura 11** se aprecia que el endófito *Acremonium* sp. (PBE12) y los hongos fitopatógenos *F. oxysporum*, *A. solani*, *P. capsici* y *P. ultimum* crecen hasta hacer contacto las hifas de su micelio, disminuyendo su crecimiento, desarrollando en consecuencia una interacción tipo B. (**Cuadro 19**). El **IA** del hongo *Acremonium* sp. (PBE12) es de siete puntos y este se mantiene durante los 12 días de interacción antagonónica.

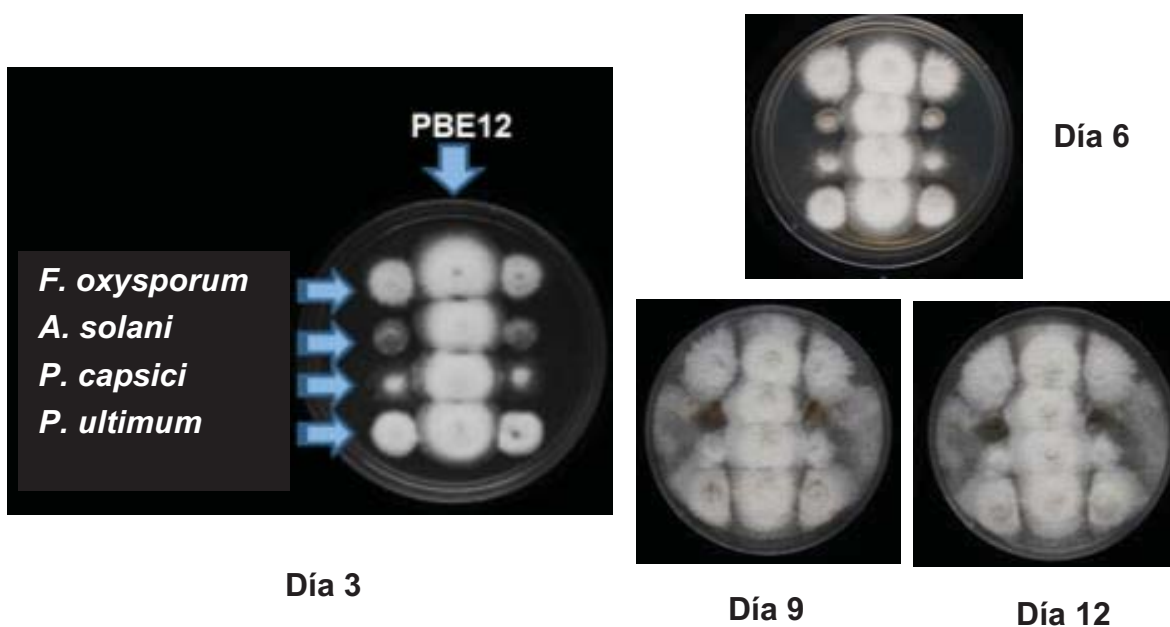


Figura 11. Antagonismo directo múltiple entre el endófito *Acremonium* sp. (PBE12) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagonónica.

En el **Cuadro 19** se muestran los porcentajes de inhibición provocados por el endófito *Acremonium* sp. (PBE12) sobre los microorganismos fitopatógenos de prueba. El hongo *A. solani* presenta el mayor porcentaje de inhibición sobre su crecimiento desde el día 6 de interacción antagonónica con un 46.5% el cual aumenta con respecto al tiempo de bioensayo en un 56.7% de inhibición a partir del día 12.



Cuadro 19. Índice de antagonismo del hongo endófito *Acremonium* sp. (PBE12), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo *in vitro*.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	3.9 ± 0.7	29.0 ± 1.3*	29.2 ± 1.0*	38.2 ± 1.1*
<i>A. solani</i>	31.4 ± 3.9*	46.5 ± 2.4*	51.1 ± 2.0*	56.7 ± 3.2*
<i>P. capsici</i>	25.1 ± 3.3*	32.8 ± 3.1*	34.6 ± 4.4*	41.4 ± 2.2*
<i>P. ultimum</i>	20.1 ± 2.8*	29.4 ± 2.4*	37.0 ± 2.9*	37.5 ± 1.3*
IA	7	7	7	7

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$). Se presenta el promedio de seis repeticiones.

6.6.6. PBE14 vs microorganismos fitopatógenos

En la **Figura 12** se muestra el bioensayo de antagonismo directo entre el endófito PBE14 y los fitopatógenos competidores. A lo largo de todo el bioensayo con excepción del fitopatógeno *A. solani* que es inhibido a distancia, con una interacción tipo E, las hifas de los fitopatógenos de prueba crecen en contacto con las del hongo PBE14 cesando su crecimiento (interacción tipo B) (**Cuadro 20**).

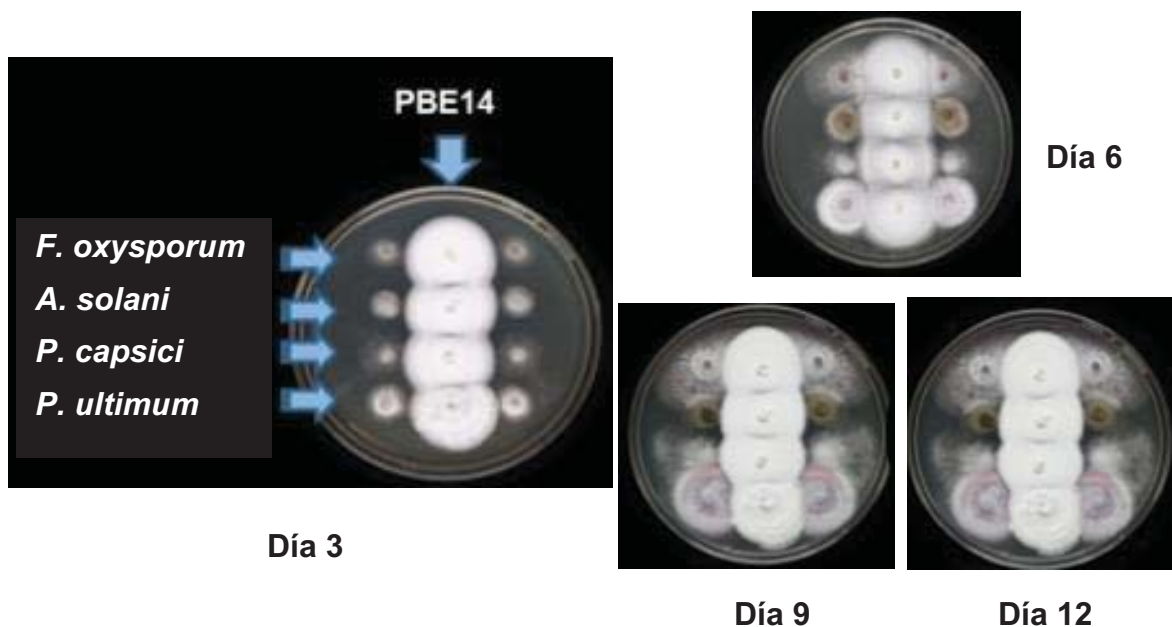


Figura 12. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE14 y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.

En el **Cuadro 20** se muestran los porcentajes de inhibición de los microorganismos competidores. En general, al día 12 de interacción el hongo PBE14 provoca porcentajes de inhibición significativos superiores al 50%. *A. solani* es la especie más afectada inhibiendo su crecimiento en un 78.4%. El **IA** del hongo endófito PBE14 es de siete y se mantiene durante todo el bioensayo.



Cuadro 20. Índice de antagonismo del hongo endófito PBE14, y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo *in vitro*.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	20.7 ± 1.1*	37.5 ± 3.5*	46.4 ± 2.7*	56.0 ± 2.1*
<i>A. solani</i>	29.7 ± 1.2*	65.9 ± 3.2*	72.4 ± 6.1*	78.4 ± 2.9*
<i>P. capsici</i>	39.4 ± 2.3*	43.7 ± 2.7*	54.0 ± 1.3*	54.0 ± 1.2*
<i>P. ultimum</i>	70.3 ± 3.5*	47.5 ± 3.4*	45.4 ± 2.9*	45.4 ± 2.8*
IA	7	7	7	7

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$). Se presenta el promedio de seis repeticiones.

6.6.7. PBE16 vs microorganismos fitopatógenos

En la **Figura 13** se observa que al día 3 de antagonismo los fitopatógenos de prueba son inhibidos a distancia, y que a partir del día 6 hasta el día 9 de interacción antagónica, el endófito PBE16 forma una barrera micelial, inhibiendo el crecimiento de todos sus competidores y estableciendo una interacción tipo C₁. (**Cuadro 21**). Con excepción de *A. solani* que a partir del día 9 de antagonismo muestra la presencia de pigmentos color café en la zona de interacción antagónica (interacción tipo C; **Cuadro 21**), la interacción tipo C₁ se mantiene durante todo el bioensayo. La formación de la barrera micelial indica que el hongo endófito PBE16 posee mecanismos de defensa físicos contra sus competidores fitopatógenos y, además, mecanismos de defensa químicos debidos a la producción de metabolitos secundarios volátiles o que difunden al medio de cultivo y que pueden ser los responsables de la inhibición a distancia que se observó al día 3 de interacción antagónica (Yuen et al. 1999).

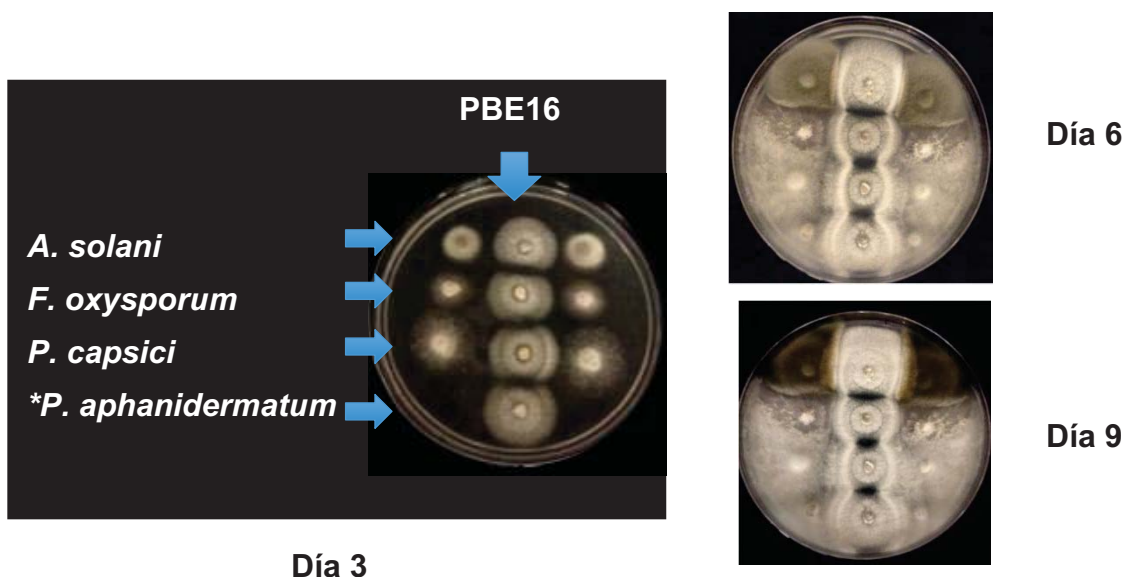


Figura 13. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE16 y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En el **Cuadro 21** se muestran los porcentajes de inhibición de los microorganismos competidores. En general, a partir del día 6 de interacción antagonica con el hongo PBE16 provoca valores de porcentajes de inhibición significativos y superiores al 30% sobre el crecimiento de tres de sus competidores. El oomiceto *P. aphanidermatum* es el más afectado inhibiendo su crecimiento en más del 45% manteniéndose a lo largo del bioensayo. El IA del endófito PBE16 fue de 12 al día 3, y de ocho en los días 6 y 9 de interacción antagonica.

Cuadro 21. Índice de antagonismo del hongo endófito PBE16, y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo *in vitro*.

Hongos fitopatógenos.	% Inhibición		
	Día 3	Día 6	Día 9
<i>A. solani</i>	9.7 ± 0.8	25.7 ± 2.3*	33.2 ± 1.3*
<i>F. oxysporum</i>	12.6 ± 1.1	36.3 ± 1.8*	37.2 ± 0.8*
<i>P. capsici</i>	2.4 ± 0.1	32.1 ± 0.9*	34.0 ± 2.9*
<i>P. aphanidermatum</i>	_____	45.5 ± 1.6*	49.2 ± 1.9*
IA	12	8	8

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$). Se presenta el promedio de seis repeticiones.

6.6.8. PBE19 vs microorganismos fitopatógenos

En la **Figura 14** se observa que a partir del día 6 de interacción antagónica, el endófito PBE19 forma una barrera micelial inhibiendo el crecimiento de todos sus competidores (interacción tipo C₁). La presencia de esta barrera micelial indica que el hongo endófito PBE19 también posee mecanismos de defensa físicos contra sus competidores (Yuen et al. 1999).

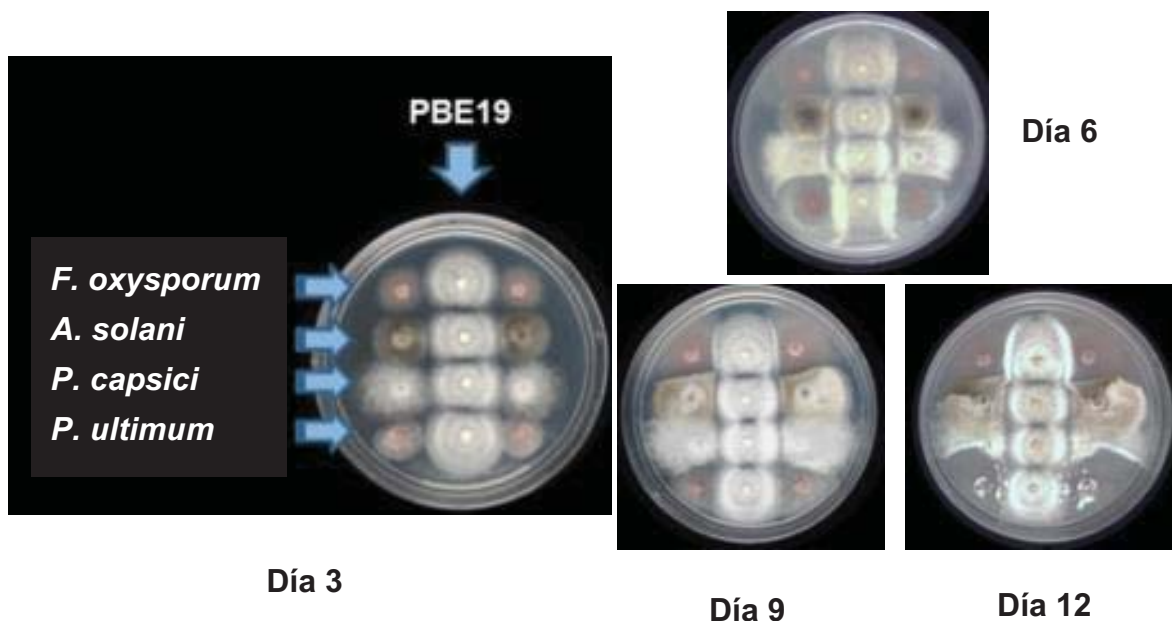


Figura 14. Antagonismo directo múltiple entre el endófito PBE19 y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica.

En el **Cuadro 22** se muestran los porcentajes de inhibición sobre los fitopatógenos de prueba, observándose en general, valores significativos próximos al 50%. Al día 12 de bioensayo *F. oxysporum* (54.1%) y *P. capsici* (61.1%) muestran los mayores porcentajes de inhibición. El **IA** del hongo PBE19 es de ocho y se mantiene durante todo el bioensayo.



Cuadro 22. Índice de antagonismo del hongo endófito PBE19, y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo *in vitro*.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición			
	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
<i>F. oxysporum</i>	14.9 ± 1.3	51.4 ± 5.0*	54.1 ± 6.8*	54.1 ± 6.8*
<i>A. solani</i>	24.7 ± 3.0*	42.8 ± 3.8*	51.8 ± 5.0*	51.8 ± 5.0*
<i>P. capsici</i>	45.1 ± 3.3*	59.4 ± 6.0*	61.7 ± 4.0*	61.7 ± 4.0*
<i>P. ultimum</i>	7.6 ± 0.7	41.0 ± 4.9*	45.6 ± 2.2*	45.6 ± 2.2*
IA	8	8	8	8

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$). Se presenta el promedio de seis repeticiones.

6.6.9. *Nodulisporium* sp. (PBE20) vs microorganismos fitopatógenos

En la **Figura 15** se observa que al día tres de interacción antagónica existe inhibición a distancia (interacción tipo E) entre el hongo endófito *Nodulisporium* sp. (PBE20) y los tres microorganismos de prueba incluidos en ese día (*A. solani*, *F. oxysporum* y *P. capsici*). Con excepción de la interacción establecida con el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*, donde se observó la formación de una barrera micelial desde el día 6 de bioensayo (interacción tipo C), se observó una interacción tipo D entre el endófito *Nodulisporium* sp. (PBE20) y los fitopatógenos de prueba; en la cual el endófito creció sobre sus competidores. Estas observaciones indican que posiblemente el endófito *Nodulisporium* sp. (PBE20) sea un micoparásito, y en consecuencia este microorganismo podría constituir un candidato para el desarrollo de un agente de control biológico sobre *A. solani*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum* (Chatterjee et al. 2016) (**Cuadro 23**).

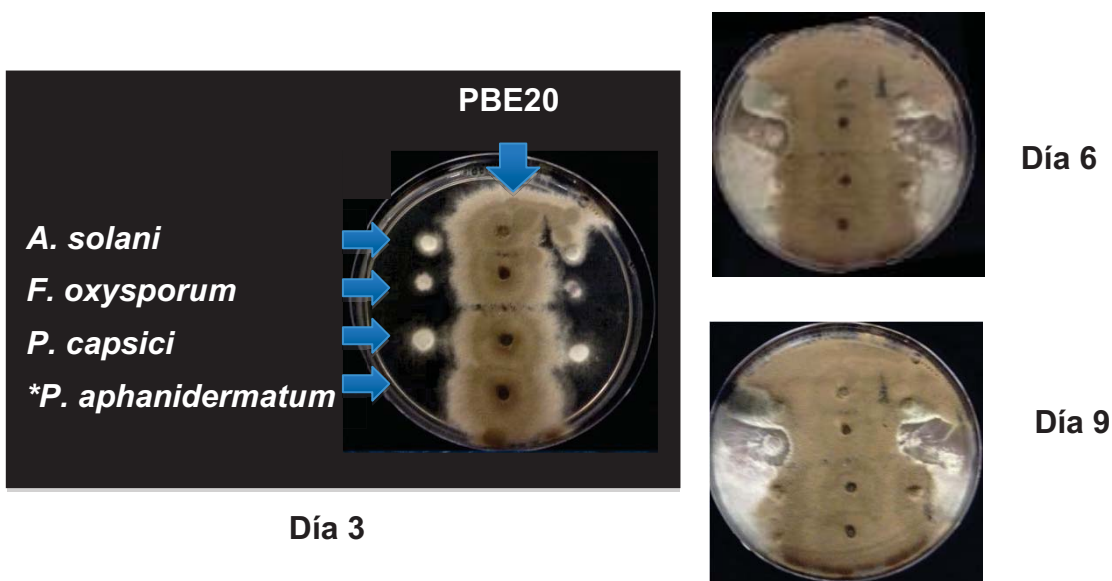


Figura 15. Antagonismo directo múltiple entre el endófito *Nodulisporium* sp. (PBE20) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica. * el microorganismo *P. aphanidermatum* fue incluido en el bioensayo a partir del día cinco de interacción antagónica

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En el **Cuadro 23** se muestran los porcentajes de inhibición de los microorganismos competidores. En general, al día nueve de interacción *Nodulisporium* sp. (PBE20) ocasiona porcentajes de inhibición significativos superiores al 90% sobre el crecimiento de *A. solani*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*. El hongo *F. oxysporum* muestra una inhibición del 68.2% desde el día 6 de antagonismo. El IA del endófito PBE20 es de 12 y se mantiene durante todo el bioensayo.

Cuadro 23. Índice de antagonismo del hongo endófito *Nodulisporium* sp. (PBE20), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo *in vitro*.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición		
	Día 3	Día 6	Día 9
<i>A. solani</i>	90.2 ± 0.9*	92.7 ± 0.7*	95.4 ± 0.0*
<i>F. oxysporum</i>	95.3 ± 1.0*	65.1 ± 1.2*	68.2 ± 0.9*
<i>P. capsici</i>	92.0 ± 1.7*	93.5 ± 2.3*	98.1 ± 2.1*
<i>P. aphanidermatum</i>	—	97.4 ± 0.9*	99.0 ± 1.2*
IA	12	12	12

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$). Se presenta el promedio de seis repeticiones.

6.6.10. *Aspergillus* sp. (PBE21) vs microorganismos fitopatógenos

En la **Figura 16** se observa que a partir del día tres de interacción antagónica el hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21) produce una inhibición a distancia tipo E sobre sus competidores (**Cuadro 24**), y que se mantiene a lo largo de todo el bioensayo. Esta inhibición podría ser generada por la presencia de metabolitos secundarios difundidos en el medio de cultivo o bien por compuestos orgánicos volátiles (VOCs), los cuales comprenden una amplia gama de compuestos químicos incluyendo alcoholes, aldehídos, cetonas, terpenos y compuestos aromáticos simples de los cuales muchos de ellos tienen propiedades antifúngicas, entre otras y están involucrados en las respuestas de defensa de diversos organismos (Stadler y Keller 2008; Cheng y Cheng 2015).

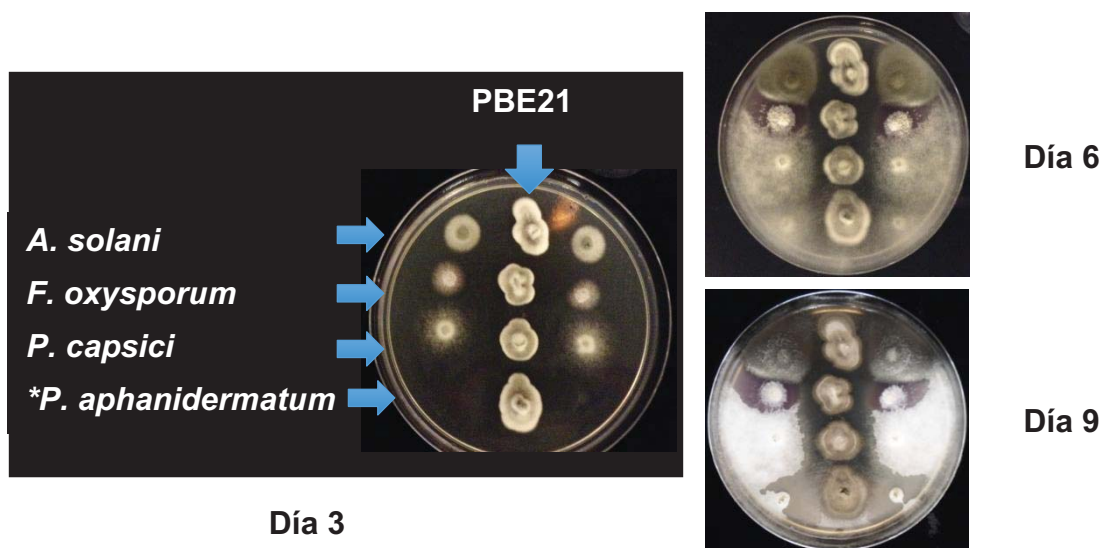


Figura 16. Antagonismo directo múltiple entre el endófito *Aspergillus* sp. (PBE21) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, a los 3, 6, 9 y 12 días de interacción antagónica. * el microorganismo *P. aphanidermatum* fue incluido en el bioensayo a partir del día cinco de interacción antagónica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



El hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21) generó una inhibición significativa sobre el crecimiento de los competidores desde el día seis de interacción antagonica, manteniéndose por arriba del 30 % a lo largo de la prueba. El **IA** es de 12 en el día 3 y 16 en los días 6 y 9 (**Cuadro 24**).

Cuadro 24. Índice de antagonismo del hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21), y porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, en bioensayo de antagonismo directo *in vitro*.

Hongos fitopatógenos	% Inhibición		
	Día 3	Día 6	Día 9
<i>A. solani</i>	20.2 ± 1.3*	31.2 ± 2.0*	32.9 ± 1.8*
<i>F. oxysporum</i>	19.5 ± 1.0*	36.2 ± 1.6*	35.8 ± 1.6*
<i>P. capsici</i>	19.7 ± 0.8*	35.9 ± 0.8*	36.0 ± 0.8*
<i>P. aphanidermatum</i>	_____	33.0 ± 1.3*	33.6 ± 2.5*
IA	12	16	16

IA. Índice de antagonismo,* Valores estadísticamente significativos, t-Student ($P < 0.05$). Se presenta el promedio de seis repeticiones.



En resumen, la mayoría de los hongos endófitos seleccionados para llevar a cabo los bioensayos de antagonismo múltiple directo *in vitro*, mostraron una inhibición a distancia sobre el crecimiento de sus competidores fitopatógenos, correspondiendo a una interacciones tipo E, siendo esta categoría la de mayor valor número (cuatro puntos) para el cálculo del IA. Asimismo, los endófitos *Xylaria* sp. (PBE11) y *Nodulisporium* sp. (PBE20) mostraron además, crecimiento sobre sus competidores, disminuyendo completamente su crecimiento (interacción tipo D) (Yuen et al. 1999) (**Cuadro 3**) con un valor numérico de tres. Por otra parte, las interacciones tipo B donde ambos microorganismos crecen en contacto y el crecimiento de ambas especies cesa, es otra de las categorías que se presentó con mayor frecuencia (valor de uno), así como, las interacciones tipo C₁ y C, en donde se observó la formación de barreras miceliares por parte de los hongos endófitos o la presencia de pigmentos en la zona de antagonismo, respectivamente. Ambas interacciones aportando un con un valor de dos puntos en el cálculo del IA.

Con base en los resultados obtenidos hasta este punto, fue posible agrupar a los 10 hongos endófitos antagonizados en dos grupos, dependiendo de los tipos de interacción antagónica exhibidos (**Cuadro 25**). Cabe destacar que estas observaciones permiten seleccionar a los candidatos idóneos para el desarrollo de posibles agentes de control biológico. Considerando que dentro de los agentes de control biológico se encuentran aquellos organismos que pueden inhibir el crecimiento de otros organismos a distancia, mediado por la producción de metabolitos secundarios volátiles o no volátiles o por parasitismo matando a su competidor (Elad et al. 1982; Chet y Inbar 1994), las interacciones más importantes para este fin corresponden a las categorías E, D y C₁ (**Cuadro 25**).

Cuadro 25. Clasificación de hongos endófitos aislados de *Haematoxylon brasiletto*, de acuerdo a su tipo de interacción antagonica contra los fitopatógenos de prueba.

GRUPO 1 Potencial antagonico a distancia y/o micoparasitismo			GRUPO 2 Potencial antagonico por contacto de micelio y/o formación de barreras miceliales		
Hongos endófitos	Tipo de interacción antagonica predominante	Índice de antagonismo promedio	Hongos endófitos	Tipo de interacción antagonica predominante	Índice de antagonismo promedio
PBE2	E, B	10,6	PBE9	B	4
PBE8	E	16	PBE12	B	7
PBE11	E,D,B	10,12	PBE16	C ₁ , C	12,8
PBE14	E, B,	7	PBE19	C	8
PBE20	E, D, C	12,11			
PBE21	E,B	12,14			

A partir de esta clasificación se eligieron los endófitos *Xylaria* sp. (PBE11), PBE16, *Nodulisporium* sp. (PBE20) y *Aspergillus* sp. (PBE21), los cuales mostraron el mayor índice de antagonismo, y por lo menos dos tipos de interacción antagonica en las pruebas de antagonismo directo múltiple, para iniciar la evaluación del potencial biológico mediante bioensayos de antagonismo en caja de Petri dividida con la finalidad de profundizar en el estudio de su potencial como agentes de control biológico.





6.7. Evaluación del potencial biológico de hongos endófitos selectos de *Haematoxylon brasiletto*, mediante bioensayos en caja de Petri dividida.

Con la finalidad de establecer si el potencial antagonico de los hongos endófitos *Xylaria* sp. (PBE11), PBE16, *Nodulisporium* sp. (PBE20), *Aspergillus* sp. (PBE21) está mediado por la producción VOCs bioactivos, se realizaron pruebas de actividad antifúngica, antioomicetos y fitotóxicas, empleando cajas de Petri divididas. En uno de los compartimentos de estas placas se colocó el inóculo del microorganismo endófito en estudio, y en el otro, el inóculo de uno de los microorganismos fitopatógenos *A. solani*, *F. oxysporum*, *P. capsici* o *P. aphanidermatum* o 30 semillas de *A. hypochondriacus* o de *S. lycopersicum*. Estas evaluaciones se desarrollaron en cuatro periodos diferentes del desarrollo de los hongos endófitos en estudio (1, 3, 5 y 10 días), con cuatro replicas por día de crecimiento. Los porcentajes de inhibición provocados por los VOCs producidos por los hongos endófitos sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos, la germinación y el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba se estableció comparando el crecimiento del tratamiento con respecto al de sus respectivos controles.

En general, los VOCs producidos por los cuatro aislamientos de hongos endófitos en estudio producen un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de la raíz de las dos plantas de prueba, a partir del día 5 de crecimiento, y alcanzando el mayor efecto al día 10 de cultivo. Los endófitos *Xylaria* sp. (PBE11) y *Aspergillus* sp. (PBE21) (**Figura 17**) fueron los más activos contra ambas semillas de prueba, siendo *S. lycopersicum* la más sensible. Ninguno de los hongos endófitos evaluados causó inhibición significativa sobre la germinación y la respiración en el proceso de germinación de las semillas de prueba.

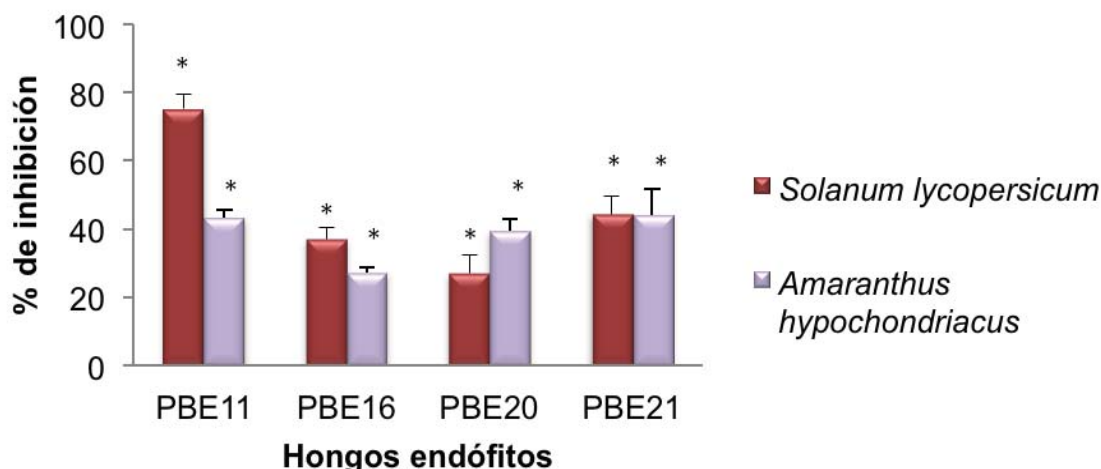


Figura 17. Potencial fitotóxico de los VOCs producidos por hongos endófitos antagonistas de *Haematoxylon brasiletto* al día diez de crecimiento, sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *S. lycopersicum* y *A. hypochondriacus*. * Estadísticamente significativo.

En el **Cuadro 26** se indica el efecto inhibitorio de los VOCs producidos por el hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *S. lycopersicum*. A partir del día uno de crecimiento se observa un efecto fitotóxico significativo alcanzando al día diez un 75% de inhibición. Por otra parte, las semillas de *A. hypochondriacus* fueron inhibidas en un 43% al día diez de crecimiento.

Con relación al potencial antifúngico y antioomiceto de los hongos endófitos en estudio, no se observó ningún efecto sobre el crecimiento de los microorganismos competidores en los días de crecimiento evaluados. Estos resultados permiten proponer que el efecto inhibitorio observado en los bioensayos de antagonismo múltiple *in vitro* puede ser generado debido a un efecto sinérgico entre los compuestos orgánicos volátiles y los metabolitos secundarios bioactivos producidos por los hongos endófitos y se difunden al medio de cultivo (Fu-kang et al. 2010; Di Francesco et al. 2015).



Cuadro 26. Potencial fitotóxico de los VOC's producidos por hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* a los días 1, 3, 5 y 10 de crecimiento, sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*.

Plantas de prueba	Tiempo de crecimiento	Hongos endófito			
		PBE11	PBE16	PBE20	PBE21
% de Inhibición del crecimiento de la raíz					
<i>A. hypochondriacus</i>	1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.01	9.5 ± 6.1
	5	6.9 ± 4.7	0.0 ± 0.0	11.9 ± 0.7	26.9 ± 4.7*
	10	43.2 ± 2.4*	27.3 ± 1.5*	39.4 ± 3.5*	44.1 ± 7.5*
<i>S. lycopersicum</i>	1	42.0 ± 2.1*	0.0 ± 0.0	11.0 ± 1.3	4.3 ± 7.0
	3	55.5 ± 3.1*	0.0 ± 0.0	12.5 ± 2.1	23.4 ± 6.3*
	5	60.2 ± 4.0*	16.9 ± 4.7 *	26.9 ± 4.3 *	34.6 ± 10.3*
	10	75.1 ± 4.5*	37.1 ± 3.7*	27.1 ± 5.5*	44.5 ± 5.4 *

*Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA (P < 0.05).

Los resultados derivados de estos bioensayos permitieron evidenciar la producción de VOCs con potencial fitotóxico producidos por los hongos endófitos *Xylaria* sp. (PBE11), PBE16, *Nodulisporium* sp. (PBE20), *Aspergillus* sp. (PBE21), los cuales incrementa su actividad biológica con respecto al día de crecimiento de los microorganismos. Estos endófitos, y en especial el hongo *Xylaria* sp. (PBE11) constituyen candidatos de estudio como posibles agentes de control biológico. En consecuencia, estos endófitos fueron seleccionados para continuar su evaluación biológica e identificación de la composición química de los VOCs a diferentes tiempos de crecimiento.



6.8. Identificación de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y su efecto fitotóxico, antifúngico y antiomiceto.

La composición química de los VOCs bioactivos producidos por los hongos endófitos antagonistas PBE16, *Nodulisporium* sp. (PBE20) y *Xylaria* sp. (PBE11), se realizó mediante la técnica de micro extracción en fase sólida (SMPE) acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-SM). Para ello cada microorganismo se cultivó en viales para SMPE de 40 mL por triplicado, durante diez días. En el caso particular del hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11), y considerando que es uno de los microorganismos más activo en los bioensayos de antagonismo múltiple directo y en caja de Petri divididas, se analizó de manera paralela la composición química de los VOCs en los diferentes días de desarrollo, del microorganismo.

6.8.1. Composición química de los VOCs producidos por el hongo endófito PBE16

El hongo endófito PBE16, cultivado durante 10 días, produjo una mezcla de 13 metabolitos secundarios volátiles (**Cuadro 27**). El sesquiterpeno tujopseno y el 3-metil-1-butanol fueron los compuestos más abundantes con un 27.0 y 21.6%, respectivamente

El tujopseno ha sido identificado como un compuesto mayoritario de los VOCs producidos por el hongo endófitos *Muscodor sutura*, aislado de *Prestonia trifidi* (Apocynaceae). Estos compuestos presentaron actividad antifúngica y antiomiceto contra *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinérea*, *Colletotrichum lagenarium*, *Ceratocystis ulmi*, *Cercospora beticola*, *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma viridae*, *Verticillium dahliae*, *Mycosphaella fijiensis*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora palmivora* y *Pythium ultimum* (Kudalkar et al. 2012), además de que el tujopseno se encontró como componente de la mezcla de VOCs del extracto orgánico de *Callitropsis nootkatensis* (Cupressaceae) con actividad antifúngica contra *Phytophthora ramorum* (Manter et al. 2007).



Por otra parte el compuesto 3-metil-1-butanol se ha encontrado también como componente de la mezcla de VOCs producidos por el hongo endófito *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34 aislado de *Lagerstroemia loudoni* (Lythraceae), y tiene actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos *Penicillium expansum* y *Penicillium digitatum* (Suwannarach et al. 2013). Del hongo endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a aislado de *Gliricidia sepium* (Fabaceae), se ha obtenido también este producto con potencial antifúngico contra oomicetos y hongos fitopatógenos *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium polytylum*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani* (Sánchez Fernández et al. 2016).

Cuadro 27 VOCs identificados en el hongo endófito PBE16 cultivado durante 10 días.

Pico	Nombre	IR	Área Total (%) 10 días	PM	Formula Molecular
1	Tujopseno	1447.5	27.00	204	C ₁₅ H ₂₄
2	12-metil-1,5,9,11-tridecatetraeno	1461.7	3.06	190	C ₁₄ H ₂₂
3	1,8-dimetil-4-(1-metiletetil)-espiro[4.5]dec-7-eno	1476.9	8.03	204	C ₁₅ H ₂₄
4	3,7,7-trimetil-11-metileno-espiro[5.5]undec-2-eno	1495.6	6.10	204	C ₁₅ H ₂₄
5	1,5,5,9-tetrametil-espiro[5.5]undeca-1,8-dieno	1520.7	9.64	204	C ₁₅ H ₂₄
6	1-metil-4-(1,2,2-trimetilciclopentil)-benceno	1524.9	9.64	202	C ₁₅ H ₂₂
7	3-metil-1-butanol	760.81	21.62	88	C ₅ H ₁₂ O
8	3,5-dimetil-1-hexeno	776.2	1.09	112	C ₈ H ₁₆
9	5-metil-1-hexeno	1164.7	1.83	98	C ₇ H ₁₄
10	acetato de isobornilo	1300.5	4.30	196	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
11	di- <i>epi</i> - α -cedreno	1412	5.23	204	C ₁₅ H ₂₄
12	1,7,7-trimetil-biciclo[2.2.1]heptano-2,5-diol	1425.3	2.41	170	C ₁₀ H ₁₈ O ₂

IR; índices de Kovats calculados a partir de los datos de tiempo de retención en una columna capilar DB-5MS, *estándares auténticos adquiridos de Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$ de pureza). Los compuestos encontrados en el control de PDA no fueron incluidos.





6.8.2. Composición química de los VOCs producidos por el hongo endófito *Nodulisporium* sp. (PBE20)

El hongo endófito antagónico *Nodulisporium* sp. (PBE20) cultivado en medio PDA durante 10 días, generó una mezcla de 43 VOCs. El monoterpeno α -terpineol (13.26%), el 1-metil-5-(1-metiletenil)-ciclohexeno (11.66%), el 1-metil-3-(1-metiletil)-benceno con 11.38% y el 1-etil-2,4-dimetil-benceno (10.30%), fueron los compuestos más abundantes en la fibra de extracción (**Cuadro 28**).

De acuerdo con la literatura científica solo el α -terpineol se ha reportado como componente mayoritario del aceite esencial de *Syzygium cumini* (Myrtaceae), y tiene actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Choanephora cucurbitarum* (Saroj et al. 2015). De igual forma este compuesto se a reportado como parte del aceite esencial de *Achillea gypsicola* Hub-Mor., *Achillea biebersteinii* Afan, con actividad antifúngica contra *Fusarium equiseti* y *F. graminearum* y actividad fitotóxica sobre el crecimiento de la raíz y la germinación de *Amaranthus retroflexus* L., *Chenopodium album* L., *Lactuca serriola* L. (Kordali et al. 2009). Finalmente se ha encontrado como componente de la mezcla de VOCs producidos por el hongo endófito *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34 aislado de *Lagerstroemia loudoni* (Lythraceae), con potencial antifúngico contra hongos fitopatógenos *Alternaria porri*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium solani*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* (Suwannarach et al. 2013).

