



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**RELACIÓN ENTRE EL POTENCIAL ANTAGÓNICO Y EL  
POTENCIAL ALELOQUÍMICO DEL HONGO ENDÓFITO  
*XYLARIA SP.*, AISLADO DE *PTERIDIUM AQUILINUM*  
(DENNSTAEDTIACEAE): OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN  
DE LOS PRINCIPALES ALELOQUÍMICOS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:  
LAURA LETICIA HERNÁNDEZ ACEVEDO**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS**

**VOCAL: DRA. IRMA SUSANA ROJAS TOMÉ**

**SECRETARIO: DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA**

**1er. SUPLENTE: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ**

**2do. SUPLENTE DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM  
LABORATORIO 1-4, PRODUCTOS NATURALES  
CIUDAD UNIVERSITARIA.**

**ASESOR DEL TEMA: \_\_\_\_\_  
DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA**

**SUSTENTANTE: \_\_\_\_\_  
LAURA LETICIA HERNÁNDEZ ACEVEDO**



---

---

## AGRADECIMIENTOS

A la gloriosa Universidad Nacional Autónoma de México, por todo y cada unos de los grandes logros que realicé durante mi estancia en esta casa de estudios.

A la Facultad de Química, por mi formación como profesionista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente trabajo a través de los proyectos 81017 y 179194.

A la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava por su inmensa paciencia, sus consejos, el tiempo dedicado, el apoyo y la confianza para conmigo y este proyecto.

Al personal técnico del Instituto de Química UNAM, por el registro de los distintos espectros de utilizados en esta investigación y por la difracción de Rx de los metabolitos secundarios.

A la Dra. Olga Gómez y la M. en C. Bertha Tlapal Bolaños del Colegio de Postgraduados y la Universidad Autónoma de Chapingo, por facilitarnos los hongos y oomicetos fitopatógenos.

A la Bióloga Carmen Loyola Blanco del Instituto de Biología, UNAM, por las fotografías tomadas de los hongos.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang, del Instituto de Ecología, UNAM, por el apoyo otorgado durante mi estancia en el Laboratorio de Alelopatía.

A la Q. A. Blanca Estela Hernández Bautista, por el gran apoyo brindado para la realización de los bioensayos.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents y a la Dra. Irma Susana Rojas Tomé, por el tiempo dedicado para la realización de las observaciones y correcciones para la mejora del presente proyecto.

A todos los compañeros de los dos Laboratorios, por los buenos momentos que pasamos, por sus consejos, las enseñanzas y lecciones aprendidas.



---

---

**DEDICATORIA**

*A MI QUERIDA ABUELITA ÁNGELA.*

*Y MUY EN ESPECIAL A UNA GRAN GUERRERA:*

*GRACIAS MAMÁ POR TU INMENSO AMOR.*



---

---

## INDICE

	PÁGINA
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	VII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	XII
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	3
1.- ALELOPATÍA.....	3
2.- HONGOS ENDÓFITOS.....	5
2.1 CLASIFICACIÓN.....	6
2.2 ESPECIFICIDAD DE TEJIDOS Y COLONIZACIÓN.....	6
2.3 TRANSMISIÓN.....	7
2.4 ABUNDANCIA Y DIVERSIDAD TAXONÓMICA.....	8
2.5 INTERACCIÓN PLANTA-HONGO ENDÓFITO.....	8
2.6 PAPEL ECOLÓGICO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.....	9
2.7 CRITERIO DE SELECCIÓN DE PLANTAS HOSPEDERAS PARA EL AISLAMIENTO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.....	10
2.8 PAPEL DE LOS HONGOS ENDÓFITOS EN LA AGRICULTURA MODERNA.....	12
3.-LOS XYLARIALES.....	13
3.1 LA FAMILIA XYLAREACEAE.....	14
3.2 EL GÉNERO <i>XYLARIA</i> .....	15
3.3 <i>XYLARIA</i> COMO ENDÓFITO.....	15
METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA AISLADOS DE HONGOS ENDÓFITOS DEL GÉNERO <i>XYLARIA</i> .....	17
4.- <i>PTERIDIUM AQUILINUM</i> .....	28
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	30
1.- OBJETIVO GENERAL.....	30
2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	30



---

---

	PÁGINA
<b>V. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	32
1.- MATERIAL FÚNGICO.....	32
2.- ORGANISMOS DE PRUEBA.....	32
2.1 MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS.....	32
2.2 PLANTAS DE PRUEBA.....	32
3.- BIOENSAYOS DE ANTAGONISMO ENTRE <i>Xylaria</i> sp. Y HONGOS FITOPATÓGENOS.....	33
4.- DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO ENDÓFITO <i>Xylaria</i> sp.....	34
5.- OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS A PARTIR DEL MEDIO DE CULTIVO Y MICELIO DE <i>Xylaria</i> sp.....	36
6.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DEL MEDIO DE CULTIVO Y MICELIO DE <i>Xylaria</i> sp.....	36
6.1 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO.....	37
6.2 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO.....	37
7.- CULTIVOS EN MEDIANA ESCALA DEL HONGOS ENDÓFITO <i>Xylaria</i> sp.....	38
8.- ESTUDIO QUÍMICO.....	39
8.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS GENERALES.....	39
8.2 FRACCIONAMIENTO PRIMARIO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE <i>Xylaria</i> sp.....	40
9.- SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	43
9.1 OBTENCIÓN DE LA PUNCTAPORONINA B.....	43
9.2 OBTENCIÓN DEL ÁCIDO SUCCÍNICO.....	43
OBTENCIÓN DE LA 5-CARBOXIMELEINA.....	43
10.- DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.....	44
11.- DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL CITOTÓXICO DE LOS COMPUESTOS PUROS.....	44
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	45
1.- BIOENSAYO DE ANTAGONISMO DIRECTO.....	45



1.1. ANTAGONISMO COMPETITIVO ENTRE EL HONGO ENDÓFITO <i>Xylaria</i> sp. AISLADO DE <i>Pteridium aquilinum</i> Y DOS HONGOS AISLADOS DE <i>Callicarpa</i> <i>acuminata</i> .....	47
1.1.1 Antagonismo entre <i>Xylaria</i> sp. y el endófito <i>Phomopsis</i> sp.	
1.1.2 Antagonismo entre <i>Xylaria</i> sp. y el fitopatógeno <i>Pestalotiopsis</i> sp.	
1.2 ANTAGONISMO COMPETITIVO ENTRE EL ENDÓFITO <i>Xylaria</i> sp. Y DIVERSOS MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS CON IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	48
1.2.1 Antagonismo directo entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>Phytophthora capsici</i> .	
1.2.2 Antagonismo directo entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>Rhizoctonia</i> sp.	
1.2.3 Antagonismo directo entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>Alternaria Solani</i> .	
1.2.4 Antagonismo directo entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>Fusarium oxysporum</i> .	
2.- DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CERCIMIENTO DE <i>Xylaria</i> sp. Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ALELOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL MEDIO DE CULTIVO Y MICELIO.....	53
2.1 EFECTO ANTIFÚNGICO.....	55
2.2 EFECTO FITOTÓXICO.....	56
3.- CULTIVO EN MEDIANA ESCALA.....	58
3.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	60
3.2 ACTIVIDAD FITOTÓXICA.....	61
4.- FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO EN MEDIANA ESCALA.....	61
4.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	62
4.2 ACTIVIDAD FITOTÓXICA.....	64
5.- CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES ACTIVAS.....	67
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA PUNCTAPORONINA B (35).....	67
5.2 CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO SUCCÍNICO (36).....	71
5.3 CARACTERIZACIÓN DE LA 5- CARBOXIMELEINA (37).....	73





6.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES ACTIVAS.....	77
6.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	77
6.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FITOTÓXICA.....	78
6.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA.....	78
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>82</b>
<b>IX. ANEXO.....</b>	<b>95</b>



---

---

## LISTA DE CUADROS

	PÁGINA
<b>Cuadro 1.-</b> Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género <i>Xylaria</i> .	17
<b>Cuadro 2.-</b> Medios de cultivo para determinar el desarrollo óptimo de <i>Xylaria</i> sp.	35
<b>Cuadro 3.-</b> Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto del medio de cultivo CPD en condiciones estáticas de <i>Xylaria</i> sp	40
<b>Cuadro 4.-</b> Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto del micelio en condiciones estáticas de <i>Xylaria</i> sp.	41
<b>Cuadro 5.-</b> Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto del medio cultivo en condiciones de agitación de <i>Xylaria</i> sp.	42
<b>Cuadro 6.-</b> Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto del micelio en condiciones de agitación de <i>Xylaria</i> sp.	42
<b>Cuadro 7.-</b> Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los microorganismos competidores en los bioensayos de antagonismo.	53
<b>Cuadro 8.-</b> Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los cultivos en pequeña escala (1 L)	54
<b>Cuadro 9.-</b> Efecto antifúngico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de <i>Xylaria</i> sp., a una concentración de 250 µg/mL, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos de importancia económica	56
<b>Cuadro 10.-</b> Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de <i>Xylaria</i> sp., sobre el crecimiento de la raíz de tres especies de semillas a una concentración de 100 µg/mL	57
<b>Cuadro 11.-</b> Condiciones óptimas de crecimiento para <i>Xylaria</i> sp	58
<b>Cuadro 12.-</b> Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, correspondientes al cultivo de <i>Xylaria</i> sp. en mediana escala, empleando condiciones de incubación estáticas y en agitación	59



<b>Cuadro 13.-</b>	Efecto antifúngico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, derivados de los cultivos en mediana escala a 250 µg/mL, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos	60
<b>Cuadro 14.-</b>	Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, derivados de los cultivos en mediana escala a 100 µg/mL, sobre el crecimiento de tres semillas	61
<b>Cuadro 15.-</b>	Cantidad de los extractos orgánicos utilizados y número de fracciones obtenidas en el fraccionamiento biodirigido	62
<b>Cuadro 16.-</b>	Constantes espectroscópicas de IR y espectrométricas de la punctaporonina B ( <b>35</b> ), el ácido succínico ( <b>36</b> ) y la 5-carboximeleina ( <b>37</b> )	69
<b>Cuadro 17.-</b>	Datos espectroscópicos de RMN <sup>13</sup> C (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> + DMSO) y de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> + DMSO) de la punctaporonina B ( <b>35</b> )	70
<b>Cuadro 18.-</b>	Datos espectroscópicos de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) y de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD), del ácido succínico ( <b>36</b> )	72
<b>Cuadro 19.-</b>	Datos espectroscópicos de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) y de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la 5-carboximeleina ( <b>37</b> )	75
<b>Cuadro 20.-</b>	Resultados del ensayo de evaluación de la actividad citotóxica de los metabolitos secundarios puros de <i>Xylaria sp.</i> , sobre seis líneas celulares cancerosas humanas	79



---

---

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>Figura 1.-</b> Ejemplos de estromas de <i>Xylaria</i> sp., en la naturaleza y en un cultivo en caja Petri.	14
<b>Figura 2.-</b> Bioensayo de antagonismo en caja Petri entre <i>Xylaria</i> sp. (A) y los microorganismos de prueba (B); donde a y b representan los radios de crecimiento de cada microorganismo y ZI es la zona de interacción antagónica.	34
<b>Figura 3.-</b> Crecimiento en cm <sup>2</sup> de <i>Xylaria</i> sp. en cultivos en PDA en función del tiempo.	46
<b>Figura 4.-</b> Bioensayo de antagonismo entre los hongos endófitos <i>Xylaria</i> sp. (izq) y <i>Phomopsis</i> sp.(der) a los 5 días de interacción. B. Interacción antagónica a los 10 días.	47
<b>Figura 5.-</b> Bioensayo de antagonismo entre <i>Xylaria</i> sp. (izq) y el hongo fitopatógeno <i>Pestalotiopsis</i> sp. (der) a los 5 días de interacción. B. Interacción antagónica a los 10 días.	48
<b>Figura 6.-</b> Bioensayo de antagonismo entre <i>Xylaria</i> sp. (izq) y el oomiceto fitopatógeno <i>P. capsici</i> (der) a los 3 días de interacción. B. Interacción antagónica a los 10 días.	49
<b>Figura 7.-</b> Bioensayo de antagonismo entre <i>Xylaria</i> sp. (izq) y el hongo fitopatógeno <i>Rhizoctonia</i> sp. (der) a los 3 días de interacción. B. Interacción antagónica a los 10 días.	50
<b>Figura 8.-</b> Bioensayo de antagonismo entre <i>Xylaria</i> sp. (izq) y el hongo fitopatógeno <i>A. solani</i> (der) a los 5 días de interacción. B. Interacción antagónica a los 10 días.	51
<b>Figura 9.-</b> A. Bioensayo de antagonismo entre <i>Xylaria</i> sp. (izq) y el hongo fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> (der) a los 5 días de interacción. B. Interacción antagónica a los 10 días.	52



<b>Figura 10.-</b>	Actividad antifúngica de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo en CPD de <i>Xylaria</i> sp., incubado en condiciones estáticas, a 250 µg/mL.	63
<b>Figura 11.-</b>	Actividad antifúngica de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo en CPD de <i>Xylaria</i> sp., incubado en condiciones estáticas, a 250 µg/mL.	63
<b>Figura 12.-</b>	Actividad antifúngica de las fracciones primarias del extracto del micelio del cultivo en CPD de <i>Xylaria</i> sp., incubado en condiciones de agitación, a 250 µg/mL.	64
<b>Figura 13.-</b>	Actividad fitotóxica de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo en CPD de <i>Xylaria</i> sp., incubado en condiciones estáticas a 100 µg/mL.	65
<b>Figura 14.-</b>	Actividad fitotóxica de las fracciones primarias del extracto del micelio del cultivo en CPD de <i>Xylaria</i> sp., incubado en condiciones estáticas, a 100 µg/mL.	66
<b>Figura 15.-</b>	Actividad fitotóxica de las fracciones primarias del extracto del micelio del cultivo en CPD de <i>Xylaria</i> sp., incubado en condiciones de agitación, a 100 µg/mL.	66
<b>Figura 16.-</b>	Proyección ORTEP al 40% de probabilidad de la punctaporonina B (35).	71
<b>Figura 17.-</b>	Proyección ORTEP de la 5-carboximeleina aislada de <i>Xylaria</i> sp, al 40% de probabilidad.	76
<b>Figura 18.-</b>	Actividad antifúngica (250 µg/mL) de los metabolitos secundarios aislados de <i>Xylaria</i> sp.	77
<b>Figura 19.-</b>	Actividad fitotóxica de los metabolitos secundarios aislados de <i>Xylaria</i> sp., a 100 µg/mL.	78
<b>Figura 20.-</b>	Espectro IR de del punctaporonina B (35).	96
<b>Figura 21.-</b>	Espectro de masas de la punctaporonina B (35).	97



---

	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 22.-</b> Espectro $^{13}\text{C}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$ ) de la punctaporonina B ( <b>35</b> ).	98
<b>Figura 23.-</b> RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$ ) de la punctaporonina B (ampliación) ( <b>35</b> ).	99
<b>Figura 24.-</b> RMN $^{13}\text{C}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$ ) de la punctaporonina B ( <b>35</b> ).	100
<b>Figura 25.-</b> Espectro de IR del ácido succínico ( <b>36</b> ).	101
<b>Figura 26.-</b> Espectro de masas de la 5-carboximeleina ( <b>37</b> ).	102
<b>Figura 27.-</b> Espectro de IR de la 5-carboximeleina ( <b>37</b> ).	103
<b>Figura 28.-</b> RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la 5-carboximeleina ( <b>37</b> ).	104
<b>Figura 29.-</b> RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la 5- carboximeleina ( <b>37</b> ).	105



---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grados
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
cm	Centímetros
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
CP	Caldo papa
COSY	Correlation spectroscopy (espectroscopia bidimensional de correlación homonuclear)
CPD	Caldo -papa- dextrosa
d	Señal doble
dd	Señal doble de doble
DEPT	Decouplate enhancement proton test (experimento de desacoplamiento de protones)
EM	Espectroscopia de masas
g	Gramos
h	Horas
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
Hex	Hexano
kg	Kilogramos
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (espectroscopia bisdimensional de correlación heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
HCQS	Heteronuclear single quantum correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
IR	Infrarojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
L	Litros
M <sup>+</sup>	Ion molecular
m/z	Unidades de masa/carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
µg	Microgramos
µL	Microlitros
MHz	Megahertzios
mL	Mililitro
mm	Milímetros
min	Minuto
Mult.	Multiplicidad
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy (espectro del efecto nuclear de Overhauser)



---

p. f	Punto de fusión
PDA	Papa-dextrosa-agar
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
s	Señal simple o segundos
t	Señal triple
TMS	Tetrametilsilato
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta
V8	Medio jugo de ocho verduras
$\delta$	Desplazamiento químico
$\lambda_{\max}$	Longitud de onda de máxima absorción
$\nu_{\max}$	Frecuencia máxima
$[\alpha]_D$	Rotación óptica





---

---

## I.- INTRODUCCIÓN

La humanidad ha utilizado a la naturaleza para su beneficio, obteniendo principalmente alimento, cobijo, recursos y energía. El crecimiento de la población humana ha dado como resultado además de un aumento en la contaminación, una disminución importante en los recursos naturales, de tal modo que se requiere de la búsqueda de nuevas estrategias para conservar dichos recursos y a su vez seguir obteniendo sus beneficios. La excesiva demanda de alimentos que excede la oferta ha sido uno de los principales problemas que ha surgido, dando como resultado que comiencen a escasear, por otra parte los cultivos están expuestos a innumerables plagas, fundamentalmente, insectos, nematodos y microorganismos fitopatógenos causantes de enfermedades. Uno de los métodos que más se utiliza para controlar este problema es el uso de agroquímicos sintéticos, ya que reducen los daños causados en los cultivos por las plagas y en consecuencia los causados económicamente. Sin embargo, la elevada toxicidad causada no solo al organismo blanco, si no al hombre y los animales, aunado a su alta permanencia en el medio ambiente, ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias para el control de plagas, con el objetivo de disminuir la utilización de agroquímicos sintéticos.

Una alternativa viable para una mayor producción de alimentos, una reducción de la contaminación ambiental y el cuidado de los recursos naturales que nos rodean, son los sistemas de producción orgánica, que fomentan el desarrollo de procesos ecológicos más sostenibles que los sistemas que actualmente predominan (Chirinos, 2009). Sin embargo, esta estrategia no es suficiente para abastecer la demanda de alimentos y de recursos naturales, de tal forma que debe emplearse de manera conjunta con la agricultura tradicional utilizando agroquímicos alternativos, que presenten un menor impacto ecológico y sean menos tóxicos para el humano y su entorno. Los compuestos alternativos pueden ser productos naturales, ya que poseen diversas estructuras y actividad biológica, por lo que son potencialmente útiles en la industria farmacéutica y agroquímica. Asimismo, pueden utilizarse por sí mismos o constituir modelos para realizar modificaciones y generar nuevos productos más eficaces y menos tóxicos (Kumar *et al.*, 2014; Rosa *et al.*, 2011).



---

Por otra parte, la investigación de metabolitos secundarios producidos por los microorganismos, ha permitido comprender y estudiar el grado de inhibición parcial o total de una amplia variedad de agentes patógenos causantes de enfermedades, incluyendo a las bacterias, hongos, virus y protozoarios que afectan a seres humanos, animales y plantas (Mogollón *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2010; Wiyakrutta *et al.*, 2004; Strobel *et al.*, 2004). Un ejemplo de estos microorganismos potencialmente útiles para la obtención de productos naturales bioactivos, son los hongos endófitos que han generado gran interés principalmente por la obtención de moléculas novedosas y con diversas actividades biológicas, algunos de ellos con potencial de aplicación como biocidas de baja toxicidad y alta compatibilidad con el medio ambiente (Padhi *et al.*, 2013; Kumari *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2011).

En este contexto, el presente trabajo de tesis se desarrolló con la finalidad de estudiar el potencial antifúngico y fitotóxico de los metabolitos secundarios producidos por el hongo endófito *Xylaria* sp., aislado de hojas sanas de *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae), colectadas en la reserva ecológica “El Eden” en el estado de Quintana Roo.

En primer lugar, se realizaron bioensayos de antagonismo entre *Xylaria* sp y diferentes microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola. Posteriormente, se evaluó el potencial aleloquímico de los extractos del medio de cultivo y micelio, derivados de la fermentación del hongo endófito en diferentes medios de cultivo, evaluando su efecto sobre el crecimiento de microorganismo fitopatógenos y semillas prueba, con el fin de aportar conocimientos para el entendimiento de la función de los hongos endófitos en la naturaleza, en particular en la relación entre planta hospedera-endófito y endófito-endófito y aportar conocimiento sobre nuevas moléculas con actividad biológica que puedan ser utilizadas benéficamente en diferentes campos.



---

---

## II. ANTECEDENTES

### 1.- ALELOPATÍA

La mayoría de las plantas presentan como características generales el ser sedentarias, por lo que su germinación, crecimiento, reproducción y diseminación, se ven afectadas por la exposición a diversos factores bióticos y abióticos, provenientes del entorno donde se desarrollan (Oliveros-Bastida, 2008). La presión ejercida por estos factores a lo largo del proceso evolutivo, provocó el desarrollo de diferentes rutas de biosíntesis, a través de las cuales las plantas son capaces de sintetizar y acumular en sus órganos una gran variedad de metabolitos secundarios. Entre ellos existen sustancias que le proporcionan beneficios a las plantas, al provocar determinados efectos sobre plantas vecinas, animales herbívoros o microorganismos patógenos; estas sustancias se denominan aleloquímicos y el fenómeno en el cual están involucradas se denomina alelopatía (Chang-Hung, 2009; Blanco, 2006).