Cuadro 28. VOCs identificados en el hongo endófito *Nodulisporium* sp. (PBE20) cultivado durante 10 días.

Pico	Nombre	^a IR	Área Total (%) 10 días	PM	Fórmula Molecular
1	Careno	1073.2	1.41	136	C ₁₀ H ₁₆
2	1-metil-4-(1-metiletil)-1,4-ciclohexadieno	1073.1	1.52	136	C ₁₀ H ₁₆
3	α-terpineol	1053.8	13.26	154	C ₁₀ H ₁₈ O
4	3,4-dimetoxifenol	1052.7	9.35	154	C ₈ H ₁₀ O ₃
5	1-metil-5-(1-metiletenil)-ciclohexeno	1050.6	11.66	136	C ₁₀ H ₁₆
6	1-metil-3-(1-metiletil)-benceno	1049.1	11.38	134	C ₁₀ H ₁₄
7	1-etil-2,4-dimetil-benceno	1047.3	10.30	134	C ₁₀ H ₁₄
8	1,5-dimethyl-1,4-ciclohexadieno	1009.6	1.91	108	C ₈ H ₁₂
9	α-felandreno	1009.2	1.05	136	C ₁₀ H ₁₆
10	2,6-nonadien-1-ol	996.16	4.07	140	C ₉ H ₁₆ O
11	6,6-dimetil-2-metilen-biciclo[3.1.1]heptano	995.15	3.85	136	C ₁₀ H ₁₆
12	α-mirceno	995.05	3.92	136	C ₁₀ H ₁₆
13	fenilsulfinilhidrazina	777.18	3.11	154	C ₆ H ₆ N ₂ O ₅
14	1-pentanol	774.51	1.36	88	C ₅ H ₁₂ O
15	4-t-butil-2-(1-metil-2-nitroetil)ciclohexanona	1548.7	1.22	241	C ₁₃ H ₂₃ NO ₃
16	1-metoxi-4-(4-propilciclohexil)-benceno	1518.5	4.81	232	C ₁₆ H ₂₄ O
17	<i>epi</i> -α-santalol	1515.4	4.69	220	C ₁₅ H ₂₄ O
18	4-metilen-2,8,8-trimetil-2-vinil-biciclo[5.2.0]nonano	1515.1	4.29	204	C ₁₅ H ₂₄
19	2-metilen-5-(1-metilvinil)-8-metil-biciclo[5.3.0]decano	1504.8	1.75	204	C ₁₅ H ₂₄
	^b Desconocidos		5.09		

IR; índices de Kovats calculados a partir de los datos de tiempo de retención en una columna capilar DB-5MS. *estándares auténticos adquiridos de Sigma-Aldrich (≥98% de pureza). Los compuestos encontrados en el control de PDA no fueron incluidos





6.9. Identificación taxonómica de los hongos endófitos *Xylaria* sp. (PBE11)

La identificación del hongo endófito PBE11(PB3f3) [Figura 18] se realizó mediante el análisis de su taxonomía polifásica, sus características macro y micromorfológicas, y el análisis de la secuencia de pares de bases de la región ITS1-5.8S-ITS2 (Chacko 1981; Rogers 1985; Callan 1993).

La colonia del hongo endófito PB3f3 sobre medio PDA a 28°C, presentó un crecimiento lento (Dugan 2006). EL cual cubre la superficie de la caja Petri de 9 cm en tres semanas, mostrando una tasa de crecimiento de 1.75 cm²/día. El micelio es plano, denso y forma anillos concéntricos con bordes regulares, al inicio es de color blanco (clave M4A1) (Kornerup y Wanscher 1978) y de textura aterciopelada. Con el paso del tiempo se observa un exudado hialino. Y el reverso de la colonia es de color crema (clave M4A4) (Kornerup y Wanscher 1978), y al paso de 2 meses de incubación se torna color rojizo en el centro (clave M7E7) (Kornerup y Wanscher 1978) [Figura 18]. No se observaron estromas, conidios o ascosporas.

Por otra parte, la comparación de las secuencias de ITS1-5.8-ITS2 con las disponibles en la base de datos del GenBank, mostró una similitud con varias especies de *Xylaria*; la secuencia con mayor porcentaje similitud (97% de cobertura) corresponde a a la especie *Xylaria* sp. TPO41010 (No. de acceso en el GenBank AB524023). Este aislamiento fue obtenido, de material vegetal en descomposición y colectado en Phayao, Tailandia (Osono 2011). La siguiente secuencia con mayor similitud (94% de cobertura, No. de acceso en el GenBank JQ623492) corresponde a la especie *Xylaria* sp. G30 un hongo aislado de *Garcinia hombroniana* cuya especie tampoco ha sido identificada (Bouthongo et al., 2012 inédito) **Cuadro 29** En la **Figura 19** se presenta el análisis neighbor-joining de las secuencias ITS1-5.5S-ITS2 depositadas en el GenBank con identidad >95%, y el aislamiento PBE11 (PB3f3).

Con base en los resultados obtenidos el aislamiento PBE11, fue identificado como *Xylaria* sp. aislamiento (PB3f3) con numero de acceso en el GenBank de KP400260.

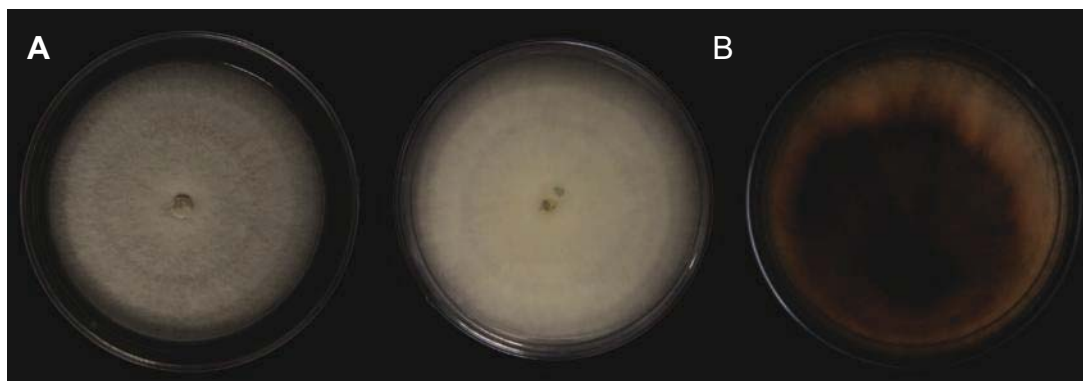


Figura 18. Hongo endófito *Xylaria* sp. PBE11(PB3f3) cultivado en medio papa destroxa agar (PDA) incubada a 28°C con fotoperiodo luz-obscuridad 12-12 h. A-B Anverso y Reverso de la colonia después de tres semanas de crecimineto. C. Reverso de la colonia despues de 12 semanas de crecimineto. Se observa una pigmentacion rojiza.

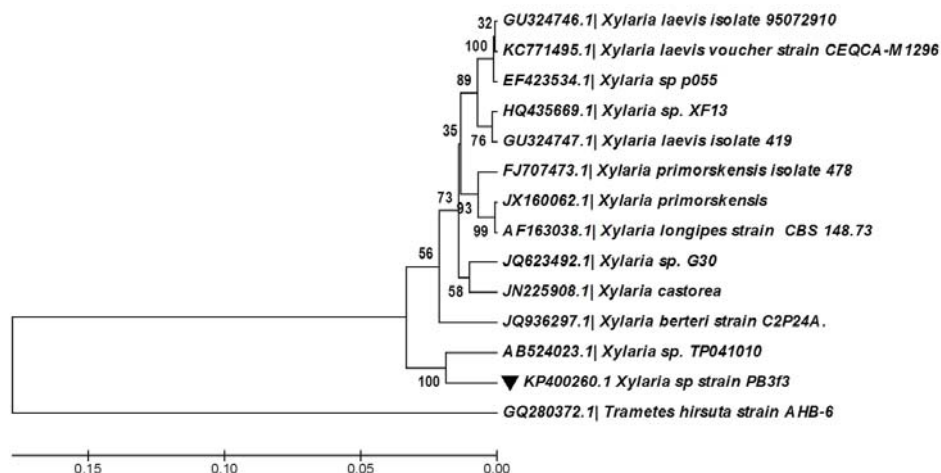


Figura 19. Análisis Neighbor-Joining de las secuencias de GenBank con identidad más alta (>95%) con la secuencia del ITS1-5.8S-ITS2, del aislamiento PBE11 (PB3f3).



Cuadro 29. Comparación de las secuencia de ITS1-5.8-ITS2 de *Xylaria* sp. PB3f3 y las disponibles en la base de datos del GenBank.

Número de acceso	Especies cercanas	Similitud %
KP400260	<i>Xylaria</i> sp. PB3f3	
AB54023	<i>Xylaria</i> sp. TP0401010	97
JQ623492	<i>Xylaria</i> sp. G30	94
EF423534	<i>Xylaria</i> sp. PO55	94
JX160062	<i>Xylaria primoskensis</i>	94
H435669	<i>Xylaria</i> sp. XF13	94
GU324747	<i>Xylaria laevis</i> 95072910	94
GU324746	<i>Xylaria laevis</i> 419	94
AF163030	<i>Xylaria longipes</i> CBS 148.73	94
FJ707473	<i>Xylaria primorskensis</i> 478	93
JN225908	<i>Xylaria castorea</i>	93
JQ936297	<i>Xylaria berteri</i> C2P24a	93
KC771495	<i>Xylaria laevis</i> CEQCA-M1296	92



6.10. *Potencial antifúngico, antioomiceto y fitotóxico del hongo endófito Xylaria sp. (PBE11) aislado de Haematoxylon brasiletto*

6.10.1. Bioensayos de antagonismo directo múltiple

Como primera etapa se evaluó el potencial antimicrobiano de los metabolitos secundarios producidos por el hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) identificado inicialmente como aislamiento PB3f3, y que a partir de esta sección se denominará como *Xylaria* sp. (PBE11) mediante bioensayos de antagonismo directo múltiple *in vitro* sobre cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura: *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. capsici* y *P. aphanidermatum*. En esta determinación, y con el fin de establecer el efecto de los VOCs, aunado al posible efecto antifúngico y antioomiceto de los metabolitos secundarios no volátiles, en el bioensayo antagonismo múltiple, los fitopatógenos competidores se inocularon en la orilla de una caja de Petri de 15 cm diámetro (**Figura 4 B** sección experimental).

En la **Figura 20** se puede observar que el hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) provocó un efecto inhibitorio significativo a distancia (interacción tipo E, **Cuadro 25**), sobre el crecimiento radial de los fitopatógenos *F. oxysporum* (24%), *A. alternata* (24%), *P. capsici* (48%) y *P. aphanidermatum* (78%), a los tres y seis días de interacción antagónica múltiple. Este efecto inhibitorio se mantuvo hasta el último día de registro y que corresponde al día 40 de interacción antagónica. Sin embargo, a causa del rápido crecimiento de los microorganismos fitopatógenos en los cultivos control, fue imposible medir el diámetro de las colonias en los siguientes días de interacción antagónica, en especial el diámetro de *P. aphanidermatum*, motivo por el cual solo se reportan los porcentajes de inhibición a los 3 y 6 días.

Los resultados derivados de este bioensayo demuestran que la presencia de diferentes competidores estimula la producción de VOCs, los cuales pueden ser químicamente diferentes o encontrarse en mayor proporción (Sanchez-Fernandez et al. 2016).

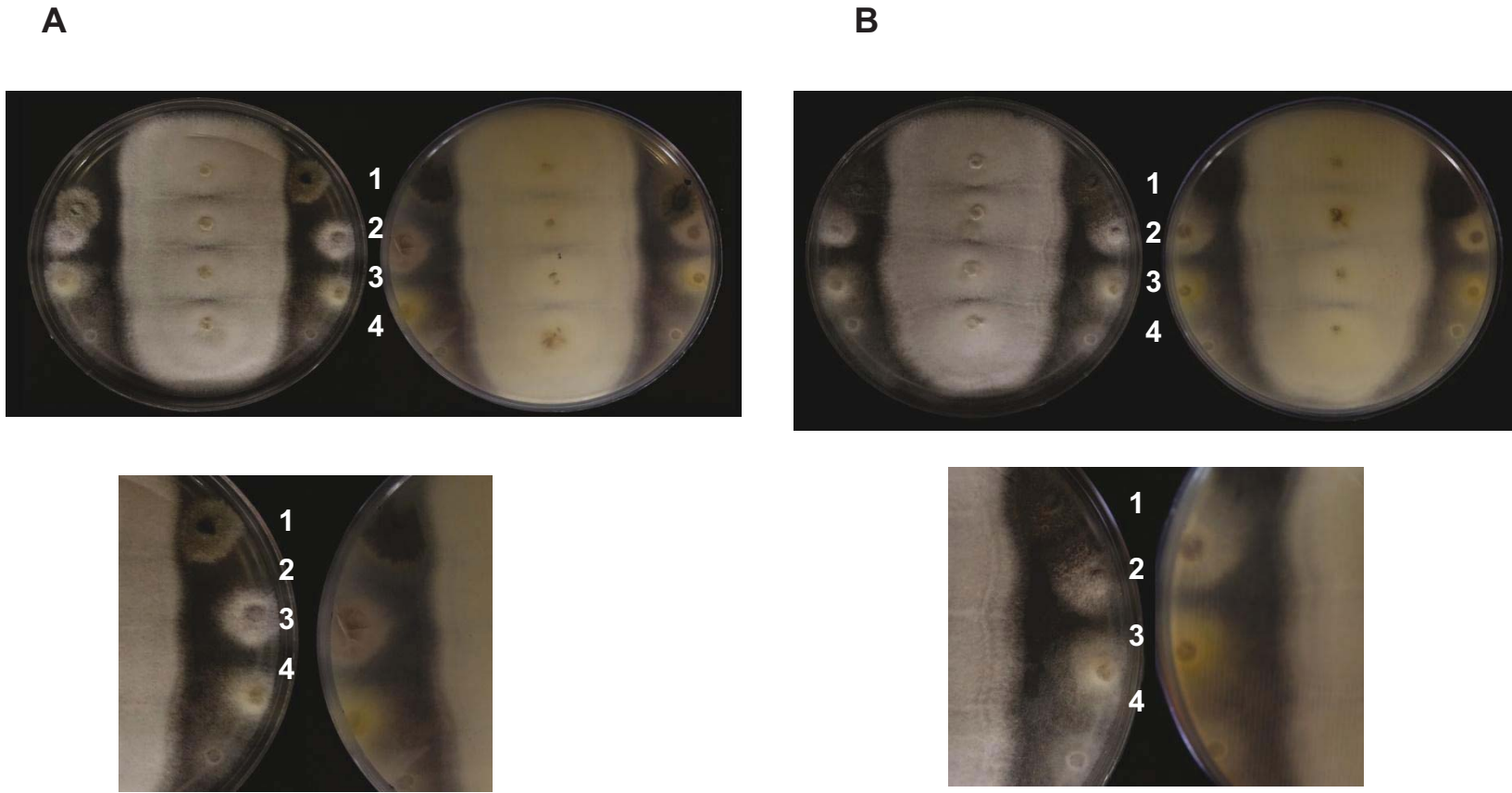


Figura 20. Bioensayos de antagonismo directo múltiple entre el hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura. 1) *A. solani*, 2) *F. oxysporum*, 3) *P. capsici* y 4) *P. aphanidermatum*. A, después de tre días de interacción antagónica, y B después de 6 días de interacción.



6.10.2. Bioensayos de antagonismo directo simple

Con la finalidad de evaluar el efecto aleloquímico de los VOCs sobre de crecimiento de los fitopatógenos de prueba en presencia de un solo competidor, se realizaron bioensayos de antagonismo directo simple, colocando un inóculo del hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) en un extremo de una caja de Petri, y después de que el endófito medía 3 cm de diámetro (cinco días de cultivo), se colocaron en el otro extremo y en la orilla de la caja, tres inóculos de cada microorganismo competidor.

En la **Figura 21** se observa que desde el día tres de interacciona antagónica *Xylaria* sp. (PBE11) produjo un efecto inhibitorio significativo superior al 90% sobre el crecimiento de todos sus competidores fitopatógenos (interacción tipo E). Al día 20 de interacción antagónica, el endófito *Xylaria* sp. (PBE11) mantienen la inhibición a distancia sobre los hongos *F. oxysporum* y *A. solani*. En el caso del oomiceto *P. aphanidermatum*, *Xylaria* sp. (PBE11) creció encima de su micelio (interacción tipo D), mientras que la interacción con *P. capsici*, el endófito creció hasta hacer contacto con las hifas (interacción tipo B).

Por otra parte, se evaluó la recuperación de los microorganismo fitopatógenos a los 20 días de interacción antagónica, mediante la transferencia de un inóculo de 5 mm de diámetro de la zona de interacción con *Xylaria* sp. (PBE11), a una nueva caja de Petri con medio PDA. Después de cinco días de cultivo se observó que *Xylaria* sp. (PBE11) inhibe completamente el crecimiento de *A. solani* y *P. aphanidermatum*, mientras que sobre *F. oxysporum* y *P. capsici*, ejerce un efecto fungistático

En conjunto, los resultados derivados de los bioensayos de antagonismo simple y múltiple, confirmaron que *Xylaria* sp. (PBE11) produce metabolitos secundarios bioactivos que lo hacen un candidato idóneo para el desarrollo de posibles agentes para el control biológico.

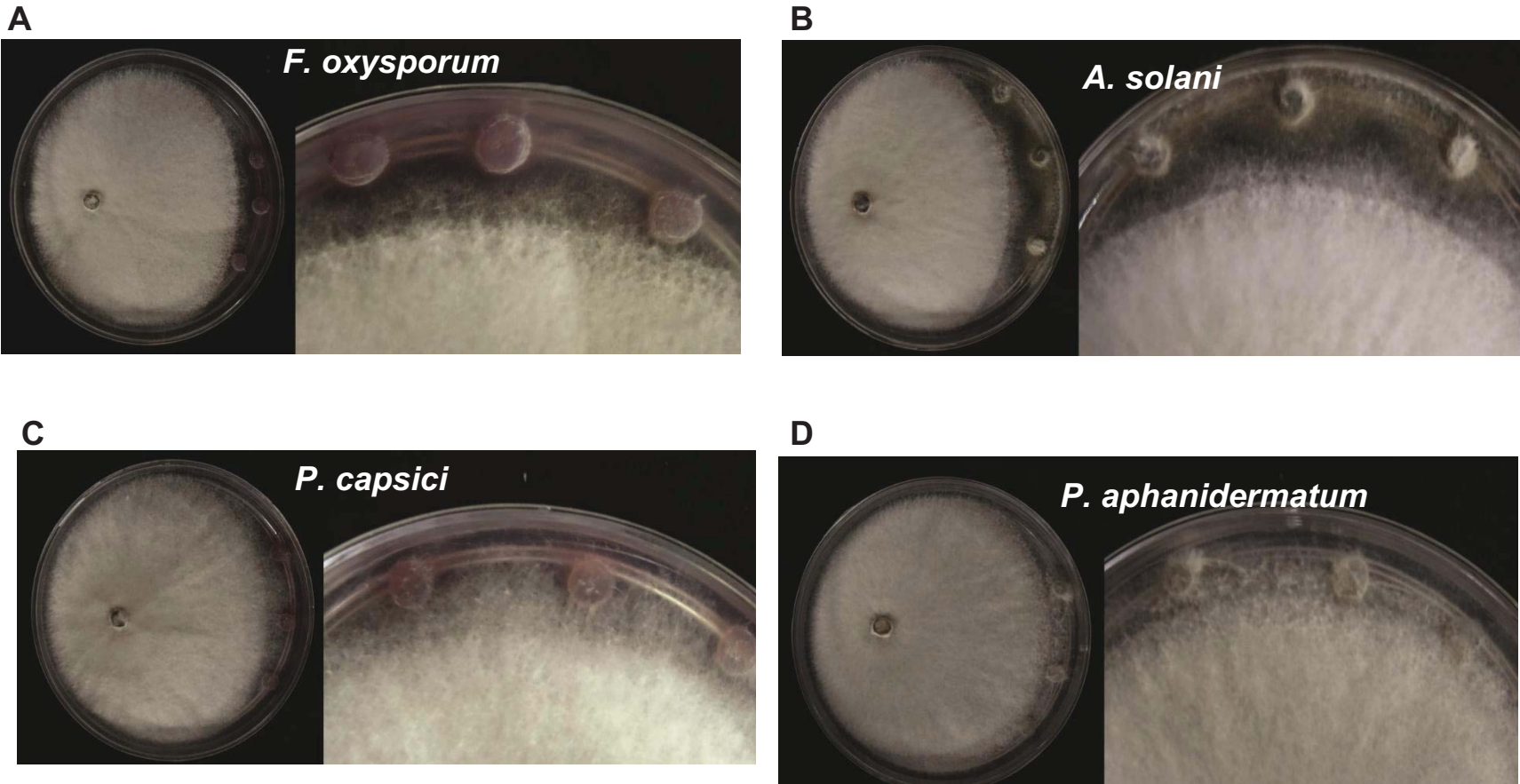


Figura 21. Bioensayos de antagonismo directo simple, entre el hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura. Observaciones a los seis días de interacción antagónica.



6.10.3. Bioensayos de antagonismo directo simple en caja dividida

Los bioensayos de antagonismo directo simple en caja dividida se llevaron a cabo con la finalidad de establecer si los VOCs producidos por el hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) poseen actividad fitotóxica, y además para comprobar la actividad antimicrobiana observada. Los bioensayos se efectuaron a los 1, 3, 5, 10, 20, 30 y 40 días de cultivo del endófito.

Con respecto a la actividad antifúngica y antioomiceto, se observó de nueva cuenta que los VOCs no inhiben el crecimiento de ninguno de los microorganismos fitopatógenos de prueba, mostrando porcentajes de inhibición entre el 5% y 10%.

Por otro lado, los VOCs producidos por *Xylaria* sp. (PBE11) no muestran efecto fitotóxico significativo a los 1, 3 y 5 días de crecimiento del endófito (datos no mostrados). Sin embargo, si se observó inhibición significativa sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*, de manera dependiente de los días de cultivo del hongo a partir del día 10 de crecimiento (**Figura 22**). Las semillas de *A. hypochondriacus* fueron inhibidas en un 27% al día 30 de cultivo, mientras que el crecimiento de la raíz de *S. lycopersicum* a los 20 días de cultivo, fue inhibida en un 53%. Al día 40 de crecimiento, los VOCs generados por *Xylaria* sp. (PBE11) no inhibieron significativamente el crecimiento de las plantas de prueba. Con relación a la germinación y la respiración durante el proceso germinación los VOCs producidos en los diferentes días de bioensayo, no se observaron cambios significativos en ninguno de los dos procesos fisiológicos (**Figura 23**).

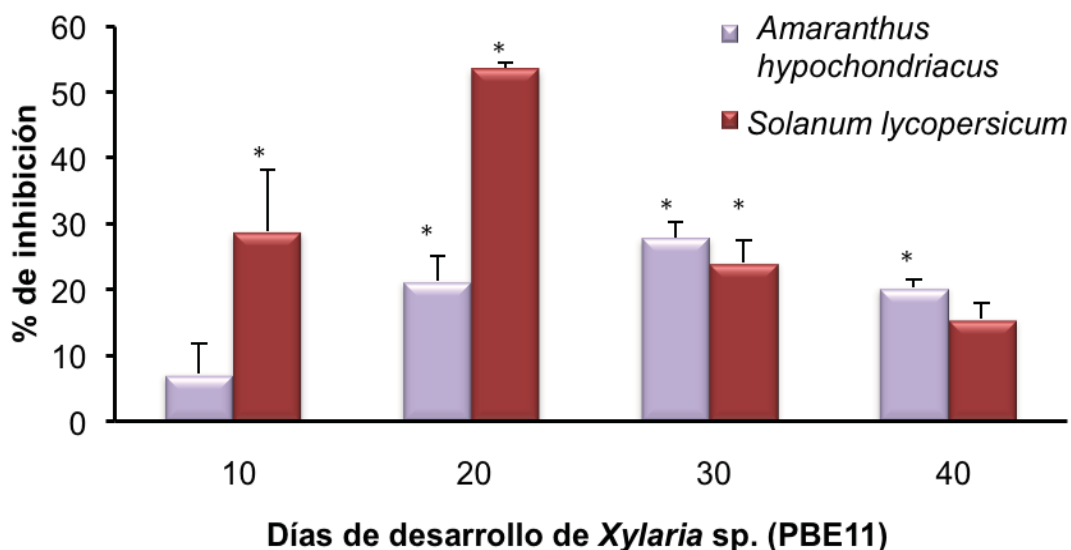


Figura 22. Efecto fitotóxico de los VOCs producidos por *Xylaria* sp. (PBE11) a los 10, 20, 30 y 40 días de cultivo. El crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* se registró después de 24 h y el de *S. lycopersicum* después de 72 h de exposición a los VOCs. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$), $N = 4$.

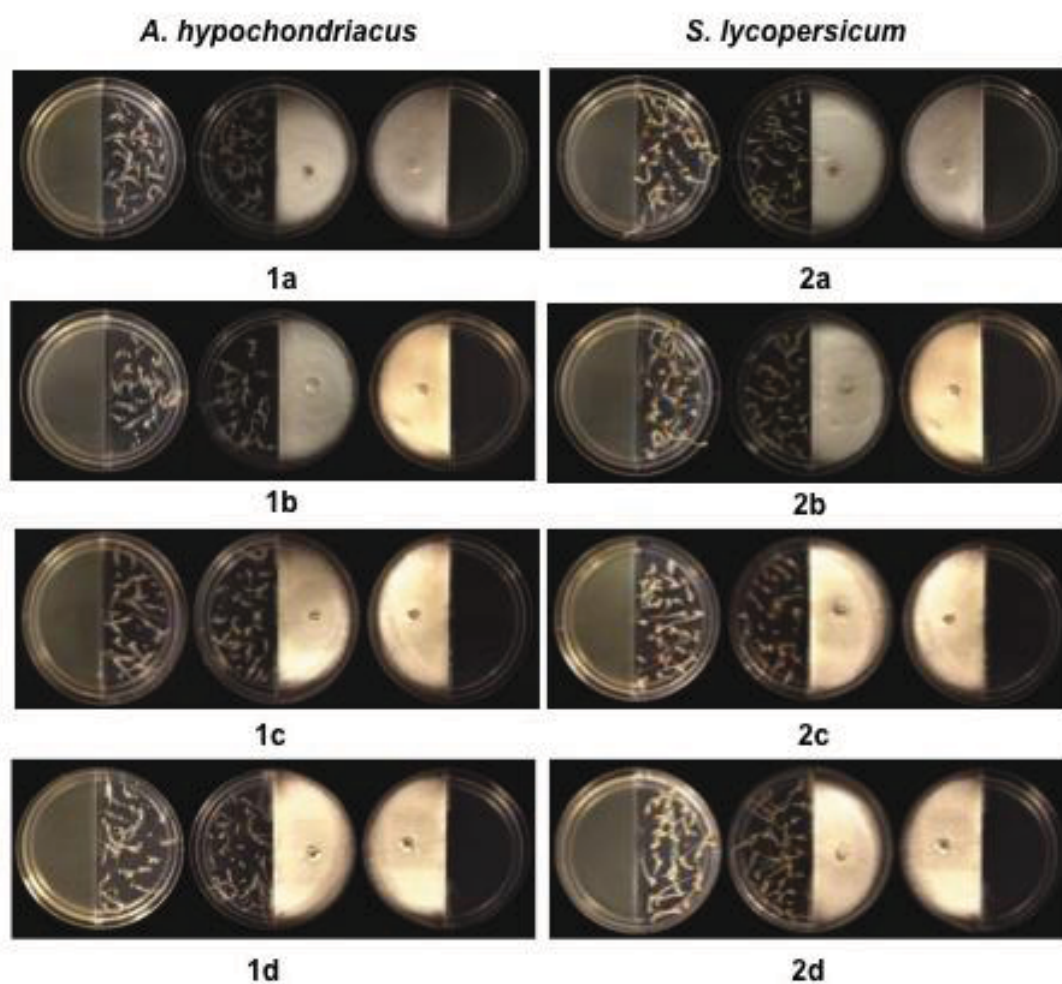


Figura 23 Potencial fitotóxico de los VOCs producidos por *Xylaria* sp. (PBE11) a los 10 (a), 20 (b), 30 (c) y 40 (d) días de cultivo, sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* (1a, 1b, 1c y 1d) y *S. lycopersicum* (2a, 2b, 2c y 2d).



6.10.4. Determinación de la composición química de los VOCs producidos por el hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) aislado de *Haematoxylon brasiletto*

El hongo *Xylaria* sp. (PBE11) produce un total de 40 VOCs en los tres días de análisis. Estos compuestos pertenecen a diferentes familias químicas, principalmente se identificaron alcanos (11), ésteres (5), sesquiterpenos (6), alcoholes (6), aminas (2), cetonas (2), compuestos derivados de benceno (2), ácidos carboxílicos (2) y un éter. La composición de la mezcla de VOCs y su abundancia varían dependiendo de la edad de desarrollo del hongo endófito (**Cuadro 30**). Por otro lado, los compuestos con mayor afinidad a la fibra fueron el 3-metil-1-butanol (24.33%) y el tujopseno (21.60%), al día 10 de crecimiento, el 2-metil-1-butanol (33.28%) y una amina de estructura desconocida (34.30%) al día 20, y el 2- metil-1 propanol (25.43%) al día 30.

El diagrama de Venn muestra el total de VOCs producidos por el hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11), observándose que son 25 compuestos al día 10; 20 al día 20, y 22 al día 30 de desarrollo del microorganismo; así como, aquellos compuestos que se comparten entre los diferentes días de cultivo (**Figura 24**).

Por otra parte, en la **Figura 25** se muestran los ocho VOCs producidos independientemente del día de análisis: 2-pentil-furano, 4-nonano, ácido acético 2-etilhexil éster, *trans*- α -bergamoteno, tujopseno, 1,8-dimetil-4-(1-metil etenil)-espiro[4.5]-7-decano(acoradieno), 3,7,7-trimetil-11-metileno-spiro[5.5]-2-undecano, y 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-dimetil-7-(1metiletenil) azuleno. Estos ocho metabolitos secundario pueden ser considerados constitutivos en esta especie, ya que fueron detectados en los diferentes días de cultivo de *Xylaria* sp. (PBE11), y en consecuencia, pueden servir como marcadores químicos (Strobel et al. 2001; Ezra et al. 2004).

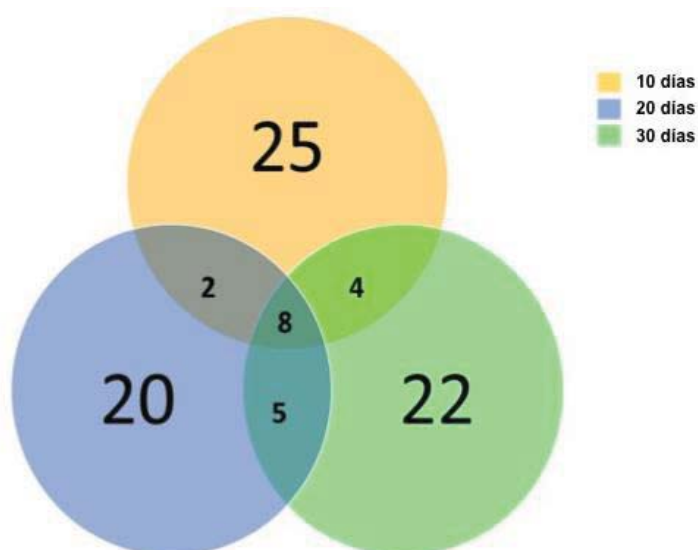


Figura 24. Diagrama de Venn ilustrando el número de metabolitos volátiles compartidos en los días 10, 20 y 30 de crecimiento del hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11).

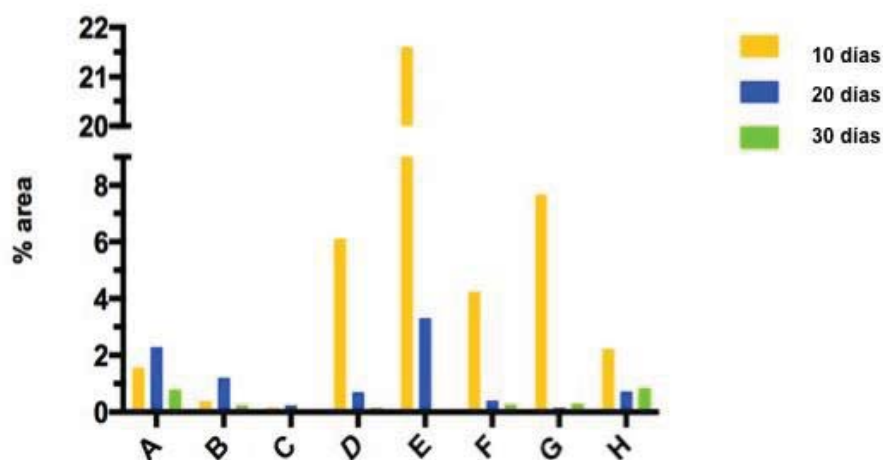


Figura 25. Compuestos orgánicos volátiles comunes en los días 10, 20 y 30 de desarrollo del hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11). A) 2-pentilfurano, B) 4-nonano, C) ácido acético 2-etilhexil ester, D) *trans*- α -bergamoteno, E) tujopseno, F) 1,8-dimetil-4-(1-metil etenil)-spiro[4.5]-7-decano (acoradieno), G) 3,7,7-trimetil-11-metileno-espiro[5.5]-2-undecano, H) 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-dimetil-7-(1metil etenil)-azuleno.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado los VOCs producidos por *Xylaria* sp. (PBE11) a los días 20 y 30 de crecimiento inhibieron significativamente el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*. En ambos casos los alcoholes 2-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol fueron los compuestos mayoritarios. Estudios previos han demostrado que estos compuestos poseen actividad fitotóxica significativa *in vitro*, causando una inhibición superior 40% sobre el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* a una concentración de 250 µg/mL (Hung 2014). Por otro lado, estos compuestos también fueron identificados previamente como VOCs producidos por el hongo endófito *Muscodora albus*, cuya mezcla posee actividad antifúngica contra patógenos de cultivos (Mercier y Jiménez 2004).

Con base en estos datos, y aunado a que *Xylaria* sp. pertenece al mismo grupo filogenético que *Muscodora* (Xylarioides), es posible que ambos hongos produzcan metanolitos secundarios bioactivos similares, los cuales pueden ser usados para el control de plagas (Mercier y Manker 2005; Riga et al. 2008; Macías-Rubalcava et al. 2010).

Cuadro 30. VOCs identificados en el hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) cultivado durante 10, 20 y 30 días.

Picos	Nombre	IR	Area Total (%)			PM	Formula Molecular
			10 días	20 días	30 días		
1	dimetil éter	587.32	-	1.71	-	46	C ₂ H ₆ O
2	desconocido	592.09	4.03	-	-	46	
3	amina desconocida	603.74	-	34.30	-	81	
4	desconocido	620.84	2.52	-	-	86	
5	2-metil-1-propanol	633.14	-	-	*25.43	74	C ₄ H ₁₀ O
6	desconocido	652.81	0.60	-	-	86	
7	amina desconocida	722.50	-	7.93	-	57	
8	3-metil-1-butanol	726.98	24.33	-	11.84	88	C ₅ H ₁₂ O
9	2-metil-1-butanol	728.72	-	*33.28	11.81	88	C ₅ H ₁₂ O
10	3-(eteniloxi)-1-propeno	732.05	-	-	14.20	84	C ₅ H ₈ O
11	2-isocianato-propano	734.45	-	-	13.54	85	C ₄ H ₇ NO
12	3-metil-pentano	735.79	-	-	13.54	86	C ₆ H ₁₄
13	2-metil-1-metil éster ácido butanoico	771.83	-	0.57	0.95	116	C ₆ H ₁₂ O ₂
14	1-pentanol	775.10	8.68	-	-	88	C ₅ H ₁₂ O
15	3-metil-1-butanol acetato	877.61	-	0.49	-	130	C ₇ H ₁₄ O ₂
16	2- <i>n</i> -butil furan	888.76	1.91	1.98	-	124	C ₈ H ₁₂ O
17	2,3-nonadieno	939.85	0.50	-	-	124	C ₉ H ₁₆
18	2-pentil-furano	987.71	1.56	2.29	0.79	138	C ₉ H ₁₄ O
19	2,3,6,7-tetrametil-octano	1033.20	0.49	-	-	170	C ₁₂ H ₂₆
20	alcano no identificado	1033.50	-	1.35	-		
21	2-etil- metil éster ácido hexanoico	1039.60	-	0.57	0.10	158	C ₉ H ₁₈ O ₂
22	3,6-dimetil-octano	1054.20	0.46	0.85	-	142	C ₁₀ H ₂₂
23	4-nonanono	1074.80	0.38	1.21	0.24	142	C ₉ H ₁₈ O
24	alcano desconocido	1094.70	0.64	-	-	156	



Cuadro 30. VOCs identificados en el hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) cultivado durante 10, 20 y 30 días(Continuación).

Picos	Nombre	IR	Area Total (%)			PM	Formula Molecular
			10 días	20 días	30 días		
25	2-nonanono	1095.30	-	3.72	0.88	142	C ₉ H ₁₈ O
26	fenil-etil alcohol	1125.20	-	1.21	0.40	122	C ₈ H ₁₀ O
27	ácido acético 2-etil hexil éster	1147.50	0.17	0.23	0.05	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
28	ácido acético 2-fenil etil éster	1260.40	0.09	-	0.34	164	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
29	2,7,10-trimetil-dodecano	1406.10	0.58	-	-	212	C ₁₅ H ₃₂
30	sesquiterpeno desconocido	1411.10	2.67	-	-	204	C ₁₅ H ₂₄
31	<i>trans</i> - α -bergamoteno	1441.30	6.11	0.71	0.16	204	C ₁₅ H ₂₄
32	3,7,11-trimetil-, 1,3,6,10-dodecatetraeno	1441.50	0.57	-	0.16	204	C ₁₅ H ₂₄
33	Tujopseno	1445.60	21.60	3.31	0.10	204	C ₁₅ H ₂₄
34	naftaleno no identificado	1454.70	1.08	-	1.00	204	
35	1,8-dimetil-4-(1-metil etenil)-espiro[4.5] -7-deceno (acoradieno)	1481.10	4.25	0.41	0.26	204	C ₁₅ H ₂₄
36	3,7,7-trimetil-11-metileno-espiro[5.5] -2-undeceno	1504.10	7.68	0.16	0.28	204	C ₁₅ H ₂₄
37	2-metileno-5-(1-metil vinil)-8-metil bicyclo[5.3.0]decano	1513.90	1.69	-	-	204	C ₁₅ H ₂₄
38	1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-dimetil-7-(1-metilethenil)-azuleno	1516.50	2.22	0.73	0.85	204	C ₁₅ H ₂₄
39	1,5,5,9-tetrametil-spiro[5.5] -1,8-undecadieno (α -chamigreno)	1519.80	2.16	-	-	204	C ₁₅ H ₂₄
40	ácido <i>n</i> -hexadecanoico	1963.50	-	-	0.19	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
	^b Desconocidos		2.96	3.11	2.89		

IR; índices de Kovats calculados a partir de los datos de tiempo de retención en una columna capilar DB-5MS. *estándares auténticos adquiridos de Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$ de pureza). Los compuestos encontrados en el control de PDA no fueron incluidos.