La definición más amplia de alelopatía es la establecida por la Sociedad Internacional de Alelopatía en 1996, la cual toma en cuenta no sólo a las plantas sino también a otros organismos: “cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos y agrícolas” (Lorenzo *et al.*, 2010; Luna-Geller *et al.*, 2007; Oliveros-Bastida, 2008; Kruse *et al.*, 2000). El fenómeno alelopático implica: un componente ecológico (evidencia de que existe en la naturaleza), un componente químico (aislamiento, identificación y caracterización de los aleloquímicos) y un componente fisiológico (interferencia en los procesos bioquímicos a nivel celular y molecular) (Oliveros-Bastida, 2008; Lorenzo *et al.*, 2010). Los aleloquímicos son clasificados como metabolitos secundarios y por ende son producidos a partir de precursores que provienen del metabolismo primario. En el caso particular de las plantas, pueden estar presentes en diversas partes incluyendo las raíces, rizomas, hojas, tallo, polen, semillas y flores. Estos compuestos son liberados al ambiente a través de la volatilización, por medio de lixiviación, exudación de la raíz y por



---

descomposición de residuos de las plantas que se incorporan al suelo (Arévalo *et al.*, 2011; Blanco, 2009; Kruse *et al.*, 2000).

La naturaleza química de los compuestos alelopáticos es variable y diversa. La mayoría de ellos presentan características estructurales novedosas, lo cual podría incidir en el hallazgo de nuevos metabolitos biodinámicos incluyendo agroquímicos, cuyos blancos de acción pudieran ser muy específicos (Siddique *et al.*, 2013; Oliveros–Bastida, 2008; Macías *et al.*, 2004; Kruse *et al.*, 2000). Entre las moléculas que se han encontrado con propiedades alelopáticas figuran los fenoles, flavonoides, taninos, alcaloides, terpenoides, esteroides, glucósidos cianogénicos, aminoácidos no proteicos, lactonas no saturadas, derivados del ácido benzoico, ácidos orgánicos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos grasos, naftoquinonas, antraquinonas y cumarinas (Soltys *et al.*, 2013; Chengxu *et al.*, 2011; Arévalo *et al.*, 2011; Bhadoria, P.B.S., 2011; Hui-Li *et al.*, 2010; Toledo *et al.*, 2004; Ferguson *et al.*, 2003).

En la actualidad se han puesto en evidencia múltiples y complejas interacciones químicas entre planta-planta (fitotóxicos, estimulantes del crecimiento), planta-animal (toxinas, inhibidores de la masticación, estrógenos, hormonas juveniles), animal-animal (telemediadores, feromonas y venenos), planta-insecto (feromonas, compuestos kairomonales o fagodisuasiva), planta-microorganismo (fitohormonales, fitoestimuladores, antimicrobianos, mutágenos, carcinogénicos y micotoxinas) y microorganismo-microorganismo (antimicrobianos) (Soltys *et al.*, 2013; Weir *et al.*, 2004; Macías *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2003; Macías-Samarano, 2001).

La alelopatía es usada hoy día como una herramienta para identificar especies de plantas o microorganismos productores de metabolitos secundarios que presenten efectos fitotóxicos, antifúngicos, insecticidas, nematicidas, entre otros, los cuales muestren actividad biológica sobre especies no resistentes y sus biotipos resistentes (Bhadoria, P.B.S., 2011; Wier *et al.*, 2004; Macías *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2000).



---

---

## 2.- HONGOS ENDÓFITOS

El término endófito fue propuesto por De Bary en 1866 para definir a los “microorganismos que colonizan el tejido interno de las plantas”. Este término ha variado de acuerdo al avance en el conocimiento en este campo. La definición más usada y completa, los describe como “microorganismos que pueden ser hongos, bacterias, algas, cianobacterias o levaduras que viven dentro de los tejidos de las plantas, en algún momento o durante todo su ciclo de vida, sin causar daño aparente o síntomas de enfermedad (Kusari *et al.*, 2012; De Souza *et al.*, 2011; Devaraju *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2009; Hyde *et al.*, 2008; Tejesvi *et al.*, 2007; Gangulli *et al.*, 2007; Maheshwari, 2006).

Se han encontrado hongos endófitos en todas las especies de plantas que han sido estudiadas: algas, musgos, hepáticas, manglares, coníferas, palmeras, cactáceas, líquenes y numerosas especies de árboles y arbustos (Hundley, 2005; Arnold *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2001), pertenecientes a diversos tipos de ecosistemas que incluyen zonas tropicales, bosques templados, boreales, en la taiga, también en el extremo ártico y en ambientes xéricos que son sitios donde existen condiciones de alta radiación solar y poca humedad, además de ambientes mesicos templados, es decir con un balanceado suministro de la humedad (Mueller *et al.*, 2004).

Los primeros estudios sobre hongos endófitos se realizaron en plantas de la familia de las gramíneas a finales del siglo XIX. Diferentes grupos de investigación describieron la presencia de micelio fúngico en los pistilos y semillas de las plantas sanas de varias especies del género *Lolium* (Kusari *et al.*, 2012; Sánchez-Márquez, 2009). El interés que impulsó la investigación sobre los hongos endófitos, se suscitó debido a las pérdidas económicas en Estados Unidos y Nueva Zelanda causadas por la intoxicación de ganado alimentado con pasto *Festuca arundinacea* infectado por endófitos del género *Neotyphodium* (Kusari *et al.*, 2012 y Zabalgogezcoa *et al.*, 2007).



---

---

## 2.1 CLASIFICACIÓN

En general los endófitos se clasifican en dos grupos importantes: los clavicipitáceos (C), que colonizan ciertas especies de pastos y los no clavicipitáceos (NC) que se establecen en los tejidos de helechos, coníferas, briófitas, gimnospermas y angiospermas. Esta clasificación se basa en las diferencias entre la evolución, taxonomía, colonización de planta hospedera, tejidos colonizados, transmisión y funciones ecológicas (Rosa *et al.*, 2011; Rodríguez, 2009; Hyde *et al.*, 2008). Estos grupos incluyen cuatro clases, la clase 1 pertenece a los endófitos clavicipitáceos que colonizan los pastos, muchos de ellos son categorizados como maleza en los cultivos y su transmisión se produce vertical (a través de semillas) y horizontalmente (se adquiere del medio ambiente) (Premjanu, 2012). La clase 2 comprende especies del subreino Dykaria que alberga a los Ascomicota o Basidiomicota y su transmisión también es horizontal y vertical. Los endófitos de la clase 3, se clasifican con base en su abundancia dentro de los tejidos colonizados y su transmisión es horizontal; incluye principalmente ascomisetos de plantas vasculares y no vasculares, plantas leñosas y angiospermas de los bosques tropicales. Por último, la clase 4 comprende a los Ascomicetes que colonizan los tejidos intra e intercelulares de las raíces de las plantas y son denominados como DSE (del inglés *dark septata endophytes*) y son endófitos septados y oscuros (Rekha *et al.*, 2013; Kumari *et al.*, 2012; Erach *et al.*, 2011; Rodríguez, 2009 y Sánchez, 2009).

## 2.2 ESPECIFICIDAD DE TEJIDOS Y COLONIZACIÓN

En los bosques tropicales se concentra una gran biodiversidad fúngica, y comparados con otros ecosistemas, en estos bosques coexisten abundantes microclimas y microhábitats que dan como resultado la existencia de una gran variabilidad en la especificidad entre los hongos endófitos y su hospedero natural. Un fenómeno que se ha registrado en zonas tropicales y templadas, es el de la especificidad de los endófitos por tejidos vegetales particulares. Esta especificidad posiblemente permite una mayor abundancia en los recursos disponibles y una disminución de la competencia entre otros endófitos que invaden la planta (Gamboa, 2006; Álvarez *et al.*, 2003). Los hongos endófitos invaden los tejidos de las plantas



---

a través de hendiduras, heridas o lenticelas (estructuras que permiten el intercambio de gases con el ambiente), por medio de vectores horizontales bióticos (insectos) y abióticos (agua de lluvia, viento, árboles) o utilizando enzimas hidrolíticas como la celulasa o pectina; de esta manera colonizan, viven y se reproducen dentro de las plantas hospederas (Zhao *et al.*, 2010; Gamboa, 2006; Maheshwari, 2006; Schulz *et al.*, 2002). La colonización de los tejidos de la planta por el endófito es el resultado de una secuencia de pasos complejos que incluyen reconocimiento del hospedero por el hongo endófito, germinación de las esporas, penetración de la epidermis y colonización de los tejidos apropiados (Redlin *et al.*, 1996). Después de la colonización del hospedero, los endófitos comienzan a establecerse en todos los tejidos y órganos de la planta, habitando el apoplasto (espacio en el que circula el agua y los nutrientes), el vaso de la planta y el interior de las células (Gangulli *et al.*, 2007). Los hongos endófitos se han encontrado en diversas partes de las plantas como hojas, tallos, semillas, corteza, flores, frutos, xilema, raíces e incluso órganos reproductores, es decir que en las plantas vasculares su colonización es localizada (Kumari *et al.*, 2013; Premjanu, 2012; Arnold, 2005; Dighton *et al.*, 2005).

### **2.3 TRANSMISIÓN**

Diversos estudios han mostrado que las semillas y las plántulas están virtualmente libres de endófitos y aproximadamente después de 4 a 8 semanas es cuando las hojas o semillas comienzan a ser colonizadas densamente (Zabalgogezcoa *et al.*, 2008; Abello *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2004; Arnold *et al.*, 2003). La transmisión se puede dar de manera horizontal, cuando el inóculo es transportado a otra planta, es decir pasa de madre a hija por medio de semillas. Este tipo de transmisión, es el mecanismo predominante por el cual se presenta la dispersión de los hongos endófitos en diversos pastos, palmeras, bambúes y otras monocotiledóneas, desarrollándose dentro de los tejidos asintóticamente. La transmisión vertical ocurre cuando las semillas progenitoras germinan generando una planta infectada (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013; Zabalgogezcoa *et al.*, 2008; Abello *et al.*, 2006; Dighton *et al.*, 2005).



---

---

## 2.4 ABUNDANCIA Y DIVERSIDAD TAXONÓMICA

Se calcula que en el mundo existen alrededor de 300,000 especies de plantas superiores (Baby *et al.*, 2011; Staniek *et al.*, 2008) y en México la diversidad se estima entre 23 mil y 30 mil especies (Montes-Belmont, 2009) En los ecosistemas tropicales se calcula que existen aproximadamente 1.5 millones de especies endofíticas (Suryanarayanan *et al.*, 2003; Hawksworth, 2001; Arnold, 2001).

Los diversos estudios sobre los hongos endófitos de plantas vasculares demuestran que la mayoría de ellos pertenece a los Ascomicetos. Este grupo de hongos interactúa estrechamente con las plantas desde hace aproximadamente 460 millones de años, desempeñando un importante papel en los cambios evolutivos sobre la tierra (Rosa *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2009; Arnold, 2005; Deshmukh *et al.*, 2005).

## 2.5 INTERACCIÓN PLANTA-HONGO ENDÓFITO

La ubicuidad, abundancia y diversidad de los endófitos en los bosques y selvas tropicales sugiere que éstos y la planta hospedera interactúan estrechamente. La interacción planta-endófito resulta en un equilibrio finamente balanceado entre la comunidad fúngica y la planta hospedera, cuando este equilibrio se rompe, los microorganismos endófitos se pueden expresar como patógenos (Arnold, 2005). ¿Pero cómo pueden los hongos endófitos activar los mecanismos de defensa de la planta hospedera y al mismo tiempo evitar ser inhibidos por los metabolitos secundarios producidos por su hospedera? Los endófitos al ser patógenos latentes comparten con los microorganismos fitopatógenos los mismos factores de virulencia que le permiten infectar y colonizar al hospedero. Para defenderse de esta invasión la planta hospedera activa sus mecanismo de defensa hacia el endófito y en consecuencia el hongo responde empleando diversas estrategias de defensa que incluyen la formación de barreras físicas, la producción de metabolitos secundarios y las defensas que son inducidas por factores externos (Kusari *et al.*, 2012; Montes-Belmont, 2009; Zabalgoeazcoa, 2006; Dighton *et al.*, 2005; Stanley, 2002).





---

Si los factores de virulencia de los hongos y las defensas de la hospedera están en equilibrio, la relación se mantiene aparentemente asintomática o avirulenta, es decir, se establece una relación endófitica. Por el contrario, si el equilibrio se rompe por factores abióticos o por senescencia, el resultado de la interacción es la aparición de enfermedad y/o la muerte de la hospedera, es decir se establece una relación fitopatógena. La virulencia del endófito y la defensa del hospedero son altamente influenciadas por factores bióticos, abióticos, y por la disponibilidad de los nutrientes. La tolerancia de las dos partes a dichos factores, establece el tipo de interacción. Asimismo este tipo de relaciones entre los endófitos y las hospederas pueden ser antagónicas mutualistas o comensales (Kusari, 2012; Gangulli, 2007; Abello *et al.*, 2006; Arnold, 2006, 2005).

Muchos endófitos son maestros del fenómeno llamado “*plasticidad*”, infectando como endosimbiontes de manera críptica y finalmente desarrollándose como un patógeno o saprófito (Staniek *et al.*, 2008; Arnold, 2006). Por otra parte, algunos hongos endófitos, pueden desarrollar la capacidad para producir sustancias bioactivas iguales o similares a las que se sintetiza su planta hospedera (Baby *et al.*, 2011; Devaraju *et al.*, 2010). A lo largo de la evolución, la interacción entre la planta hospedera y los endófitos ha permitido que estos últimos se adapten al microambiente de su hospedera y mediante variaciones genéticas, que incluyen la incorporación de algunos fragmentos de ADN de la planta en su propio genoma, así como la inclusión de segmentos de su propio ADN dentro del genoma de la planta, ha dado como consecuencia que ciertos hongos endófitos posean la capacidad de biosintetizar algunos metabolitos secundarios que originalmente sintetiza la planta hospedera (Baby *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2010).

## **2.6 PAPEL ECOLÓGICO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS**

Los endófitos clavicipitáceos crecen sistémicamente a lo largo de las hojas y tallos infectando a las plantas. Los beneficios que pueden aportar a la hospedera incluyen la tolerancia a los metales pesados, la resistencia a la sequía, a los patógenos, la reducción de la herbivoría y una mejora en el crecimiento de su planta hospedera. Por otra parte, los endófitos no



---

clacivipitáceos colonizan localizadamente a las plantas leñosas, existiendo una alta diversidad de éstos dentro de los tejidos de las hospederas (Dighton *et al.*, 2005; Deshmukh *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2003; Rodriguez, 2001).

Se ha observado que los hongos endófitos pueden contribuir a la protección de su planta hospedera por medio de tres mecanismos: 1) directos: por 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 y 3) ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y predación (Allen *et al.*, 2007; Abello *et al.*, 2006).

## **2.7 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PLANTAS HOSPEDERAS PARA EL AISLAMIENTO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS**

Los bosques y selvas tropicales son un claro ejemplo de ecosistemas donde la diversidad biológica se correlaciona con la diversidad química. Esto sugiere que las especies de endófitos que habitan estos bosques que al ser muy diversas, constituyen una fuente de moléculas innovadoras con actividad biológica (Gangulli, 2007; Barnerjee, 2011). Considerando que 6 de cada 20 medicamentos prescritos son de origen fúngico, los hongos ofrecen un enorme potencial para aislar nuevos productos útiles en la medicina, la industria y la agricultura (Schulz *et al.*, 2002). Uno de los requisitos importantes para el aislamiento de los hongos endófitos es la selección adecuada de plantas hospederas que incrementen la posibilidad de aislar hongos productores de metabolitos secundarios con actividad biológica. Las estrategias para aislar hongos endófitos consideran la diversidad de especies vegetales y la capacidad que tienen los endófitos de mejorar los mecanismos de defensa de sus hospederas y de protegerlas del ataque de posibles enemigos (Devaraju *et al.*, 2010; Gangulli *et al.*, 2007; Tejesvi *et al.*, 2007).



---

---

Estas estrategias comprenden:

- a) Especies de plantas con reconocido uso en la tradición medicinal, “criterio etnomédico”.
- b) Plantas que habitan en nichos ecológicos que sugieren que los microorganismos juegan un rol de protección contra otros microorganismos “criterio ecológico”.
- c) Plantas que crecen en condiciones extremas, por ejemplo, expuestas a altas o bajas temperaturas, extrema radiación solar, ambientes acuáticos y alta concentración salina.
- d) Plantas que habitan en ecosistemas únicos, plantas que presentan una biología inusual y/o poseen estrategias novedosas de sobrevivencia.
- e) Plantas que son endémicas y que presentan una longevidad poco usual o que han vivido mucho tiempo en cierta área.
- f) Plantas que crecen en áreas con gran diversidad biológica, son prospectos para albergar una gran variedad de hongos endófitos.

La técnica más usual para aislar hongos endófitos a partir de las plantas recolectadas y seleccionadas de acuerdo con los criterios señalados, es la esterilización superficial del tejido vegetal y la posterior siembra en un medio de cultivo adecuado (Padhi *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2011; Erach *et al.*, 2011; Menéndez *et al.*, 1997). Los hongos endófitos que son sembrados *in vitro* son afectados fuertemente por el medio en el cual crecen. Generalmente, los endófitos que se encuentran en una determinada hospedera crecen adecuadamente en medios que contienen lixiviado de la especie hospedera de la cual fueron aislados (Dighton *et al.*, 2005). Mediante este procedimiento es posible conocer la diversidad y la abundancia de especies de hongos y su distribución entre los distintos órganos de la planta. Sin embargo, es insuficiente para caracterizar el tipo de relación existente entre cada endófito y su hospedera. Para ello, son necesarios estudios profundos acerca del papel ecológico de los hongos en las complejas relaciones que establecen (Rosa *et al.*, 2011; Erach *et al.*, 2011; Menéndez *et al.*, 1997).



---

---

## 2.8. PAPEL DE LOS HONGOS ENDÓFITOS EN LA AGRICULTURA MODERNA

La agricultura moderna se basa en el uso de agroquímicos sintéticos. Esta estrategia ha resultado en un incremento en los costos de producción y ha contribuido a la contaminación del ambiente. De ahí la necesidad de buscar y desarrollar otras alternativas que permitan reducir el número de aplicaciones de plaguicidas (Zhenhua *et al.*, 2012; Gómez-Rodríguez, *et al.*, 2001).

Los hongos endófitos constituyen una fuente alternativa para la obtención de moléculas potencialmente útiles en la agricultura. Por otra parte, son considerados candidatos idóneos para el desarrollo de agentes de control biológico. Para proponer un microorganismo endofítico como un potencial agente de biocontrol se requieren ciertas características. En primer lugar, no debe ser patógeno de plantas, del hombre o de los animales, debe tener una elevada capacidad de colonización y de reproducción en los tejidos internos después de su inoculación en las plantas. Una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora presente en la planta. En segundo lugar, es muy importante que tenga la capacidad de reproducirse abundantemente en condiciones *in vitro* para asegurar su preproducción y conservación a nivel comercial, además, debe ser de fácil aplicación (Chaves-Méndez, 2007).

Como se señaló anteriormente, los endófitos confieren un gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas, entre las que se encuentran una mayor resistencia a la sequía al estrés oxidativo, suelos ácidos o con altos contenidos de zinc y aluminio (Abello *et al.*, 2006), por otra parte, el uso biotecnológico de estos organismos o del producto de su metabolismo secundario, los sitúa como una fuente altamente prometedora para su aplicación en productos farmacéuticos o agroquímicos (Sánchez *et al.*, 2013). Hasta ahora se conocen muy poco de los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos producidos por hongos endófitos, pero no se descarta la posibilidad de que se puedan desarrollar, fármacos, fungicidas o herbicidas comerciales basados en productos naturales endofíticos y



---

con estabilidad en el mercado tanto para uso en medicina, medicina veterinaria y fitopatología (Kaul *et al.*, 2012; Montes-Belmont, 2009).

En países en vía de desarrollo, la falta de investigación y el entendimiento de estos microorganismos son un obstáculo, ya que actualmente se prioriza el uso de los recursos para la investigación en temas que generan soluciones a corto plazo, dejando de lado el potencial con que cuentan estos microorganismos y sus interacciones (Abello *et al.*, 2006).

### **3. LOS XYLARIALES**

El filum Ascomicota (ascomicetes) es considerado el grupo más diverso y ecológicamente importante de los hongos. Posee una gran distribución biogeográfica, estableciéndose en todos los reinos y hábitats ecológicos. Se estima que contienen más de 32, 000 especies conteniendo 3, 400 géneros (Webster *et al.*, 2007). Los ascomicetos se distinguen por la presencia de un saco o *asca* donde se forman las esporas (unidades de reproducción). Estos organismos pueden comportarse como saprobios (creciendo en restos orgánicos de diversas clases), simbiontes (asociados a raíces de los árboles formando micorrizas o asociados con algas con las que forman los líquenes o como endófitos) y parásitos de plantas (Medel *et al.*, 2010; Webster *et al.*, 2007).

El orden de los Xylariales pertenece a los ascomicetos de la clase Hymenoascomycetes y subclase Pirenomicetes que contienen alrededor de 92 géneros y 800 especies clasificadas en 8 familias (Smith *et al.*, 2003; Webster *et al.*, 2007). Los miembros de este grupo tienen como característica que producen estromas (Figura 1), por lo general de color negruzco que puede ser unipartito, bipartito, unpericial y multipericial; los ascos son cilíndricos y poseen un anillo apical que reacciona con yodo tiñéndose de azul y las ascosporas son melanizadas (Dennis, 1956; San Martín *et al.*, 1998, Webster *et al.*, 2007; Peláez *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Ejemplos de estromas de *Xylaria* sp., en la naturaleza y en un cultivo en caja Petri.