Entre los compuestos identificados, el sesquiterpeno tujopseno es uno de los compuestos mayoritarios al día 10 de crecimiento del hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) (Polizzi et al. 2011; Costa et al. 2000; Manter et al. 2007; Oh et al. 2011). Este producto se encuentra también en el aceite esencial obtenido por hidrodestilación del hongo endófito *Xylaria* sp. NICL5 aislado de *Cupressus lusitánica*, en donde el isomero *cis*-tujopseno fue identificado como compuesto mayoritario (Santos et al. 2011).

Por otra parte, el tujopseno también ha sido identificado como compuesto mayoritario de los VOCs producidos por el hongo *Penicillium decumbens* aislado de las paredes de edificios dañados por la humedad, y mostró actividad antifúngica contra *Eurotium herbarium* y *Gonytrichum macrocladum* (Polizzi et al. 2011); como componente de los aceites esenciales de *Eugenia dysenterica* con actividad antibacteriana contra varias cepas de *Cryptococcus neoformans* (Costa 2000) y como constituyente del aceite esencial de la corteza de *Callitropsis nootkatensis* el cual tiene actividad contra *Phytophthora ramorum* (Manter et al. 2007; Oh et al. 2011). Finalmente se ha reportado que el *cis*-tujopseno aislado de *Thujaopsis dolabrata* posee actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

De igual forma, el acoradieno (1,8-dimetil-4-(1-metiletenil)-espiro[4,5]dec-7-eno) se encontró presente en la mezcla de VOCs producidos por *F. oxysporum* y demostró un efecto nematocida sobre *Meloidogyne incognita*, y como parte de los VOCs producidos por *Salvia fruticosa*, y que posee actividad antifúngica contra *R. solani* y *S. sclerotiorum* (Pitaroskili et al. 2003). De forma similar el sesquiterpeno bergamoteno identificado como constituyente del extracto de *Ocimum basilicum* tiene actividad antifúngica contra diferentes especies de *Fusarium* (Kocic et al. 2011); y es también constituyente del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, con actividad antibacteriana contra *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus* (Falcão et al. 2012). Asimismo, el 2-nonano, también posee potencial antifúngico contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Zheng et al. 2013) y *Botrytis cinerea* (Almenar et al. 2009), además de ser utilizado para aumentar la vida de anaquel de las fresas debido a su efecto antifúngico.



Es importante señalar que a pesar de que se identificaron diversos VOCs que poseen actividad antifúngica previamente reportada en la literatura, es bien conocido que, en general, los efectos antimicrobianos provocados por los VOCs son el resultado del efecto sinérgico de los mismos (Ezra y Strobel 2003; Macías et al. 2010). Esto permite concluir que la presencia de estos compuestos constituye en la actividad antifúngica observada en los bioensayos de antagonismo múltiple entre *Xylaria* sp. (PBE11) y los cuatro fitopatógenos de prueba con importancia económica en la agricultura.

6.11. Efecto fitotóxico del (\pm)-2-metil-1-butanol y el 2-metil-1-propanol

Con la finalidad de establecer si los compuestos más abundantes en la mezcla de VOCs en los días 20 y 30 de desarrollo del hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11), son responsables de la actividad fitotóxica observado en los bioensayos en caja de Petri dividida, se evaluó el efecto de los compuestos puros 2-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* y de *S. lycopersicum* usando bioensayos en fase gas empleando cajas de Petri divididas.

De manera general ambos compuestos provocaron un efecto inhibitorio significativo dependiente de la concentración sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de las dos plantas de prueba. El 2-metil-1-butanol mostró un potente efecto fitotóxico sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* con valores de IC_{50} de 26.45 $\mu\text{g/mL}$ y 4.59 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, muestra que las semillas de *S. lycopersicum* fueron inhibidas con valores de IC_{50} de 39.74 $\mu\text{g/mL}$ sobre la germinación y de 23.15 $\mu\text{g/mL}$ sobre el crecimiento de la raíz. Por otra parte, el 2-metil-1-propanol también mostró un efecto fitotóxico significativo sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus*, con IC_{50} 's de 48.20 $\mu\text{g/mL}$ y 26.45 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En cuanto a las semillas de *S. lycopersicum*, el valor del IC_{50} sobre la germinación fue de 130.0 $\mu\text{g/mL}$ y de 54.25 $\mu\text{g/mL}$ sobre el crecimiento de la raíz.



Los resultados de inhibición de la respiración durante el proceso de germinación de las dos plantas prueba, revelaron que ambos alcoholes presentaron un efecto inhibitorio significativo en un intervalo de 20 a 27% a la máxima concentración evaluada que fue de 160.0 $\mu\text{g/mL}$.

En conjunto los resultados derivados de los bioensayos en fase gas, sugieren que el 2-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol presentes en la mezcla VOCs producidos por *Xylaria* sp. (PBE11) pueden ser usados para el control de malezas. Asimismo, la mezcla VOCs puede ser útil en el control biológico contra hongos y oomicetos patógenos de cultivos.

6.12. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos del hongo endófito *Xylaria* sp. (PBE11) aislado de *Haematoxylon brasiletto*

Con la finalidad de corroborar si la actividad antifúngica y antioomiceto observada en los bioensayos de antagonismo directo simple y múltiple es atribuible a los compuestos no volátiles producidos por *Xylaria* sp. (PBE11) y difundidos en el medio de cultivo, se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto orgánico del medio de cultivo y micelio, derivado de su cultivo en medio PDA, a una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$.

Con excepción del oomiceto *P. capsici* (4%), el extracto fúngico inhibe significativamente el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos de prueba, sin embargo, los porcentajes de inhibición fueron bajos: los fitopatógenos *P. aphanidermatum* y *F. oxysporum* fueron inhibidos en un 17%, mientras que el hongo *A. solani* en un 20%. En consecuencia, estos resultados indican que la actividad antimicrobiana observada en los bioensayos de antagonismos directo simples y múltiple, esta mediada por un efecto sinérgico entre los VOCs y los metabolitos secundarios difusibles en el medio de cultivo.



6.13. Cultivo en mediana escala del hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21)

Una vez que se puso en evidencia el potencial aleloquímico de los extractos orgánicos de los 21 hongos endófitos puros aislados de *Haematoxylon brasiletto* cultivados en pequeña escala, se seleccionó al hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21) para llevar a cabo su cultivo en mediana escala, empleando medio de cultivo CPD (6 L) e incubando al microorganismo por 30 días, bajo condiciones estáticas. Una vez transcurrido el período de incubación, el micelio y el medio de cultivo se sometieron a un proceso de maceración y partición exhaustivo, respectivamente, empleando CH_2Cl_2 y AcOEt como disolventes de extracción. El perfil cromatográfico de los extractos obtenidos se comparó por CCF, y se reunieron con base en su similitud, obteniéndose 9 g de extracto total.

A continuación, se procedió a verificar cuantitativamente el potencial biológico del extracto orgánico sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, así como sobre la germinación y la longitud de la raíz de las dos plantas blanco, empleando el método de dilución en agar y a las concentraciones de prueba de 250 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

El extracto crudo produjo una inhibición del 50% sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba (*F. oxysporum*, *A. solani*, *P. parasitica*), y este resultado fue similar al mostrado por los extractos orgánicos derivados del cultivo en pequeña escala, que mostraron un efecto inhibitorio significativo en un rango del 40 al 50%. Sin embargo, el efecto sobre el *P. aphanidermatum* fue más importante, mostrando una inhibición del 80% de su crecimiento.

De forma paralela se realizó la evaluación del potencial fitotóxico del extracto orgánico del cultivo en mediana escala de *Aspergillus* sp. sobre las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*. El crecimiento de la raíz de las dos plantas prueba fue inhibido significativamente en más del 60%. La actividad biológica demostrada es comparable con el potencial fitotóxico observado para los extractos derivados del cultivo en pequeña escala, que provocaron un efecto inhibitorio significativo del 65% y 80% sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus*



y *S. lycopersicum*, respectivamente, a la misma concentración de prueba (100 µg/mL).

A continuación, se establecieron las concentraciones inhibitorias media (CI_{50}), sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba, empleando cinco diferentes concentraciones (**Cuadro 31** y **32**). Los resultados sobre el potencial antimicrobiano mostraron un efecto inhibitorio significativo dependiente de la concentración y superior al 45% sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba. En el caso de los hongos *F. oxysporum* y *A. solani*, se observó un efecto de saturación a partir de la concentración de 500 µg/mL, con una inhibición del 58%. Por otro lado el crecimiento de los oomicetos *P. parasitica* y *P. aphanidermatum* fue inhibido en un 100 % a la concentración de 750 µg/mL. Estos resultados confirman la presencia de metabolitos bioactivos con potencial antifúngico en el extracto orgánico total. La CI_{50} sobre los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *A. solani* fue de 68.79 µg/mL y 192.0 µg/mL, respectivamente. Estos valores son menores a la CI_{50} establecida para el fungicida comercial carbendazim ($CI_{50} > 1000$ µg/mL). Los valores de CI_{50} sobre el crecimiento de los oomicetos *P. parasitica* (165.1 µg/mL) y *P. aphanidermatum* (124.7 µg/mL) fueron mayores a los mostrados por el control positivo metalaxil (1.4 y 50 µg/mL, respectivamente) (**Cuadro 31**).



Cuadro 31. Potencial antifúngico y antioomiceto del extracto orgánico del medio de cultivo y micelio obtenido del cultivo en mediana escala del hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21).

Tratamiento	Concentraciones µg/mL	% de inhibición del crecimiento radial			
		<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	<i>A. solani</i>	<i>P.</i> <i>parasítica</i>	<i>P.</i> <i>aphanidermatum</i>
Extracto orgánico <i>Aspergillus</i> sp.	125	51.25 ± 1.0	45.5 ± 0.9	46.5 ± 0.9	48.7 ± 1.0
	250	54.75 ± 1.0	53.5 ± 0.9	53.5 ± 0.9	80.7 ± 1.0
	500	58.0 ± 1.5	57.0 ± 1.0	79.2 ± 1.0	87.0 ± 1.0
	750	58.0 ± 0.0	58.5 ± 0.9	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	1000	58.0 ± 0.0	58.5 ± 1.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Cl ₅₀ µg/mL		68.79 ± 1.1	192.0 ± 1.0	165.1 ± 1.0	124.7 ± 1.0

*Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$).

Por otra parte la evaluación del potencial fitotóxico del extracto orgánico total del hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21), inhibió significativamente el crecimiento de las raíces de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* de manera dependiente partir de la concentración de 50 µg/mL, y con una Cl₅₀ de 147.0 µg/mL sobre el crecimiento de la raíz de las dos plantas de prueba la cual es comparable a la Cl₅₀ calculada para el herbicida comercial RIVAL. Estos resultados permiten evidenciar la presencia de metabolitos bioactivos con potencial fitotóxico presentes en el extracto orgánico. Cabe destacar que ninguno de los tratamientos mostró un efecto inhibitorio significativo sobre la germinación a la máxima concentración de prueba que fue de 1000 µg/mL y no muestran efecto significativo sobre la respiración durante el proceso de germinación (**Cuadro 32**).



Cuadro 32. Potencial fitotóxico del extracto orgánico del medio de cultivo y micelio obtenido del cultivo en mediana escala del hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21).

Tratamiento	Concentración µg/mL	% de Inhibición del crecimiento de la raíz	
		<i>A. hypochondriacus</i>	<i>S. lycopersicum</i>
Extracto orgánico <i>Aspergillus</i> sp.	25	12.3 ± 2.9	18.6 ± 3.5
	50	21.2 ± 4.6	29.1 ± 6.9
	100	34.7 ± 5.4	39.3 ± 6.9
	200	61.4 ± 3.9	55.1 ± 4.4
	300	71.3 ± 4.9	66.2 ± 4.8
	Cl ₅₀ µg/mL	146.5 ± 1.0	148.9 ± 1.0
Glifosato	Cl ₅₀ µg/mL	124.7 ± 1.0	115.7 ± 1.0

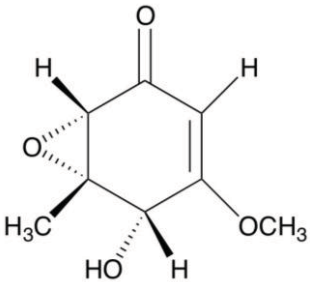
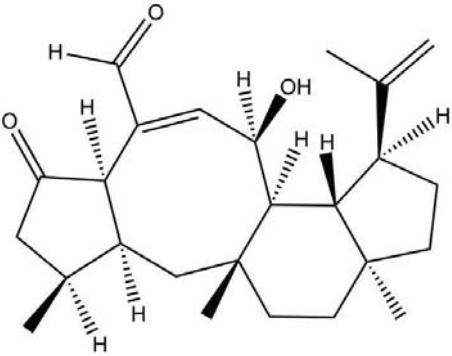
*Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA (P < 0.05).

6.14. Estudio químico biodirigido del hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21)

El fraccionamiento químico biodirigido de los extractos activos derivados del cultivo en pequeña (5xx mg) y mediana (9 g) escala del hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21), permitió la obtención de un metabolito secundario conocido e identificado como la (4S,5S,6S)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona o coriloxina (**70**) [Figura 28] y un sesterpeno novedoso de tipo variecolina A (**71**) [Figura 42]. En el Cuadro 33 se muestran las estructuras de los dos compuestos aislados, su rendimiento y las fracciones de las cuales fueron purificados.



Cuadro 33. Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21).

Metabolito Secundario	Rendimiento (µg/L)	Fracciones
	20 mg	IV _p
	45 mg	IX _{M3} -IX _{M5}

6.15. Caracterización de la (4*S*,5*S*,6*S*)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona o coriloxina (70)

La elucidación estructural del compuesto **70** se llevó a cabo utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Su fórmula se determinó por espectrometría de masas de alta resolución. El espectro de masas presenta un ion molecular en una relación masa carga (m/z) de 171 $[M+1]^+$, y permite establecer una fórmula molecular $C_8H_{10}O_4$. El espectro en el infrarrojo (IR) presenta bandas de absorción asociadas con grupos hidroxilo (ν_{\max} 3394 cm^{-1}) y una cetona conjugada (ν_{\max} 1646 cm^{-1}). Los espectros de resonancia magnética unidimensionales (^1H y ^{13}C) y bidimensionales (HSQC, HMBC, COSY y NOESY) permitieron establecer que el producto natural contienen un núcleo ciclo hexenona epoxidada (Yoshihito et al. 2005).



A continuación se discuten las características principales de los espectros:

El espectro de RMN¹³C (**Figura 26**) presenta señales para ocho átomos de carbono en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas. El análisis del espectro permitió establecer la presencia de señales para una cetona α,β insaturada en δ_C 193.3 (C-1), 171.3 (C-3) y 97.7 (C-2), para un metilo unido al carbono de un epóxido en δ_C 18.9 (CH₃-5), para un metoxilo en δ_C 56.5 (OCH₃-3), para dos metinos oxigenados en δ_C 60.6 (C-6) y 69.1 (C-4), y para un carbono cuaternario base de oxígeno en δ_C 59.8 (C-5).

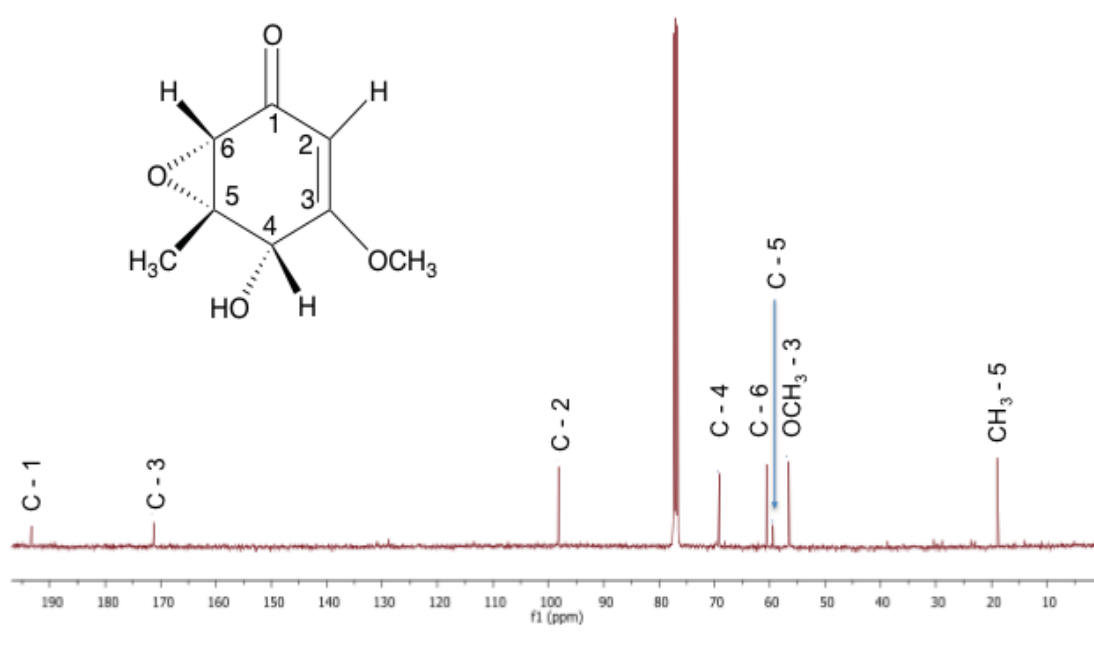


Figura 26. Espectro de RMN¹³C del (4S,5S,6S)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona (**70**) de *Aspergillus sp.* (100 MHz, CDCl₃).

En el espectro de RMN¹H (**Figura 27**) se observa una señal simple en δ_H 1.66 que integra para tres hidrógenos, asignable al metilo en el carbono cuaternario en C-5 y que muestra una correlación con la señal en δ_C 18.9 en el espectro HSQC. También se observa una señal doble en δ_H 4.49 ($J= 6.1$ Hz) asignable al grupo hidroxilo en C-4. En δ_H 3.33 se aprecia otra señal doble ($J= 2$ Hz, 1H) que integra



para un hidrógeno asignable a H-6 alfa al carbonilo, el cual correlaciona con la señal en δ_C 60.6 en el espectro HSQC. En δ_H 3.77 se observa una señal simple que integra para tres hidrógenos y de acuerdo con su desplazamiento químico corresponde al OCH₃-3. En δ_H 2.59 se observa una señal doble que integra para un hidrógeno y que se encuentra acoplada al hidroxilo evidenciado anteriormente ($J= 6.0$ Hz) asignable a H-4 y que en el espectro HSQC correlaciona con la señal en δ_C 69.1. Finalmente, en la región de los hidrógenos vinílicos el espectro de RMN¹H del compuesto **70** muestra una señal doble en δ_H 5.26 asignable al hidrógeno H-2 ($J= 2$ Hz) el cual correlaciona con la señal en δ_C 97.7 en el espectro HSQC.

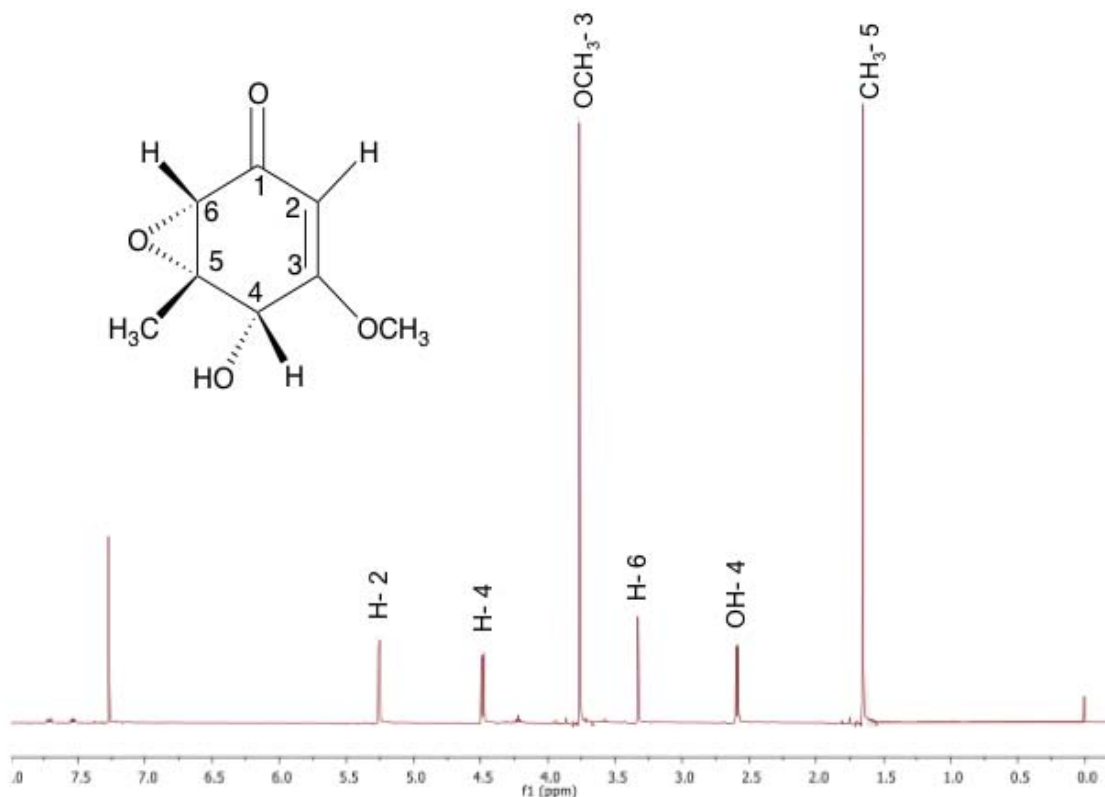


Figura 27. Espectro de RMN¹H del 4*S*,5*S*,6*S*)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona (**70**) de *Aspergillus* sp. (400 MHz, CDCl₃).



Los carbonos restantes observados en el espectro de RMN¹³C se asignaron a dos carbonos cuaternarios en δ_C 193.3, (C-1) y 59.8 (C-5). En el **Cuadro 34** se presentan los datos espectroscópicos de RMN¹³C y de RMN¹H así como, las correlaciones observadas en los espectros bidimensionales HMBC y NOESY del compuesto **70**.

Con base en el análisis espectroscópico anterior, la estructura del producto natural **70** se estableció como la de la (4*S*,5*S*,6*S*)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona o coriloxina (**Figura 28**). Cabe señalar que todos los datos espectroscópicos del producto natural **70** se encuentran en armonía con los descritos previamente en la literatura (Yoshihito et al. 2005; Garcia Méndez et al. 2016).

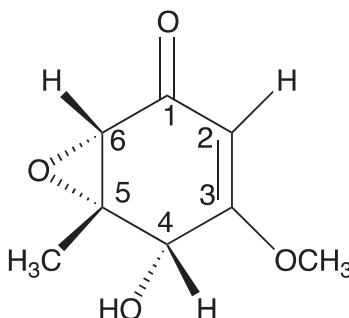


Figura 28. (4*S*,5*S*,6*S*)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona (**70**)

La (4*S*,5*S*,6*S*)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona ha sido obtenida de hongos endófitos *Xylaria* como *X. allantoides* BCC 23163 aislado de madera muerta (Isaka et al. 2014), de *Xylaria* sp. endófito de aislado de *Vitis labrusca* (Vitaceae) (Ibrahim et al. 2014), y del hongo endófito *X. feejeensis* SM3e-1b, obtenido de *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae) (Garcia Méndez et al. 2016).

Además, de *Xylaria* sp. YUA-026 se aisló el compuesto **70** con actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *C. albicans* con valores de Concentración Inhibitoria Media (MIC) de 100, 100 y 200



$\mu\text{g/mL}$, respectivamente. También se ha reportado la actividad fitotóxica de **70** sobre el crecimiento de semillas de lechuga con un porcentaje de inhibición del 46% a una concentración de $50 \mu\text{g/mL}$ (Yoshihito et al. 2005).

Por otra parte, García y colaboradores (2016) reportaron que el compuesto **70** posee actividad fitotóxica sobre *Trifolium pratense*, *Medicago sativa*, *Panicum miliaceum*, y *A. hypochondriacus*, inhibiendo de forma significativa la germinación de las semillas, el crecimiento de la raíz y el consumo de oxígeno de las plántulas

Cuadro 34. Datos espectroscópicos de RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD) y de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃), de la (4S,5S, 6S)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona(**70**)

.Posición	Multiplicidad (DEPT)	¹³ C (δ_c) 100 MHz	¹ H (δ_H) mult. J en Hz 400 MHz	HMBC	NOESY
1	C	193.3	---		
2	CH	97.7	5.26 (d J=2 Hz, 1H)	C-1, C-3, C-6	
3	C	171.3			
4	CH	69.1	4.49 (d J= 6.0 Hz, 1H)	C-3, C-2, C-4, C-5	CH ₃ 5, H-6
5	C	59.8			
6	CH	60.6	3.33 (d J= 2 Hz, 1H)	C-1, C-2, C-5	CH ₃ 5, H-4
OH-4	---	---	2.59(d J= 6.0Hz, 1H)	C-3, C-5	
CH ₃ -5	CH ₃	18.9	1.66 (s)	C-6, C-4	H-4, H-6
OCH ₃ -3	CH ₃	56.5	3.77 (s, 3H)	C-2, C-3	

6.16. Caracterización de la variecolina A (**71**)

La elucidación estructural de la variecolina A (**71**) se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas de alta resolución. El espectro de masas presenta



un ion molecular en una relación masa carga (m/z) de 385 $[M+1]^+$, y permite establecer una fórmula molecular $C_{25}H_{36}O_3$. El espectro en el infrarrojo (IR) presenta bandas de absorción asociadas con grupos hidroxilo (ν_{\max} 3549.51 cm^{-1}), cetona (ν_{\max} 1729.65 cm^{-1}), aldehído (ν_{\max} 1670.85 cm^{-1}) y vinilo (ν_{\max} 1619.42 cm^{-1}).

Los espectros de resonancia magnética unidimensionales (1H y ^{13}C) y bidimensionales (HSQC, HMBC, COSY y NOESY) permitieron establecer que el producto natural corresponde a un sesterpeno con núcleo variecolina (Iwamoto et al. 2004). En el cuadro 35 se presentan los datos espectroscopicos de 1H y ^{13}C . A continuación, se discute en detalle las características principales de los espectros:

El espectro de RMN ^{13}C de la variecolina A (**Figura 29 y 30**) se observan señales para 25 átomos de carbono en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas. A campo bajo se aprecia una señal para un carbonilo de cetona en δ_C 218.91 (C-5), una para un aldehído α,β insaturado en δ_C 191.13 (C-20), y en la región comprendida entre δ_C 110-170 se observan cuatro señales que corresponden a carbonos vinílicos en δ_C 149.49 (C-23), δ_C 111.24 (C-24), δ_C 140.90 (C-7) y δ_C 164.66 (C-8). También se observan señales para un carbono alifático base de oxígeno en δ_C 71.14 (C-9). Por otra parte, a campo alto del espectro se observan dieciocho señales para carbonos alifáticos, seis de ellas corresponden a metilenos en δ 42.91 (C-1), δ 47.94 (C-4), δ_C 36.05 (C-12), δ_C 36.64 (C-13), δ_C 23.70 (C-17) y δ_C 39.56 (C-18); seis para metinos en δ_C 39.92 (C-2), δ_C 34.73 (C-3), δ_C 49.37 (C-6), δ_C 48.88 (C-10), δ_C 46.71 (C-15) y δ_C 47.24 (C-16); dos para carbonos cuaternarios en δ_C 38.85 (C-11), δ_C 44.15 (C-14); y cuatro para metilos en δ_C 15.94 (C-19), δ_C 23.84 (C-21), δ_C 17.63 (C-22) y δ_C 18.81 (C-25). Todas estas señales fueron confirmadas mediante el análisis del espectro DEPT.



En el espectro de RMN ^1H de la variecolin A (**Figura 31**) se observa una señal en δ_{H} 9.23 y que en el espectro HSQC. correlaciona con la señal en δ_{C} 191.13 asignable al aldehído en C-20. En la zona vinílica se observan tres hidrógenos en aproximadamente δ_{H} 4.50 (1H d, $J = 2.6$ Hz; H-24a), δ_{H} 4.44 (1H dd, $J = 2.6, 1.3$ Hz; H-24b) y δ_{H} 7.12 (d, $J = 3.4$ Hz; H-8), los cuales muestran correlación con las señales en δ_{C} 111.12 (C-24) y δ_{C} 164.66 (C-8) en el espectro HSQC. También, se observa una señal ancha en δ_{H} 3.37 asignable al grupo hidroxilo en C-9 y una señal doble en δ_{H} 4.62 (1H dd, $J = 7.6, 3.4$ Hz; H-9) para un hidrógeno geminal al hidroxilo evidenciado (OH-9). Por otra parte, a campo alto del espectro se observan señales para seis metilenos alifáticos en δ_{H} 1.17 (2H d $J = 10.2$ Hz; CH₂-1), δ_{H} 2.60 (1H dd $J = 8, 1.2$ Hz; H-4a) y δ_{H} 2.28 (1H d $J = 18$ Hz; H-4b), δ_{H} 0.75 (2H d $J = 7.4$ Hz; CH₂-12), δ_{H} 1.52 (2H m; CH₂-13), δ_{H} 1.72 (1H d $J = 3.6$ Hz; CH₂-17a), δ_{H} 1.53 (1H m; CH₂-17b), δ_{H} 1.71 (1H m; CH₂-18a), y en δ_{H} 1.00 (1H dd $J = 4.0, 1.7$ Hz; CH₂-18b), que correlacionan en el espectro HSQC con las señales en δ_{C} 42.91 (C-1), δ_{C} 47.94 (C-4), δ_{C} 36.05 (C-12), δ_{C} 36.64 (C-13), δ_{C} 23.70 (C-17) y δ_{C} 39.56 (C-18), respectivamente. Además, se aprecian señales para hidrógenos de metinos alifáticos en δ_{H} 2.56 (1H dd $J = 8.0, 1.2$ Hz; CH-2), δ_{H} 2.46 (1H dd $J = 7.05, J = 7.0$ Hz; CH-3), δ_{H} 3.27 (1H d $J = 11.6$ Hz; CH-6), δ_{H} 2.10 (1H dd, $J = 12.4, 7.8$ Hz; CH-10), δ_{H} 1.57 (1H d, $J = 2.8$ Hz; CH-15), y en δ_{H} 2.9 (1H dd $J = 7.5, 1.8$ Hz; CH-16), las cuales muestran correlación en el espectro HSQC con las señales en δ_{C} 39.92 (C-2), δ_{C} 34.73 (C-3), δ_{C} 49.37 (C-6), δ_{C} 48.88 (C-10), δ_{C} 46.71 (C-15) y δ_{C} 47.24 (C-16), respectivamente; y cuatro señales para metilos en δ_{H} 0.85 (3H s; CH₃-19), en δ_{H} 1.03 (3H s; CH₃-21), en δ_{H} 0.83 (3H s; CH₃-22) y en δ_{H} 1.13 (3H s; CH₃-25), las cuales muestran correlación en el espectro HSQC con las señales en δ_{C} 15.94 (C-19), δ_{C} 23.84 (C-21), δ_{C} 17.63 (C-22) y δ_{C} 18.81 (C-25), respectivamente.

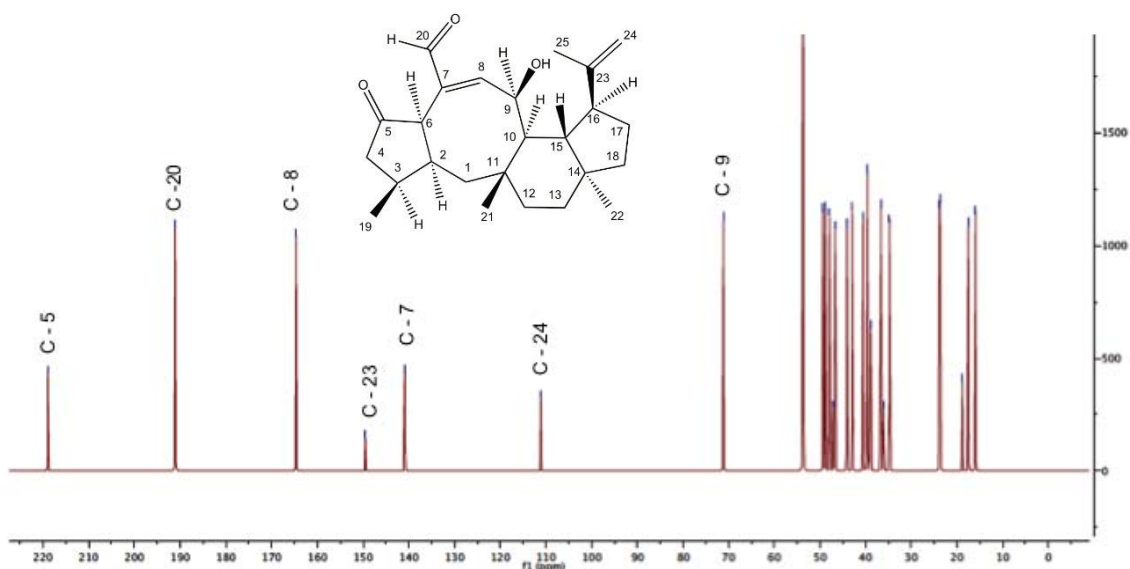


Figura 29. Espectro de RMN¹³C de la variecolina A (71) aislada de *Aspergillus* sp. (100 MHz, CD₂Cl₂).

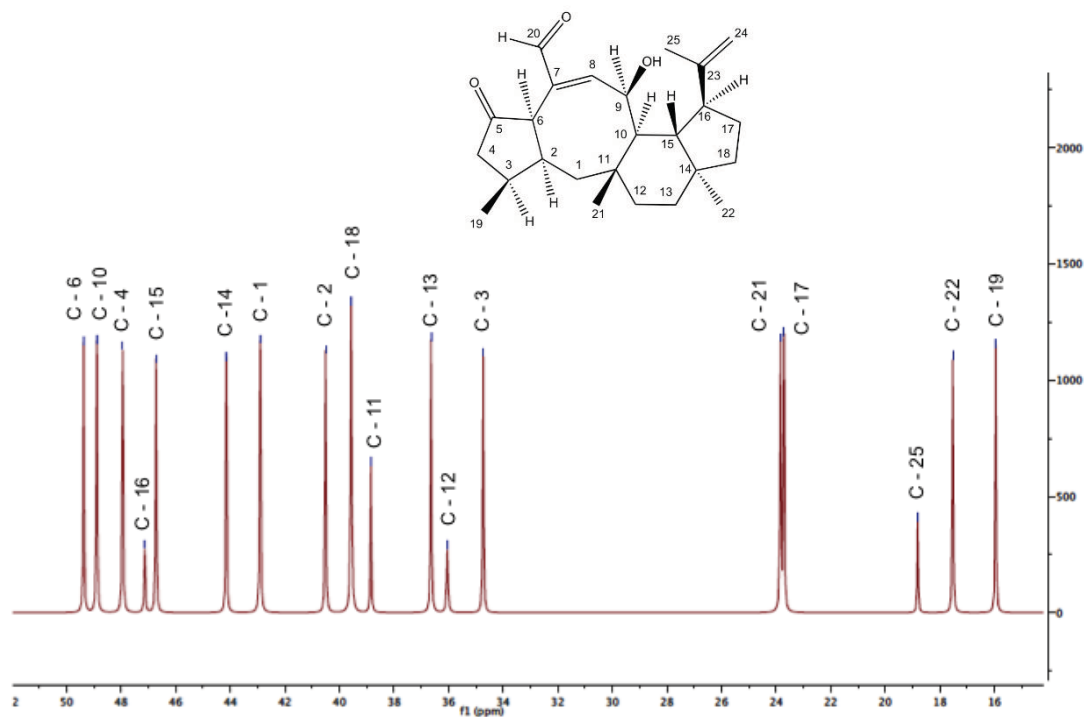


Figura 30. Espectro parcial A de RMN¹³C de la variecolina A (71) aislada de *Aspergillus* sp. (100 MHz, CD₂Cl₂).

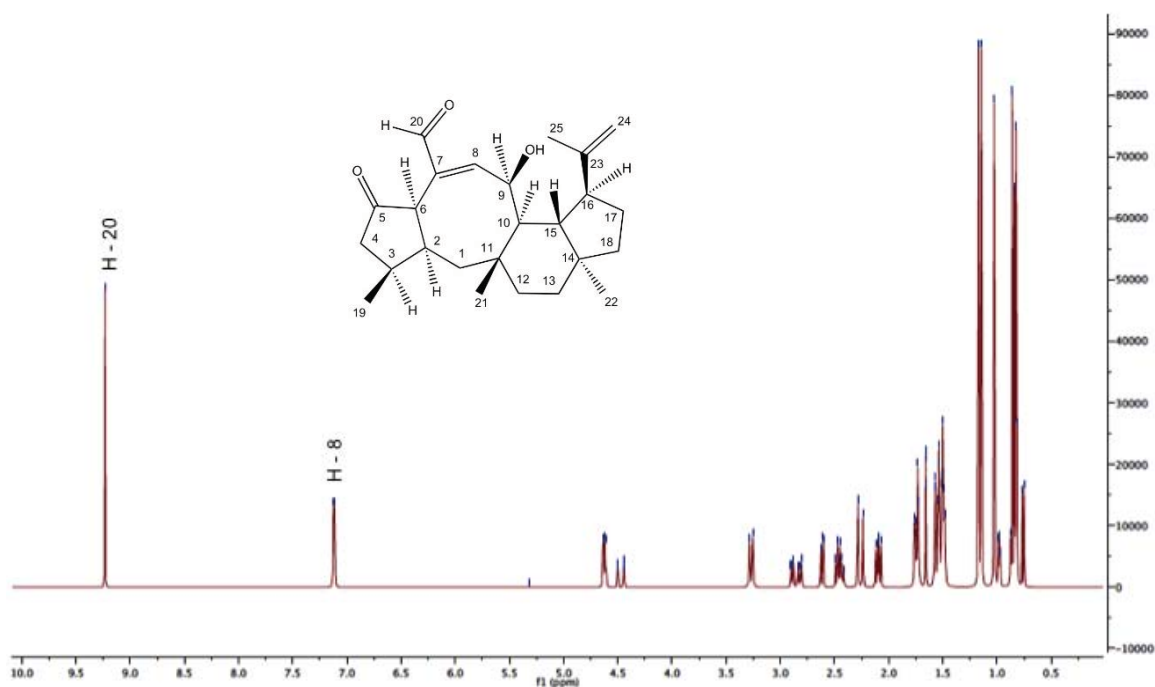


Figura 31. Espectro de RMN¹H de la varicolina A (71) aislada de *Aspergillus* sp. (400 MHz, CD₂Cl₂).