### **3.1 LA FAMILIA XYLARIACEAE**

La familia Xylariaceae es la más estudiada de los Xylariales, ya que es considerada como una enorme fuente de compuestos activos, que muestran una amplia variedad de estructuras químicas. Los compuestos aislados se pueden agrupar principalmente en derivados de dihidroisocumarinas, derivados del ácido succínico, butirolactonas, citocalasinas, sesquiterpenos, derivados del naftaleno, derivados de la griseofulvina y de ácidos grasos (Whalley *et al.*, 1999; Whalley, 1996; Whalley *et al.*, 1995). Muchos miembros de esta familia habitan como son parásitos y saprófitos en plantas angiospermas; también se encuentran distribuidos en la basura, en la tierra, el estiércol y asociados a insectos (Peláez *et al.*, 2008; Whalley, 1996; Rogers, 1979).

La investigación química y biológica de hongos pertenecientes a esta familia ha permitido evidenciar sus propiedades farmacológicas (Pinheiro *et al.*, 2012), incluyendo su actividad antimalárica (Jiménez *et al.*, 2008; Tanswan *et al.*, 2007), antibiótica (Ratnaweera *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2008), antioxidante (Xing Li *et al.*, 2013), antifúngica (Silva *et al.*, 2010; Pongcharoen *et al.*, 2008), antiparasitaria (Abate *et al.*, 1997) y anticancerígena (Yu li *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2010).



---

---

### 3.2 EL GÉNERO *XYLARIA*

Entre los hongos que pertenecen a la familia Xylareaceae, el género comúnmente encontrado es *Xylaria* Hill ex Schrank, con alrededor de 100 especies reportadas, muchas de las cuales habitan en regiones tropicales y subtropicales (Abate *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1991;). Los miembros de este género crecen comúnmente sobre restos de madera, hojas secas, frutos en descomposición, en el suelo (quizás asociados a nidos de insectos) y algunas especies fructifican en estiércol de diferentes herbívoros (San Martín *et al.*, 1998, Sung-Lee *et al.*, 2000).

Las especies endofíticas de *Xylaria* son difíciles de identificar y clasificar debido a que los estromas de una misma especie varían mucho en color y tamaño, pudiendo ser filiformes (apariencia de hilo), de un espesor en forma de salchicha, simple o bifurcado en la base o la punta (Sung-Lee *et al.*, 2000). Estas variaciones están asociadas con las etapas de desarrollo, la región geográfica y la variabilidad (Sung-Lee *et al.*, 2000). Este género constituye una importante fuente de metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural y biológica (Pinheiro *et al.*, 2012). Se han descubierto en *Xylaria* spp., nuevos compuestos como son las xilaramida, xilarina, xiloquetales, globoscina y maldoxina, la mayoría de los cuales presentan actividad antifúngica (Mogollón *et al.*, 2013).

### 3.3 *XYLARIA* COMO ENDÓFITO

Los ascomicetos del género *Xylaria* representan un buen ejemplo de cómo los endófitos que habitan los trópicos difieren de los que habitan en climas templados. En las áreas templadas las especies de *Xylaria* son más conocidas como patógenos y son raramente vistos como endófitos (Bailey *et al.*, 2006). Se encuentra entre los hongos endófitos aislados de plantas tropicales, incluyendo cultivos de café, plátano, palmera, pudiendo también ser aislados de orquídeas, bromelias, helechos y de plantas no vasculares o briófitas (Bailey *et al.*, 2006; Bayman *et al.*, 1998).



---

Una hipótesis del papel de los endófitos del género *Xylaria* en la naturaleza, postula que estos microorganismos esperan hasta que su hospedero envejezca, momento en el cual el endófito puede comenzar la descomposición de los materiales de la pared celular (Davis *et al.*, 2003; Whalley, 1996). Los endófitos xilariáceos emplean esta estrategia para tener una ventaja sobre sus competidores saprofitos, habiendo ocupado con anterioridad el tejido, antes del comienzo de la descomposición; sin embargo, teniendo en cuenta su área de distribución, la transmisión se realiza por conidias o esporas. Por otra parte, *Xylaria* sp., muestra moderada especificidad hacia los tejidos de su hospedero, algunas especies parecen limitarse a la corteza, mientras que otras se establecen principalmente dentro del tejido vascular o en la venas de la hoja (Davis *et al.*, 2003; Gamboa-Gaitán, 2006).

Estudios *in vitro* de hongos endófitos del género *Xylaria* han demostrado la producción masiva de metabolitos activos, los cuales también pueden producirse cuando el hongo habita en los tejidos vivos de las plantas (Mogollón *et al.*, 2013; Davis *et al.*, 2003), incluso se ha demostrado que pueden proteger a su hospedador de necrosis foliar y muerte inducida por algún patógeno (Arnold *et al.*, 2003).

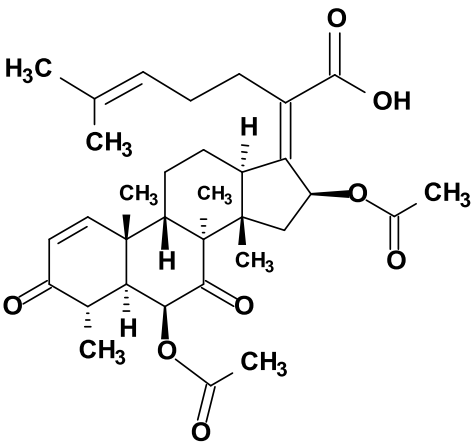
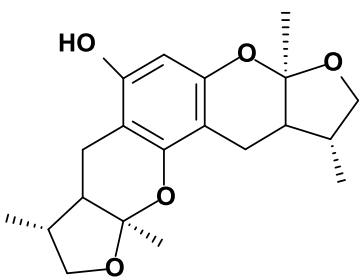
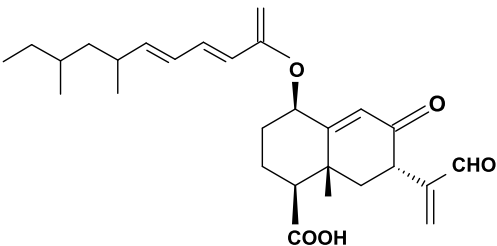
Aproximadamente, una tercera parte las especies representantes del género *Xylaria* han sido estudiadas desde el punto de vista químico y biológico. Muchos metabolitos nuevos estructuralmente y activos biológicamente han sido aislados y incluyendo citocalasinas (Klaiklay *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2010), eremofilanos (Shiono *et al.*, 2005; Abate *et al.*, 1997), xyloquetales (Xing-Li *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2001; Yu-Wu *et al.*, 2005), ciclopétidos (Wu *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2001;), lactonas (Jiménez *et al.*, 2008; Boonphong *et al.*, 2001; Pittayakhuanwut *et al.*, 2009), xantonas (Healy *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2006), sequiterpenos (Song *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2010; Isaka *et al.*, 2010, Yu-Hu *et al.*, 2008), cumarinas (Liu *et al.*, 2008; Cafêu *et al.*, 2005), sordacinas (Pongcharoen *et al.*, 2008) y derivados aromáticos (Wang *et al.*, 2008 ;Xu *et al.*, 2008).

En el Cuadro 1 se muestra la gran variedad de metabolitos secundarios producidos por diversas especies de *Xylaria*, así como su actividad biológica.





**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género *Xylaria*.

Metabolito secundario	Nombre	Organismo/origen	Actividad biológica	Referencia
 <p>(1)</p>	Ácido helvético (Triterpenoide)	<i>Xylaria</i> sp. de <i>Anoectochilus</i> <i>setaceus</i>	Antimicrobiano contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	Ratnaweera <i>et al.</i> , 2014
 <p>(2)</p>	Xiloquetal B (aflatoxina)	<i>Xylaria</i> sp. (No. 2508) de <i>Avicennia marina</i>	Actividad Antioxidante a través de la inducción de HO-1 en las células endoteliales vasculares y en pez cebra.	Xing Li <i>et al.</i> , 2013 Zhao <i>et al.</i> , 2009 Chen <i>et al.</i> , 2009
 <p>(3)</p>	07H239-A (sesquiterpeno del tipo eremofilano)	<i>Xylaria</i> sp. BL321 de un manglar	Inhibe la actividad de la enzima $\alpha$ -glucosidasa de cáncer y es citotóxico selectivo para células de la línea CCRFCM de leucemia.	Song <i>et al.</i> , 2012 McDonal <i>et al.</i> , 2004



**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género *Xylaria* (continuación).

Metabolito secundario	Nombre	Organismo/origen	Actividad biológica	Referencia
<p>(4)</p>	Citocalasina H2 (citocalasina)	<i>Xylaria</i> sp. A23 de <i>Annona squamosa</i>	Citotóxica contra líneas celulares de mamíferos de HeLA (tumor de cuello uterino humano) y células HEK 293T(células embrionarias del riñón)	Yu Li <i>et al.</i> , 2012
<p>(5)</p>	19,20-epoxicitocalasina (citocalasina)	<i>Xylaria</i> sp. de <i>Piper aduncum</i> (Piperaceae)	Antifúngico contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> y <i>C. sphaerospermum</i> . Citotóxicos contra líneas celulares de mamíferos de HeLA (tumor de cuello uterino humano) y CHO (ovario de hámster chino)	Silva <i>et al.</i> , 2010
<p>(6)</p>	19,20-epoxicitocalasina C (citocalasinas)			



**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género *Xylaria* (continuación).

Metabolito secundario	Nombre	Organismo/origen	Actividad biológica	Referencia
<p>(7)</p>	19,20-epoxicitocalasina D (citocalasina)			
<p>(8)</p>	19,20-epoxicitocalasina N (citocalasina)	<i>Xylaria</i> sp. de <i>Piper aduncum</i> (Piperaceae)	Antifúngico contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> y <i>C. sphaerospermum</i> . Citotoxicidad contra líneas celulares de mamíferos de HeLA (tumor de cuello uterino humano) y CHO (ovario de hámster chino)	Silva, <i>et al.</i> , 2010
<p>(9)</p>	19,20-epoxicitocalasina R (citocalasinas)			

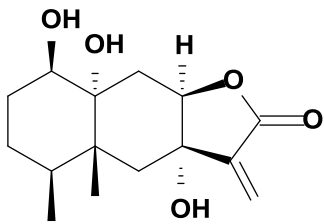
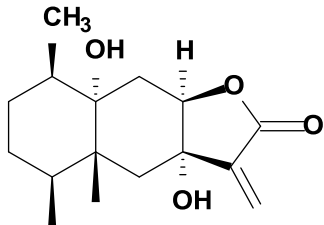
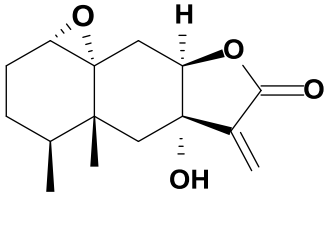
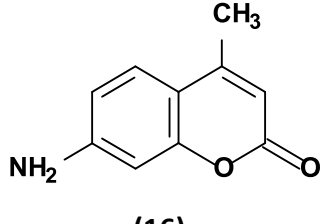


**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género *Xylaria* (continuación).

Metabolito secundario	Nombre	Organismo/origen	Actividad biológica	Referencia
<p>(10)</p>	(3R,4R)-3,4-dihidro-4,6-dihidroxi-3-metil-1-oxo-1H-isocromona-5-carboxil (isocromona)		Moderada actividad antifúngica contra las levaduras <i>C. cladosporioides</i> y <i>C. sphaerospermum</i> . Inhibe la actividad de la AChE (acetilcolinesterasa)	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
<p>(11)</p>	Phaseolinona (sesquiterpeno del tipo eremofilano)	<i>Xylaria</i> sp. de <i>Piper aduncum</i> (Piperaceae)	Antifúngico contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) SPC 140 y <i>C. sphaerospermum</i> (Perzig) SPC 491	Silva <i>et al.</i> , 2010
<p>(12)</p>	Phomenona (sesquiterpeno del tipo eremofilano)		Citotóxico contra líneas celulares CHO (ovario de hámster chino)	

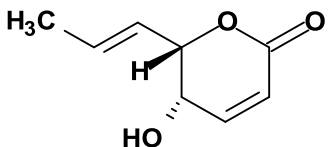
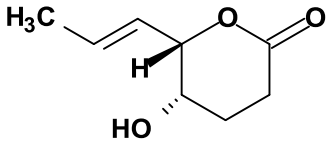
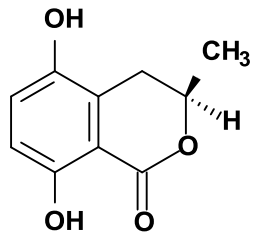
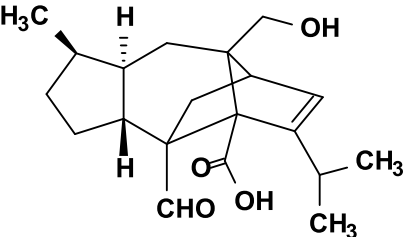


**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género *Xylaria* (continuación).

Metabolito secundario	Nombre	Organismo/origen	Actividad biológica	Referencia
 <p>(13)</p>	1β, 7α, 10α- trihidro xieremofil-11(13)-en-12, 8β-olido (sesquiterpeno del tipo eremofilano)		Moderada actividad citotóxica contra células KB, MCF-7, NCI-H187 y Vero	
 <p>(14)</p>	7α, 10α- dihidroxi-1β-metoxieremofil-11(13)-en-12, 8β-olido (sesquiterpeno del tipo eremofilano)	<i>Xylaria</i> sp. BCC 21097 de <i>Licuala spinosa</i>	Moderada actividad citotóxica contra células KB, MCF-7, NCI-H187 y Vero. Antimalárico ( <i>Plasmodium falciparum</i> K1)	Isaka <i>et al.</i> , 2010
 <p>(15)</p>	1α, 10α-epoxi-7α-hidroxi-eremofil-11(13)-en-12, 8β-olido (sesquiterpeno del tipo eremofilano)		Moderada actividad citotóxica. Antifúngico contra <i>Candida albicans</i>	
 <p>(16)</p>	7-amino-4-metilcumarina (cumarina)	<i>Xylaria</i> sp. YX-28 de <i>Ginkgo biloba</i> L.	Antimicrobiano contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Yersinia</i> sp., <i>Shigella</i> sp. Antifúngico contra <i>Candida albicans</i> , etc.	Liu <i>et al.</i> , 2008

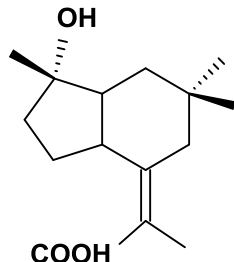
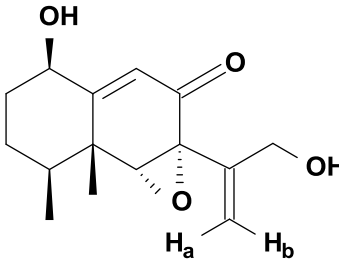
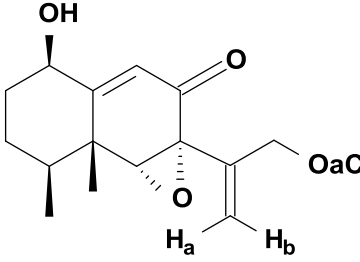


**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género *Xylaria* (continuación).

Metabolito secundario	Nombre	Organismo/origen	Actividad biológica	Referencia
 <p>(17)</p>	(+)-Fomalactona (lactona)			
 <p>(18)</p>	6-(1-propenil)- 3,4,5,6-tetrahydro-5- hidroxi-4Hpiran-2- ona (lactona)	<i>Xylaria</i> sp. Grev. de <i>Siparuna</i> sp. (Siparunaceae)	Antimalárico contra <i>Plamodiun falciparum</i> , citotóxico contra células Vero.	Jiménez <i>et al.</i> , 2008
 <p>(19)</p>	5- hidroximeleina (dihidroisocumarina)			
 <p>(20)</p>	Sordaricina (Diterpeno)	<i>Xylaria</i> sp. PSU-D14 de <i>Garnicia dulcis</i> .	Antifúngico moderado contra <i>C. albicans</i> . ATCC90028 Inhibe el factor de elongación de la síntesis de proteínas del hongo.	Pongcharoen <i>et al.</i> , 2008



**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género *Xylaria* (continuación).

Metabolito secundario	Nombre	Organismo/origen	Actividad biológica	Referencia
 <p>(21)</p>	Ácido xylarénico (sesquiterpeno)			
 <p>(22)</p>	Xylarenona A (sesquiterpeno)	<i>Xylaria</i> sp. NCY2 de <i>Torreya jackii</i> CHUN	Citotóxicos contra células HeLA Antibacteriano contra <i>E. coli</i> ; <i>S aureus</i> ; <i>B. subtilis</i>	Yu Hu <i>et al.</i> , 2008
 <p>(23)</p>	Xylarenona B (sesquiterpeno)			



**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género *Xylaria* (continuación).

Metabolito secundario	Nombre	Organismo/origen	Actividad biológica	Referencia
<p>(24)</p>	2-cloro-2-metoxi-3- -2,5-dieno-1,4-diona (benzoquinona)	<i>Xylaria</i> sp. PBR 30 de <i>Sandoricum</i> <i>koetjape</i>	Antimalárico contra <i>Plasmodium falciparum</i> cepa K1 y citotóxico contra Células Vero (fibroblastos de hígado del mono verde africano)	Tanswan <i>et al.</i> , 2007
<p>(25)</p>	Xylariaquinona A (benzoquinona)			
<p>(26)</p>	(-) Xylariamida A (alcaloide)	<i>Xylaria</i> sp. (FRR5657) de <i>Glochidion</i> <i>ferdinandi</i>	Tóxico para <i>Artemia</i> <i>salina</i> .	Davis, 2005





**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género *Xylaria* (continuación).

Metabolito secundario	Nombre	Organismo/origen	Actividad biológica	Referencia
<p>(27)</p>	2-hexil-3-metil-ácido butanodioico. (policétido)	<i>Xylaria</i> sp. de <i>Palicourea marcgravii</i> St.Hil. (Rubiaceae)	Antifúngicos contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> y <i>Cladosporium sphaerospermum</i> .	Cafêu <i>et al.</i> , 2005
<p>(28)</p>	Citocalasina D (citocalasina)	<i>Xylaria cubensis</i> PSU-MA34 de <i>Bruguiera parviflora</i>	Antifúngicos contra <i>Cladosporium cladosporioides</i> y <i>Cladosporium sphaerospermum</i> . También presenta moderada actividad antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y MSRA	Klaiklay <i>et al.</i> , 2012 Pongcharoen <i>et al.</i> , 2007 Cafêu <i>et al.</i> , 2005
<p>(29)</p>	Griseofulvina (policétido)	<i>Xylaria</i> sp. F 0010 de <i>Abies holophylla</i>	Antifúngico contra <i>A. mali</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>P. capsici</i> , varias especies de <i>Microsporum</i> , <i>Epidermophyton</i> y <i>Trychophyton</i> .	Joong-Hyeop <i>et al.</i> , 2005 Cafêu <i>et al.</i> , 2005
<p>(30)</p>	Declorogriseofulvina (policétido)		Antifúngico contra <i>A. mali</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>P. capsici</i> , etc.	Joong-Hyeop <i>et al.</i> , 2005

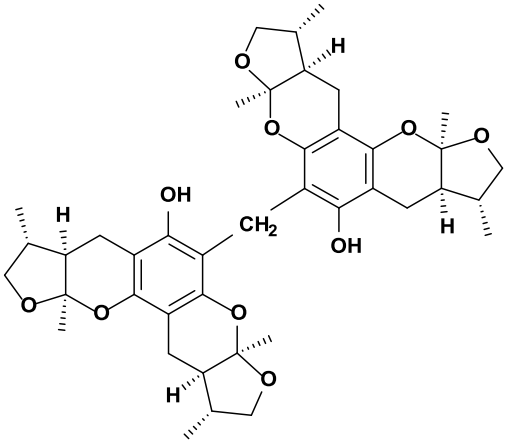
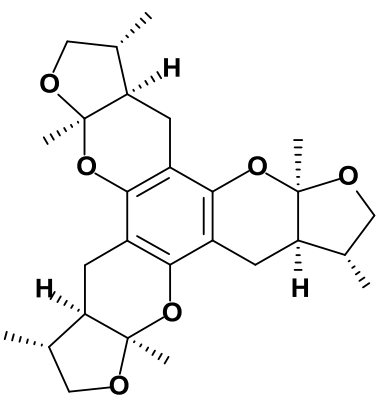


**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género *Xylaria* (continuación).

Metabolito secundario	Nombre	Organismo/origen	Actividad biológica	Referencia
<p>(31)</p>	Eremoxyarina A (sequiterpeno del tipo eremofilano)	<i>Xylaria</i> sp. YUA-026 de muestras de plantas (ramas y pecíolos)	Actividad antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeuroginosa</i> .	Shiono <i>et al.</i> , 2005
<p>(32)</p>	Eremoxyarina B (sequiterpeno del tipo eremofilano)			



**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos del género *Xylaria* (continuación).

Metabolito secundario	Nombre	Organismo/origen	Actividad biológica	Referencia
 <p>(33)</p>	Xyloquetal F (policétido)	<i>Xylaria</i> sp. #2508 de <i>Avicennia marina</i>	Bloqueador de los canales L de calcio de las células del hipocampo en ratas.	Yu Wu <i>et al.</i> , 2005
 <p>(34)</p>	Xyloquetal A (policétido)	<i>Xylaria</i> sp. #2508 de <i>Avicennia marina</i>	Inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa	Lin <i>et al.</i> , 2001



---

#### **4. PTERIDIUM AQUILINUM**

*Pteridium aquilinum* es un helecho que ha sido descrito como una de las cinco plantas más comunes en el planeta (Sahin, 1999). Su amplia distribución resulta de su gran tolerancia al estrés y a las perturbaciones ambientales, aspectos que responden al producto de una exitosa combinación de características morfológicas y fisiológicas (Ramírez, 2007).