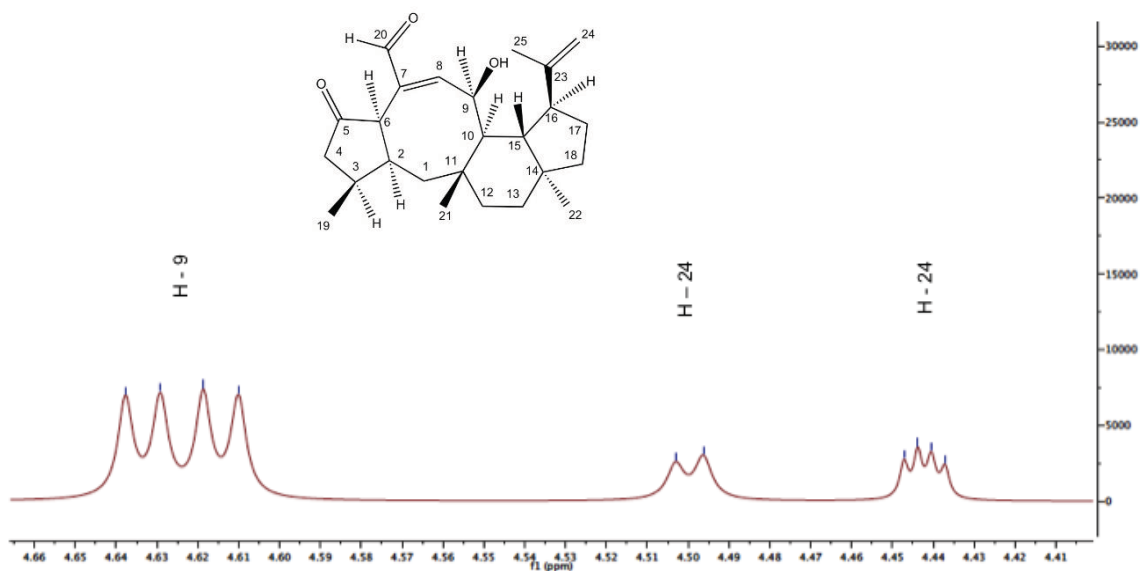


Figura 32. Espectro parcial A de RMN¹H de la varicolina A (71) aislada de *Aspergillus* sp. (400 MHz, CD₂Cl₂).

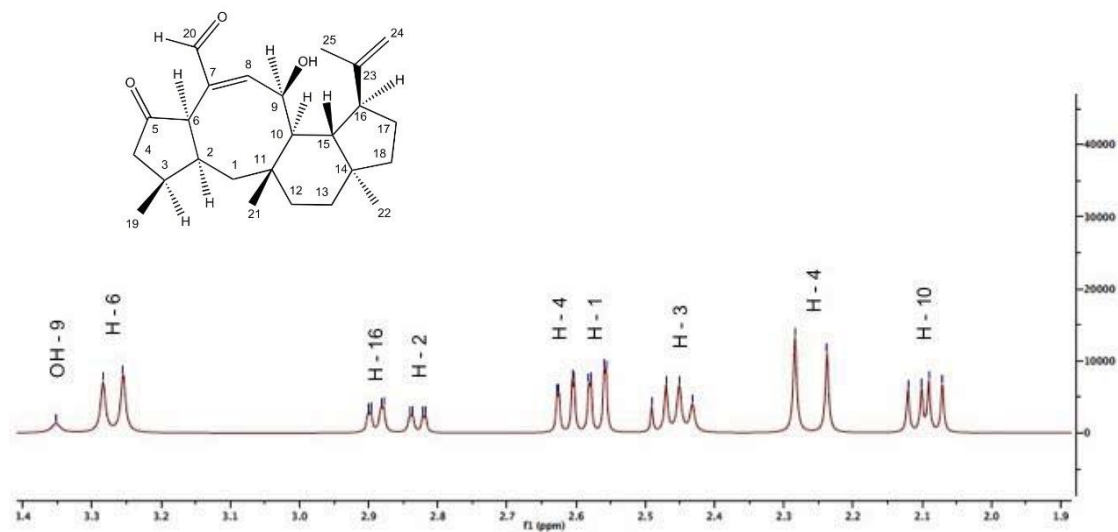


Figura 33. Espectro parcial B de RMN¹H variecolina A (**71**) aislada de *Aspergillus* sp. (400 MHz, CD₂Cl₂).

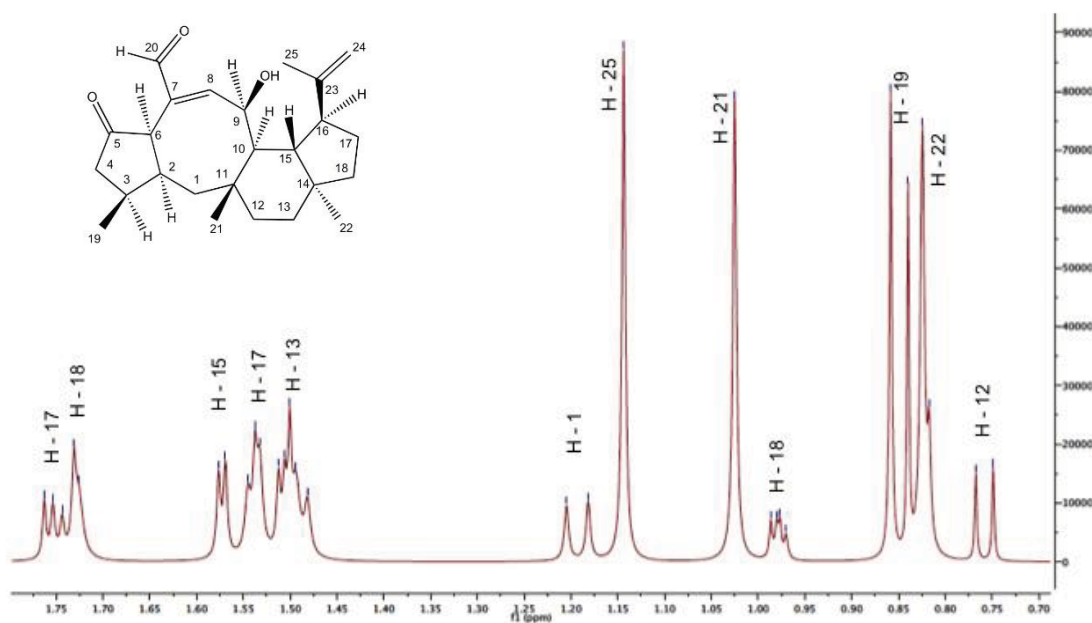


Figura 34. Espectro parcial C de RMN¹H de la variecolina A (**71**) aislada de *Aspergillus* sp. (400 MHz, CD₂Cl₂)



El análisis exhaustivo de los espectros bidimensionales de correlación heteronuclear y homonuclear permitieron ubicar los grupos funcionales evidenciados en los espectros de una dimensión en el esqueleto base de la molécula. Las observaciones más importantes se resumen a continuación:

El espectro HMBC del compuesto **71** muestra que el hidrógeno vinílico en δ_H 7.12 (CH-8) (Estructura **A**; **Figuras 31** y **35**) presenta correlación a dos enlaces con el carbono vinílico cuaternario en δ_C 140.90 (C-7) y con el carbono alifático base de oxígeno en δ_C 71.12 (C-9); a tres enlaces con el carbonilo del aldehído en δ_C 191.13 (C-20) y con el metino en δ_C 49.37 (C-6); y a cuatro enlaces con el carbonilo de cetona en δ_C 218.91 (C-5) y con el metino en δ_C 39.92 (C-2). Con esta información podemos confirmar que el hidrógeno H-8 se encuentra en la posición β al aldehído en C-20 del núcleo base de variecolina.

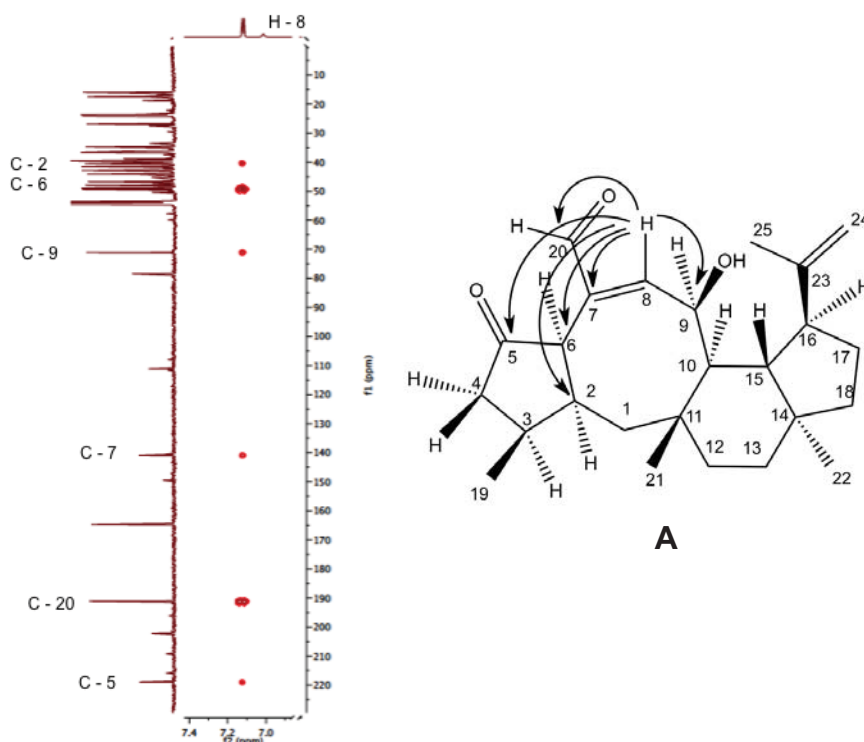


Figura 35. Espectro HMBC parcial A de la variecolina A (**71**) aislada de *Aspergillus* sp.

Por otra parte el hidrógeno en δ_H 3.27 (CH-6) (Estructura **B**; **Figuras 33 y 36**) muestra correlaciones a dos enlaces con el carbono vinílico cuaternario en δ_C 140.90 (C-7), con el carbonilo de cetona en δ_C 218.91 (C-5) y con el metino en δ_C 39.92 (C-2); a tres enlaces con el metino vinílico en δ_C 164.66 (C-8), con el metino en δ_C 34.73 (C-3), con el metileno en δ 47.94 (C-4) y con el carbonilo del aldehído α,β insaturado en δ_C 191.13 (C-20).

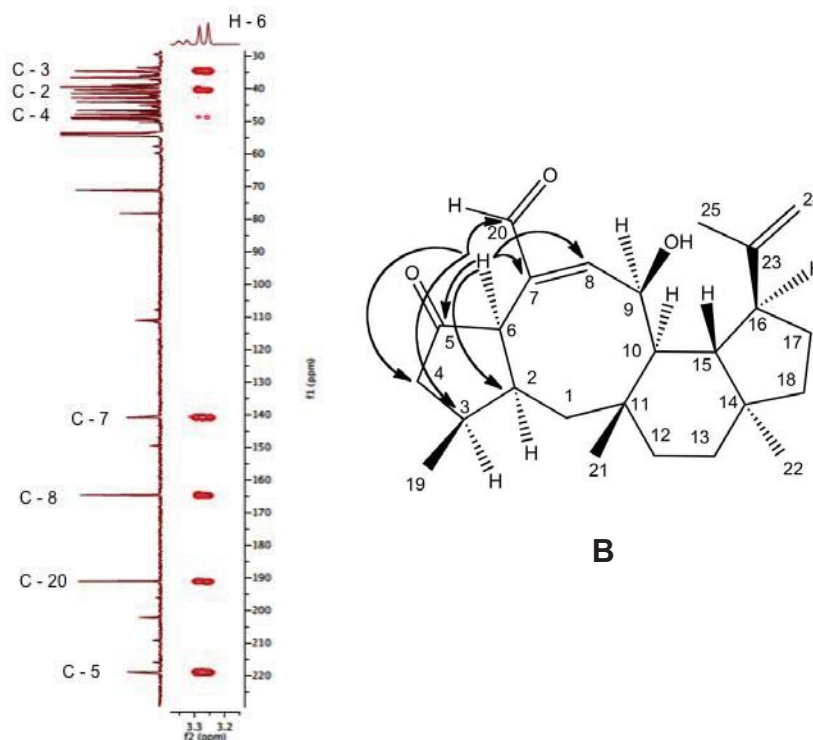


Figura 36. Espectro HMBC parcial B de la variecolina A (**71**) aislada de *Aspergillus* sp.

Los hidrógenos en δ_H 2.60 y δ_H 2.28 (CH₂:4) (Estructura **C y D**; **Figuras 33 y 37**) muestran correlaciones a dos enlaces con el carbonilo de cetona en δ_C 218.91 (C-5) y con el metino en δ_C 34.73 (C-3); a tres enlaces con el carbono cuaternario α al carbonilo de cetona en δ_C 49.37 (C-6), con el carbono del metilo en δ_C 15.96 (C-19) y con el metino en δ_C 39.92 (C-2).

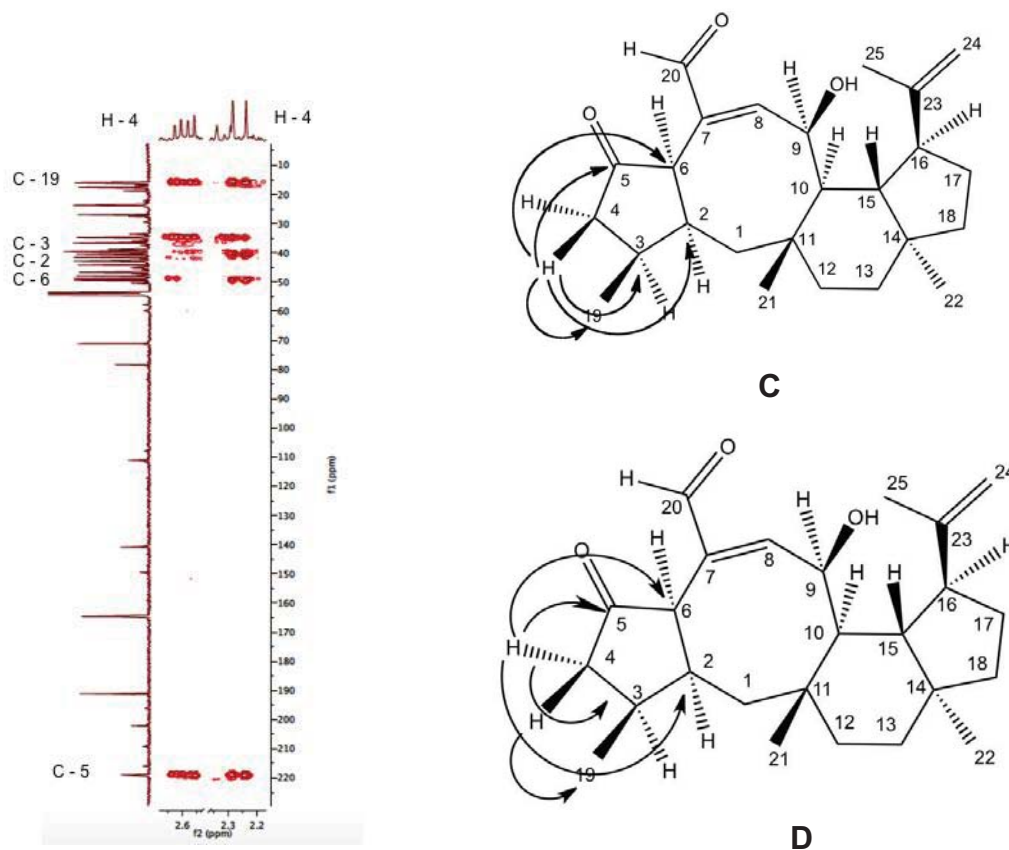


Figura 37. Espectro HMBC parcial C de la variecolina A (71) aislada de *Aspergillus* sp.

El hidrógeno en δ_H 2.46 (CH-3) (Estructura E; Figuras 33 y 38) muestra correlaciones a dos enlaces con el metileno en δ_C 47.94 (C-4), con el metino en δ_C 39.92 (C-2) y con el metilo en δ 15.94 (C-19); a tres enlaces con el carbonilo de cetona en δ_C 218.91 (C-5) y con el metino en δ_C 49.37 (C-6).

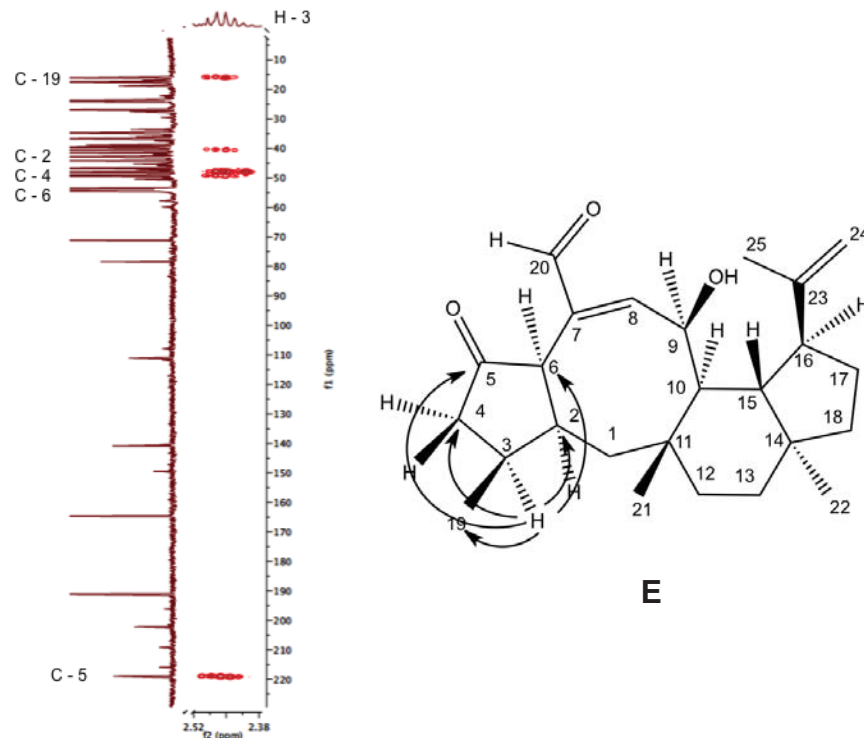
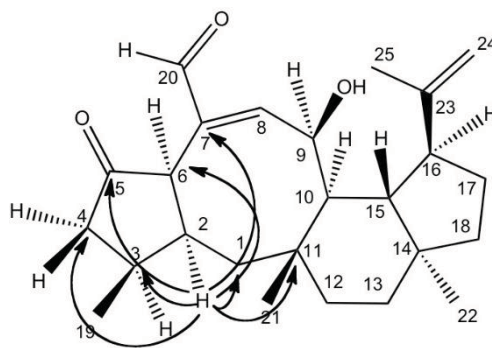


Figura 38. Espectro parcial HMBC D de la variecolina A (71) aislada de *Aspergillus* sp.

El hidrógeno en δ_H 3.26 (CH-2) (Estructura F; **Figura 33**) muestra correlaciones a dos enlaces con el metino δ_C 34.73 (C-3), con el metino en δ_C 49.37 (C-6) y con el metileno en δ 42.91 (C-1); a tres enlaces con el metileno en δ 47.94 (C-4), con el carbonilo de cetona en δ_C 218.91 (C-5), con el carbono cuaternario en δ_C 38.64 (C-11) y con el carbono vinílico en δ_C 140.90 (C-7).



F



El hidrógeno en δ_H 4.63 (CH-9) (Estructura **G**; Figuras 32 y 39) muestra correlaciones a dos enlaces con el carbono cuaternario δ_C 48.88 (C-10) y con el metino vinílico en δ_C 164.66 (C-8); a tres enlaces con el carbono cuaternarios en δ_C 38.64 (C-11) y con el carbono vinílico cuaternario en δ_C 140.90 (C-7); a cuatro enlaces con el carbonilo del aldehído α,β insaturado en δ_C 191.13 (C-20) y con el metino en δ_C 49.37 (C-6).

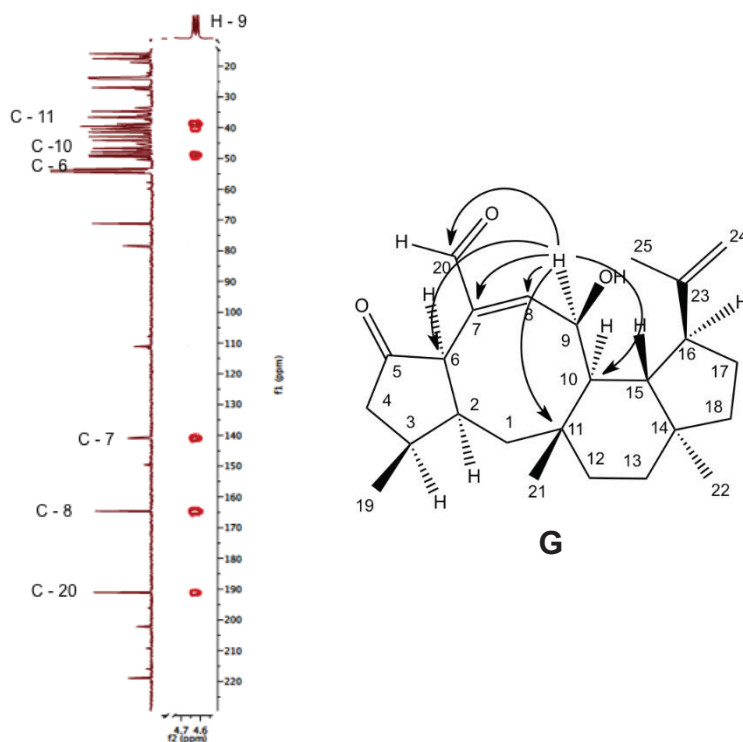
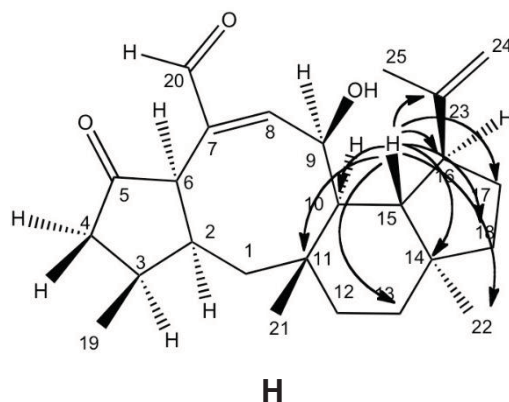


Figura 39. Espectro HMBC parcial E de la variecolina A (71) aislada de *Aspergillus* sp.

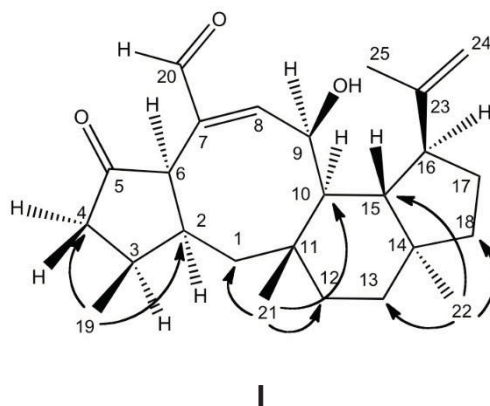
El hidrógeno en δ_H 2.10 (CH-15) (Estructura **H**; Figura 34) muestra correlaciones a dos enlaces con el metino en δ_C 40.50 (C-10), con el carbono cuaternario en δ_C 44.15 (C-14), con el metino en δ_C 48.88 (C-16); a tres enlaces con el carbono cuaternario δ_C 38.64 (C-11), con el metileno en δ_C 33.56 (C-13), con el metileno en



δ_C 23.70 (C-17), con el metileno en δ_C 39.56 (C-18), con el carbono vinílico en δ_C 149.49 (C-23) y con el metilo en δ_C 17.53 (C-22).

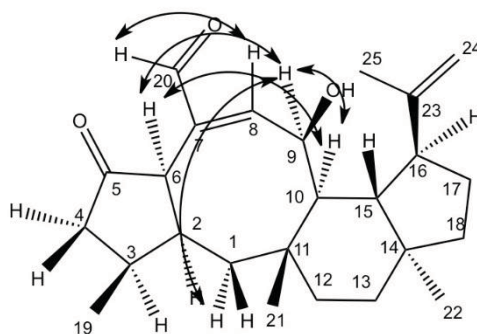


Finalmente los hidrógenos en δ_H 2.46 (CH₃-3) muestran correlaciones a tres enlaces con el metino en δ_C 39.92 (C-2) y con el metileno en δ 47.94 (C-4). Los hidrógenos en δ_H 1.03 del metilo en CH₃-11 muestran correlaciones a tres enlaces con el metileno en δ 42.91 (C-1) y con el metileno en δ_C 36.05 (C-12). Los hidrógenos en δ_H 0.83 del metilo en CH₃-14 muestran correlaciones a tres enlaces con el metileno en δ_C 36.64 (C-13), con el metileno en δ_C 39.56 (C-18) y con el metino en δ_C 46.71 (C-15) (Estructura I; **Figura 34**).





Por otra parte, en el espectro de correlación homonuclear NOESY se aprecian una correlación entre el hidrógeno en δ_H 7.12 (CH-20) y el hidrógeno vinílico en δ_H 9.23 (CH-8); entre el hidrógeno en δ_H 4.63 (CH-9) y el hidrógeno en δ_H 3.27 (CH-6), el hidrógeno en δ_H 2.10 (CH-10) y el hidrógeno en δ_H 1.17 (CH₂-1a); y una correlación entre el hidrógeno en δ_H 2.10 (CH-10) y el hidrógeno en δ_H 3.27 (CH-6) (Estructura **J**). Estas correlaciones permiten confirmar la ubicación y disposición espacial de estos sustituyentes, en la estructura propuesta para el producto 71.



J

Con base en los análisis presentados la estructura del producto natural **71** se estableció como la variecolina A (**Figura 40**), y cuyo nombre químico corresponde a (2a*S*,5*S*,5a*S*,5b*R*,7*E*,8a*R*,11*S*,11a*S*,12a*R*)-5-isopropenil-2a,11,12a-trimetil-6-hidroxi-9-oxo-1,2,2a,3,4,5,5a,5b,6,8a,9,10,11,11a,12,12a hexadecahidrociclopenta[4,5]cicloocta[1,2-*e*]indeno-8-carbaldehído. Los datos espectroscópicos del producto natural **71** se encuentran en armonía con los descritos previamente en la literatura para la variecolina (Otto et al.1991; Haruhiro 2000). Cabe destacar que a la fecha se tiene únicamente el reporte del aislamiento de la variecolina en tres ocasiones (**Figura 41**), la primera de ellas a partir del hongo *Aspergillus valiecolor* MF138 (Otto et al 1991), con actividad biológica sobre la vasoconstricción como inhibidor de la angiotensina II. Posteriormente, se aisló del hongo *Emericella aurantio-brunnea* y se evaluó como inmunosupresor evitando la proliferación de linfocitos en el bazo (Haruhiro 2000), y el último a partir de *E. aurantiobrunnea* y con actividad inhibitoria sobre el receptor de quimiocinas CCR5 (Yoganathan et al. 2004).

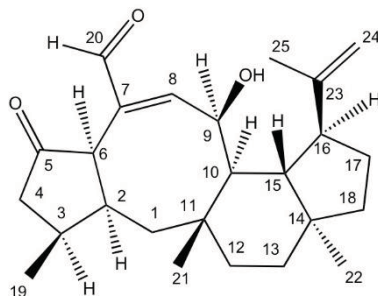


Figura 40. variecolina A

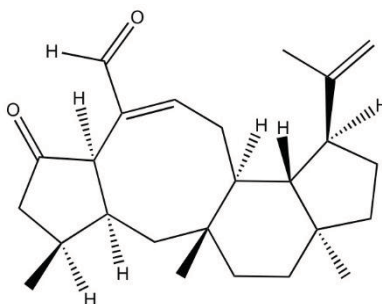


Figura 41. variecolina

Finalmente, la estructura de la variecolina A (**71**) se confirmó de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X. En la **Figura 42** se muestra una vista estereoscópica de este compuesto.

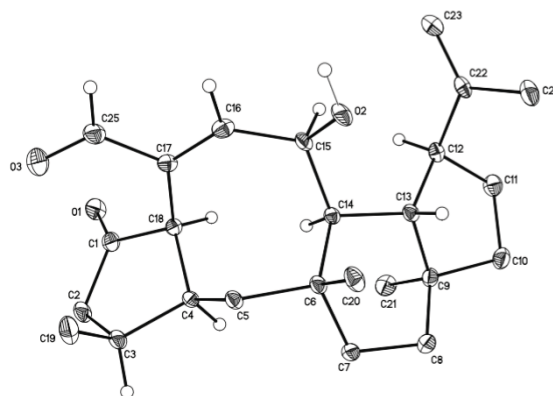


Figura 42. Vista estereoscópica de la variecolina A (**71**) aislada de *Aspergillus* sp.

Cuadro 35. Datos espectroscópicos de RMN¹³C (100 MHz, CD₂Cl₂) y de RMN¹H (400 MHz, CD₂Cl₂), de la variecolina A.

Posición	Multiplicidad (DEPT)	¹³ C (δ _C) 125 MHz	¹ H (δ _H) mult. <i>J</i> en Hz 400 MHz	HMBC	NOESY
1	CH ₂	42.91	1.17(d <i>J</i> = 10.2)	C-2, C-3, C-6, C-10, C-11,C-12, C-21	H-9
2	CH	39.92	2.56 (dd <i>J</i> = 8.0, 1.2)	C-1, C-3, C-6, C-11, C-13, C-15, C-14	
3	CH	34.73	2.46 (dd <i>J</i> = 7.05, <i>J</i> = 7.0)	C-2, C-4, C-5, C-6, C-19	
4	CH ₂	47.94	2.60 (dd <i>J</i> = 8, 1.2) 2.28 (d <i>J</i> = 18)	C-3, C-2, C-5, C-6, C-19	
5	C	218.91			
6	CH	49.37	3.27 (d <i>J</i> = 11.6)	C-2, C-3, C-4, C-5, C-7, C-8, C-20	H-9,H-10
7	C	140.90			
8	CH	164.66	7.12 (d, <i>J</i> = 3.4)	C-2, C-5, C-6, C-7, C-20	H-20
9	CH	71.14	4.63 (dd, <i>J</i> = 7.6, 3.4)	C-10, C-11,C-6 C-7 C-20,C-8	H-1,H-6,H-10
10	CH	48.88	2.10 (dd, <i>J</i> = 12.4, 7.8)	C-9, C-1,C-15, C-21	H-9,H-6
11	C	38.85			
12	CH ₂	36.05	0.75 (d <i>J</i> = 7.4)	C-1,C-15,C-13	



Cuadro 35. Datos espectroscópicos de RMN¹³C (100 MHz, CD₂Cl₂) y de RMN¹H (400 MHz, CD₂Cl₂), de la variecolina A (Continuación).

Posición	Multiplicidad (DEPT)	¹³ C (δ _c) 125 MHz	¹ H (δ _H) mult. <i>J</i> en Hz 400 MHz	HMBC	NOESY
13	CH ₂	36.64	1.52 (m)	C-2, C-12, C-22, C-14	
14	C	44.15			
15	CH	46.71	1.57 (d, <i>J</i> = 2.8)	C-12, C-11, C-10, C-22, C-14, C-18, C-17, C-16, C-23	
16	CH	47.24	2.9 (dd <i>J</i> = 7.5, 1.8)	C-15, C-17, C-23, C-24, C-25	
17	CH ₂	23.70	1.72 (d <i>J</i> = 3.6) 1.53 (m)	C-15, C-17, C-23, C-24, C-25	
18	CH ₂	39.59	1.71 (m) 1.00 (dd <i>J</i> = 4.0, 1.7)	C-15, C-17, C-23, C-24, C-25	
19	CH ₃	15.94	0.85 (s)	C-2, C-4	
20	CH	191.13	9.23 (s)	C-6, C-8, C-9	H-8
21	CH ₃	23.84	1.03 (s)	C-1, C-2, C-10	
22	CH ₃	17.63	0.83 (s)	C-15, C-13, C-18	
23	C	149.49			
24	CH ₂	111.12	4.51 (d, <i>J</i> = 2.68) 4.44 (dd, <i>J</i> = 2.68, 1.36)	C-16, C-23, C-25	
25	CH ₃	18.81	1.13 (s)	C-16, C-23, C-24	
OH-9			3.37 (s)		





6.17. Evaluación de la actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica de los metabolitos aislados del hongo endófito *Aspergillus* sp. (PBE21)

Con la finalidad de establecer el potencial biológico de los compuestos aislados en el extracto orgánico de *Aspergillus* sp. (PBE21), se realizó la evaluación del potencial antifúngico y antioomiceto sobre el crecimiento de cuatro fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, a una concentración de 250 µg/mL, y la determinación de potencial fitotóxico sobre dos plantas de prueba a una concentración de 100 µg/mL.

El compuesto (70) inhibe significativamente el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* en un 77% y 81%, respectivamente. El efecto fitotóxico provocado por el compuesto (70), es superior al que presentó el herbicida comercial Rival (empleado como control positivo, el cual inhibe en un 21% el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y en un 71% el de las semillas de *S. lycopersicum*. No muestra efecto sobre la germinación y la respiración durante el proceso de germinación.

El sesterpeno con esqueleto variecolina, el compuesto (71) presenta un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura: *F. oxysporum* (52%), *A. solani* (30%), *P. aphanidermatum* (52%) y *P. parasitica* (63%). La inhibición similar a la que presenta el fungicida comercial metalaxil en un rango de 50% al 70%. Asimismo, inhibe significativamente el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* en un 30% y 57%, respectivamente. El efecto fitotóxico provocado por el producto natural 71 es superior al que presenta el herbicida comercial (Rival) sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* (21%). No muestra efecto significativo sobre la germinación y la respiración durante el proceso de germinación.



7. CONCLUSIONES

- I. A partir de 510 aislamientos de hojas sanas y de 75 aislamientos de hojas que presentaron síntomas de enfermedad de la planta hospedera *Haematoxylon brasiletto*, se obtuvieron un total de 21 hongos endófitos y cuatro hongos fitopatógenos puros.
- II. El análisis detallado de las características macroscópicas y microscópicas de los 21 hongos endófitos y cuatro fitopatógenos, permitió determinar la pureza y la tasa de crecimiento de los aislamientos. Asimismo, permitió inferir que los aislamientos PBE6 y PBE8 posiblemente pertenecen al género *Aspergillus*; los hongos PBE2, PBE3, PBE9 y PBF2 al género *Fusarium*; el endófito PBE10 al género *Xylaria*; el aislamiento PBE12 al género *Acremonium*; el hongo PBE1 al género *Verticillium*, PBE20 al género *Nodulisporum* y el aislamiento PBE21 al género *Aspergillus*.
- III. El cultivo en pequeña escala de los 24 hongos en estudio aislados de *H. brasiletto*, empleando medio arroz y Caldo Papa Dextrosa, incubando a los microorganismos bajo condiciones estáticas, permitió el crecimiento favorable de todos los microorganismos. Estas dos son condiciones adecuadas para el crecimiento en mediana escala de estos aislamientos.
- IV. La diferencia en la actividad biológica demostrada por los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio derivado de las distintas condiciones de cultivo de los hongos endófitos, comprueba que la producción de metabolitos secundarios bioactivos puede cambiar de acuerdo a las condiciones en las que se desarrolle el microorganismo, ya que cada medio de cultivo y condiciones de incubación someten a los microorganismos a diferentes factores de estrés que pueden promover o disminuir la producción alguno metabolitos secundarios.
- V. Los extractos orgánicos obtenidos del cultivo en medio arroz de los hongos endófitos PBE1, PBE2, PBE4, PBE9, PBE20, mostraron un efecto inhibitorio selectivo sobre el crecimiento de los oomicetos fitopatógenos



Pythium aphanidermatum y *Phytophthora capsici* a la concentración de 250 µg/mL.

- VI. Los extractos fúngicos derivados del cultivo de los aislamientos PBE2 y PBE9 cultivados en medio arroz, poseen el mayor potencial fitotóxico provocando un efecto inhibitorio del 100% y 90%, sobre el crecimiento de la raíz las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*, respectivamente a la concentración de 100 µg/mL.
- VII. Los extractos orgánicos obtenidos del cultivo en medio arroz y CPD bajo condiciones de incubación estáticas de los aislamientos PBE6, PBE8, PBE9, PBE11, PBE13, PBE14 y PBE20 a la concentración de 100 µg/mL, presentan efecto inhibitorio significativo y superior al 45% sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*.
- VIII. El empleo de técnicas de biología molecular permitió establecer la identidad taxonómica hongo endófito PBE11 como *Xylaria* sp. aislamiento PB3f3.
- IX. Los bioensayos de antagonismo directo múltiple *in vitro* permitieron poner en evidencia, el potencial antagónico de los hongos endófitos *Xylaria* sp. (PBE11) y *Aspergillus* sp. (PBE20), provocando un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, constituyendo candidatos para estudio como posibles agentes de control biológico.
- X. Los extractos orgánicos derivados del cultivo en mediana escala de los endófitos *Xylaria* sp. aislamiento (PBE11) y *Aspergillus* sp. (PBE20), presentaron valores de CI_{50} , sobre el crecimiento de las plantas y microorganismos blanco, comparables con los valores mostrados por los agroquímicos comerciales el herbicida Rival, el antiomiceto metalaxil y antifúngico carbendazim, constituyendo candidatos ideales para realizar estudios químicos biodirigidos con el fin de obtener metabolitos secundarios con potencial uso en la agricultura como antifúngicos, antiomicetos y fitotóxicos, para el desarrollo de agentes alternativos.



- XI. El estudio químico biodirigido del extracto activo del micelio del hongo endófito *Aspergillus* sp., permitió el aislamiento y caracterización de la (4S,5S,6S)-5,6-epoxi-4-hidroxi-3-metoxi-5-metil-2-ciclohexen-1-ona o coriloxina y un sesterpeno novedoso con esqueleto de variecolina.
- XII. La coriloxina inhibe significativamente el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* en un 77% y 81%, respectivamente, a la concentración de 100 µg/mL.
- XIII. El sesterpeno producido por *Aspergillus* sp. presenta un efecto antifúngico significativo sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola; *F. oxysporum* (52%), *A. alternata* (30%), *P. aphanidermatum* (52%), y *P. parasitica* (63%) a la concentración de 250 µg/mL, y un efecto fitotóxico significativo del sobre crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* (30%) y *S. lycopersicum* del (57%) a la concentración de 100 µg/mL.
- XIV. La inhibición causada por los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y del micelio de *Xylaria* sp., sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos de prueba y las plantas modelo, así como la actividad antifúngica y fitotóxica demostrada por los metabolitos secundarios volátiles producidos por *Xylaria* sp. confirman que este endófito posee potencial de uso en la agricultura.
- XV. El estudio químico biodirigido del hongo endófito *Aspergillus* sp. permitió el aislamiento y caracterización de dos metabolitos secundarios con actividad fitotóxica y antifúngica, corroborando de esta manera que el criterio de selección basado en el potencial antagónico y evaluación de actividad a nivel de extracto es importante para ampliar la posibilidad de obtener compuestos bioactivos, destacando la importancia de estudiar hongos endófitos, ya que al pertenecer a un microambiente biológicamente diverso en el cual compiten con otros endófitos incluyendo hongos y bacterias, microorganismos fitopatógenos, y con su propia planta hospede.



- XVI. El presente proyecto demuestra que el estudio químico y biológico de los hongos asociados a *Haematoxylon brasiletto* colectada en una zona de alta biodiversidad como es la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla, constituye una contribución al conocimiento de la diversidad fúngica y al desarrollo de compuestos novedosos que presenten actividad biológica, y que puedan ser útiles como agroquímicos naturales alternativos. Asimismo, permite inferir los posibles beneficios que ofrecen los endófitos a su hospedera.



8. PESPECTIVAS

- Clasificar taxonómica mediante métodos moleculares a las especies antagónicas de hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *Haematoxylon brasiletto*.
- Realizar el estudio químico biodirigido de los extractos fúngicos de los endófitos PBE2 y PBE9 que demostraron mayor actividad biológica en los cultivos en pequeña escala.
- Aislar y purificar el mayor número de metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica demostrada por las fracciones activas de *Aspergillus* sp. y los extractos orgánicos de *Xylaria* sp., empleando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y determinar cuantitativamente el efecto antifúngico, antiomicetos y fitotóxico.
- Establecer el mecanismo de acción de los metabolitos secundarios bioactivos sobre el crecimiento de oomicetos, hongos y plantas.
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados, mediante técnicas espectroscópicas, espectrometría y de difracción de rayos X.
- Profundizar en el estudio del potencial como agentes de control biológico de los hongos endófitos de *H. brasiletto*.
- Determinar los efectos citotóxicos de los extractos y compuestos puros, sobre diferentes líneas celulares y macrófagos, con el fin de establecer posibles efectos tóxicos sobre el hombre y los animales.