El género *Pteridium* es considerado una planta muy tóxica (Nascimento *et al.*, 2002). Al ser ingerido por el ganado produce afectaciones graves como avitaminosis, parálisis mecánica, padecimientos hematológicos, ceguera permanente, neoplasia de la vejiga urinaria, hemorragias internas y cáncer (Sahin, 1999; Ramírez-Trejo *et al.*, 2007). *Pteridium* también produce sustancias alelopáticas que tienen capacidad de inhibir el establecimiento de otras plantas cuando éstas se hallan en estado de semillas o esporas. Entre los metabolitos secundarios que han sido aislados y que presentan actividad herbicida e insecticida se encuentran taninos, glucósidos cianogénicos, flavonoides y las ecdisomas (Velázquez- Montes, 2001).

Los estudios químicos y biológicos llevados a cabo sobre *Pteridium aquilinum* han permitido el aislamiento de la astagalina, el ácido fumárico, la isoquercitina, ácido succínico, la tilirosida (Yung *et al.*, 1973), el ácido shikímico, la quercetina, el aquilade A, la ptaloquiosida y la prunasina (Villalobos, 1985). El estudio realizado por Sahin (1999), permitió establecer que el ácido shikímico es carcinogénico para ratones, la quercetina es carcinógeno para ratas y mutágeno para *Salmonella typhimurium*; la aquilade A es mutagénico para células de mamíferos (Villalobos, 1985); la ptaloquiosida, un norsesquiterpeno glicósidico, es un potente cianogénico que causa la degeneración retinal y aplasia mieloide. Este último compuesto puede transferirse directamente a los humanos cuando consumen leche derivada de animales que han sido expuestos al helecho. Estos resultados permiten inferir que estos metabolitos secundarios son los responsables de los efectos tóxicos observados en el ganado y en los humanos, así como los efectos alelopáticos atribuidos a esta especie.



---

### III. HIPÓTESIS

El endófito *Xylaria* sp., aislado de *Pteridium aquilinum* puede constituir una fuente de metabolitos secundarios novedosos con actividad aleloquímica, considerando que este tipo de hongos contribuyen a la protección de sus hospederas del ataque de microorganismos y plantas competidoras.



---

## IV. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la relación entre el efecto antagónico y el potencial aleloquímico del hongo endófito *Xylaria* sp., aislado de *Pteridium aquilinum*, mediante la realización de bioensayos de antagonismo directo y a través de la evaluación del efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio, sobre el crecimiento de especies de endófitos y de fitopatógenos de cultivos de importancia agroalimentaria y sobre el crecimiento de especies vegetales. Lo anterior con el fin de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones planta-endófito, así como participar en el posible desarrollo de plaguicidas útiles en la agricultura moderna.

### 2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el potencial antagónico del hongo endófito *Xylaria* sp., mediante la realización de bioensayos de antagonismo directo, utilizando las especies fitopatógenas *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici*, *Alternaria solani* y un hongo endófito aislado de las hojas de *Callicarpa acuminata*: *Phomopsis* sp.
- Establecer las condiciones óptimas de crecimiento de *Xylaria* sp., mediante la obtención de cultivos en pequeña escala, verificando el desarrollo del microorganismo en los medios de cultivo caldo papa, agar papa-dextrosa, sabouraud y jugo de ocho verduras, incubando en condiciones estáticas y con agitación controlada.
- Obtener los extractos orgánicos a partir del medio de cultivo (partición) y micelio (maceración) de *Xylaria* sp.
- Determinar cuantitativamente el potencial antifúngico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio, mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre



---

el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos *F. oxysporum*, *P. capsici*, *Rhizoctonia* sp. y *A. solani*, empleando el método de dilución en agar.

- Evaluar cuantitativamente el efecto fitotóxico de los extractos de *Xylaria* sp., estableciendo su efecto sobre la germinación y sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *S. lycopersicum* y *Lolium multiflorum*, utilizando el método en caja de Petri.
- Realizar cultivos en mediana escala empleando las condiciones óptimas de crecimiento y obtener los extractos orgánicos correspondientes. Verificar cuantitativamente el potencial aleloquímico (actividad antifúngica y fitotóxica) de los extractos del medio de cultivo y del micelio.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios bioactivos, a partir de los extractos crudos derivados del cultivo en mediana escala, mediante un fraccionamiento químico biodirigido, utilizando el método de dilución en agar, para monitorear la actividad aleloquímica de las fracciones.
- Determinar cuantitativamente el potencial aleloquímico de los compuestos presentes en las fracciones activas, sobre el crecimiento de los microorganismos y plantas de prueba.
- Establecer la estructura molecular de los compuestos bioactivos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X.



---

## V. PARTE EXPERIMENTAL

### 1. MATERIAL FÚNGICO

El hongo endófito *Xylaria* sp., fue aislado en el año 2004 de las hojas sanas del helecho *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Dennstaedtiaceae) colectadas en la reserva ecológica “El Edén”, en Quintana Roo (a los 21° 12’ LN y 87° 11’ LW). La identidad de este microorganismo se estableció con base en sus características morfológicas, macro y microscópicas.

### 2. ORGANISMOS DE PRUEBA

#### 2.1 Microorganismos fitopatógenos

Se utilizaron tres hongos filamentosos o verdaderos (Eumycota): *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., y *Alternaria solani.*, el oomiceto (Oomycota) *Phytophthora capsici*. Todas las cepas fueron donadas por la Doctora Olga Gómez del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

También fueron utilizados dos hongos aislados de las hojas de la planta *Callicarpa acuminata* Humb *et al.* (Verbenaceae), colectadas en la reserva ecológica “El Eden”: el endófito *Phomopsis* sp., y el fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp.

#### 2.2 Plantas de prueba

Se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae), *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) y *Lolium multiflorum* (Poaceae). Las semillas de *A. hypochondriacus* y de *L. multiflorum* se compraron en el Mercado de Tulyehualco, México, D.F., mientras que las de *S. lycopersicum* en “Semillas Berentsen”, en el municipio de Celaya, Guanajuato, México.





---

### 3. BIOENSAYOS DE ANTAGONISMO ENTRE *Xylaria* sp. Y HONGOS FITOPATÓGENOS

---

Los bioensayos de antagonismo directo se realizaron entre *Xylaria* sp. y dos hongos aislados de las hojas de *C. acuminata*: *Phomopsis* sp. (endófito) y *Pestalotiopsis* sp. (fitopatógeno), así como entre *Xylaria* sp. y los fitopatógenos de importancia económica *P. capsici* (oomiceeto) y *Rhizoctonia* sp., *A. solani* y *F. oxysporum* (hongos verdaderos).

Los microorganismos se inocularon, de acuerdo con sus tasas de crecimiento, en cajas de Petri estériles de 10 cm que contenían 20 mL de medio papa dextrosa agar (PDA) preparado con papas frescas. El endófito *Xylaria* sp., es un microorganismo de crecimiento lento, por lo cual se sembró 7 días antes que los competidores de crecimiento medio *F. oxysporum*, *A. solani*, *Phomopsis* sp., y *Pestalotiopsis* sp., y 9 días antes que los competidores de crecimiento rápido *P. capsici* y *Rhizoctonia* sp.

Cada competidor se sembró utilizando inóculos de micelios (5 mm de diámetro) de los microorganismos previamente incubados en PDA por 10 días. Los inóculos se colocaron equidistantes ocupando sólo un extremo de la caja Petri como se muestra en la Figura 2. Las cajas de Petri se incubaron a 28 °C con fotoperiodos luz-oscuridad naturales (12:12 h). Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Todo el procedimiento experimental se efectuó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar.

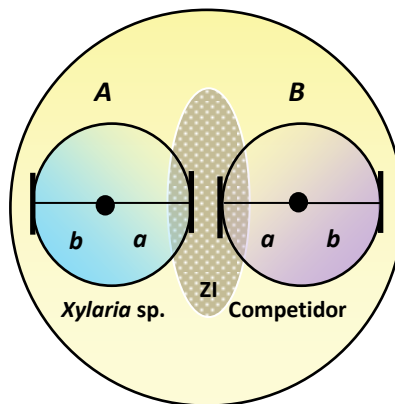
Los resultados del bioensayo se registraron e interpretaron después de 5 y 10 días. Para los bioensayos entre *Xylaria* sp. y los microorganismos de crecimiento rápido los registros fueron a los días 3 y 10 días de interacción. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento de los diferentes competidores, comparando su crecimiento con respecto al de los microorganismos control que fueron sembrados paralelamente, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{a - b}{b} \times 100$$



Donde **a** y **b** corresponden a los radios de crecimiento de *Xylaria* sp. (**A**) y de los diferentes competidores (**B**).

Los datos obtenidos se examinaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ( $\alpha = 0.05$ ) y una prueba de contrastes de Tukey HSD, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.01 (Macías-Rubalcava *et al.* 2010; 2014; Armendáriz, 2013).



**Figura 2.** Bioensayo de antagonismo en caja Petri entre *Xylaria* sp. (**A**) y los microorganismos de prueba (**B**); donde **a** y **b** representan los radios de crecimiento de cada microorganismo y **ZI** es la zona de interacción antagónica.

#### **4. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO ENDÓFITO *Xylaria* sp.**

Las condiciones óptimas del cultivo de *Xylaria* sp. se establecieron realizando cultivos en pequeña escala (1 L) y verificando el desarrollo del microorganismo en diversos medios y utilizando diferentes condiciones de incubación.

*Xylaria* sp. se cultivó en condiciones estáticas y de agitación a 180 rpm, a temperatura ambiente con fotoperiodos de luz-oscuridad naturales 12:12 h, utilizando los medios de cultivo caldo papa-dextrosa (CPD), caldo papa (CP), caldo Sabouraud dextrosa (Sabouraud) y caldo jugo de ocho verduras (V8). En el Cuadro 1 se presenta la composición de los medios de cultivo empleados. Los inóculos consistieron en cinco cortes circulares del micelio de *Xylaria* sp., provenientes de un cultivo incubado anteriormente por un periodo de 15 días en medio



solido (PDA). Los cultivos en pequeña escala de *Xylaria* sp., en condiciones estáticas, se realizaron en matraces Fernbach de 2800 mL conteniendo 1 L de medio de cultivo y se incubaron por un período de 2.5 meses.

Los cultivos en condiciones de agitación se realizaron en dos matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 500 mL de medio de cultivo, incubándose por un período de 1.5 meses, con una agitación de 180 rpm utilizando un agitador orbital (orbital Shaker, Lab Line modelo 1250).

**Cuadro 2.** Medios de cultivo para determinar el desarrollo óptimo de *Xylaria* sp.

Medio	Composición
Papa dextrosa agar (PDA)	trozos de papa peladas.....200 g dextrosa.....20 g agar.....15 g agua destilada.....1 L
Caldo de papa dextrosa (CPD)	trozos de papa peladas ....200 g dextrosa.....20 g agua destilada .....1 L
Caldo papa (CP)	trozos de papa peladas ....200 g agua destilada .....1 L
Caldo Sabouraud dextrosa Bioxon® (Sabouraud)	peptona de carne.....5 g peptona de caseína.....5 g dextrosa.....20 g agua destilada.....1 L pH = 5.7
Caldo jugo de ocho Verduras (V8)	jugo V-8.....180 mL carbonato de calcio.....2 g agua destilada.....820 mL pH = 5.5

\*Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 120° durante 15 min.