9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert LA. (2005) Panorama de los plaguicidas en México. *Revista de Toxicología* **8**, 1-17.
- Almenar E., Catala R., Hernandez-Muñoz P. and Gavara R. (2009) Optimization of an active package for wild strawberries based on the release of 2-nonanone. *LWT - Food Science and Technology* **42**, 587-593.
- Altschul SFG., Miller W., Myers EW., Lipman, DJ. (1997) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Aly AH., Debbab A. and Proksch P. (2011) Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**, 1829-1845.
- Andrade LDR. and Franken P. (2013) Fungal Endophytes in Plant Roots: Taxonomy, Colonization Patterns and Functions. In: Aroca R. (eds), *Symbiotic endophytes*, *Soil Biology* **37**, 311-334.
- Argueta V., Cano A., Rodarte ME. (1994.) Atlas de las plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana. México, D.F.
- Arnold AE., Henk DA., Eells RL., Lutzoni F. and Vilgalys R. (2007) Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia* **99**, 185-206.
- Atmosukarto I., Castillo U., Hess WM., Sears J. and Strobel G. (2005) Isolation and characterization of *Muscodora albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. *Plant Science* **169**, 854-861.
- Bai ZQ., Lin X., Wang Y., Wang J., Zhou X., Yang B., Liu J., Yang X., Wang Y. and Liu Y. (2014) New phenyl derivatives from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 derived of mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia* **95**, 194-202.
- Benhamou N. and Chet I. (1997) Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2095-2099.
- Berdy J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics* **58**, 1-26.
- Betina V. (1992) Biological effects of the antibiotic brefeldin A (Decumbin, cyanein, ascotoxin, synergisidin): A retrospective. *Folia Microbiologica* **37**, 3-11.
- Calhoun LA., Findlay JA., David MJ. and Whitney NJ. (1992) Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. *Mycological Research* **96**, 281-286.
- Callan EB., Rogers DJ. (1993) A synoptic key to *Xylaria* species from continental United States and Canada based on cultural and anamorphic features. *Mycotaxon* **46**, 141-154.
- Cano LAO. (2015) Hongos asociados a *Salvia* sp., como una fuente de metabolitos secundarios con potencial antifúngico y fitotóxico, útiles en la agricultura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cao R., Liu X., Gao K., Mendgen K., Kang Z., Gao J., Wang X. (2009) Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Current Microbiology* **59**, 584-592.
- Capasso R., Lacobellis NS., Bottalico A. and Randazzo G. (1984) Structure toxicity relationships of the eremophilane phenomene and PR-toxin. *Phytochemistry* **23**, 2781-2784.
- Chacko JR., Rogers DJ. (1981) Cultural characteristics of some species of *Xylaria*. *Mycologia* **73**, 415-428.
- Chatterjee S., Kuang Y., Splivallo R., Chatterjee P. and Karlovsky P. (2016) Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology* **16**, 83.



- Chaudhary B. (2013) Plant Domestication and Resistance to Herbivory. *International Journal of Plant Genomics* **2013**, 14.
- Chen L., Chen J., Zheng X., Zhang J., and Yu X. (2007) Identification and antifungal activity of the metabolite of endophytic fungi isolated from *Llex cornuta*. *Chinese Journal of Pesticide Science* **9**, 143-148.
- Cheng F. and Cheng Z. (2015) Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1020.
- Chet I. and Inbar J. (1994) Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **48**, 37-43.
- Costa TR., Fernandes OFL., Santos SC., Oliveira CMA., Lião LM., Ferri PH., Paula JR., Ferreira HD., Sales BHN., Silva M do RR. (2000) Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethnopharmacology* **72**, 111-117.
- Cota BB., Rosa LH., Caligiorme RB., Rabelo AL., Almeida TM., Rosa CA. and Zani CL. (2008) Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters* **285**, 177-182.
- Cui JL., Guo SX. and 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.
- Cutler HG. and LeFiles JH. (1978) Trichodermin: Effects on plants. *Plant and Cell Physiology* **19**, 177-182.
- da Silva BP. and Parente JP. (2010) Chemical properties and antiinflammatory activity of a galactomannoglucan from *Arecastrum romanzoffianum*. *Phytochemistry Letters* **3**, 109-112.
- Dai C., Yu B., Zhao Y., Yang Q. and Jiang J. (2005) Correlation between inhibition activity of endophytic fungus from *Euphorbia pekinensis* and its host. *The Journal of Applied Ecology* **16**, 1290-1294.
- Dai J., Krohn K., Draeger S. and Schulz B. (2009) New Naphthalene-Chroman Coupling Products from the Endophytic Fungus, *Nodulisporium* sp. from *Erica arborea*. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, 1564-1569.
- Dai J., Krohn K., Floerke U., Draeger S., Schulz B., Kiss SA., Antus S., Kurtan, T. and van Ree T. (2006) Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp from *Juniperus cedre*. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, 3498-3506.
- Daisy BH., Strobel GA., Castillo U., Ezra D., Sears J., Weaver DK. and Runyon JB. (2002) Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **148**, 3737-3741.
- Di Francesco A., Ugolini L., Lazzeri L. and Mari M. (2015) Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control* **81**, 8-14.
- Dorado O., Dulce M., Arias GA., Maldonado B. (2002) Educación ambiental para la biodiversidad en el trópico seco, Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, Morelos, México. *Tópicos en Educación Ambiental* **4**.
- Dugan F. (2006) The identification of fungi 2ª edición United States of America.
- Durand L. and Vázquez LB. (2011) Biodiversity conservation discourses. A case study on scientists and government authorities in Sierra de Huautla Biosphere Reserve, Mexico. *Land Use Policy* **28**, 76-82.
- Elad Y., Chet I. and Henis Y. (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* **28**, 719-725.
- Ezra D., Hess WM. and Strobel GA. (2004) New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a



- volatile antibiotic producing fungus. *Microbiology* **150**, 4023-4031.
- Ezra D. and Strobel G.A. (2003) Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. *Plant Science* **165**, 1229-1238.
- Falcão MA., Fianco ALB., Lucas AM., Pereira MAA., Torres FC., Vargas RMF. and Cassel E. (2012) Determination of antibacterial activity of vacuum distillation fractions of lemongrass essential oil. *Phytochemistry Reviews* **11**, 405-412.
- Fennell BJ., Carolan S., Petti, G.R. and Bell A. (2003) Effects of the antimitotic natural product dolastatin 10, and related peptides, on the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**, 833-841.
- Fesel PH. and Zuccaro A. (2016) Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology* **32**, 103-112.
- Fisher PJ. and Petrini O. (1992) Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist* **120**, 137-143.
- Föster H., Driever GF., Thompson DC and Adaskaveg JE. (2007) Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the "reduced-risk" fungicides fludioxonil and fenhexamid. *Plant Disease* **91**, 209-215.
- Fournier J., Flessa F., Peršoh D. and Stadler M. (2010) Three new *Xylaria* species from southwestern Europe. *Mycological Progress* **10**, 33-52.
- Fu KG., Chuan CD. and Xiao ZL. (2010) Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research* **4**, 1346-1351.
- Gao SS., Li XM., Li CS., Proksch P. and Wang BG. (2011) Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**, 2894-2897.
- García-Méndez MC., Macías-Ruvalcaba NA., Lappe-Oliveras P., Hernández-Ortega S. and Macías-Ruvalcaba ML. (2016) Phytotoxic Potential of Secondary Metabolites and Semisynthetic Compounds from Endophytic Fungus *Xylaria feejeensis* Strain SM3e-1b Isolated from *Sapium macrocarpum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 4255-4263.
- Gepts P. (2003) Crop Domestication as a Long-Term Selection Experiment. In *Plant Breeding Reviews*. pp.1-44: John Wiley & Sons, Inc.
- González CA., Reina M., Gutiérrez C., Fraga B. (2002) Natural insecticides: Structure Diversity, Effects and Structure-Activity Relationships. A case stud. In *Studies in Natural Products Chemistry* ed. Elsevier-Amsterdam. pp.849-879.
- Grosch R., Scherwinski K., Lottmann J. and Berg G. (2006) Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycological Research* **110**, 1464-1474.
- Hall T. (2005) BioEdit: Biological Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP.
- Hamayun M., Khan SA., Khan AL., Rehman G., Sohn EY., Shah AA., Kim SK., Joo GJ. and Lee IJ. (2009) *Phoma herbarum* as a new gibberellin-producing and plant growth-promoting fungus. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**, 1244-1249.
- Hammond-Kosack KE. and Parker JE. (2003) Deciphering plant-pathogen communication: Fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 177-193.
- Harold S., Tordoff GM., Jones TH. and Boddy L. (2005) Mycelial responses of *Hypholoma fasciculare* to collembola grazing: effect of inoculum age, nutrient status and resource quality. *Mycological Research* **109**, 927-935.
- Harri E., Loeffler W., Sigg HP., Stähelin H. and Tamm C. (1963) Über die Isolierung der stoffwechselprodukte aus *Penicillium*



- brefeldianum* Dodge. *Helvetica Chimica Acta* **46**, 1235-1243.
- Harris MJ. and Boddy L. (2005) Nutrient movement and mycelial reorganization in established systems of *Phanerochaete velutina*, following arrival of colonized wood resources. *Microbial ecology* **50**, 141-151.
- Heilmann-Clausen J. and Boddy L. (2005) Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: exudates from colonized wood influence growth by other species. *Microbial Ecology* **49**, 399-406.
- Herre EA., Mejia LC., Kylo DA., Castillo M. and Ramirez LA. (2005) Anti-pathogen effects of fungal endophytes in tropical host plants. *Phytopathology* **95**, S138-S138.
- Horn WS., Simmonds, MSJ., Schwartz RE. and Blaney WM. (1995) Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron* **51**, 3969-3978.
- Hu JF., Wunderlich D., Thiericke R., Dahse HM., Grabley S., Feng XZ. and Sattler I. (2003) Jenamidines A to C: unusual alkaloids from *Streptomyces* sp. with specific antiproliferative properties obtained by chemical screening. *The Journal of Antibiotics* **56**, 747-754.
- Hung R., Lee S., Rodriguez-Saona C., Bennett JW. (2014) Common gas phase molecules from fungi affect seed germination and plant health in *Arabidopsis thaliana*. *AMB Express* **4**.
- Ibarra JE., Castro MCDR., Galindo E., Patiño M., Serrano L., García R., Bravo A. (2006) Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **48**, 113-120.
- Ibrahim A., Sørensen D., Jenkins HA., McCarry BE. and Sumarah MW. (2014) New diplosporin and agistatine derivatives produced by the fungal endophyte *Xylaria* sp. isolated from *Vitis labrusca*. *Phytochemistry Letters* **9**, 179-183.
- Ibrahim SRM., Elkhayat ES., Mohamed GA., Khedr AIM., Fouad MA., Kotb MHR. and Ross SA. (2015) Aspernolides F and G, new butyrolactones from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. *Phytochemistry Letters* **14**, 84-90.
- INE, SEMARNP (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca) (1996) Lo que usted debe saber sobre los plaguicidas Instituto Nacional de Ecología, 18.
- Isaka M., Chinthanom P., Boonruangprapa T., Rungjindamai N. and Pinruan U. (2010) Eremophilane-Type Sesquiterpenes from the Fungus *Xylaria* sp. BCC 21097. *Journal of natural products* **73**, 683-687.
- Isaka M., Srisanoh U., Sappan M., Kongthongo S. and Srikitikulchai P. (2012) Eremophilane and eudesmane sesquiterpenoids and a pimarane diterpenoid from the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC 5484. *Phytochemistry Letters* **5**, 78-82.
- Isaka M., Yangchum A., Supothina S., Chanthaket R. and Srikitikulchai, P. (2014) Isopimaranes and eremophilanes from the wood-decay fungus *Xylaria allantoides* BCC 23163. *Phytochemistry Letters* **8**, 59-64.
- Iwamoto M., Miyano M., Utsugi M., Kawada H. and Nakada M. (2004) Synthetic studies on the seven- and eight-membered rings by the intramolecular Nozaki-Hiyama reaction of the allylic phosphates. *Tetrahedron Letters* **45**, 8653-8657.
- Haruhiro F., Etsuko N., Emi O., and Masami I. (2000) Immunomodulatory Constituents from an Ascomycete, *Emericella aurantio-brunnea*. *Chem Pharma Bull* **48**, 1436-1441.
- Jiménez-Romero C., Ortega-Barria E., Arnold, AE. and Cubilla-Rios L. (2008) Activity against *Plasmodium falciparum* of lactones isolated from the endophytic fungus *Xylaria* sp. *Pharmaceutical Biology* **46**, 700-703.
- Johann S., Rosa LH., Rosa CA., Perez P., Cisalpino PS., Zani CL. and Cota BB. (2012) Antifungal activity of altenusin isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp. against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Revista Iberoamericana de Micología* **29**, 205-209.



- Kaul S., Ahmed M., Sharma T. and Dhar MK. (2014) Unlocking the Myriad Benefits of Endophytes: An Overview, In: Kharwar RN. et al. (eds), *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*, Springer India pp. 41-57.
- Kavroulakis N., Ntougias S., Zervakis GI, Ehaliotis C., Haralampidis K. and Papadopoulou KK. (2007) Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3853-3864.
- Kharwar RN., Verma VC., Kumar A., Gond SK., Harper JK., Hess WM., Lobkovosky E., Ma C., Ren Y. and Strobel GA. (2009) Javanicin, an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of neem, *Chloridium* sp. *Current Microbiology* **58**, 233-238.
- Kim IH., Takashima S., Hitotsuyanagi Y., Hasuda T. and Takeya K. (2004) New Quassinoids, Javanicolides C and D and Javanicosides B-F, from Seeds of *Brucea javanica*. *Journal of Natural Products* **67**, 863-868.
- Kocić TS., Lević J., Tanackov I., Tuco D., (2011) Antifungal activities of basil (*Ocimum basilicum* L.) extract on *Fusarium* species. *African Journal of Biotechnology* **10**, 10188-10195
- Kordali S., Cakir A., Akcin TA., Mete E., Akcin A., Aydin T. and Kilic H. (2009) Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Industrial Crops and Products* **29**, 562-570.
- Kornerup A., Wanscher JH. (1978) *The methuen handbook of colour*. Eyre Methuen Ltd, Londres, Inglaterra.
- Kudalkar P., Strobel G., Riyaz-UI-Hassan S., Geary B. and Sears J. (2012) *Muscodor sutura*, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities. *Mycoscience* **53**, 319-325.
- Lazo JS., Tamura K., Vogt A., Jung JK., Rodríguez S., Balachandran R., Day BW. and Wipf P. (2001) Antimitotic actions of a novel analog of the fungal metabolite palmarumycin CP1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **296**, 364-371.
- Liu JY., Song YC., Zhang Z., Wang L., Guo ZJ., Zou WX. and Tan R.X. (2004) *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology* **114**, 279-287.
- Liu L., Liu S., Chen X., Guo L. and Che Y. (2009) Pestalofones A-E, bioactive cyclohexanone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**, 606-613.
- Liu S. and Jiang Y. (2010) Identification of differentially expressed genes under drought stress in *Perennial ryegrass*. *Physiologia Plantarum* **139**, 375-387.
- Liu X., Dong M., Chen X., Jiang M., Lv X. and Zhou J. (2008) Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Applied microbiology and biotechnology* **78**, 241-247.
- Ludwig MJ. (2015) Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology letters* **37**, 1325-1334.
- Macías-Rubalcava ML., Hernández-Bautista BE., Jimenez-Estrada M., Gonzalez-MC., Glenn AE., Hanlin RT., Hernández-Ortega S., Saucedo-Garcia A., Muria-González JM. and Anaya AL. (2008) Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* **69**, 1185-1196.
- Macias-Rubalcava ML., Hernández-Bautista BE., Oropeza F., Duarte G., González MC., Glenn AE., Hanlin RT. and Anaya AL. (2010) Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodor yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology* **36**, 1122-1131.
- Macias-Rubalcava ML., Ruíz-Velasco SME., Melendez-Garcia C., King-Diaz B. and Lotina-Hennsen B. (2014) Selected phytotoxins and



- organic extracts from endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as light reaction of photosynthesis inhibitors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology* **138**, 17-26.
- Manczinger, L., Antal, Z. and Kredics, L. (2002) Ecophysiology and breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains (a review). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **49**, 1-14.
- Manter DK., Kelsey RG. and Karchesy JJ. (2007) Antimicrobial activity of extractable conifer heartwood compounds toward *Phytophthora ramorum*. *Journal of Chemical Ecology* **33**, 2133-2147.
- Martínez GI. (2015) Hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* (Fabacea) productores de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y herbicida. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez M. (1979) Catálogo de Nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas Fondo de Cultura Económica. México. pp 1127
- Martínez-Luis S., Della-Tonga G., Coley PD., Kursar TA., Gerwick WH. and Cubilla RL. (2008) Antileishmanial Constituents of the Panamanian Endophytic Fungus *Edenia* sp. *Journal of Natural Products* **71**, 2011-2014.
- Mercier J. and Jiménez JI. (2004) Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biology and Technology* **31**, 1-8.
- Mercier J. and Manker DC. (2005) Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodor albus*. *Crop Protection* **24**, 355-362.
- Mier T., Rivera FB., Ayala ZC., Toriello S. Aguilar O., Ulloa M. (2013) Métodos experimentales para el estudio de hongos microscópicos. UNAM México D.F. pp103.
- Naumova ES., Sukhotina NN., Naumov GI. (2004) Molecular-genetic differentiation of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives. *FEMS Yeast Research* **5**, 263-269.
- Oh I., Yang WY., Park J., Lee S., Mar W., Oh KB. and Shin J. (2011) In vitro Na⁺/K⁺-ATPase inhibitory activity and antimicrobial activity of sesquiterpenes isolated from *Thujopsis dolabrata*. *Archives of Pharmacal Research* **34**, 2141-2147.
- Osono T., To-Anun C., Hagiwara Y., Hirose D., (2011) Decomposition of wood, petiole and leaf litter by *Xylaria* species from northern Thailand. *Fungal Ecology* **4**, 210-218
- Otto DH., Joanne DZ., Williamson, M. Lotti VJ. Raymond S. Chang L. and Michael AG (1991) Variocolin, a Sesterterpenoid of Novel Skeleton from *Aspergillus variecolor*. *Journal of Natural Products* **56**, 3399-3403.
- Park JH., Choi GJ., Lee HB., Kim KM., Jung HS., Lee SW., Jang KS., Cho KY. and Kim JC. (2005) Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **15**, 112-117.
- Partida MLP. and Heil M. (2011) The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science* **2**, 100.
- Pérez-Jaramillo JE., Mendes R. and Raaijmakers JM. (2016) Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Molecular Biology* **90**, 635-644.
- Pitaroskili D., Tzakou O., Loukis A., Havala C., (2003) Volatile Metabolites from *Salvia fruticosa* as Antifungal Agents in Soilborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 3294-3301.
- Polizzi V., Fazzini L., Adams A., Picco AM., De Saeger S., Van Peteghem C. and De Kimpe, N. (2011) Autoregulatory properties of (+)-thujopsene and influence of environmental conditions on its production by *Penicillium decumbens*. *Microbial Ecology* **62**, 838-852.



- Pongcharoen W., Rukachaisirikul V., Phongopaichit S., Rungjindamai N., and Sakayaroj J. (2006). Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44. *Journal of Natural Products* **69**, 856–858.
- Qin JC., Zhang YM., Gao JM., Bai MS., Yang SX., Laatsch H. and Zhang AL. (2009) Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 1572-1574.
- Ratnaweera PB., Williams DE., de Silva ED., Wijesundera RL., Dalisay DS and Andersen RJ. (2014) Helvolic acid, an antibacterial nortriterpenoid from a fungal endophyte, sp. of *Oorchid endemic* to Sri Lanka. *Mycology* **5**, 23-28.
- Riga E., Lacey LA. and Guerra N. (2008) *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. *Biological Control* **45**, 380-385.
- Rivera-Chávez J., Figueroa M., Gonzalez M del C., Glenn AE. and Mata R. (2015) Alpha-Glucosidase Inhibitors from a *Xylaria feejeensis* Associated with *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products* **78**, 730-735.
- Rivero-Chávez JF. (2008) Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal Ethnopharmacol* **119**, 99-103.
- Rodriguez EAE., Hegeman A., Kistler HC. and May G. (2011) In vitro interactions between *Fusarium verticillioides* and *Ustilago maydis* through real-time PCR and metabolic profiling. *Fungal Genetics and Biology : FG & B* **48**, 874-885.
- Rodriguez EAE., Jonkers W., Kistler HC. and May G. (2012) Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays*: an endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genetics and Biology : FG & B* **49**, 578-587.
- Rodriguez RJ., White JF., Arnold AE. and Redman RS. (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New Phytologist* **182**, 314-330.
- Rogers JD. (1985) Anamorphs of *Xylaria*: Taxonomic Considerations. . *Sydowia, Annales Mycolgici Ser II* **30**, 22-262.
- Rukachaisirikul V., Sommart U., Phongopaichit S., Sakayaroj J. and Kirtikara K. (2008) Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry* **69**, 783-787.
- Rusch A., Valantin MM., Sarthou JP. and Roger EJ. (2010) Biological control of insect pests in agroecosystems: effects of crop management, farming systems, and seminatural habitats at the landscape scale: a review. In *Advances in Agronomy*, Vol **109** ed. Sparks, D.L. pp.219-259. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Saari S. and Faeth SH. (2012) Hybridization of Neotyphodium endophytes enhances competitive ability of the host grass. *The New Phytologist* **195**, 231-236.
- Sachin N., Manjunatha BL., Kumara PM., Ravikanth G., Shweta S., Suryanarayanan TS., Ganeshaiyah KN. and Shaanker RU. (2013) Do endophytic fungi possess pathway genes for plant secondary metabolites? *Current Science* **104**, 178-182.
- Sánchez-Fernández RE., Diaz D., Duarte G., Lappe-Oliveras P., Sánchez S. and Macías-Rubalcava ML. (2016) Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2II1a: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microbial Ecology* **71**, 347-364.
- Sánchez-Ortiz BL., Sánchez-Fernández RE., Duarte G., Lappe-Oliveras P. and Macías-Rubalcava .M.L. (2016) Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Applied Microbiology* **120**, 1313-1325.



- Sandoval EYKM. (2014) Aislamiento y purificación de hongos endófitos con potencial antifúngico y fitotóxico de *Lysiloma acapulcense*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Santamaria J. and Bayman P. (2005) Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* **50**, 1-8.
- Santos FFC., da Silva AL. and Rodrigues FE. (2011) Composition of essential oils from *Cupressus lusitanica* and a Xylariaceous fungus found on its leaves. *Biochemical Systematics and Ecology* **39**, 485-490.
- Saroj A., Pragadheesh VS., Palanivelu YA., Singh SC., Samad A., Negi AS and Chanotiya CS. (2015) Anti-phytopathogenic activity of *Syzygium cumini* essential oil, hydrocarbon fractions and its novel constituents. *Industrial Crops and Products* **74**, 327-335.
- Schulz B., Sucker J., Aust HJ., Krohn K., Ludwig K., Jones PG. and Döring D. (1995) Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. *Mycological Research* **99**, 1007-1015.
- Sette LD., Passarini MRZ., Delarmelina C., Salati F. and Duarte MCT. (2006) Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**, 1185-1195.
- Shen L., Zhu L., Luo Q., Li XW., Xi JQ., Kong GM. and Song YC. (2015) Fumigaclavine I, a new alkaloid isolated from endophyte *Aspergillus terreus*. *Chinese Journal of Natural Medicines* **13**, 937-941.
- Shin DS., Oh MN., Yang HC. and Oh KB. (2005) Biological characterization of periconicins, bioactive secondary metabolites, produced by *Periconia* sp OBW-15. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **15**, 216-220.
- Silva GH., de Oliveira CM., Teles HL., Pauletti PM., Castro GI., Silva DHS., Bolzani VS., Young MCM., Costa NCM., Pfenning LH., Berlinck RGS. and Araujo AR. (2010) Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). *Phytochemistry Letters* **3**, 164-167.
- Singh SK., Strobel GA., Knighton B., Geary B., Sears J. and Ezra D. (2011) An endophytic *Phomopsis* sp. possessing bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds. *Microbial Ecology* **61**, 729-739.
- Smith HC., Larsen HO. and Pouliot M. (2012) People, plants and health: a conceptual framework for assessing changes in medicinal plant consumption. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **8**, 43.
- Song XQ., Zhang X., Han QJ., Li XB., Li G., Li RJ., Jiao Y., Zhou JC. and Lou HX. (2013) Xanthone derivatives from *Aspergillus sydowii*, an endophytic fungus from the liverwort *Scapania ciliata* S. Lac and their immunosuppressive activities. *Phytochemistry Letters* **6**, 318-321.
- Srinuan TSP., Sophon R., Amorn PNM. and Prakitsin SNC. (2007) Antimalarial Benzoquinones from an Endophytic Fungus, *Xylaria* sp. *Journal of Natural Products* 1620-1623.
- Stadler M. and Keller NP. (2008) Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. *Mycological Research* **112**, 127-130.
- Stinson AM., Zidack NK., Strobel GA., Jacobsen BJ. (2003) Mycofumigation with *Muscodor albus* and *Muscodor roseus* for Control of Seedling Diseases of Sugar Beet and Verticillium Wilt of Eggplant. *Plant Disease* **87**, 1349-1354.
- Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J. (2004) Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products* **67**, 257-268.
- Strobel G. (2006) *Muscodor albus* and its biological promise. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **33**, 514-522.
- Strobel G. and Daisy B. (2003) Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 491-502.



- Strobel GA., Dirkse E., Sears J. and Markworth C. (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **147**, 2943-2950.
- Strobel GA., Torczynski R. and Bollon A. (1997) *Acremonium* sp. a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science* **128**, 97-108.
- Suryanarayanan TS., Thirunavukkarasu N., Govindarajulu MB., Sasse F., Jansen R. and Murali TS. (2009) Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews* **23**, 9-19.
- Suwanarach N., Kumla J., Bussaban B., Nuangmek W., Matsui K. and Lumyong S. (2013) Biofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit. *Crop Protection* **45**, 63-70.
- Tomsheck AR., Strobel GA., Booth E., Geary B., Spakowicz D., Knighton B., Floerchinger C., Sears J., Liarzi O. and Ezra D. (2010) *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. *Microbial Ecology* **60**, 903-914.
- Tripathi S., Kamal S., Sheramati I., Oelmuller R. and Varma A. (2008) Mycorrhizal Fungi and Other Root Endophytes as Biocontrol Agents Against Root Pathogens. In *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics* ed. Varma, A. pp.281-306.
- Berlin H.S. Tuntiwachwuttikul P., Phansa P., Pootaeng-On Y. and Taylor W.C. (2006) Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. *Chemical & Pharmaceutical bulletin* **54**, 149-151.
- Tuntiwachwuttikul P., Pootaeng-On Y., Phansa P., Limpachayaporn P., Charoenchai P. and Taylor WC. (2007) Constituents of the leaves of *Holarrhena pubescens*. *Fitoterapia* **78**, 271-273.
- Venugopalan A. and Srivastava S. (2015) Endophytes as *in vitro* production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* **33**, 873-887.
- Wang JW., Zheng LP. and Tan RX. (2006) The preparation of an elicitor from a fungal endophyte to enhance artemisinin production in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Sheng wu gong cheng xue bao. Chinese Journal of Biotechnology* **22**, 829-834.
- Wang JZ., Zhang M., Ren, FZ., Han BZ., Wang L., Chen SW. and Humera A. (2007) Changes of chemical and nutrient composition of porcine blood during fermentation by *Aspergillus oryzae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**, 1393-1399.
- Wang Y. and Dai CC. (2010) Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology* **61**, 207-215.
- White TJ., Bruns TD., Lee S., Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols :a Guide to Methods and Applications* Academic Press, New York Ed. Innis MA., Gelfand DH., Sninsky JS., White TJ. New York.
- Wicklow DT and Poling SM. (2009) Antimicrobial activity of pyrrolicidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. *Phytopathology* **99**, 109-115.
- Wu SH., He J., Li XN., Huang R., Song F., Chen YW. and Miao CP. (2014) Guaiane sesquiterpenes and isopimarane diterpenes from an endophytic fungus *Xylaria* sp. *Phytochemistry* **105**, 197-204.
- Yoganathan KCR., Robert P., Glover S., Cao JJ., Vittal S., Ng YH., Antony DB. and Mark SB. (2004) Inhibition of the Human Chemokine Receptor CCR5 by Variocolin and Variocolin Analogues, Emericolins A-D, from *Emericella aurantiobrunnea*. *Journal of Natural Products* **67**, 1681-1684.
- Yoshihara T., Togiya S., Koshino H., Sakamura S., Shimanuki T., Sato T. and Tajimi A. (1985) Three fungitoxic cyclopentanoid sesquiterpenes



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

from stromata of *Epichloe typhina*. Tetrahedron Letters **26**, 5551-5554.

Yoshihito STM., Koetsu T., Katsuhide O., Shigeyoshi K. and Michimasa I. (2005) Three oxygenated cyclohexenone derivatives produced by an endophytic fungus. Biosci Biotechnol Biochem **69**, 287-292.

Yu H., Zhang L., Li L., Zheng C., Guo L., Li W., Sun P. and Qin L. (2010) Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. Microbiological Research **165**, 437-449.

Yuan L., Zhao PJ., Ma J., Lu CH., and Shen YM. (2009). Labdane and tetranorlabdane diterpenoids from *Botryosphaeria* sp. MHF, an endophytic fungus of *Maytenus hookeri*. Helvetica Chimica Acta **92**, 1118–1125.

Yuen TK., Hyde KD., and Hodgkiss IJ. (1999). Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fung. Microbial Ecology **37**, 257-262.

Zhang HC., Ma YM., Liu R. and Zhou F. (2012) Endophytic fungus *Aspergillus tamarii* from *Ficus carica* L., a new source of indolyl diketopiperazines. Biochemical Systematics and Ecology **45**, 31-33.

Zheng M., Shi J., Shi J., Wang Q. and Li Y. (2013) Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. Biological Control **65**, 200-206.

Zou WX., Meng JC., Lu H., Chen GX., Shi GX., Zhang TY. and Tan RX. (2000) Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mongolica*. Journal of Natural Products **63**, 1529-1530.

Páginas de internet:

GenBank

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>



Anexo

ORIGINAL ARTICLE

Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto*

B.L. Sánchez-Ortiz¹, R.E. Sánchez-Fernández¹, G. Duarte², P. Lappe-Oliveras³ and M.L. Macías-Rubalcava¹

1 Instituto de Química, Departamento de Productos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Coyoacán, México

2 Facultad de Química, Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Coyoacán, México

3 Instituto de Biología, Departamento de Botánica, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Coyoacán, México

Keywords

biological control, endophytic fungus, solid phase microextraction, volatile metabolites, weed control, *Xylaria* sp.

Correspondence

Martha L. Macías-Rubalcava, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F. 04510, México.

E-mails: mmacias@iquimica.unam.mx; mamaciasr@gmail.com

Taken in part from the PhD thesis of Brenda Lorena Sánchez.

2016/0059: received 7 October 2015, revised 4 February 2016 and accepted 13 February 2016

doi:10.1111/jam.13101

Abstract

Aims: To determine the antifungal, anti-oomycete and phytotoxic activity; and chemical composition of the volatile organic compounds (VOCs) produced by endophytic fungus *Xylaria* sp. PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto* Karst.

Methods and Results: Bioactivity and chemical composition of the VOCs from *Xylaria* sp. PB3f3 were established by using simple and multiple antagonism bioassays, and gas chromatography/mass spectrometry, respectively. The results showed that *Xylaria* sp. PB3f3 inhibited the growth of the oomycetes *Pythium aphanidermatum* (78.3%), *Phytophthora capsici* (48.3%), and the fungi *Alternaria solani* (24.5%) and *Fusarium oxysporum* (24.2%), in multiple antagonism bioassays. Volatile organic compounds, produced at 20 and 30 days of fungal growth, inhibited root elongation on *Amaranthus hypochondriacus* (27.6%) and on *Solanum lycopersicum* (53.2%). Forty VOCs were identified at 10, 20 and 30 days in *Xylaria* sp. PB3f3 cultures. The compounds with the highest fibre affinity were: 3-methyl-1-butanol and thujopsene, at 10 days of fungal growth; an unidentified amine and 2-methyl-1-butanol at 20 days; and 2-methyl-1-propanol at 30 days. In the gas phase assay method 2-methyl-1-propanol and 2-methyl-1-butanol showed significant inhibitory effects on root elongation and germination of *Am. hypochondriacus* and *S. lycopersicum*.

Conclusions: *Xylaria* sp. PB3f3 and its VOCs showed significant phytotoxic effects on root elongation and germination of *Am. hypochondriacus* and *S. lycopersicum*.

Significance and Impact of the Study: The genus *Xylaria* produces a great variety of secondary metabolites, but, up date, there are no reports of the identification of bioactive volatile compounds. Thus, *Xylaria* sp. PB3f3 and its VOCs are a possible candidate for the biological control of weeds.

Introduction

Endophytic fungi are micro-organisms that colonize the tissue of its host plant in an inter, or intra, cellular way without apparently causing symptoms of disease (Aly

et al. 2011). These micro-organisms produce a large number of secondary bioactive metabolites, useful in medicine (Sette *et al.* 2006; Yu *et al.* 2010; Cui *et al.* 2011), industry and agriculture (Suryanarayanan *et al.* 2009; Wang and Dai 2010).

In agriculture, endophytic fungi and their volatile or non-volatile metabolites have potential as biocontrol agents against pathogenic micro-organisms of crops, insects and weeds (Mercier and Jiménez 2004; Macías-Rubalcava *et al.* 2010, 2014; Brum *et al.* 2012; Suwanarach *et al.* 2013). One example is the case of the genera *Muscodora* and *Trichoderma*. They are producers of volatile organic compounds (VOCs) with a large biological potential, such as antimicrobial compounds against different fungal species (*Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*) and oomycetes (*Aphanomyces cochlioides*, *Pythium ultimum*) (Stinson *et al.* 2003; Mercier and Smilanick 2005; Schotsmans *et al.* 2008; Hung *et al.* 2013; Chen *et al.* 2015). These volatile compounds are used as agents in mycofumigation or biofumigation (Daisy *et al.* 2002).

The genus *Xylaria* Hill (ex Schrank, 1789, Xylariaceae) covers several fungal species ubiquitously present in vascular plants (Fournier *et al.* 2010). The endophytic species of *Xylaria* produces a large variety of secondary metabolites with different chemical structures, such as cytochalasins, terpenoids, alkaloids, coumarins and benzoquinones; with several biological activities such as phytotoxic, antifungal, antimalarial and antibacterial, among others (Tansuwan *et al.* 2007; Liu *et al.* 2008; Silva *et al.* 2010; Santos Filho *et al.* 2011; Isaka *et al.* 2012; Ratnaweera *et al.* 2014; Wu *et al.* 2014).

According to phylogenetic studies, the genera *Muscodora* and *Xylaria* are anamorphs of the Xylariaceae family and belong to the Xylarioid group (Yuan *et al.* 2011); because of this, it is probable that *Xylaria* also produces volatile compounds with possible application as biocontrol agents. However, there are no reports of volatile compounds with biological activity produced by *Xylaria* species.

The objective of this study is to determine the antifungal, anti-oomycete and phytotoxic activity, and the chemical composition of the VOCs produced by the endophytic fungus *Xylaria* sp. PB3f3 isolated from *Hae-matoxylon brasiletto* Karst, employing simple and multiple antagonism bioassays against fungal and oomycetes plant pathogens; and to evaluate its phytogrowth-inhibitory activity on seed germination, root elongation and seedling respiration on two model plants.

Materials and methods

Fungal isolation

The endophytic fungus PB3f3 was isolated from healthy *H. brasiletto* Karst leaves (Fabaceae), collected at the 'Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla' (REBIOSH) at

Quilamula (18°30'4.1" N – 98°51'52" W and 18°32'12.2" N – 99°02'05" W; 1080–1230 m.a.s.l.) Morelos, Mexico, in September 2010.

The leaves were washed with running and distilled water and the surface was sterilized with the following sequence of solutions: 75% ethanol for 60 s; sterile distilled water, 3.4% sodium hypochlorite (65% Clorox®) (The Clorox company, Tlalnepantla Estado de México, México) for 60 s; and sterile distilled water (Rodrigues 1994). The surface-sterilized leaves were dried using sterile filter paper (Whatman® qualitative, Grade 1), after that the leaves were cut into 2 × 2 mm pieces at the central vein level, and four pieces were placed (per plate) in two different growth conditions, distilled water agar (WA) and natural potato-dextrose-agar (PDA) plates. Both media were added with chloramphenicol (500 mg l⁻¹) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), in order to inhibit bacterial growth. Plates were incubated at 25°C, and in 12:12 h light–dark photoperiod with a T12 30 W fluorescent light (Phillips, Chihuahua, México). They were observed daily. Fungal colonies emerging from the leaf pieces were isolated and re-cultured on PDA until pure cultures were obtained.

The purified PB3f3 strain was preserved in PDA slants at the Instituto de Química, UNAM, as well as in the Laboratorio de Micología C006, Instituto de Biología, UNAM in WA (0.2%) at 4°C, and in 30% glycerol–potato dextrose broth (PDB) at –80°C. Dried PDA and oatmeal agar (OA) cultures were deposited at the Herbario Nacional de México (MEXU), UNAM, with the collection number MEXU 27-559.

Identification of the strain PB3f3

Morphological characteristics and sequencing of the ITS1-5.8-ITS2 region were used for taxonomic identification. For examination of the macro and micro morphological characteristics the strain PB3f3 was grown onto PDA plates at 27°C, in 12:12 h light–dark photoperiod for 8 weeks. Cultures were observed daily to measure the growth rate, for colony description and observation of morphological structures in a brightfield microscope. Colony and pigment colours were determined with the Methuen Handbook of Colors (Kornerup and Wanscher 1978).

For sequence analysis, the total genomic DNA was extracted from mycelium collected from a 7-old-day PDA culture with a FT71415 Rapid Fungal Genomic DNA isolation kit (Bio Basic Inc, Markham, ON, Canada). The ITS-5.8 S region was amplified with the universal ITS primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.* 1990). The PCR reaction was performed in a Thermal

Cycler Gernandt 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA) with a reaction volume of 50 μl containing 25 μl GoTaq[®] Master Mix (Promega, Madison, WI), 2.5 μl of each primer (10 pm μl^{-1}) and 5 ng genomic DNA. The PCR programme, modified from Naumova *et al.* (2004), consisted of an initial denaturing step at 94°C for 1 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 2 min at 58°C, 1 min at 72°C, and a final extension step for 5 min at 72°C. The amplification product was separated by electrophoresis in 0.8% (w/v) agarose gel (Invitrogen, Carlsbad, CA), stained with gel red (Biotium, Hayward, CA) in 1 \times TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer at 90 V for 40 min; and, visualized under Benchtop Dual-Intensity Transilluminator (UVP Inc., Upland, CA). The sequence was obtained by the Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología UNAM, and then edited using the BIOEDIT Program v 7.0.5 (Hall 2005). The edited sequence was aligned against GenBank sequences (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BLASTN program (Altschul *et al.* 1997) and deposited. The GenBank accession number of the strain PB3f3 is depicted in the results section.

Evolutionary relationship of the endophytic fungus PB3f3

The sequence of the endophytic fungus PB3f3 was analysed using BLAST searching against the NCBI nucleotide sequence database. The closest resulting sequences (12 references and the strain PB3f3 isolated in this study) were aligned, with gaps treated as missing data. A distance genetic tree was generated using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987). Evolutionary distances were computed using the p-distance method (Nei and Kumar 2000) and evolutionary analyses were conducted in MEGA v (Tamura *et al.* 2011).

Multiple direct antagonism bioassay

Four 5 mm diameter inocula of *Xylaria* sp. PB3f3, obtained from a 8-day-old PDA culture at 28°C, were placed at the centre of the Petri dish with a 3.5 cm separation between them, and incubated at 28°C for 1, 3, 5 and 7 days with 12:12 h (light–dark) photoperiod. Then, two 5 mm inocula obtained from a 10-day-old PDA culture at 28°C of the economically important plant pathogenic oomycetes *Pythium aphanidermatum* and *Phytophthora capsici*, and the fungi *Alternaria solani* and *Fusarium oxysporum* were placed at 2.5 cm on each side of each inoculum of the *Xylaria* sp. PB3f3, respectively. The plant pathogenic micro-organisms used in the bioassays were donated by the Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.

The plates were sealed with Parafilm[®] (Probiotek, San Nicolás de los Garza, México) and incubated in the conditions described above. The average diameter measurement for each mycelium plant pathogen was recorded after 3 and 6 days of antagonistic interaction. The percentages of growth inhibition of plant pathogenic micro-organisms were determined, compared with their respective controls. Four replicate plates were used for each multiple antagonism bioassay. The controls consisted of each plant pathogen growing under the same conditions, without the presence of *Xylaria* sp. PB3f3. The antagonistic interactions were observed until day 40 (Macías-Rubalcava *et al.* 2008; Sánchez-Fernández *et al.* 2016).

Simple direct antagonism bioassay

Simple antagonism bioassays were performed using 9 cm PDA plates. *Xylaria* sp. PB3f3 was pre-inoculated for 1, 3, 5 and 7 days on one side of the plate and incubated under an artificial 12:12 h (light–dark) photoperiod at 28°C. Then, three inocula of 5 mm diameter from the plant pathogenic fungus and oomycete cultures were placed on the shore on the other side of the plate after each pre-inoculation date of *Xylaria* sp. PB3f3, sealed with Parafilm[®] and incubated under the same conditions as mentioned above. The percentages of growth inhibition were measured after 3 and 6 days of antagonistic interaction by measuring the diameter of each mycelium of the plant pathogenic fungi and oomycete, and compared with their respective controls. Four replicates were used for each simple antagonism bioassay. The controls consisted of each fungus growing individually under the same conditions.

The recovery of the micro-organisms was evaluated after 20 days of antagonistic interaction by transferring a plug of the fungi and oomycete colonies to a new PDA plate, and incubating them under the same conditions. The growth of the plant pathogens was compared with controls (Macías-Rubalcava *et al.* 2010; Sánchez-Fernández *et al.* 2016).

Antifungal effect of VOCs in divided Petri dishes

Bioassays were performed in 9 cm two-compartment divided Petri plates, each containing 10 ml PDA. The plate-dividing wall prevented the diffusion of any soluble compounds produced by *Xylaria* sp. PB3f3, but allowed the free exchange of VOCs (Macías-Rubalcava *et al.* 2010). The antifungal activity of the VOCs was tested against plant pathogenic micro-organisms five times: at 1, 3, 5, 10, 20 and 30 days. An inoculum of the endophyte was placed in one of the compartments of the plate, and

incubated at 28°C in a 12:12 h light–dark photoperiod, before the bioassay. The inoculum from the plant pathogenic fungi and oomycete cultures was then placed in the other dish compartment. The plate was sealed with Parafilm® and incubated as described above. The bioassays were carried out in quadruplicate. Control cultures were obtained by growing each plant pathogen alone, under the same conditions. The results of the bioassays were observed for 40 days. The percentage growth inhibitions were calculated after 3 and 6 days by measuring the colony diameter of each plant pathogen, and comparing it with their respective control (Macías-Rubalcava *et al.* 2010; Sánchez-Fernández *et al.* 2016).

Culture and extraction of organic compounds produced by endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3

Fifty 10 cm Petri plates, containing 15 ml PDA medium, were inoculated with a 1 cm² agar plug from the growing periphery of an 8-day mycelium of *Xylaria* sp. PB3f3 growing in PDA, and placed in the centre of a Petri dish. The Petri dishes were incubated at room temperature for 30 days in a 12:12 h light–dark photoperiod under fluorescent light.

At the end of the incubation period, the mycelia and culture medium were mechanically fragmented and, subsequently macerated with 2 l of CH₂Cl₂ (×5). The organic phases were filtered over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to yield 2 g of a reddish solid.

Antifungal and anti-oomycete effect of organic extracts

The inhibitory effect of the organic extract (culture medium and mycelium) from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PB3f3 was tested on the radial growth of the fungi and oomycetes used in the antagonism bioassays described above. The extract was dissolved in maximum 0.5% MeOH; and then evaluated at 250 µg ml⁻¹ in sterile PDA, and before the agar had solidified added to 6 cm Petri dishes. The positive controls were the commercial fungicide Prozycar® (carbendazim: methyl benzimidazol-2-yl-carbamate) (Promotora técnica industrial S.A. de C.V. Morelos, México), and the anti-oomycete Ridomil Gold 4E®, (Metalaxyl: 2-[(2,6-dimethyl-phenyl)-(2-methoxy-acetyl)-amino]-propionic acid methyl ester) (Syngenta Crop protection, Inc., Greensboro, NC), both were added to agar at 250 µg ml⁻¹. Plates with only PDA, and PDA plates with 0.5% MeOH, were used as a negative control. An inoculum (5 mm² agar plug) of each test micro-organism was placed in a Petri dish, and incubated at 28°C in a 12:12 h light–dark photoperiod. The average of two perpendicular diameter measurements of each colony was recorded after 1, 6 and 10 days of incu-

bation, depending on the growth rate of the tested micro-organisms. The experiment used a complete randomized design with four replications per treatment (Macías-Rubalcava *et al.* 2010; Meléndez-González *et al.* 2015).

Phytoinhibitory effect of VOCs in divided Petri dishes

The phytotoxic activity of VOCs from *Xylaria* sp. PB3f3 was evaluated against the seed germination, root elongation and seedling respiration of two dicotyledonous species, *Amaranthus hypochondriacus* Linneo (Amaranthaceae), and *Solanum lycopersicum* Linneo var. *lycopersicum* (Solanaceae). These plants have commonly been used in phytotoxic bioassays. These test plants were selected because of their rapid, homogenous and high frequency germination (Macías-Rubalcava *et al.* 2014). *Am. hypochondriacus* seeds were purchased at a local market at Tulyehualco, Mexico, D.F., and *S. lycopersicum* seeds at Semillas Berentsen, Celaya, Guanajuato, Mexico.

In vitro bioassays were carried out in Petri dishes with two compartments, one containing 10 ml of PDA for *Xylaria* sp. PB3f3 growth; and the other containing 10 ml of WA for seed germination. The PDA was inoculated with a 5 mm diameter agar plug from a *Xylaria* sp. PB3f3 culture. This was incubated at 28°C in darkness for 1, 3, 5, 10, 20, 30 and 40 days. At each incubation time, 30 seeds of *Am. hypochondriacus* or *S. lycopersicum* were sown onto the WA compartment, following a complete randomized design, with four replications per treatment. The plates were wrapped with plastic film layers to avoid leakage of VOCs from the plates, and incubated at 28°C in darkness. *Am. hypochondriacus* and *S. lycopersicum* seed germination, root elongation and seedling respiration were evaluated after 24 or 48 h exposure to VOCs, respectively. Seed germination, root elongation and seedling respiration were compared with controls without *Xylaria* sp. PB3f3 inoculum (Macías-Rubalcava *et al.* 2010, 2014).

Seed respiration was measured polarographically as oxygen uptake during the germination process with a Clark-type electrode connected to an YSI 5300A biological oxygen monitor (YSI Incorporated, Yellow, Springs, OH). The seedlings were transferred into a glass chamber containing 4 ml of air-saturated deionized water at 28°C. Oxygen uptake, in the presence of *Xylaria* sp. PB3f3 VOCs, was measured for 3 min (Macías-Rubalcava *et al.* 2014).

Furthermore, the phytogrowth-inhibitory activity of (±)-2-methyl-1-butanol and 2-methyl-1-propanol was evaluated using a gas phase method. These compounds were purchased from Sigma-Aldrich (≥98% purity). Bioassays were carried out in two-compartment Petri dishes; one containing 10 ml WA (1%) for seeds

germination; and the other containing a handmade aluminium cup located in the centre. Thirty seeds of *Am. hypochondriacus* or *S. lycopersicum* were sown onto the WA compartment following a complete randomized design, with four replications per treatment. To determine the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values, the pure compound concentrations were 3, 5, 10, 20, 40, 80 and $160 \mu\text{g ml}^{-1}$. The organic compounds were added directly to the aluminium cup per 50 cm^3 of air space, above the culture medium in a standard Petri dish. The plates were sealed with Parafilm[®], and incubated at 28°C in darkness. Seed germination, root elongation and seedling respiration were measured 24 h after treatment for *Am. hypochondriacus*, and 72 h for *S. lycopersicum*. The results were obtained as described above.

Analysis of volatile organic compounds

The volatiles were tentatively identified at 10, 20 and 30 days of fungal culture, in triplicate. A 5 mm diameter inoculum from a *Xylaria* sp. culture was placed in solid phase micro extraction (SPME) vials of 40 ml capacity, with a polypropylene hole-cap and PTFE/coated silicone septa containing 15 ml of PDA. The cultures were incubated at 28°C and a 12:12 h (light–dark) photoperiod. Three PDA non-inoculated vials were also evaluated.

The VOCs were obtained by headspace (HS) SPME with a DVB/Carboxen/PDMS fibre (2 cm, 50/30 μm ; Supelco, Bellefonte, PA). The fibre was conditioned before use during 40 min at 300°C , and exposed to the vials HS for 60 min. After VOCs adsorption, the fibre was inserted into the Agilent 6890 N series GC inlet (Agilent Technology, Palo Alto, CA), at 300°C , in splitless mode. The compounds were desorbed for 2 min, and separated on a $20 \text{ m} \times 0.18 \text{ mm} \times 0.18 \mu\text{m}$, DB-5MS capillary column, utilizing the following GC oven temperature programme: 3 min at 40°C up to 300°C for 15 min, at $20^\circ\text{C min}^{-1}$. The flow rate of the helium carrier gas was 1 ml min^{-1} . The GC was coupled to a LECO time of flight mass spectrometer (MS-TOF; Leco Corporation, St Joseph, MI), operating at low resolution, with electronic ionization energy of 70 eV, and scanning at a rate of 20 spec s^{-1} with a mass range of 33–500 *uma*. The transfer line and ionization chamber temperatures were 250°C and 200°C , respectively. A LECO CHROMATOF[™] software system (St Joseph, MI, USA) was used for data acquisition and processing.

Xylaria sp. PB3f3 VOCs tentative identification was performed based on comparison of MS fragmentation patterns with those available in the National Institute of Standards and Technology (NIST) database and those reported by Adams (2007). Kovats retention indices were calculated in relation to the retention times of a series of alkanes (C_8 – C_{20}), and also compared with NIST database

and literature data. Only compounds with quality match scores of $>80\%$ are listed. Compounds identified in the non-inoculated PDA vials were removed from the data analysis. The relative amount of each compound was expressed as a percentage resulting from the average of the peak area of the three replicates, compared with the total peak area. Whenever possible, the compound identification was confirmed by comparison of mass spectra, and Kovats indices from the available commercial standards with $\geq 98\%$ purity (Sigma-Aldrich).

Statistical analysis

The experimental results relating to the inhibitory effect of *Xylaria* sp. strain PB3f3 on the mycelial growth of plant pathogenic micro-organisms, in the multiple and simple direct antagonism bioassays, were analysed with the paired *t*-test. The phytogrowth-inhibitory activity of VOCs and pure compounds, and the antifungal and anti-oomycete effects of the organic extract were analysed with one way analysis of variance (ANOVA, $\alpha = 0.05$), followed by a Tukey statistical test (Mead *et al.* 2002), utilizing GRAPHPAD PRISM ver. 5.01 statistical computer software (GraphPad software, La Jolla, CA). Data are represented as mean \pm standard deviation (SD). A *P* value of ≤ 0.05 (*) was employed to indicate statistical significance. The IC_{50} value for pure compounds was calculated by probit analysis, based on the average percentage inhibition, obtained at each concentration with the previously mentioned statistical software.

Results

Identification of PB3f3 strain

For identification of the PB3f3 strain the macro and micro-morphological characteristics were determined, as well as the sequence analysis of the ITS1-5.8S rDNA gene. Data were compared with those available in the literature (Chacko and Rogers 1981; Rogers 1985; Callan and Rogers 1993).

Culture description

The colony on PDA was incubated at 28°C in 12:12 h light–dark photoperiod, had a radial slow growth, covering a 9 cm Petri dish in 3 weeks. The growth rate was $1.75 \text{ cm}^2 \text{ day}^{-1}$; plane, low and dense, with concentric rings and a regular margin; mycelium white (M4A1), velvety; exudate clear; reverse uncoloured becoming cream (M4A4) or reddish brown (M7E7) toward the centre, after 2 months incubation (Fig. 1). After 9 weeks of growth no stromata, conidiogenous cells, conidia or ascospores were observed, although treatments for spore

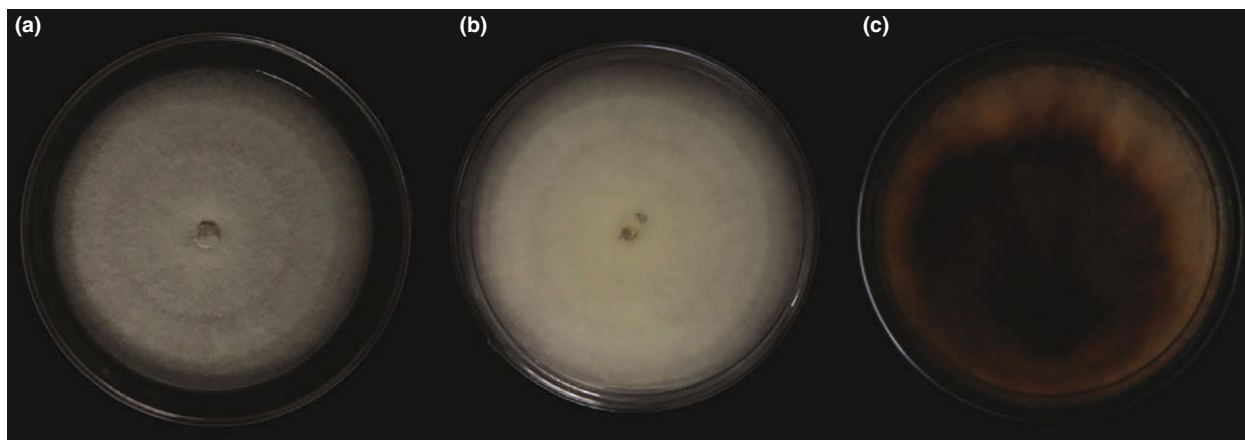


Figure 1 Culture of *Xylaria* sp. strain PB3f3 on potato dextrose agar (PDA), incubated at 28°C in 12–12 dark–light photoperiod. (a, b) Anvers and reverse of the colony, after 3 weeks of growth. (c) Reverse of the colony after 12 weeks of growth, with a reddish brown colour.

producing inducements, including ultraviolet radiation, freezing and temperature difference were carried out.

The identity of the PB3f3 strain was determined by BLAST analysis of its ITS1-5.8 sequence (GenBank accession number KP400260). The most similar sequences were those of *Xylaria* sp. TPO41010 (accession no. AB524023, with 97% similarity and 100% coverage) obtained from mass ascospores discharged from a fruiting body collected from a branch in Phayao, Thailand (Osono *et al.* 2011) and *Xylaria* sp. G30 (accession no. JQ623492, with 94% similarity and 99% coverage) an endophytic fungus isolated from *Garcinia hombroniana* (Bouthong *et al.* 2012, unpublished); followed by several other sequences of *Xylaria* species or of unidentified *Xylaria* strains (Table 1).

In the genetic distance tree (Fig. 2) inferred from the closest ITS1-5.8S-ITS2 NCBI sequences, the endophytic fungus PB3f3 clustered with *Xylaria* sp. TP041010 with a

bootstrap support of 100%, and a genetic distance of 0.037. The results showed that the strain PB3f3 is a species of the genus *Xylaria*.

Antifungal and anti-oomycete effect of *Xylaria* sp. PB3f3

As a preliminary test for the antifungal and anti-oomycete activity of the endophyte *Xylaria* sp. PB3f3, we performed multiple direct antagonism bioassays. Only the fungus previously incubated for 7 days showed a significant inhibitory effect on the radial growth of the plant pathogens after 3 and 6 days of antagonistic interaction, in which the endophytic fungus had 10 and 13 days of growth. From day 3 of antagonistic interaction, the endophytic fungus *Xylaria* sp. PB3f3 presented a significant inhibitory effect ($P < 0.05$) at a distance from the radial growth of the plant pathogens *F. oxysporum* (24.2%), *A. solani* (24.5%), *Ph. capsici* (48.3%) and *Py. aphanidermatum* (78.3%). The inhibitory effects were constant during the 40 days of observation.

On the other hand, simple direct antagonism bioassays were performed for determining whether *Xylaria* sp. PB3f3 could inhibit the plant pathogen's growth in dual interactions. From day 3 of antagonistic interaction, in which the endophytic fungus had 10 days of growth, it produced a significant inhibitory effect at a distance of 90% ($P < 0.05$) over the growth of the four plant pathogens, this inhibition was constant during the 40 days of observation.

In order to confirm whether the plant pathogens could recover after the inhibition caused by the endophytic fungus *Xylaria* sp. in these simple direct antagonisms, each plant pathogen was re-inoculated in PDA plates after 20 days of antagonistic interaction. *Xylaria* sp. PB3f3, had a fungistatic effect on the *F. oxysporum* and *Ph. capsici* growth due to their recovery. In contrast, *Xylaria* sp. PB3f3 had a fungicide and oomycide effect on *A. solani*

Table 1 Identities of the ITS1-5.8S-ITS2 sequences obtained from the comparison of the PB3f3 to their closest relatives available in the NCBI nucleotide sequence database

Accession number	Closest relatives	Identity %
KP400260	<i>Xylaria</i> sp. PB3f3	
AB54023	<i>Xylaria</i> sp. TP0401010	97
JQ623492	<i>Xylaria</i> sp. G30	94
EF423534	<i>Xylaria</i> sp. PO55	94
JX160062	<i>Xylaria primorskensis</i>	94
H435669	<i>Xylaria</i> sp. XF13	94
GU324747	<i>Xylaria laevis</i> 95072910	94
GU324746	<i>Xylaria laevis</i> 419	94
AF163030	<i>Xylaria longipes</i> CBS 148-73	94
FJ707473	<i>Xylaria primorskensis</i> 478	93
JN225908	<i>Xylaria castorea</i>	93
JQ936297	<i>Xylaria berteri</i> C2P24a	93
KC771495	<i>Xylaria laevis</i> CEQCA-M1296	92

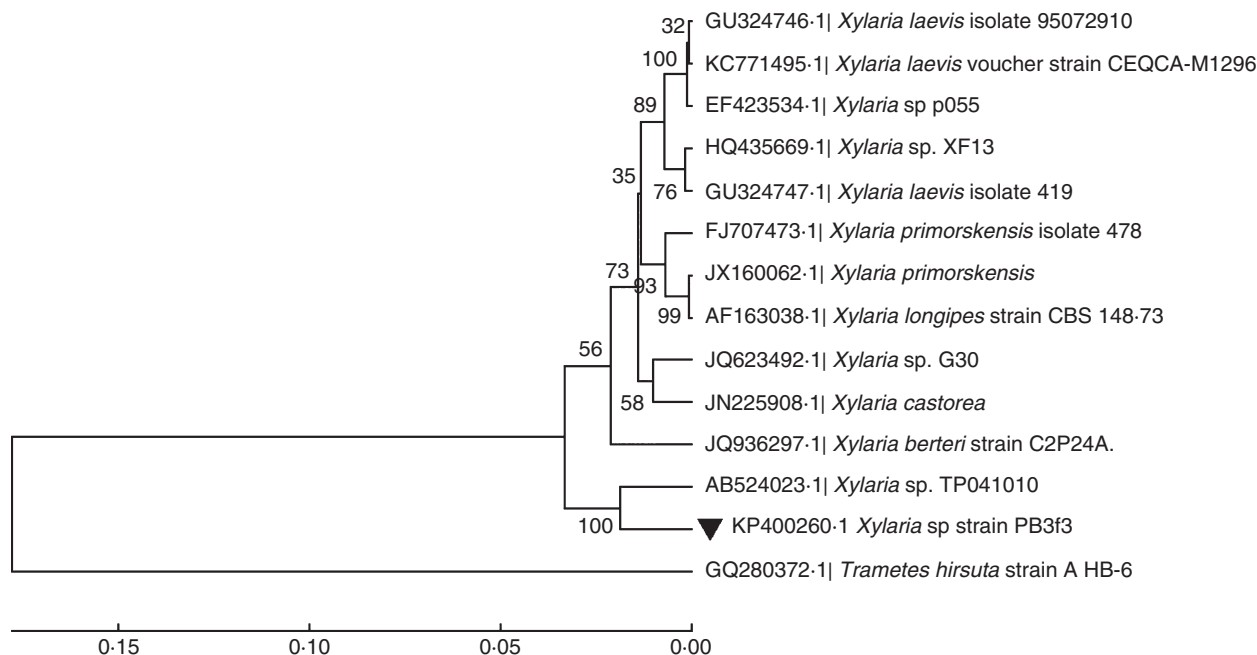


Figure 2 Genetic distance tree showing the relationship among the endophytic fungus PB3f3 and the closest fugal sequences present in the NCBI database. The tree was constructed based on the ITS1-5.5S-ITS2 rDNA sequences by using the Neighbor-Joining method. The bootstrap values were determined from 1000 replications. The tree was rooted by making *Trametes hirsuta* strain AHB-6 (GQ280372.1) as outgroup. The scale bar (0.00–0.15) indicates evolutionary distance as the number of substitutions per nucleotide. The isolate PB3f3 clusters with *Xylaria* sp. TP041010 with a bootstrap support of 100% and a genetic distance of 0.037, suggesting the endophytic strain PB3f3 is a species of *Xylaria*.

and *Py. aphanidermatum*, respectively, since they were not recovered. The growth inhibition observed in the bioassays can be mediated by volatile secondary metabolites and extracellular metabolites diffused into agar produced by *Xylaria* sp. PB3f3. However, there was not a significant inhibitory effect on the growth of any of the plant pathogens tested in the divided plate bioassay, which shows that the inhibition was caused by the metabolites diffused into the agar.

Antifungal and anti-oomycete effect of organic extracts

In order to evaluate whether the biological activity was attributable to volatile or non-volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3, we also evaluated organic extracts from the culture medium and mycelium of *Xylaria* sp. PB3f3 on the same phytopathogens. The organic extract showed significant inhibitory activity ($P < 0.05$) on the radial growth of the oomycete *Py. aphanidermatum* ($17.3\% \pm 3.7$) and on the fungi *A. solani* ($20.4\% \pm 2.4$) and *F. oxysporum* ($17.6\% \pm 1.9$); however, the percentages of inhibition were low.

Phytogrowth-inhibitory activity of VOCs

The VOCs significantly inhibited ($P < 0.05$) the root growth of *Am. hypochondriacus* and *S. lycopersicum*. This

inhibition varied depending on the *Xylaria* sp. PB3f3 growth. The VOCs production after 1, 3 and 5 days of fungal growth did not show significant inhibitory effects. For *Am. hypochondriacus* seeds the most phytotoxic effect was shown when the endophytic fungus had 30 days of growth (27.6% of inhibition); while in the *S. lycopersicum* seeds, the higher inhibition (53.2%) on the root growth

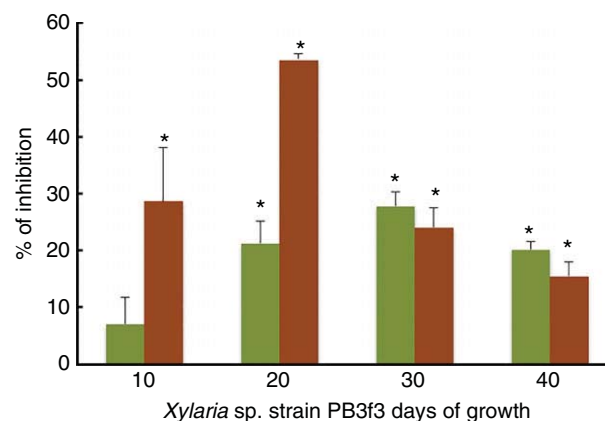


Figure 3 Phytoinhibitory activity of VOCs produced by *Xylaria* sp. strain PB3f3 after 10, 20, 30 and 40 days of growth. The root lengths of *Amaranthus hypochondriacus* and *Solanum lycopersicum* seedlings were determined after 24 and 72 h of exposure to VOCs, respectively. Vertical bars SD, $N = 4$; * $P < 0.05$.

was after 20 days. In both cases, a decrease of the phytotoxic effect on *Am. hypochondriacus* (15.1% of inhibition) and on *S. lycopersicum* (20.5%) after day 40 of growth of *Xylaria* sp. PB3f3 (Fig. 3) was recorded. The VOCs did not significantly inhibit the germination and respiration processes of the two plants at any time of the endophyte growth.

Chemical composition

In this study, we tentatively determined a total of 40 VOCs in the samples at 10, 20 and 30 cultivation days (Table 1), and they belonged to different chemical families. The endophyte *Xylaria* sp. PB3f3 produced mainly alkanes (11). Likewise, other compounds were identified

Table 2 GC/MS analysis of the volatile compounds produced by *Xylaria* sp. PB3f3 after 10, 20 and 30 days of culture

Peak	Name	RI*	Total area (%)			MW	Molecular formula
			10 days	20 days	30 days		
1	Dimethyl ether	587.32	–	1.71	–	46	C ₂ H ₆ O
2	Unknown	592.09	4.03	–	–	46	
3	Unidentified amine	603.74	–	34.30	–	81	
4	Unknown	620.84	2.52	–	–	86	
5	2-Methyl-1-propanol	633.14	–	–	25.43	74	C ₄ H ₁₀ O
6	Unknown	652.81	0.60	–	–	86	
7	Unknown amine	722.50	–	7.93	–	57	
8	3-Methyl-1-butanol	726.98	24.33	–	11.84	88	C ₅ H ₁₂ O
9	2-Methyl-1-butanol	728.72	–	33.28	11.81	88	C ₅ H ₁₂ O
10	3-(Ethenyloxy)-1-propene	732.05	–	–	14.20	84	C ₅ H ₈ O
11	2-Isocyanato-propane	734.45	–	–	13.54	85	C ₄ H ₇ NO
12	3-Methyl-pentane	735.79	–	–	13.54	86	C ₆ H ₁₄
13	2-Methyl- butanoic acid methyl ester	771.83	–	0.57	0.95	116	C ₆ H ₁₂ O ₂
14	1-Pentanol	775.10	8.68	–	–	88	C ₅ H ₁₂ O
15	3-Methyl-1-butanol acetate	877.61	–	0.49	–	130	C ₇ H ₁₄ O ₂
16	2- <i>n</i> -Butyl furan	888.76	1.91	1.98	–	124	C ₈ H ₁₂ O
17	2,3-Nonadiene	939.85	0.50	–	–	124	C ₉ H ₁₆
18	2-Pentyl-furan	987.71	1.56	2.29	0.79	138	C ₉ H ₁₄ O
19	2,3,6,7-Tetramethyl-octane	1033.20	0.49	–	–	170	C ₁₂ H ₂₆
20	Unidentified alkane	1033.50	–	1.35	–		
21	2-Ethyl-hexanoic acid methyl ester	1039.60	–	0.57	0.10	158	C ₉ H ₁₈ O ₂
22	3,6-Dimethyl-octane	1054.20	0.46	0.85	–	142	C ₁₀ H ₂₂
23	4-Nonanone	1074.80	0.38	1.21	0.24	142	C ₉ H ₁₈ O
24	Unknown alkane	1094.70	0.64	–	–	156	
25	2-Nonanone	1095.30	–	3.72	0.88	142	C ₉ H ₁₈ O
26	Phenylethyl alcohol	1125.20	–	1.21	0.40	122	C ₈ H ₁₀ O
27	Acetic acid 2-ethylhexyl ester	1147.50	0.17	0.23	0.05	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
28	Acetic acid 2-phenylethyl ester	1260.40	0.09	–	0.34	164	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
29	2,7,10-Trimethyl-dodecane	1406.10	0.58	–	–	212	C ₁₅ H ₃₂
30	Unknown sesquiterpene	1411.10	2.67	–	–	204	C ₁₅ H ₂₄
31	<i>trans</i> - α -Bergamotene	1441.30	6.11	0.71	0.16	204	C ₁₅ H ₂₄
32	3,7,11-Trimethyl-1,3,6,10-dodecatetraene	1441.50	0.57	–	0.16	204	C ₁₅ H ₂₄
33	Thujopsene	1445.60	21.60	3.31	0.10	204	C ₁₅ H ₂₄
34	Unidentified naphthalene	1454.70	1.08	–	1.00	204	
35	1,8-Dimethyl-4-(1-methylethenyl)-spiro[4.5]dec-7-ene (acoradiene)	1481.10	4.25	0.41	0.26	204	C ₁₅ H ₂₄
36	3,7,7-Trimethyl-11-methylene-spiro[5.5]undec-2-ene	1504.10	7.68	0.16	0.28	204	C ₁₅ H ₂₄
37	2-Methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methyl-bicyclo[5.3.0]decane	1513.90	1.69	–	–	204	C ₁₅ H ₂₄
38	1,2,3,5,6,7,8,8a-Octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-azulene	1516.50	2.22	0.73	0.85	204	C ₁₅ H ₂₄
39	1,5,5,9-Tetramethyl-spiro[5.5]undeca-1,8-diene (α -chamigrene)	1519.80	2.16	–	–	204	C ₁₅ H ₂₄
40	<i>n</i> -Hexadecanoic acid	1963.50	–	–	0.19	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
	Unknowns†		2.96	3.11	2.89		

Compounds found in the control PDA plate are not included in this table. Only compounds with quality match scores >80 are listed.

*Kovats indices calculated from retention time data on a DB-5MS capillary column.

†The values of the total area of VOCs were calculated considering all identified compounds before discriminating the peaks representing less than 1% of the total area.

in a lower proportion: esters (5), sesquiterpenoids (6), alcohols (6), amines (2), ketones (2), carboxylic acids (2) and one ether. From the total VOCs, 25, 20 and 22 compounds were produced at days 10, 20 and 30 of fungal growth, respectively (Table 2). Compounds with high fibre affinity were: 3-methyl-1-butanol and thujopsene after 10 days of growth; 2-methyl-1-butanol and an amine of unidentified structure after 20 days; and 2-methyl-1-propanol after 30 days of growth.

The Venn diagram shows the compounds identified at two or three dates of cultivation (Fig. 4). Two compounds were identified in common at 10 and 20 days of *Xylaria* sp. PB3f3 growth. Four compounds were produced at 10 and 30 days of fungal growth; and five compounds were produced commonly at 20 and 30 days of cultivation (Table 2). Figure 4 shows eight VOCs that were detected at the three dates of cultivation (10, 20 and 30 days): 2-pentyl-furan, 4-nonanone, acetic acid 2-ethyl-hexyl ester, *trans*- α -bergamotene, thujopsene, 1,8-methyl-4-(1-methyl,ethenyl)-spiro[4.5]dec-7-ene (acoradiene), 3,7,7-trimethyl-11-methylene-spiro[5.5]undec-2-ene and 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-azu-

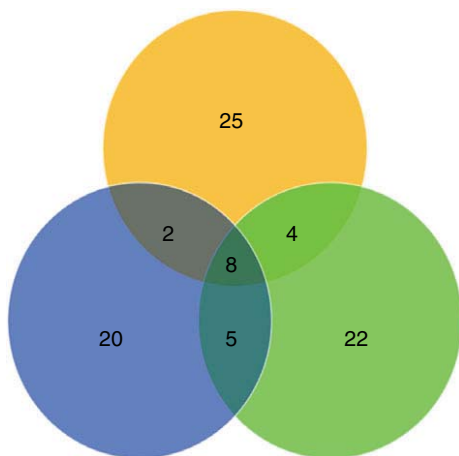


Figure 4 Venn diagram showing the shared VOCs between each incubation time of the endophyte *Xylaria* sp. strain PB3f3. 10, 20 and 30 days culture.

lene. Such compounds were produced in a constitutive way with the fungus growth.

Phytogrowth-inhibitory activity of (\pm)-2-methyl-1-butanol and 2-methyl-1-propanol

Since 2-methyl-1-butanol (33.2%) and 2-methyl-1-propanol (25.4%) were two of the most abundant constituents present in the VOCs produced after 20 and 30 days, respectively, of *Xylaria* sp. PB3f3 growth, we evaluated their ability to inhibit the seed germination, root elongation and seedling respiration of *Am. hypochondriacus* and *S. lycopersicum*, using a gas phase bioassay.

Both compounds displayed a significant phytotoxic effect on the seed germination, and root elongation in a concentration-dependent manner. The (\pm)-2-methyl-1-butanol displayed high phytotoxic activity on the root growth of *Am. hypochondriacus* and showed an IC_{50} value of $4.59 \mu\text{g ml}^{-1}$. Besides, the IC_{50} value on seed germination was found to be $26.45 \mu\text{g ml}^{-1}$ with respect to *S. lycopersicum* seeds, the IC_{50} values on seed germination and root elongation were found to be 39.74 and $23.15 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. On the other hand, 2-methyl-1-propanol also significantly inhibited the tested seeds, it showed an IC_{50} value of $48.20 \mu\text{g ml}^{-1}$ on germination and $26.45 \mu\text{g ml}^{-1}$ on root growth of *Am. hypochondriacus*, while for *S. lycopersicum* the IC_{50} on germination and root growth were found to be 130.0 and IC_{50} $54.25 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. Finally, both compounds significantly ($P < 0.05$) inhibited the seedling respiration process of the two plants tested at the maximum concentration evaluated, which was $160.0 \mu\text{g ml}^{-1}$, in a range between 20% and 27% (Table 3).

Discussion

In the present study, we isolated a novel endophytic fungus identified as *Xylaria* sp. PB3f3 (GenBank ID: KP400260) from healthy leaves of *H. brasiletto*. We also showed, for the first time, that an endophyte of the genus *Xylaria* produces VOCs.

Regarding the antifungal activity, the multiple antagonistic bioassay showed significant inhibitory effects in a

Table 3 IC_{50} values of phytogrowth-inhibitory activity of (\pm)-2-methyl-1-butanol and 2-methyl-1-propanol

Physiological process	(\pm)-2-Methyl-1-butanol ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		2-Methyl-1-propanol ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	<i>Am. hypochondriacus</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>S. lycopersicum</i>
Seed germination	26.45	39.74	48.20	130.0
Root elongation	4.59	23.15	26.45	54.25
Seedling respiration process	<160.0	<160.0	<160.0	<160.0

range between 24 and 78% on the growth of *F. oxysporum*, *A. solani*, *Ph. capsici* and *Py. aphanidermatum*. However, in antagonism bioassays, in divided Petri dishes, the volatile organic compounds did not show significant inhibitory activity on the growth of pathogenic micro-organisms. In addition, the organic extracts showed significant inhibitory effects in a range between 17 and 20% on the growth of *F. oxysporum*, *A. solani* and *Py. aphanidermatum*. Therefore, the antifungal and anti-oomycete effect at a distance from the radial growth of the plant pathogens, observed in the multiple and simple direct antagonism bioassays, is generated by secondary metabolites produced by *Xylaria* sp. strain PB3f3: volatiles and non-volatile organic compounds acting individually or synergistically to increase the activity.

Concerning the composition of the identified VOCs of *Xylaria* sp. PB3f3, it changed qualitatively and quantitatively depending on the day of the fungus growth. The relative abundance of the 2-methyl-1-butanol, 2-nonanone, *trans*- α -bergamotene, thujopsene, 1,8-dimethyl-4-(1-methylethenyl)-spiro[4.5]dec-7-ene (acoradiene) and 3,7,7-trimethyl-11-methylene-spiro[5.5]undec-2-ene changed dramatically along the culture time; and as a consequence of the endophyte age (Fig. 5 and Table 2).

The most phytotoxic effect on the root development of *Am. hypochondriacus* and *S. lycopersicum* was obtained after 20 and 30 days of growth of *Xylaria* sp. PB3f3, respectively. The different phytotoxic effects on the root growth, on different ages of growth of *Xylaria* sp. PB3f3, was due to the sensitivity of each plant tested to the volatile compounds produced at the two dates. In addition,

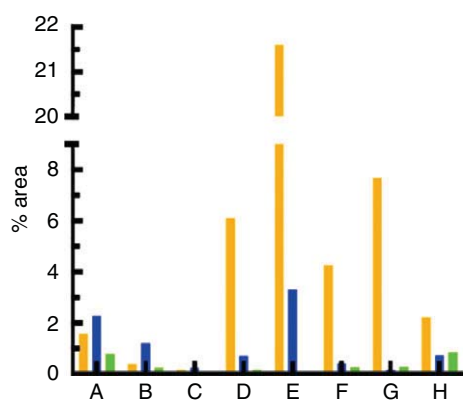


Figure 5 Relative area of common volatile metabolites produced after 10, 20 and 30 days culture of *Xylaria* sp. PB3f3. (A) 2-pentylfuran, (B) 4-nonanone, (C) acetic acid 2-ethylhexyl ester (at day 30 showed a relative abundance of 0.05), (D) *trans*- α -bergamotene (at day 30 showed a relative abundance of 0.16), (E) thujopsene (at day 30 showed a relative abundance of 0.10), (F) 1,8-dimethyl-4-(1-methylethenyl)-spiro[4.5]dec-7-ene (acoradiene), (G) 3,7,7-trimethyl-11-methylene-spiro[5.5]undec-2-ene, (H) 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)- azulene.

the VOC composition changed from 20 to 30 days of fungal growth. One of the most abundant compounds at 20 days was 2-methyl-1-butanol (33.28%); and 2-methyl-1-propanol (25.43%) at 30 days. These compounds showed significant inhibitory effects on the germination and root elongation of *Am. hypochondriacus* and *S. lycopersicum*, employing the gas phase bioassay, where *Am. hypochondriacus* was the most affected by both compounds (Table 3). This can explain why *Am. hypochondriacus* was the most inhibited at 30 days of fungal growth, since 2-methyl-1-propanol was the most abundant compound (25.43%), followed by 2-methyl-1-butanol (11.81%). On the other hand, 2-methyl-1-butanol also showed more phytotoxic activity on *S. lycopersicum* than 2-methyl-1-propanol and only the former was present at 20 days of fungal growth. In addition, 2-methyl-1-butanol in previous evaluations *in vitro* presented a significant phytotoxic activity on *Arabidopsis thaliana* causing 40% inhibition on seedling formation, at 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$; and, 2-methyl-1-propanol also inhibited by more than 50% the seedling formation (Hung *et al.* 2014).

On the other hand, 3-methyl-1-butanol and 2-methyl-1-butanol, compounds with a high fibre affinity at 10 and 20 days of *Xylaria* sp. PB3f3 growth were also identified as volatile compounds produced by *Muscodor albus* which had antifungal activity against crop pathogens (Mercier and Jiménez 2004). This corroborates that micro-organisms belonging to the same phylogenetic group are able to produce similar bioactive compounds. Besides, volatiles from *Muscodor* can be used as biocontrol agents due to the bioactivity of its volatile compounds (Mercier and Manker 2005; Riga *et al.* 2008; Macías-Rubalcava *et al.* 2010). Among the identified compounds, the sesquiterpene thujopsene, the main compound identified at 10 days of fungal growth, has been previously identified in fungi and plants. It is worth mentioning that in the essential oil obtained by means of hydrodistillation, from the endophytic fungus *Xylaria* sp. NICL5, and isolated from *Cupressus lusitanica*, one of its main components was *cis*-thujopsene (Santos Filho *et al.* 2011). Thujopsene has been also identified as the main component of the VOCs produced by the *Penicillium decumbens*, isolated from a building impaired by water. The *P. decumbens* VOCs have antifungal activity against *Eurotium herbarium* and *Gonytrichum macrocladum*. In addition, thujopsene also acted as a self-regulation mechanism against the growth of *P. decumbens* (Polizzi *et al.* 2011). Pure thujopsene isolated from *Thujopsis dolabrata* presents antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria (Oh *et al.* 2011). Also, it is part of the essential oil of *Eugenia dysenterica*, which shows antibacterial activity against several strains of *Cryptococcus neoformans* (Costa *et al.* 2000). It is a volatile component

of the heartwood extract of the cedar *Callitropsis nootkatensis* with activity against *Phytophthora ramorum* (Manter *et al.* 2007). Furthermore, the sesquiterpene *trans*- α -bergamotene is present in the *Ocimum basilicum* extract, which has antifungal activity against different species of *Fusarium* (Kocić-Tanackov *et al.* 2011); and, it is also a constituent of the essential oil of *Cymbopogon citratus*, which has antibacterial activity against *Salmonella enterica* (formerly *Salmonella choleraesuis*), *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (Falcão *et al.* 2012). The 1,8-dimethyl-4-(1-methylethenyl)-spiro[4.5]dec-7-ene (acoradiene) is present in the VOCs generated by *F. oxysporum*, with nematocidal effects on *Meloidogyne incognita* (Freire *et al.* 2012); and, as part of the VOCs of *Salvia frutescens*, which have antifungal activity against *R. solani* and *Sc. sclerotiorum* (Pitaroskili *et al.* 2003). Additionally, the 2-nonanone produced by *Bacillus pumilus* and *Bacillus thuringiensis* also has antifungal potential against *Colletotrichum gloeosporioides* (Zheng *et al.* 2013) and *B. cinerea* (Almenar *et al.* 2009). Likewise, it is used to increase the shelf life of the strawberry, due to its antifungal effects (Almenar *et al.* 2009). 3-Methyl-1-butanol, thujopsene, acoradiene, *trans*- α -bergamotene and 2-nonanone can contribute to the antifungal activity observed in the multiple antagonism bioassays between *Xylaria* sp. PB3f3 and the four plant pathogens tested, which have economic importance in agriculture. These compounds could be the responsible for the antifungal and anti-oomycete activities shown in the antagonism bioassays, since they were the main compounds identified after 10 and 20 days of growth of *Xylaria* sp. PB3f3; and, they could be the compounds diffusing into agar, acting individually or synergistically to increase the activity.

Finally, it is important to say that in spite of the identification of different compounds with antifungal activity, previously reported in the literature, it is widely known that, in general, the antimicrobial effects caused by the microbial VOCs are the result of the synergistic effect (Strobel *et al.* 2001; Strobel 2010).

These results suggest that the endophytic fungus *Xylaria* sp. PB3f3 could be useful in the biological control of microorganisms, in particular, as a fungistatic or anti-oomycete agent on *F. oxysporum* and *Ph. capsici*, respectively; and, as a fungicide and oomycete agent on *A. solani* and *Py. aphanidermatum*, respectively. Furthermore, the VOCs, produced by *Xylaria* sp. PB3f3, could be useful in the biocontrol of weeds. Further studies in crop protection might be needed, especially to establish their potential efficiency. In addition, we will start research on the anti-oomycete, antifungal and phytotoxic potential of the non-volatile fungal secondary metabolites produced by the endophyte *Xylaria* sp. PB3f3; and, the VOC production in multiple antagonistic interactions and its biological importance.

Acknowledgements

This work was supported by the CONACyT grant 179194. We also wish to thank Bertha Tlalpal Bolaños PhD and Olga Gómez PhD, from Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, for the donation of plant pathogenic microorganisms used in the bioassays. We also wish to thank especially Rafael Ibarra Contreras MSc from Facultad de Química, UNAM, for language revision. To Biol. Carmen Loyola Blanco, from Instituto de Biología, UNAM (IBUNAM), for the photographic material, as well as to Rebeca Martínez Flores MSc, from IBUNAM, for technical assistance in the identification of the fungus strain. Brenda Lorena Sánchez Ortiz acknowledges a fellowship from CONACyT to carry out graduate studies.

Conflict of Interest

No conflict of interest declared.

References

- Adams, R.P. (2007) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Caron Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Almenar, E., Catala, R., Hernandez-Muñoz, P. and Gavara, R. (2009) Optimization of an active package for wild strawberries based on the release of 2-nonanone. *LWT Food Sci Technol* **42**, 587–593.
- Altschul, S.F.G., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1997) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.
- Aly, A.H., Debbab, A. and Proksch, P. (2011) Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**, 1829–1845.
- Brum, M.C.P., Araujo, W.L., Maki, C.S. and Azevedo, J.L. (2012) Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. *Genet Mol Res* **11**, 4187–4197.
- Callan, E.B. and Rogers, D.J. (1993) A synoptic key to *Xylaria* species from continental United States and Canada based on cultural and anamorphic features. *Mycotaxon* **46**, 141–154.
- Chacko, J.R. and Rogers, D.J. (1981) Cultural characteristics of some species of *Xylaria*. *Mycologia* **73**, 415–428.
- Chen, J.L., Sun, S.Z., Miao, C.P., Wu, K., Chen, Y.W., Xu, L.H., Guan, H.L. and Zhao, L.X. (2015) Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *J Ginseng Res* DOI: 10.1016/j.jgr.2015.09.006.
- Costa, T.R., Fernandes, O.F.L., Santos, S.C., Oliveira, C.M.A., Lião, L.M., Ferri, P.H., Paula, J.R., Ferreira, H.D. *et al.*

- (2000) Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *J Ethnopharmacol* **72**, 111–117.
- Cui, J.L., Guo, S.X. and Xiao, P.G. (2011) Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*. *J Zhejiang Univ Sci B* **12**, 385–392.
- Daisy, B.H., Strobel, G.A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D.K. and Runyon, J.B. (2002) Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodora vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **148**, 3737–3741.
- Falcão, M.A., Fianco, A.L.B., Lucas, A.M., Pereira, M.A.A., Torres, F.C., Vargas, R.M.F. and Cassel, E. (2012) Determination of antibacterial activity of vacuum distillation fractions of lemongrass essential oil. *Phytochem Rev* **11**, 405–412.
- Fournier, J., Flessa, F., Peršoh, D. and Stadler, M. (2010) Three new *Xylaria* species from southwestern Europe. *Mycol Prog* **10**, 33–52.
- Freire, E.S., Campos, V.P., Pinho, R.S.C., Oliverira, D.F., Faria, M.R., Pohlit, A.M., Noberto, N.P., Rezende, E.L. et al. (2012) Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect meloidogyne incognita and *Arthrobotrys conoides*. *J Nematol* **44**, 321–328.
- Hall, T. (2005) *BioEdit: biological sequence alignment editor for windows 95/98/NT/XP*.
- Hung, R., Lee, S. and Bennett, J.W. (2013) *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of Trichoderma volatile organic compounds. *Fungal Ecol* **6**, 19–26.
- Hung, R., Lee, S., Rodriguez-Saona, C. and Bennett, J.W. (2014) Common gas phase molecules from fungi affect seed germination and plant health in *Arabidopsis thaliana*. *AMB Express* **4**, 53.
- Isaka, M., Srisanoh, U., Sappan, M., Kongthong, S. and Srikitikulchai, P. (2012) Eremophilane and eudesmane sesquiterpenoids and a pimarane diterpenoid from the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC 5484. *Phytochem Lett* **5**, 78–82.
- Kocić-Tanackov, S., Dimić, G., Lević, J., Tanackov, I. and Tuco, D. (2011) Antifungal activities of basil (*Ocimum basilicum* L.) extract on *Fusarium* species. *Afr J Biotechnol* **10**, 10188–10195.
- Kornerup, A. and Wanscher, J.H. (1978) *The Methuen Handbook of Colour*. London, UK: Eyre Methuen Ltd.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X. and Zhou, J. (2008) Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**, 241–247.
- Macías-Rubalcava, M.L., Hernandez-Bautista, B.E., Jimenez-Estrada, M., Gonzalez, M.C., Glenn, A.E., Hanlin, R.T., Hernandez-Ortega, S., Saucedo-Garcia, A. et al. (2008) Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* **69**, 1185–1196.
- Macías-Rubalcava, M.L., Hernandez-Bautista, B.E., Oropeza, F., Duarte, G., Gonzalez, M.C., Glenn, A.E., Hanlin, R.T. and Anaya, A.L. (2010) Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodora yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *J Chem Ecol* **36**, 1122–1131.
- Macías-Rubalcava, M.L., Ruiz-Velasco-Sobrinho, M.E., Melendez-Gonzalez, C. and Hernandez-Ortega, S. (2014) Naphthoquinone spiroketals and organic extracts from the endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as potential herbicides. *J Agric Food Chem* **62**, 3553–3562.
- Manter, D.K., Kelsey, R.G. and Karchesy, J.J. (2007) Antimicrobial activity of extractable conifer heartwood compounds toward *Phytophthora ramorum*. *J Chem Ecol* **33**, 2133–2147.
- Mead, R., Curnow, R.N. and Hasted, A.M. (2002) *Statistical Methods in Agriculture and Experimental Biology*. Boca Raton, FL: Chapman and Hall. CRC Press.
- Meléndez-González, C., Muriá-González, J.M., Anaya, A.L., Hernández-Bautista, B.E., Hernández-Ortega, S., González, M.C., Glenn, A.E., Hanlin, R.T. et al. (2015) Acremoxanthone E, a novel member of heterodimeric polyketides with a bicyclo[3.2.2]nonene ring, produced by *Acremonium camptosporum* W. Gams (Clavicipitaceae) endophytic fungus. *Chem Biodivers* **12**, 133–147.
- Mercier, J. and Jiménez, J.I. (2004) Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodora albus*. *Postharvest Biol Technol* **31**, 1–8.
- Mercier, J. and Manker, D.C. (2005) Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodora albus*. *Crop Prot* **24**, 355–362.
- Mercier, J. and Smilanick, J.L. (2005) Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodora albus*. *Biol Control* **32**, 401–407.
- Naumova, E.S., Sukhotina, N.N. and Naumov, G.I. (2004) Molecular-genetic differentiation of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives. *FEMS Yeast Res* **5**, 263–269.
- Nei, M. and Kumar, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York, NY: Oxford University Press.
- Oh, I., Yang, W.Y., Park, J., Lee, S., Mar, W., Oh, K.B. and Shin, J. (2011) *In vitro* Na⁺/K⁺ -ATPase inhibitory activity and antimicrobial activity of sesquiterpenes isolated from as a preliminary *Thujopsis dolabrata*. *Arch Pharm Res* **34**, 2141–2147.
- Osono, T., To-Anun, C., Hagiwara, Y. and Hirose, D. (2011) Decomposition of wood, petiole and leaf litter by *Xylaria* species from northern Thailand. *Fungal Ecol* **4**, 210–218.
- Pitaroskili, D., Tzakou, O., Loukis, A. and Havalá, C. (2003) Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *J Agric Food Chem* **51**, 3294–3301.
- Polizzi, V., Fazzini, L., Adams, A., Picco, A.M., De Saeger, S., Van Peteghem, C. and De Kimpe, N. (2011) Autoregulatory properties of (+)-thujopsene and influence

- of environmental conditions on its production by *Penicillium decumbens*. *Microb Ecol* **62**, 838–852.
- Ratnaweera, P.B., Williams, D.E., de Silva, E.D., Wijesundera, R.L.C., Dalisay, D.S. and Andersen, R.J. (2014) Helvolic acid, an antibacterial nortriterpenoid from a fungal endophyte, *Xylaria* sp. of orchid endemic to Sri Lanka. *Mycology* **5**, 23–28.
- Riga, E., Lacey, L.A. and Guerra, N. (2008) *Muscodora albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. *Biol Control* **45**, 380–385.
- Rodrigues, K.F. (1994) The Foliar endophytes of the amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia* **86**, 376–385.
- Rogers, J.D. (1985) Anamorphs of *Xylaria*: taxonomic considerations. *Sydowia, Annales Mycolgici Ser II* **30**, 22–262.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Sánchez-Fernández, R.E., Diaz, D., Duarte, G., Lappe-Oliveras, P., Sánchez, S. and Macias-Rubalcava, M.L. (2016) Antifungal volatile organic compounds from the endophyte *Nodulisporium* sp. strain GS4d2III1a: a qualitative change in the intraspecific and interspecific interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microb Ecol* **71**, 347–364.
- Santos Filho, F.C., da Silva, A.L. and Rodrigues-Filho, E. (2011) Composition of essential oils from *Cupressus lusitanica* and a *Xylariaceae* fungus found on its leaves. *Biochem Syst Ecol* **39**, 485–490.
- Schotsmans, W.C., Braun, G., DeLong, J.M. and Prange, R.K. (2008) Temperature and controlled atmosphere effects on efficacy of *Muscodora albus* as a biofumigant. *Biol Control* **44**, 101–110.
- Sette, L.D., Passarini, M.R.Z., Delarmelina, C., Salati, F. and Duarte, M.C.T. (2006) Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World J Microbiol Biotechnol* **22**, 1185–1195.
- Silva, G.H., de Oliveira, C.M., Teles, H.L., Pauletti, P.M., Castro-Gamboa, I., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Young, M.C.M. *et al.* (2010) Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). *Phytochem Lett* **3**, 164–167.
- Stinson, A.M., Zidack, N.K., Strobel, G.A. and Jacobsen, B.J. (2003) Mycofumigation with *Muscodora albus* and *Muscodora roseus* for control of seedling diseases of sugar beet and verticillium wilt of eggplant. *Plant Dis* **87**, 1349–1354.
- Strobel, G. (2010) *Muscodora* species-endophytes with biological promise. *Phytochem Rev* **10**, 165–172.
- Strobel, G., Dirkse, E., Sears, J. and Markworth, C. (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **147**, 2943–2950.
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., Sasse, F., Jansen, R. and Murali, T.S. (2009) Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biol Rev* **23**, 9–19.
- Suwanarach, N., Kumla, J., Bussaban, B., Nuangmek, W., Matsui, K. and Lumyong, S. (2013) Biofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit. *Crop Prot* **45**, 63–70.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- Tansuwan, S., Pornpakakul, S., Roengsumran, S., Petsom, A., Muangsin, N., Sihanonta, P. and Chaichit, N. (2007) Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria* sp. *J Nat Prod* **70**, 1620–1623.
- Wang, Y. and Dai, C.C. (2010) Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Ann Microbiol* **61**, 207–215.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. and Taylor, J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.S. and White, T.J. pp. 315–322. New York, NY: Academic Press.
- Wu, S.H., He, J., Li, X.N., Huang, R., Song, F., Chen, Y.W. and Miao, C.P. (2014) Guaiane sesquiterpenes and isopimarane diterpenes from an endophytic fungus *Xylaria* sp. *Phytochemistry* **105**, 197–204.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P. and Qin, L. (2010) Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol Res* **165**, 437–449.
- Yuan, Z.L., Su, Z.Z., Mao, L.J., Peng, Y.Q., Yang, G.M., Lin, F.C. and Zhang, C.L. (2011) Distinctive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of *Muscodora* (*Xylariaceae*). *J Microbiol* **49**, 15–23.
- Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q. and Li, Y. (2013) Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biol Control* **65**, 200–206.

HONGOS ENDÓFITOS: FUENTE POTENCIAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS CON UTILIDAD EN AGRICULTURA Y MEDICINA

Rosa Elvira Sánchez-Fernández, Brenda Lorena Sánchez-Ortiz,
Yunueth Karina Monserrat Sandoval-Espinosa,
Álvaro Ulloa-Benítez, Beatriz Armendáriz-Guillén,
Marbella Claudia García-Méndez y Martha Lydia Macías-Rubalcava*

¹Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F. E-mail: *mamaciasr@gmail.com; mlmacias@unam.mx

RESUMEN

Los hongos endófitos habitan en las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad. La estrecha relación que existe entre el endófito y su planta hospedera se considera de gran importancia, ya que el hongo es capaz de producir metabolitos bioactivos, así como modificar los mecanismos de defensa de su hospedera, permitiendo e incrementando la sobrevivencia de ambos organismos. Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos endófitos para producir compuestos activos que le confieren protección a su hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros, constituyendo una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina. En este trabajo se describen diferentes aspectos relacionados con los hongos endófitos, abarcando su definición, descubrimiento, clasificación, interacción con su hospedera, papel ecológico, ejemplos de metabolitos secundarios bioactivos, así como estrategias metodológicas para su obtención. Por último, se presentan algunos resultados recientes, de estudios realizados en nuestro grupo de trabajo mostrando que los hongos endófitos son una fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos.

Palabras Clave: Actividad antimicrobiana, actividad fitotóxica, compuestos bioactivos, hongo endófito, interacción hongo-planta, metabolito secundario.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that live inside plant tissues without causing disease symptoms. In most cases, their relationship with the host plant is considered beneficial because the endophyte is able to produce bioactive metabolites that the host can use as defense mechanisms, and this allows survival of both organisms. Recent studies have demonstrated that the endophytic fungus confers protection to the host plant against attack by pathogens and herbivores. Since they have the ability to benefit the host plant, it is reasonable to think that the diverse bioactive compounds produced by the endophyte might exhibit potential applications in agriculture and medicine, and also serve as a source of inspiration for the discovery of new and more active molecules. In this paper, some aspects regarding endophytic fungi are described: definition, discovery, classification, interactions with their host plants, ecological role, selected examples of bioactive metabolites, host selection strategy, and methodological strategies for their isolation. Finally, we show some recent results of our research, which demonstrate that endophytic fungi are promising sources of new bioactive secondary metabolites.

Key Words: Antimicrobial activity, phytotoxic activity, bioactive compounds, endophytic fungus, fungus-plant interaction, secondary metabolite.

INTRODUCCIÓN

La palabra ‘endófito’ etimológicamente significa ‘dentro de la planta’ (*endon*: dentro, *phyton*: planta). En un principio, el término endófito se refería a cualquier organismo que colonizara el interior de los tejidos de las plantas, pero fue Wilson en 1995¹ quien restringió el término únicamente a microorganismos, refiriéndose sólo a bacterias y a hongos que no provocan daño aparente a la planta hospedera. Actualmente, este término se refiere a bacterias, hongos, algas e insectos²⁻⁵, en donde los hongos son los microorganismos que se han aislado con mayor frecuencia como endófitos⁶.

Los hongos endófitos se definen como microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño evidente. El ‘endofitismo’ se refiere a una asociación de costo-beneficio no obstructiva, asintomática y transitoria, definida por localización (no por función), y que se establece dentro de los tejidos vivos de la planta hospedera²⁻⁶. Los hongos endófitos se han encontrado en todas las plantas (pastos, algas, musgos y plantas vasculares), desde las que habitan en el ártico hasta los trópicos, así como en los campos agrícolas. De todos los ecosistemas del Planeta Tierra, los bosques templados y tropicales presentan una gran biodiversidad de plantas y éstas parecen albergar también una cantidad significativa de hongos endófitos^{7,8}.

DESCUBRIMIENTO E HISTORIA DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

El término ‘endófito’ lo propuso de Bary en 1866⁹ y los primeros registros de la presencia de hongos endófitos provienen del año 1898, en donde los investigadores formularon la hipótesis de que los cuadros toxicológicos observados en animales, se debían al consumo de semillas o partes aéreas de los pastos *Lolium temulentum*, *L. arvense*, *L. linicolum* y *L. remotum* (Poaceae) infectados con hongos Clavicipitáceos (familia del ergot)¹⁰. Sin embargo, no se dio continuidad a esta suposición hasta que Bacon en 1977, relacionó la presencia del hongo *Neotyphodium coenophialum* a la alta incidencia de una intoxicación del ganado denominada “síndrome de verano”, debida al consumo de pastos de la especie *Festuca arundinaceae* (Poaceae). En los años 80, Funk describió la resistencia al ataque de insectos en los pastos infectados con endófitos¹¹ y en 1988, Clay¹² propuso que varios hongos endófitos Clavicipitáceos son mutualistas que defienden a la hospedera del ataque de herbívoros. Posteriormente, varios investigadores de múltiples disciplinas como químicos, ecólogos, botánicos y micólogos se han dedicado al estudio de estos organismos⁸.

En la actualidad el interés por estos microorganismos ha aumentado enormemente debido a que son productores de metabolitos secundarios novedosos y con diversa actividad biológica.

CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Los hongos endófitos son un grupo muy diverso y polifilético que habitan en diversas partes de las plantas. La mayoría pertenecen al *phylum* Ascomycota, aunque también se han encontrado en los Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota¹³.

Históricamente los hongos endófitos se han clasificado en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, basados en su filogenia e historia de vida^{3,6,14,15}. Rodríguez y colaboradores² (2009) los clasifican tomando en cuenta su taxonomía, sus plantas hospederas, su evolución y sus funciones ecológicas. En esta clasificación se conservan los grupos Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, y este último se divide en tres clases (Cuadro I).

Los Clavicipitáceos son los endófitos que colonizan los pastos, mientras que los no Clavicipitáceos colonizan las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas^{2,8}. Existen diversos estudios relativos a los hongos endófitos de las zonas templadas, no obstante, la información sobre los endófitos de zonas tropicales aún representa un objeto potencial de estudio, ya que se tiene información muy limitada al respecto^{2,8}. Asimismo, se conoce relativamente poco de la naturaleza de la interacción entre las plantas leñosas y sus endófitos foliares, a pesar de su abundancia y gran diversidad, particularmente en regiones tropicales, donde se ha planteado que cada hoja representa un mosaico de diversas especies de hongos endófitos^{2,14}. Dreyfuss y colaboradores¹⁶ estimaron que debe haber aproximadamente 1.3 millones de especies de hongos endófitos por descubrir.

RELACIÓN HONGO ENDÓFITO-PLANTA HOSPEDERA

La relación entre los hongos endófitos y su planta hospedera puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis^{2,4,5}. En estas relaciones ambos organismos producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos. El hongo endófito produce factores de virulencia, como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos, mientras que la planta produce defensas, tanto mecánicas como bioquímicas³. En consecuencia, para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado, que depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, las cuales varían y son influenciadas por los factores ambientales y por la etapa de desarrollo de ambos organismos. Cuando los factores de virulencia del hongo y las defensas de la planta están en equilibrio se establece una relación endofítica y, por el contrario, cuando se presenta la senescencia del hospedero o se encuentra bajo estrés, el balance se torna a favor del hongo y éste se expresa como patógeno, presentándose los síntomas de enfermedad^{3,6}.

PAPEL ECOLÓGICO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Los hongos endófitos usualmente toman nutrientes y protección de su hospedera y algunos de ellos en retribución

Criterio	Clavicipitáceos		No Clavicipitáceos	
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Rango de hospederos	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
Tejidos que colonizan	Tallo y rizomas	Tallos, hojas y rizomas	Tallos, hojas, corteza, flores, frutos	Raíces
Colonización <i>in planta</i>	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
Biodiversidad <i>in planta</i>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
Transmisión*	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Función ecológica	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia a la sequía y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia al estrés biótico y abiótico y protegen contra los hongos patógenos por acción de los metabolitos secundarios	Inducen resistencia a las enfermedades, protección contra los herbívoros y modifican la sensibilidad al estrés abiótico mediante la producción de los metabolitos secundarios	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros

*Transmisión de hongos endófitos en las plantas: vertical, a través de las semillas, y horizontal, se adquieren del medio ambiente.

Cuadro I. Grupos y clases de hongos endófitos.

pueden desempeñar un papel mutualista, ya que pueden beneficiarla al inducir su crecimiento, al aumentar su tolerancia al estrés y al producir metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural que le brindan protección y resistencia contra herbívoros y/o microorganismos fitopatógenos^{2,4,5,17}.

Un hongo endófito puede producir metabolitos secundarios que inhiben a un patógeno en particular o a otros hongos endófitos. Sin embargo, puede no inhibir a otros organismos de su mismo entorno¹⁵. Algunos hongos endófitos inducen los efectos alelopáticos de su hospedera a través de la producción de metabolitos secundarios o aleloquímicos, es decir, influyen sobre el crecimiento y desarrollo de otras especies que crecen a su alrededor y que usualmente son competidores por el espacio y nutrientes^{4,5}. Incluso se ha visto que ciertos hongos endófitos producen los precursores o los metabolitos secundarios con actividad biológica, cuya síntesis se le había atribuido a la planta^{4,18,19}. Esto se ha observado principalmente en las interacciones entre los hongos endófitos y los pastos, sin embargo, en plantas leñosas (árboles o arbustos) se ha comprobado en escasas ocasiones^{3,14,18}.

Se ha observado que los hongos endófitos pueden contribuir a la protección de su hospedera contra factores bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (estrés salino, térmico, presencia de metales, etc.), por medio de tres mecanismos:

- 1) Directos: por medio de enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno, producidos directamente por el hongo endófito.
- 2) Indirectos: consisten en la inducción o incremento de la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos a su planta hospedera.
- 3) Ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y predación^{14,17}.

Un ejemplo de mecanismo de defensa directo contra los patógenos de la hospedera es la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) del hongo endófito *Muscody yucatanensis*, aislado de *Bursera simaruba* (Burseraceae). Los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y del micelio de *M. yucatanensis* y, principalmente, la mezcla de VOCs que produce, son letales para los fitopatógenos *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*. Algunos de los VOCs identificados son: octano, 2-pentilfurano, cariofileno, aromadendreno, derivados del naftaleno, entre otros^{20,21}.

El segundo mecanismo de protección a las hospederas es evidenciado en la investigación realizada por Waller y colaboradores (2005)²², en donde demostraron que la resistencia en la cebada (*Hordeum vulgare*, Poaceae) al ataque de microorganismos patógenos es debida a la colonización de las raíces por el endófito *Piriformospora indica*. En las plantas

inoculadas con el endófito e infectadas con los patógenos *Fusarium culmorum* KF 350 y *Cochliobolus sativus* fue menor la pérdida de la biomasa y la severidad de la enfermedad causada por estos microorganismos. Los efectos positivos observados están relacionados con la inducción de niveles más altos del antioxidante ascorbato, presente en las raíces y mediado por acción del endófito *P. indica*. Este antioxidante puede proteger a la hospedera de la muerte celular^{22,23}.

El último mecanismo de protección está bien ilustrado con una cepa no patógena de *Fusarium oxysporum*, denominada Fo47, la cual inhibe al patógeno *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y reduce los síntomas de la pudrición de la raíz en el tomate (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae). La inoculación en plantas de tomate de una carga de esporas 50 veces mayor que la del patógeno, asegura que las esporas de *F. oxysporum* Fo47 compitan con *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* por la misma fuente de carbono, lo que reduce la disponibilidad de nutrientes para este último microorganismo. Estas cepas de *Fusarium* presentan estrategias similares de colonización. En consecuencia, *F. oxysporum* Fo47 puede ocupar y reducir el número de sitios adecuados para la fijación de esporas y la colonización del patógeno *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, por lo que resulta en un menor número de lesiones sintomáticas²⁴.

Los mecanismos de protección hacia las hospederas pueden actuar de manera simultánea bajo diversas condiciones de estrés²³.

Los hongos endófitos, además de interactuar con su hospedera, interactúan entre ellos dentro de la planta. Estas interacciones interespecíficas (entre distintas especies de hongos) están regidas por: a) mecanismos físicos o directos, como son las interacciones entre hifas, la interferencia hifal (micoparasitismo) y el contacto de micelio, y b) mecanismos químicos o indirectos, los cuales se dan por la producción de compuestos solubles, algunos metabolitos primarios, metabolitos secundarios, enzimas o por compuestos volátiles efectivos a distancia que limitan el crecimiento de las hifas del competidor^{14,15,18,25-28}. Estos mecanismos han sido evidenciados en algunas interacciones en cultivos *in vitro* donde los hongos antagonistas producen metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas o muestran una clara interferencia. En la actualidad, son escasos los estudios que establecen cuál es el modo de acción y cuáles son los compuestos antimicrobianos implicados en las interacciones interespecíficas dentro de las comunidades fúngicas en la naturaleza^{25,29-32}. Por lo tanto, el estudio químico y biológico de estas interacciones conduce al descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos estructuralmente diversos y novedosos, por lo que este recurso constituye una fuente prometedora de moléculas potencialmente útiles para su uso en la agricultura, la medicina y la industria. Además, mediante estos estudios es posible seleccionar especies útiles como agentes de control biológico^{4,5,21,31,32}.

METABOLITOS SECUNDARIOS DERIVADOS DE HONGOS ENDÓFITOS Y SU APLICACIÓN EN AGROQUÍMICA Y FARMACIA

Los metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos poseen una gran diversidad química y algunos de ellos presentan esqueletos base no reportados en otras fuentes naturales. Así por ejemplo, los alcaloides lolina y sus derivados, que comprenden una familia de compuestos pirrolizidínicos, presentan un núcleo base de 2-oxa-6-azatriciclo[4.2.1.0^{3,7}] nonano; los indoloditerpénicos tipo lolitrem, que consisten en sistemas heterocíclicos de 8 anillos fusionados; los indoloditerpénicos paspalitrem, de 7 anillos y los alcaloides del ergot tipo ergoclavina y ergopeptina constituyen metabolitos secundarios biológicamente activos, exclusivos de hongos endófitos Clavicipitáceos^{3-6,19,33}.

También se han encontrado muchos compuestos novedosos que presentan núcleos heterocíclicos complejos, producidos por hongos de diferentes ambientes, como los alcaloides espiroquinazolínicos, los alcaloides isoindólicos fusionados con un macrociclo como son las quetoglobosinas y las citocalasinas. Además, se han aislado diversos anhidropéptidos pirazodiónicos, ciclopéptidos y lipociclopéptidos con actividad biológica^{3-6,19,33}.

En la literatura se encuentra reportado un número considerable de compuestos de origen policétido, incluyendo aquéllos que se encuentran ampliamente distribuidos en todos los taxones de hongos, como los que han sido aislados exclusivamente de hongos endófitos. Muchos consisten en macrólidos, así como en diversos compuestos aromáticos como bencenos, naftalenos, antracenos, piranos, furanos, benzofuranos, cromanos, xantanos, oxepanos y dépsidos^{3-6,19,33}.

Los hongos endófitos también producen metabolitos secundarios con estructuras terpénicas novedosas y exclusivas. Los chokoles A-K son compuestos que presentan un esqueleto monoterpénico de ciclofarnesano. El guanacastano tiene un esqueleto base tricíclico de los compuestos denominados guanacastepenos, ambos compuestos son exclusivos de hongos endófitos. Del mismo modo, se han aislado compuestos con estructuras comunes, pero reportadas únicamente en endófitos, por ejemplo tricotecenos, eudesmanos, calamenos, fusiococanos y diterpenos tipo sordarina. Los esteroides que más se han reportado son los de esqueleto de ergostano^{3-6,19,33}.

Asociada a la diversidad estructural de los metabolitos secundarios biosintetizados por los hongos endófitos, sobreviene su pluralidad funcional y su aplicación^{3-6,19,34}. Un claro ejemplo de la importancia de estos compuestos como fuente potencial de fármacos está representado por el taxol, un diterpeno aislado del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*, Taxaceae)³³, que se utiliza en el tratamiento de cáncer de ovario y de mama, además de otras aplicaciones en enfermedades proliferativas de los tejidos⁴. Su elevado costo

lo hace disponible sólo a ciertos sectores de la población³⁵. A principios de los años 90, Stierle y colaboradores (1993)³⁶ sugirieron que los tejidos vegetales de *T. brevifolia* podrían albergar microorganismos endófitos que sintetizaran taxol. Posteriormente, Strobel y colaboradores (1993)³⁷ aislaron de esta especie vegetal el hongo endófito *Taxomyces andreanae* que tiene la capacidad de sintetizar taxol. En estudios posteriores, se encontraron otras especies de microorganismos aislados de coníferas capaces de producir taxol, como *Pestalotiopsis microspora*^{38,39}, *Periconia* sp., *Fusarium solani*, *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp.⁴⁰⁻⁴²

Por otro lado, debido a la compleja interacción que se establece entre los hongos endófitos y su planta hospedera, entre distintas especies de hongos endófitos, y otras especies invasoras como otros hongos, oomicetos y bacterias, se ha puesto atención no sólo en el papel ecológico que pueden desempeñar los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos en dichas interacciones, sino en las aplicaciones de estos compuestos para el desarrollo de agroquímicos como nematocidas, fungicidas, insecticidas y herbicidas^{4,6}. Así por ejemplo, el estudio biodirigido del extracto orgánico del hongo endófito *Phomopsis phaseoli*, aislado de un árbol tropical no identificado que crece en la Guyana Francesa, permitió el aislamiento del ácido 3-hidroxi-3-propiónico, un compuesto con actividad nematocida contra *Meloidogyne incognita*⁴³.

Por otra parte se aislaron dos policétidos de la familia de los dépsidos, la uredinina A y el 4-[(2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoil)oxi]-2-hidroxi-3,6-dimetilbenzoato de 3-hidroxi-2,5-dimetilfenilo, del hongo *Cladosporium uredinicola*, un endófito de la guayaba (*Psidium guajava*, Rosaceae). Ambos dépsidos presentan actividad herbicida inhibiendo el flujo de electrones del agua al metilviológeno, actuando como inhibidores de la reacción de Hill en tilacoides de espinaca⁴⁴.

Edenia gomezpompae, un endófito de las hojas de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae), produce varios compuestos con potencial antifúngico, incluyendo las preusomerinas EG₁, EG₂ y EG₃ y las palmarumicinas CP₂, CP₁₇ y CP₁₈. Las preusomerinas inhiben significativamente el crecimiento de varios endófitos de su misma planta hospedera, así como el de diversos microorganismos fitopatógenos de importancia económica, como *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *A. solani*, *P. capsici* y *P. parasitica*^{25,45,46}.

La investigación sobre endófitos de pastos han demostrado que pueden defender a su hospedera del ataque de herbívoros por medio de compuestos con actividad insecticida y antialimentaria. Existen estudios que han demostrado que los alcaloides tipo lolina son efectivos contra los áfidos *Rhopalosiphum padi*⁴⁷, los heterópteros *Oncopeltus fasciatus*⁴⁸, el coleóptero *Popillia japonica*⁴⁹ y el lepidóptero *Spodoptera*

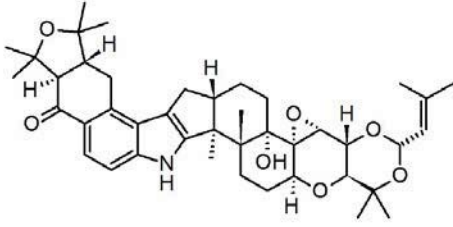
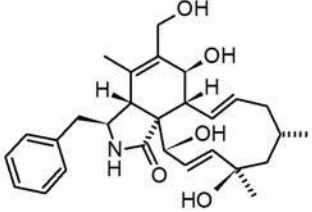
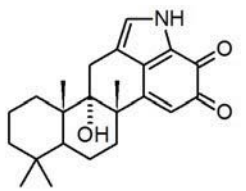

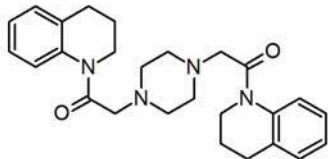
*frugiperda*⁵⁰. Debido a su baja toxicidad en los mamíferos, se están desarrollando métodos sintéticos para su venta como insecticidas comerciales⁵¹.

Diversos compuestos aislados de hongos endófitos presentan actividad antibacteriana, contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y micobacterias. Por citar un ejemplo, en el estudio realizado por Zhao y colaboradores (2012)⁵², se reportaron dos compuestos con esa actividad, obtenidos del endófito *Gliomastix murorum* Ppf8, aislado de *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Trilliaceae): un esteroel ergosta-5,7,22-trien-3-ol y un benzofurano el 2,3-dihidro-5-hidroxi- α,α -dimetil-2-benzofuranometanol. Ambos compuestos presentaron valores de CI₅₀ entre 55.65 a 145.36 $\mu\text{g/mL}$ contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas lachrymans*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus haemolyticus*⁵². Por otra parte, en un estudio realizado por Rukachaisirikul en 2008⁵³, se reportó una amida novedosa, la fomoenamida, que presenta actividad antifúngica contra *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Ra. Este compuesto se obtuvo del endófito *Phomopsis longicolla* aislado a partir del árbol *Garcinia dulcis* (Clusiaceae).


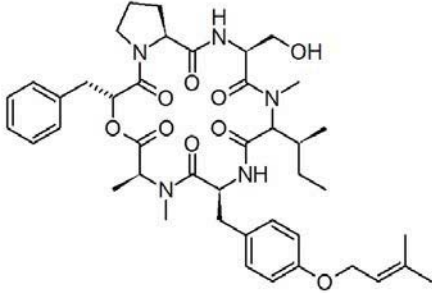
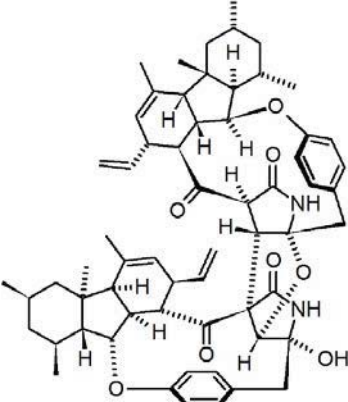
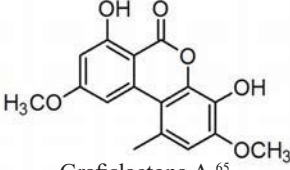
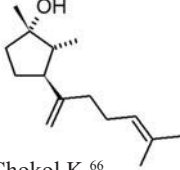
Cabe destacar que los estudios sobre hongos endófitos también aportan conocimientos sobre metabolitos secundarios aislados de hongos de diferentes fuentes, reportados con funciones biológicas distintas. Para citar un ejemplo, la fumigaclavina C es un alcaloide tipo clavina que fue originalmente aislado y reportado por Cole y colaboradores en 1977⁵⁴ como una micotoxina alimentaria de *Aspergillus fumigatus*. Posteriormente, Pinheiro y colaboradores en 2012⁵⁵ reportaron la actividad antimicrobiana de este compuesto, obtenido a partir del extracto acetofélico de una especie endófito no identificada de *Aspergillus* aislado de la planta medicinal *Bauhinia guianensis* (Fabaceae). La fumigaclavina C es activo contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis*.

En el Cuadro II se presentan ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos.

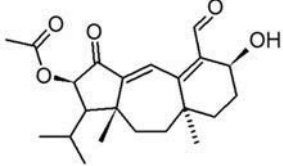
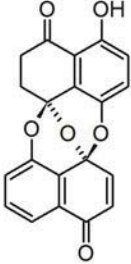
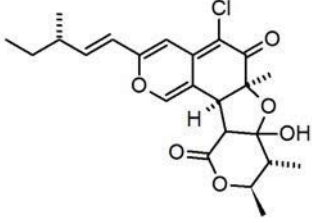
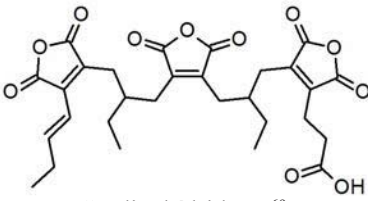
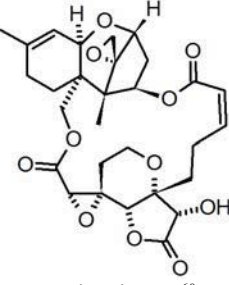
Una de las grandes ventajas que representa la disponibilidad de un sinnúmero de microorganismos endófitos capaces de sintetizar un fármaco o un agroquímico potencial, es evitar la necesidad de cultivar o coleccionar especies vegetales silvestres, así como reducir el costo de producción de los principios activos⁵⁶. De la misma forma, se ha propuesto que estos metabolitos podrían ser utilizados para desarrollar agroquímicos de origen natural, que serían menos perjudiciales para el hombre y para el medio ambiente que los compuestos químicos sintéticos que actualmente se utilizan en la agricultura, ya que los productos naturales pueden interactuar con blancos moleculares específicos, afectar procesos fisiológicos particulares y presentar menores índices de bioacumulación⁴.

Hongo endófito / planta hospedera	Metabolito secundario / Núcleo base	Actividad biológica
<p><i>Neotyphodium lolii</i> (Clavicipitaceae). Endófito de <i>Lolium perenne</i> (Poaceae).</p>	 <p>Lolitrem B⁵⁷ Alcaloide indolterpénico.</p>	<p>Neurotóxico. Inhibidor de los canales de calcio activados por potasio.</p>
<p><i>Endothia gyrosa</i> IFB-E023 (Cryphonectriaceae). Endófito de <i>Vatica mangachapo</i> (Dipterocarpaceae).</p>	 <p>Citocalasina Z10⁵⁸ Alcaloide policétido isoindólico.</p>	<p>Citotóxico. En líneas celulares de leucemia K562.</p>
<p><i>Mycoleptodiscus</i> sp. (Magnaporthaceae). Endófito de <i>Desmotes incomparabilis</i> (Rutaceae).</p>	 <p>Micoleptodiscina B⁵⁹ Alcaloide indolterpénico.</p>	<p>Citotóxico. En líneas celulares de fibroblastos humanos IMR-90.</p>
<p><i>Penicillium</i> sp. (Trichocomaceae). Endófito de <i>Mauritia flexuosa</i> (Arecaceae).</p>	 <p>Glandicolina B⁶⁰ Alcaloide α-carbólico.</p>	<p>Antimicrobiano. Contra <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Micrococcus luteus</i> y <i>E. coli</i>.</p>
<p><i>Aspergillus niger</i> IFB-E003 (Trichocomaceae). Endófito de <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae).</p>	 <p>Aspernigerina⁶¹ Alcaloide piperazínico.</p>	<p>Citotóxico. En líneas celulares de los carcinomas nasofaríngeo epidermoide, cervical Hela y colorectal SW1116.</p>

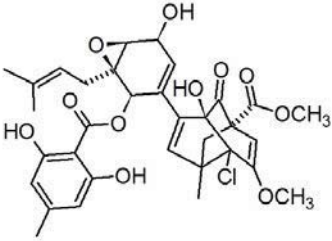
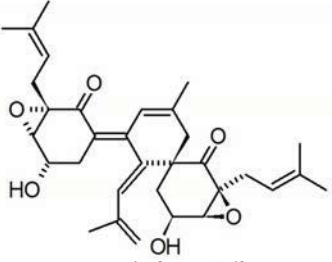
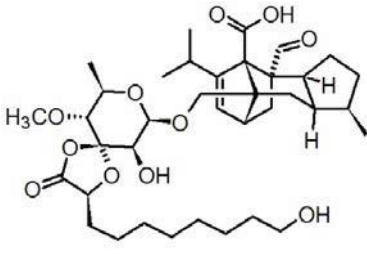
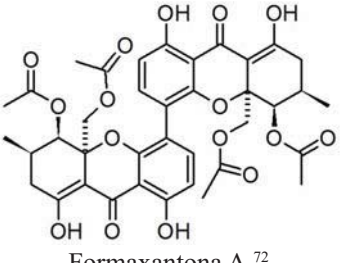
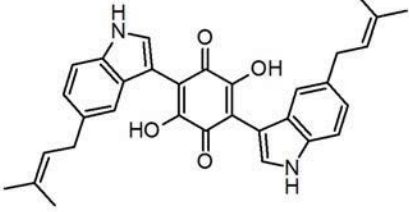
Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos.

Hongo endófito / planta hospedera	Metabolito secundario / Núcleo base	Actividad biológica
<p><i>Aspergillus tamarii</i> (Trichocomaceae) Endófito de <i>Ficus carica</i> (Moraceae).</p>	 <p>Fumitremorgina B.⁶² Alcaloide indolil dicitopiperazínico.</p>	<p>Antifúngico. Activo contra los fitopatógenos <i>Fusarium graminearum</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Phytophthora capsici</i>, <i>Phytophthora oryzae</i>.</p>
<p><i>Pullularia</i> sp. BCC 8613 (Dothioraceae). Endófito de <i>Calophyllum</i> sp. (Calophyllaceae).</p>	 <p>Pulularina A.⁶³ Depsipéptido.</p>	<p>Antiplasmodico. Contra <i>Plasmodium falciparum</i> K1. Antiviral. Contra el virus del herpes simple (HSV-1).</p>
<p><i>Neonectria ramulariae</i> Wollenw KS-246 (Nectriaceae). Endófito de un árbol no identificado.</p>	 <p>Bispirrocidina.⁶⁴ Alcaloide dímero de la pirrocidina.</p>	<p>Inhibidor enzimático. Actúa sobre la prolilpolipeptidasa.</p>
<p><i>Cephalosporium</i> sp. IFB-E001 (Incertae sedis). Endófito de <i>Trachelospermum jasminoides</i> (Apocynaceae).</p>	 <p>Grafislactona A.⁶⁵ Benzocromeno policétido.</p>	<p>Antioxidante. Inhibe la peroxidación del ácido linoleico.</p>
<p><i>Epichloë festucae</i> (Clavicipitaceae). Endófito de varias especies de pastos (Poaceae).</p>	 <p>Chokol K.⁶⁶ Sesquiterpeno (2,6-ciclofarnesano, esqueleto reportado sólo en endófitos).</p>	<p>Atractor de insectos. Atractor de la mosca <i>Botanophila</i> para la propagación de esporas.</p>

Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

Hongo endófito / planta hospedera	Metabolito secundario / Núcleo base	Actividad biológica
<p>Hongo CR115 no identificado. Endófito de <i>Daphnopsis americana</i> (Thymelaeaceae).</p>	 <p>Guanacastepeno.⁶⁷ Diterpeno (guanacastano, esqueleto reportado sólo en endófitos).</p>	<p>Antibacterial. Contra <i>S. aureus</i> y <i>Enterococcus faecium</i>.</p>
<p><i>E. gomezpompae</i> (Pleosporaceae). Endófito de <i>C. acuminata</i> (Verbenaceae).</p>	 <p>Preusomerina EG₁.²⁵ Bisnaphthoespirocetal.</p>	<p>Antifúngico. Contra <i>P. capsici</i>, <i>P. parasitica</i>, <i>F. oxysporum</i> y <i>A. solani</i>.</p>
<p><i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae). Endófito de <i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae).</p>	 <p>Quetomugilina D.⁶⁸ Isocromano policétido.</p>	<p>Antifúngico. Activo contra <i>Mucor miehei</i>. Tóxico para <i>Artemia salina</i>.</p>
<p><i>Dwyaangam colodena</i> (Orbiliaceae). Endófito de <i>Picea rubens</i> (Pinaceae).</p>	 <p>Cordianhídrido B.⁶⁹ Anhídrido derivado de ácidos grasos.</p>	<p>Insecticida. Contra el lepidóptero <i>Choristoneura fumiferana</i>.</p>
<p><i>Myrothecium roridum</i> IFB-E091 (incertae sedis). Endófito de raíces de <i>Artemisia annua</i> (Asteraceae).</p>	 <p>Roritoxina E.⁶⁰ Macrólido tipo tricoteceno.</p>	<p>Citotóxico. En líneas celulares de carcinoma gástrico SGC-7901 y hepatocarcinoma SMMC-7721.</p>

Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

Hongo endófito / planta hospedera	Metabolito secundario / Núcleo base	Actividad biológica
<p><i>Pestalotiopsis fici</i> (Amphisphaeriaceae). Endófito de un árbol no identificado colectado en Hangzhou, República Popular China.</p>	 <p>Cloropupukeananina.⁷⁰ Dímero policétido prenilado.</p>	<p>Antiviral. Inhibe la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (HIV-1).</p>
<p><i>Pestalotiopsis fici</i> (Amphisphaeriaceae). Endófito de un árbol no identificado colectado en Hangzhou, República Popular China.</p>	 <p>Pestalofona C.⁴² Dímero policétido prenilado.</p>	<p>Antifúngico. Contra <i>Candida albicans</i>, <i>Geotrichum</i> <i>candidum</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i>.</p>
<p><i>Morinia logiappendiculata</i> (Amphisphaeriaceae). Endófito de <i>Santolina rosmarinifolia</i> (Asteraceae), <i>Helichrysum stoechas</i> (Asteraceae), <i>Thymus mastichina</i> (Lamiaceae) y <i>Calluna vulgarisin</i> (Ericaceae).</p>	 <p>Moriniafungina.⁷¹ Diterpeno tipo sordiarina.</p>	<p>Antifúngico. Contra <i>Cryptococcus neoformans</i>, <i>C. albicans</i>, <i>C. glabrata</i>, <i>C. parapsilosis</i>, <i>C. krusei</i> y <i>C. lusitaniae</i>.</p>
<p><i>Phoma</i> sp. (Incertae sedis). Endófito de <i>Costus</i> sp. (Costaceae).</p>	 <p>Formaxantona A.⁷² Dímero de xantona policétida.</p>	<p>Antifúngico. Contra <i>Phytophthora infestans</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Pyricularia oryzae</i> y <i>Ustilago violacea</i>.</p>
<p><i>Chaetomium</i> sp. (Chaetomiaceae). Endófito de <i>Salvia officinalis</i> (Lamiaceae).</p>	 <p>Coelioidinol.⁵⁶ Alcaloide indólico.</p>	<p>Citotóxico. Contra líneas celulares de linfoma murino t L5178Y.</p>

Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

ESTRATEGIAS DE SELECCIÓN DE HOSPEDERAS ÚTILES PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS

Los antecedentes y consideraciones anteriores, aunados a la gran diversidad de especies vegetales existentes a nivel mundial, así como a la capacidad que tienen algunos hongos endófitos de mejorar los mecanismos de resistencia de su hospedera y de protegerla del ataque de posibles enemigos, han permitido establecer estrategias de selección de plantas hospederas que incrementen la posibilidad de aislar hongos endófitos capaces de producir metabolitos secundarios bioactivos. Estos criterios incluyen^{4,73}:

1. Plantas sin síntomas de enfermedad que crecen rodeadas de otras plantas infectadas por diversos patógenos o atacadas por herbívoros (criterio ecológico), las cuales pueden estar colonizadas por endófitos productores de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas e insecticidas.
2. Plantas que crecen en áreas de alta biodiversidad y que, por lo tanto, pueden alojar endófitos igualmente biodiversos.
3. Plantas que tienen antecedentes etnobotánicos, que se relacionan con algún uso específico o aplicaciones relacionadas a los intereses de la investigación, como son las plantas con uso en la medicina tradicional (criterio etnomédico).
4. Plantas con estrategias especiales para su supervivencia o que crecen en ambientes únicos.
5. Plantas endémicas que poseen una longevidad inusual, o que han ocupado extensiones de tierra poco convencionales.

ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS

Para el descubrimiento de metabolitos secundarios de microorganismos endófitos, se ha aplicado en repetidas ocasiones la estrategia metodológica que se indica a continuación: en primer lugar, se realiza la selección de las hospederas, de acuerdo con los criterios mencionados y se lleva a cabo el aislamiento de los hongos endófitos^{34,73,75,76}. La caracterización taxonómica de los endófitos puros se lleva a cabo mediante el análisis detallado de sus características macro y microscópicas, así como mediante el empleo de técnicas moleculares modernas⁷⁷. A continuación se realiza la preselección de los microorganismos, mediante un criterio ecológico, principalmente con base en las interacciones planta-microorganismo^{4,17,78} y microorganismo-microorganismo^{21,25,79,80}. En múltiples ocasiones, la observación de este tipo de interacciones ha constituido un punto de partida para la preselección de especies fúngicas como una fuente valiosa de principios bioactivos^{21,25,81}.

En segundo lugar, es necesario realizar cultivos en pequeña escala, con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de crecimiento de los organismos fúngicos objeto de estudio.

Posteriormente, se preparan los extractos del medio de cultivo y del micelio^{21,25}. A continuación, se realizan pruebas biológicas preliminares, las cuales consisten en la determinación del efecto biológico de los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y del micelio, mediante la utilización de bioensayos sencillos y de fácil implementación. Entre los más utilizados para detectar posibles agroquímicos se encuentran los ensayos de germinación y de crecimiento radicular de diversas especies de semillas^{21,25,82} y el ensayo para detectar inhibidores y promotores del crecimiento de plantas, mediante el empleo de *Lemna minor* (Araceae)⁸³. La determinación del potencial antifúngico se realiza mediante la medición del efecto de los extractos sobre el crecimiento de diversos microorganismos fitopatógenos de importancia económica^{21,25}, mientras que para evidenciar el efecto insecticida y nematocida se utilizan bioensayos sobre diferentes artrópodos y nematodos para observar actividad tóxica, ovicida, y/o repelente⁸⁴.

Por otra parte, para encontrar metabolitos secundarios con aplicación terapéutica, existen ensayos para evidenciar actividad antimicrobiana, empleando métodos comunes como el de difusión en disco, el de dilución en agar y la prueba de inhibición sobre el crecimiento radial de microorganismos patógenos para los humanos^{21,25,85-87}. Sobre diferentes líneas celulares tumorales, para comprobar acción anticancerígena⁸⁸. Para comprobar actividad antiinflamatoria se realizan pruebas sobre diferentes líneas celulares y la prueba de enema en oreja de ratón⁸⁹. Para demostrar actividad antidiabética se trabaja con ratones^{90,91} y, por último, mediante la infección de células por virus y el método de difusión en pozo con una suspensión de células virales, se logra observar la actividad antiviral⁹². Cabe destacar que estas pruebas son sólo una muestra representativa de los principales bioensayos utilizados y de la actividad biológica puesta en evidencia.

Estas evaluaciones preliminares permiten detectar extractos naturales apropiados para la obtención de agentes terapéuticos o agroquímicos^{4,5}. En general, los extractos que demuestran respuestas positivas en los ensayos de fitoinhibición o como inhibidores del crecimiento de microorganismos, se consideran candidatos adecuados para la realización de otras pruebas biológicas dirigidas a un blanco de acción específico en la fisiología o en el metabolismo vegetal o de los microorganismos, respectivamente^{17,44}.

Una vez seleccionados los extractos activos se aíslan los principios bioactivos mediante estudios químicos biodirigidos. Este proceso permite la obtención de los metabolitos secundarios con actividad biológica^{21,25,72}. Los compuestos naturales activos puros se identifican y, por último, éstos son sometidos a ensayos biológicos adicionales con la finalidad de explorar de manera más detallada su posible aplicación como fármacos o agroquímicos comerciales^{13,25,44,74}. En el caso particular de los agroquímicos potenciales, se realizan

pruebas de invernadero sobre especies vegetales cultivables o sobre malezas para determinar la actividad de tipo pre y postemergente⁸⁷.

Finalmente, es necesario determinar la toxicidad de los compuestos bioactivos y para ello se han desarrollado pruebas preliminares sobre los crustáceos *Artemia salina* y *Daphnia magna*^{93,94}, así como la muerte celular de macrófagos, utilizando líneas celulares⁹⁵. Posteriormente, es necesario verificar la toxicidad en mamíferos, en cuyo caso se trabaja inicialmente con ratones y cobayos, para posteriormente dar inicio a las pruebas clínicas en pacientes y personas sanas^{96,97}.

En este contexto, se muestran a continuación los resultados obtenidos a nivel de extractos orgánicos de hongos endófitos con potencial antagonístico, aislados de las hojas de plantas seleccionadas bajo un criterio ecológico, y colectadas en una zona de alta biodiversidad como lo es la 'Reserva Ecológica de la Biósfera Sierra de Huautla' (REBIOSH), ubicada en Morelos, México. Esta investigación se realiza actualmente en nuestro grupo de trabajo y está enfocada principalmente en la obtención de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico y antimicrobiano con posible aplicación sobre el control de malezas, hongos verdaderos y oomicetos fitopatógenos.

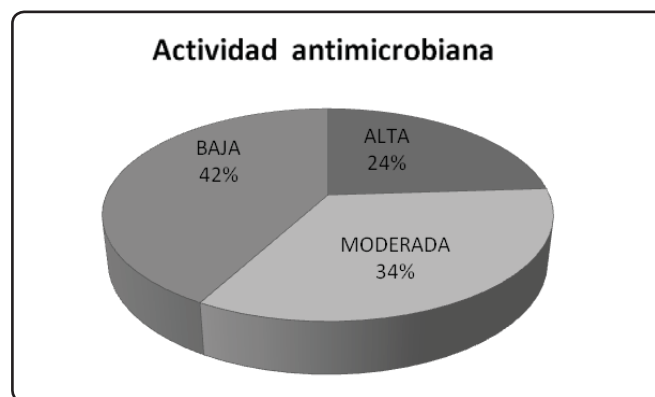
Para lograr este objetivo, se aislaron hongos endófitos^{73,76} de las hojas sanas de 11 plantas pertenecientes a las familias Burseraceae, Celastraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Labiatae y Piperaceae, obteniendo un total de 4310 aislamientos de hongos endófitos, de los cuales se han conseguido 183 morfotipos puros a la fecha, que poseen potencial antagonístico sobre el crecimiento de otras poblaciones de hongos endófitos que emergían al mismo tiempo durante las etapas de aislamiento y purificación. Estos resultados muestran claramente que las plantas en estudio se encuentran colonizadas por un amplio número de hongos endófitos, y confirman que el criterio de selección empleado, es decir, plantas que crecen en áreas de gran diversidad biológica y que no presentan ningún daño por patógenos o herbívoros, constituyen una buena estrategia para aislar una gran cantidad y diversidad de endófitos^{4,74}.

Con el propósito de obtener los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos y comprobar que poseen potencial antimicrobiano y fitotóxico, de los 183 endófitos puros, se eligieron 75 para su cultivo, los cuales inhibieron significativamente el crecimiento de otros endófitos en las interacciones antagonísticas observadas durante la etapa de purificación. Los hongos seleccionados se cultivaron en pequeña escala bajo diferentes condiciones, utilizando como medio de crecimiento, caldo papa dextrosa (1 L), incubando en condiciones estáticas y en agitación (15 días a 200 rpm), en medios sólidos empleando agar papa dextrosa (10 cajas de Petri de 10 cm) y en medio a base de arroz (300 g), incubado

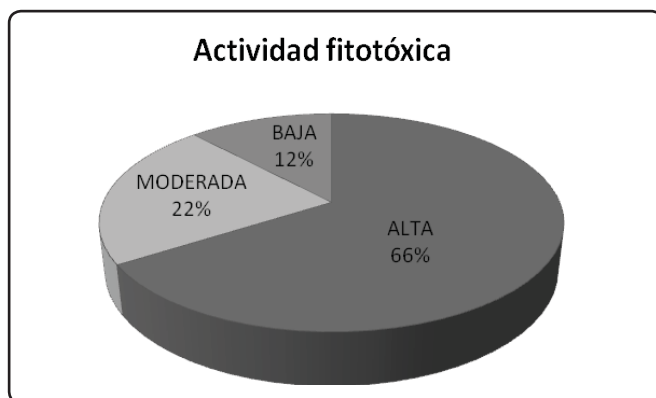
estáticamente por un periodo de 30 días, con fotoperiodo de luz artificial-obscuridad 12:12 h, a temperatura ambiente. Transcurrido el periodo de incubación, se obtuvieron los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio para los cultivos en medio líquido y de medio-micelio para los cultivos en medio sólido y arroz. El potencial antimicrobiano y fitotóxico, de los extractos orgánicos obtenidos se determinó cuantitativamente sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos y sobre la longitud de la raíz de plantas modelo, utilizando el método de dilución en agar^{21,25,98,99}.

De los de 75 endófitos cultivados en pequeña escala, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos con los mayores rendimientos. En la Gráfica 1 se muestra el potencial antimicrobiano de 36 extractos orgánicos sobre el crecimiento de cinco microorganismos fitopatógenos con importancia económica, dos hongos verdaderos (*Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*) y sobre tres oomicetos (*Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora capsici*). El efecto de inhibición provocado por cada uno de los extractos fúngicos evaluados sobre el crecimiento de los microorganismos de prueba, se agrupan en alto, moderado y bajo, según su actividad antimicrobiana mostrada, donde bajo corresponde a inhibiciones del 1-24%, moderado del 25-50% y alto del 51-100%, de acuerdo con los intervalos establecidos en nuestro grupo de trabajo. El 42% tuvo actividad baja, el 34% presentó actividad moderada y el 24% exhibió actividad alta.

Estos resultados demuestran que los metabolitos secundarios biosintetizados por más del 50% de los hongos endófitos evaluados, poseen actividad antimicrobiana de moderada a alta. Por lo que son considerados como candidatos idóneos en la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural, con actividad antimicrobiana, útiles en la agricultura moderna y que además posiblemente tengan un papel en la protección de su hospedera contra patógenos y herbívoros.



Gráfica 1. Potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos de hongos endófitos sobre el crecimiento de cinco microorganismos fitopatógenos con importancia económica.



Gráfica 2. Potencial fitotóxico de los extractos orgánicos de hongos endófitos sobre la longitud de la raíz de dos plantas de prueba.

Con respecto a la actividad fitotóxica en la Gráfica 2 se muestra el efecto inhibitorio de 70 extractos orgánicos sobre la longitud de la raíz de las semillas de dos plantas modelo, *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) y *Solanum lycopersicum* (Solanaceae). De nueva cuenta, el porcentaje de inhibición provocado por cada uno de los extractos orgánicos evaluados sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba se agrupan en alto, moderado y bajo, según su actividad fitotóxica mostrada, donde bajo corresponde a inhibiciones del 1-24%, moderado del 25-50% y alto del 51-100%, de acuerdo con los intervalos establecidos en nuestro grupo de trabajo. El 12% de los extractos evaluados tuvo actividad fitotóxica baja, el 22% presentó actividad moderada y el 60% mostró actividad alta. Estos datos demuestran que la mayoría de los hongos endófitos aislados de plantas de la REBIOSH son excelentes productores de compuestos con actividad fitotóxica, útiles para el desarrollo de agentes herbicidas alternativos a los usados hoy en día. Por otra parte, es posible que estos compuestos también contribuyan en la defensa de su planta hospedera, protegiéndola de la invasión de algunas plantas o malezas que habitan en su comunidad y a su vez pueden ser necesarios para su sobrevivencia dentro de su planta hospedera.

En el presente trabajo se pone en evidencia que los hongos endófitos representan candidatos idóneos, para la investigación y obtención de compuestos bioactivos.

CONCLUSIONES

Desde el descubrimiento de los hongos endófitos como productores de metabolitos secundarios tóxicos contra herbívoros, comenzó un amplio estudio que agrupa a investigadores de diversas áreas con el fin de conocer varios aspectos de los endófitos, entre ellos la producción de metabolitos bioactivos útiles para la humanidad.

Con los ejemplos proporcionados podemos demostrar la importancia del estudio de los hongos endófitos y su potencial para la obtención de compuestos bioactivos. Sin embargo, falta todavía mucha investigación que nos proporcione información sobre la toxicidad y seguridad de los metabolitos secundarios para que puedan ser utilizados como agentes agroquímicos o como fármacos. Asimismo, es necesario realizar estudios sobre el papel que estos metabolitos puedan tener en la naturaleza y en la protección hacia su hospedera.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a través del Instituto de Química, por el apoyo para la realización de los estudios sobre hongos endófitos de plantas de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero otorgado a través del proyecto 81017.

REFERENCIAS

- Wilson, D. Endophyte the evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**, 274-276 (1995).
- Rodríguez, R., White, J., Arnold, A.E. & Redman, R. Fungal endophytes: Diversity and ecological roles. *New. Phytol.* **182**, 314-330 (2009).
- Schulz, B. & Boyle, C. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* **109**, 661-686 (2005).
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* **67**, 257-268 (2004).
- Tan, R.X. & Zou, W.X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 448-459 (2001).
- Kusari, S., Hertweck, C. & Spiteller, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chem. & Biol.* **19**, 792-798 (2012).
- Mittermeier, R.A., Meyers, N. Robles-Gil, P. & Mittermeier, C.G. in Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered ecoregions (ed. CEMEX, México, 1999).
- Arnold, E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* **21**, 51-66 (2007).
- de Bary, A. in Morphologie und physiologie der pilze, flechten, und myxomyceten. Hofmeister's handbook of physiological botany (Leipzig, Germany, Engelmann, 1866).
- Guerin, M.P. Structure particuliere du fruit de quelques graminees. *Bot.* **12**, 365-374 (1898).
- Funk, C.R., Halisky, P.M., Ahmad, S. & Hurley, R.H. in How endophytes modify turfgrass performance and response to insect pests in turfgrass breeding and evaluation trials (ed. Lemaire, E.) 137-145 (Avignon, France 1985).
- Clay, K. Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**, 10-16 (1988).
- Rosa, L.H. *et al.* in Drug Development. A case study based insight into modern strategies (ed. Rundfeldt, C.) 1-18 (Intech, Croatia, 2011).
- Herre, E.A. *et al.* Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology* **88**, 550-558 (2007).

15. Arnold, A.E. *et al.* Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS* **100**, 15649-15654 (2003).
16. Dreyfuss, M.M. & Chapela, I.H. in *The discovery of natural products with therapeutic potential* (ed. Gullo, V.P.) 49-80 (Butterworth-Heinemann, London, UK, 1994).
17. Gao, F.K., Dai, C.C. & Liu, X.Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.* **4(13)**, 1346-1351 (2010).
18. Herre, E.A. *et al.* In *Biotic interactions in the tropics: Their role in the maintenance of species diversity*. (ed. Burslem, D.F.R.P., Pinard, M.A. & Hartey, S.E.) 226-227 (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2005).
19. Zhao, J. *et al.* in *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 567-576 (ed. Méndez-Vilas, A., 2010).
20. González, M.C. *et al.* *Muscodyrucatanensis*, a new endophytic ascomycete from Mexican chakah, *Bursera simaruba*. *Mycotaxon* **110 (1)**, 363-372 (2009).
21. Macías-Rubalcava, M.L. *et al.* Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodyrucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *J. Chem. Ecol.* **36**, 1122-1131 (2010).
22. Waller, F. *et al.* The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS* **102**, 13386-13391 (2005).
23. Kageyama, S.A., Mandyam, K.G. & Jumpponen, A. in *mycorrhiza: State of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*. (ed. Varma, A.) 29-57 (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2008).
24. Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Lugtenberg, B.J.J. & Bloemberg, G.V. Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**, 710-721 (2005).
25. Macías-Rubalcava, M.L. *et al.* Naftoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochem.* **69**, 1185-1196 (2008).
26. Body, L. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microb. Ecol.* **31(3)**, 185-194 (2000).
27. Tuininga, A.R. in: *The Fungal Community: It's organization and role in the ecosystem* (ed. Dighton, J., White, J. & Oudemans, J.) 265-283 (CRC Press, E.U., 2005).
28. Widden, P. in *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. (ed. Wicklow, D. T. & Sönderström, B.) 135-147 (Springer-Verlag, Alemania, 1997).
29. Rotheray, T.D., Chancellor, M., Jones, T.H. & Boddy, L. Grazing by collembola affects the outcome of interspecific mycelial interactions of cord-forming basidiomycetes. *Fungal Ecol.* **4(1)**, 42-55 (2011).
30. Hynes, J., Müller, C.T., Jones, T.H. & Boddy, L. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholomafasciculare* and *Resinicium bicolor*. *J. Chem. Ecol.* **33**, 43-57 (2007).
31. Yuen, T.K., Hyde, K.D. & Hodgkiss, I.J. Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microb. Ecol.* **37**, 257-262 (1999).
32. Shearer, C.A. Fungal competition. *Can. J. of Bot.* **73 (S1)**, 1259-1264 (1995).
33. Wani, M., Taylor, H., Wall, M., Coggon, P. & McPhail, A. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93(9)**, 2325-2327 (1971).
34. Gunatilaka, A.A.L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J. Nat. Prod.* **69**, 509-526 (2006).
35. Nicolaou, K.C. Total synthesis of taxol. *Nature* **367**, 630-634 (1994).
36. Stierle, A., Strobel, G.A. & Stierle, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. *Science* **260**, 214-216 (1993).
37. Strobel, G.A., Stierle, A., Stierle, D. & Hess, W.M. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with pacific yew. *Mycotaxon* **47**, 71-78(1993).
38. Stribel, G. *et al.* Taxol from *Pestalotiopsis microspore*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiol.* **142**, 435-440(1996).
39. Li, J.Y. *et al.* Endophytic taxol producing fungi from bald cypress *Taxodium distichum*. *Microbiology* **142**, 2223-2226 (1996).
40. Kim, S.U., Strobel, G.A. & Ford, E. Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* and *Taxus cuspidata* in Korea. *Agr. Chem. Biotechnol.* **42**, 97-99 (1999).
41. Sun, D.F., Ran, X.Q. & Wang, J.F. Isolation and identification of Taxol producing endophytic fungus from *Podocarpus*. *Acta Microbiol.* **48**, 589-595(2008).
42. Liu, L., Liu, S., Chen, X., Guo, L. & Che, Y. Pestalofones A-E, bioactive cyclohexanone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Bioorg. Med. Chem.* **17(2)**, 606-613 (2009).
43. Schwarz, M. *et al.* 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle endophytic fungi. *Phytochem.* **65**, 2239-2245 (2004).
44. Medeiros, L.S. *et al.* Evaluation of herbicidal potential of depsides from *Cladosporium uredinicola*, an endophytic fungus found in *Guava* fruit. *J. Braz. Chem. Soc.* **23(8)**, 1551-1557 (2012).
45. González, M.C. *et al.* A new endophytic ascomycete from El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico. *Mycotaxon.* **101**, 251-260 (2007).
46. Meléndez González, C. Potencial aleloquímico del endófito *Edenia gomezpompae* sobre diferentes comunidades de hongos endófitos de plantas tropicales. Tesis de Licenciatura (Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2008) 113 págs.
47. Siegel, D.A. *et al.* Meridional variations of springtime phytoplankton community in the Sargasso Sea. *J. Mar. Res.* **48**, 379-412 (1990).
48. Yates, S.G., Fenster, J.C. & Bartelt, R.J. Assay of tall fescue seed extracts, fractions and alkaloids using the large milkweed bug. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 354-357 (1989).
49. Patterson, C.G., Potter, D.A. & Fannin, F.F. Feeding deterrence of alkaloids from endophyte-infected grasses to Japanese beetle grubs. *Entomol. Exp. Appl.* **61**, 285-289 (1991).
50. Riedel, W.E., Kieckhefer, R.E., Petroski, R.J. & Powell, R.G. Naturally occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: Insect feeding behavior modification and toxicity. *J. Entomol. Sci.* **26(1)**, 122-129 (1991).
51. Hovey, M.T., Eklund, E.J., Pike, R.D., Mainkar, A.A. & Scheerer, J.R. Synthesis of (±)-acetylornitine via stereoselective

- tethered aminohydroxylation. *Org. Lett.* **13**(5), 1246-1249 (2011).
52. Zhao, J. *et al.* Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Gliomastix murorum* Ppf8 associated with the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Journal of Medicinal Plants Research* **6**(11), 2100-2104 (2012).
53. Rukachaisirikul, V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J. & Kirtikara, K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochem.* **69**(3), 783-787 (2008).
54. Cole, R.J. *et al.* Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J. Agric. Food Chem.* **25**, 826-830 (1977).
55. Pinheiro, E.A. *et al.* Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. *Nat. Prod. Res.* (2012). In press DOI: 10.1080/14786419.2012.750316.
56. Debbab, A. *et al.* Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. Isolated from *Salvia officinalis* growing in Morocco. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**(2), 229-234 (2009).
57. Imlach, W.L., Finch, S.C., Dunlop, J. & Dalziel, J.E. Structural determinants of lolitrems for inhibition of BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Eur. J. Pharmacol.* **605**(1-3), 36-45 (2009).
58. Xu, S. *et al.* Cytotoxic Cytochalasin Metabolites of Endophytic *Endothia gyrosa*. *Chem. Biodivers.* **6**(5), 739-745 (2009).
59. Ortega, H.E. *et al.* Mycoleptodiscins A and B, Cytotoxic Alkaloids from the Endophytic Fungus *Mycoleptodiscus* sp. F0194. *J. Nat. Prod.* (2013). In press DOI: 10.1021/np300792t.
60. Ferreira Koolen, H.H. *et al.* An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. an endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L.f. *Quím. Nova.* **35**(4), 771-774 (2012).
61. Shen, L. *et al.* Structure and Total Synthesis of Aspernigerin: A Novel Cytotoxic Endophyte Metabolite. *Chem. Eur. J.* **12**(16), 4393-4396 (2006).
62. Zhang, H., Ma, Y., Liu, R. & Zhou, F. Endophytic fungus *Aspergillus tamarii* from *Ficus carica* L., a new source of indolyl diketopiperazines. *Biochem. Sys. Ecol.* **45**, 31-33 (2012).
63. Isaka, M., Berkaew, P., Intereya, K., Komwijit, S. & Sathitkunanon, T. Antiplasmodial and antiviral cyclohexadepsipeptides from the endophytic fungus *Pullularia* sp. *Tetrahedron* **63**(29), 6855-6860 (2007).
64. Shiono, Y. *et al.* A dimeric pyrrocidine from *Neonectria ramulariae* is an inhibitor of prolyl oligopeptidase. *Phytochem. Lett.* **5**(1), 91-95(2012).
65. Song, Y.C., Huang, W.Y., Sun, C., Wang, F.W. & Tan, R.X. Characterization of graphis lactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(3), 506-509 (2005).
66. Bultman, T.L. & Leuchtman, A. Biology of the *Epichloë-Botanophila* interaction: An intriguing association between fungi and insects. *Fungal Biol. Rev.* **22** (3-4), 131-138 (2008).
67. Hughes, C.C., Kennedy-Smith, J.J. & Trauner, D. Synthetic Studies toward the Guanacastepenes. *Org. Lett.* **5**(22), 4113-4115 (2003).
68. Qin, J.C. *et al.* Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**(6), 1572-1574 (2009).
69. Sumarah, M.W. *et al.* Secondary metabolites from anti-insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens*. *Phytochemistry* **71**, 760-765 (2010).
70. Liu, L. *et al.* Chloropupukeananin, the First Chlorinated Pupukeanane Derivative, and Its Precursors from *Pestalotiopsis fici*. *Org. Lett.* **10** (7), 1397-1400 (2008).
71. Basilio, A. *et al.* The discovery of moriniafungin, a novel sordarin derivative produced by *Morinia pestalozzioides*. *Bioorg. Med. Chem.* **14**(2), 560-566 (2006).
72. Elsaesser, B. *et al.* X-ray structure determination, absolute configuration and biological activity of phomoxanthone A. *Eur. J. Org. Chem.* **21**, 4563-4570 (2005).
73. Strobel, G. & Daisy, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**(4), 491-502 (2003).
74. Yu, H. *et al.* Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microb. Res.* **165**, 437-449(2010).
75. Gamboa, M.A., Laureano, S. & Bayman, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathol.* **156**, 41-45 (2002).
76. Rodríguez, K.F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe Oleracea*. *Mycol.* **86**, 376-385(1994).
77. Ko Ko, T.W., Stephenson, S.L., Bahkali, A.H. & Hyde, K.D. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? *Fungal Divers.* **50**, 113-120 (2011).
78. Montesinos, E. *et al.* Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int. Microbiol.* **5**, 169-175 (2010).
79. Mejía, L.C. *et al.* Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biolog. Cont.* **46**, 4-14 (2008).
80. Waqas, M. *et al.* Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. *Molecules* **17**, 10754-10773 (2012).
81. Rubini, M.R. *et al.* Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci.* **1**, 24-33 (2005).
82. Bhagobaty, R.K. & Joshi, S.R. Promotion of seed germination of Green gram and Chick pea by *Penicillium verruculosum* RS7PF, a root endophytic fungus of *Potentilla fulgens* L. *Adv. Biotech.* **8**(12), 7-15 (2009).
83. Neilan, B.A., Pomatia, F., Nettinga, A.G. & Calamarib, D. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquat. Toxicol.* **67**(4), 387-396 (2004).
84. Mann, R.S & Kaufman, P.E. Natural Product Pesticides: Their Development, Delivery and use against Insect Vectors. *Rev. in Org. Chem.* **9**, 185-202 (2012).
85. Homan, A.M. *et al.* Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. *Phytochem.* **69**, 1049-1056 (2008).
86. Rhoden, S.A., Garcia, A., Bongiorno, V.A., Azevedo, J.L. & Pamphile, J.A. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Trichilia elegans* a. Juss. *JAPS* **2**(8), 57-59 (2012).
87. Rosa, L.H. *et al.* Antifungal activity of extracts from endophytic

- fungi associated with *Smallanthus* maintained *in vitro* as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. *Can. J. Microbiol.* **58**, 1202–1211 (2012).
88. Zhu, J.W. *et al.* Elucidation of Strict Structural Requirements of Brefeldin A as an inducer of differentiations and apoptosis. *Biorg. Med. Chem.* **8**, 455-463 (2000).
89. Weber, D. *et al.* Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *J. Antibiot.* **57(9)**, 559-563 (2004).
90. Dompeipen, E.J., Srikandace, Y., Suharso, W.P., Cahyana, H. & Simanjuntak, P. Potential endophytic microbes selection for antidiabetic bioactive compounds production. *Asian J. of Biochem.* **6**, 465-471 (2011).
91. Mata, R. *et al.* Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochem.* **68(15)**, 2087-2095 (2007).
92. Schmeda-Hirschmann, G., Hormozabal, E., Astudillo, L., Rodríguez, J. & Theoduloz, C. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). *World J. Microbiol. Biotech.* **21(1)**, 27-32 (2005).
93. Mayorga, P., Pérez, K. R., Cruz, S.M. & Cáceres, A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. *Braz. of Pharmacog.* **20**, 897-903 (2010).
94. Morettia, A., Muléa, G., Ritienib, A. & Logriecoa, A. Further data on the production of beauvericin, enniatins and fusaproliferin and toxicity to *Artemia salina* by *Fusarium* species of *Gibberella fujikuroi* species complex. *Int. J. of Food Microbiol.* **118(2)**, 158-163 (2007).
95. Guimaraes, D.O. *et al.* Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *Immunol. Med. Microbiol.* **52**, 134-144 (2008).
96. DiMasi, J.A., Hansen, R.W. & Grabowski, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. of Health Econ.* **22**, 151-185 (2003).
97. Baskin-Bey, E.S. *et al.* Clinical trial of the pan-caspase inhibitor, IDN-6556, in human liver preservation injury. *Am. J. of Trans.* **7**, 218-225 (2007).
98. Sánchez Fernández, R.E. Determinación del potencial alelopático de los extractos del medio de cultivo y del micelio de un hongo endófito aislado de *Lonchocarpus castilloi* (Fabaceae). Tesis de Licenciatura (Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2010) 87 págs.
99. Armendáriz Guillén, B. Hongos endófitos productores de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico y antifúngico. Tesis de Licenciatura (Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2013) 106 págs.