Al término del crecimiento, se realizaron preparaciones microscópicas para descartar la posibilidad de contaminación por otros microorganismos. El producto de cada fermentación se filtró a través de varias capas de gasa para separar el micelio del medio de cultivo, procediéndose a la obtención de los extractos microbianos (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2010; Sánchez, 2010; Armendáriz, 2013).



---

## **5. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS A PARTIR DEL MEDIO DE CULTIVO Y DEL MICELIO DE *Xylaria* sp.**

El micelio húmedo obtenido de cada una de las fermentaciones se sometió a un proceso de maceración exhaustivo con 1 L de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) durante tres días; el proceso experimental se repitió en tres ocasiones. Utilizando el mismo procedimiento, se realizaron cuatro extracciones adicionales con acetato de etilo (AcOEt). Los extractos resultantes se filtraron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío.

Los extractos de los medios de cultivo se obtuvieron mediante sucesivas particiones empleando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt. La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2010; Sánchez, 2010 y Armendáriz, 2013).

Cada uno de los dos extractos obtenidos a partir del micelio y del medio de cultivo, generados en los dos tipos de fermentación (estáticas o agitación), se analizaron utilizando cromatografía en capa fina (CCF), observándose que cada par de extractos ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt), en iguales condiciones de fermentación, eran cromatográficamente similares, por lo que se combinaron (extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt medio de cultivo y extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt del micelio), obteniéndose así dos extractos totales por condición de incubación. Los extractos resultantes (cuatro en condiciones de agitación y uno en condiciones estáticas), se evaluaron para determinar su potencial aleloquímico (actividad antifúngica y fitotóxica) utilizando el método en caja de Petri (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008, 2010; Sánchez, 2010; Armendáriz, 2013).

## **6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DEL MEDIO DE CULTIVO Y MICELIO DE *Xylaria* sp.**

### **6.1 Determinación del potencial antifúngico**

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico de los extractos orgánicos del medio de cultivo, del micelio, de las fracciones cromatográficas y de los compuestos puros aislados de *Xylaria* sp., se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre el crecimiento



---

radial de los microorganismos fitopatógenos *F. oxysporum*, *A. solani*, *Rhizoctonia* sp. y *P. capsici*.

Los bioensayos se realizaron en cajas Petri de 5 cm de diámetro y la concentración de prueba fue de 250 µg/mL. Para preparar la muestras se pesaron 20 mg de muestra y se disolvieron en 0.1-0.2 mL de CH<sub>3</sub>OH, posteriormente se adicionaron 40 mL de agua destilada estéril y 40 mL de PDA al 2%. En cada caja de Petri se colocaron 5 mL de la disolución resultante y se dejaron solidificar a temperatura ambiente (temperatura de solidificación ≈ 40 °C). Enseguida se colocó en el centro de cada caja un inóculo de 0.5 cm de diámetro del microorganismo de prueba obtenido de un cultivo en PDA previamente incubado por un periodo de 10 días. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las cajas se incubaron 3 días (*P. capsici* y *Rhizoctonia* sp.) y 4 días (*F. oxysporum* y *A. solani*), dependiendo del microorganismo, a 28 °C con fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad, 12:12 h. Como control negativo se utilizaron PDA (1%) y PDA (1%)+CH<sub>3</sub>OH (0.1-0.2 mL) y como control positivo se empleó el fungicida comercial Prozycar® 50 P.H (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato) a una concentración de 250 µg/mL, para hongos verdaderos y el Ridomil Gold 4E® (metalaxil-m) para los oomicetos a una concentración de 250 µg/mL. Al final del periodo de incubación se registraron dos medidas perpendiculares al diámetro de los micelios. Los datos obtenidos se trataron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ( $\alpha = 0.05$ ) y una prueba de contrastes de Tukey HSD, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.01 (Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Sánchez 2010, Armendáriz, 2013).

## **6.2 Determinación del potencial fitotóxico**

Los bioensayos de fitotoxicidad se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar las muestras se pesaron 6 mg de extracto orgánico, fracciones o compuestos puros, y se disolvieron en 0.1 mL de CH<sub>3</sub>OH, posteriormente se agregaron 30 mL de agua destilada y 30 mL de agar al 2%, para obtener una concentración final de 100 µg/mL. Se vertieron 5 mL de las disoluciones en las cajas de Petri y se dejaron solidificar por completo (≈ 40 °C). A



---

continuación, se colocaron aleatoriamente 10 semillas de cada una de las especies modelo en las cajas de Petri y se incubaron en la oscuridad a 27 °C.

Posteriormente, la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las raíces 24 h después para las semillas de *A. hypochondriacus*, 48 h para las de *L. multiflorum*, y 72 h para las de *S. lycopersicum*. Como controles negativos se utilizaron agar-agua al 1 % y agar-agua al (1 %)-CH<sub>3</sub>OH (0.1 mL) y como control positivo el herbicida comercial RIVAL® (Glifosato: sal monoamónica de N-(fosfometil) glicina) a 100 y 200 µg/mL. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado bajo un diseño completamente al azar. Los datos de crecimiento de las plantas fueron examinados mediante un análisis de varianza de una vía, (ANOVA) modelo I ( $\alpha=0.05$ ) y una prueba de contrastes de Tukey HSD utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.01 (Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Sánchez 2010, Armendáriz, 2013).

Para las fracciones orgánicas de menor polaridad el bioensayo se realizó en cajas de Petri de 5 cm de diámetro que contenían un disco de papel filtro (Whatman No. 1). Se prepararon disoluciones de cada fracción con una concentración final de 100 µg/mL, pesando 2 mg de muestra y disolviéndolos en 20 mL de Hexano (Hx), en seguida se vertieron 1.5 mL de cada una de las disoluciones en las cajas de Petri y se permitió la evaporación completa del disolvente. Posteriormente, se humedeció el papel filtro con 3 mL de agua destilada y a continuación se colocaron en las cajas de Petri 10 semillas de cada una de las especies de plantas prueba, incubándose a 27°C en oscuridad. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. La actividad fitotóxica de los extractos se registró midiendo el crecimiento radicular, para el caso de las semilla de *A. hypochondriacus* a las 24 h, para las de *L. multiflorum* a las 48 h y para las de *S. lycopersicum* a las 72 h (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010).

## **7. CULTIVOS EN MEDIANA ESCALA DEL HONGO ENDÓFITO *Xylaria* sp.**

De acuerdo con las condiciones óptimas de crecimiento indicadas en el Cuadro 11 (Sección de Resultados y Discusión), se realizó un cultivo en mediana escala del hongo endófito *Xylaria*



---

sp., utilizando 20 L de CPD, incubando en condiciones estáticas y otro de 5.5 L incubado en condiciones de agitación.

El cultivo en condiciones estáticas se realizó empleando cuatro garrafones de vidrio con capacidad para 18 L, en cada garrafón se adicionaron 5 L de CPD. Por otra parte, el cultivo en mediana escala en condiciones de agitación se realizó utilizando 11 matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 0.5 L de CPD. Posteriormente, cada garrafón y/o matraz se inoculó, en condiciones de esterilidad, con 5 cortes de 10 mm de diámetro con el micelio de *Xylaria* sp., previamente incubada por un periodo de 10 días en PDA. Por último, se sellaron con un tapón estéril de tela de gasa. El cultivo en condiciones estáticas se mantuvo en incubación durante un periodo de 4 meses. Para el cultivo en condiciones agitación se utilizó un equipo orbital Shaker, Lab Line modelo 1250, a 180 rpm, manteniendo la incubación durante 2 meses; ambos cultivos se mantuvieron con fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad (12:12 h), a una temperatura de 28°C (Sánchez, 2010; Armendáriz, 2013).

Al término de la incubación se obtuvieron los extractos orgánicos y se verificó su potencial fitotóxico y antifúngico siguiendo los procedimientos experimentales descritos en el Numeral 6

## **8. ESTUDIO QUÍMICO**

### **8.1 Métodos cromatográficos generales**

Los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de *Xylaria* sp., obtenidos en mediana escala, se fraccionaron mediante cromatografía de adsorción en columna abierta, empleando gel de sílice (Sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230). Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (Sílica Gel 60 GF<sub>254</sub> Merck de 0.25 mm de espesor), y diversos sistemas de elución (Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, en diversas proporciones). La visualización de las placas se realizó con luz UV (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y como agentes cromogénicos se emplearon sulfato cérico (12.0 g sulfato cérico más 22.2 mL ácido sulfúrico concentrado y 350.0 g de hielo), ácido sulfúrico al 10 % y



reactivo de Dragendorff; para evidenciar el color propio de los compuestos, fue necesario calentar cada cromatoplaque por dos minutos a 110 °C (Ghisalberti, 1993). La cromatografía preparativa en capa delgada se realizó empleando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> Merck de 20 x 20 cm y de 0.25 y 2.0 mm de espesor, aplicando en cada cromatoplaque aproximadamente 10 y 100 mg de muestra, respectivamente.

### 8.2 Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos de *Xylaria* sp.

Los extractos activos del medio de cultivo (2.5 g en condiciones estáticas y 0.69 g en condiciones de agitación) y del micelio (1.94 g en condiciones estáticas y 1.98 g en condiciones de agitación), se fraccionaron mediante una cromatografía en columna abierta utilizando 150 g de gel de sílice; exceptuando el extracto orgánico del medio de cultivo en condiciones de agitación, el cual se fraccionó utilizando 40 g de gel de sílice. Para los extractos orgánicos del medio de cultivo en condiciones de incubación estáticas y con agitación, se obtuvieron 200 y 94 fracciones de 50 mL cada una, respectivamente. Para los extractos del micelio fueron 151 y 157 fracciones, respectivamente, también de 50 mL cada una. Aquellas fracciones que presentaron características cromatográficas similares se combinaron para generar los grupos de fracciones indicados en los Cuadros 3-6, en donde además se resumen los sistemas de elución empleados. El efecto fitotóxico y antifúngico de las fracciones primarias se evaluó empleando el método de dilución en agar (Numeral 6 de esta sección).

**Cuadro 3.** Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto del medio de cultivo CPD en condiciones estáticas de *Xylaria* sp.

Sistema de elución	Proporción %	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave	Peso (mg)
Hexano	100	1-18	1-56	I Me-E	74.6
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	19-24			
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	25-36			
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	37-46			
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	47-56			
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	57-66	57-104	II Me-E	33.8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	67-83	105-110	III Me-E *,**	214.7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	84-113			





**Cuadro 3.** Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto del medio de cultivo CPD en condiciones estáticas de *Xylaria* sp. (continuación).

Sistema de elución	Proporción %	Fraciones obtenidos	Fraciones reunidas	Clave	Peso (mg)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	98:2	114-123	111-131	IV Me-E *; **	196.9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	97:3	124-141	132-153	V Me-E *	95.4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	96:4	142-153			
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	95:5	154-163	154-157	VI Me-E	15.8
			158-163	VII Me-E	4.6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	90:10	164-174	164-168	VIII Me-E *	168.7
			169-172	IX Me-E	67.0
			173-174	X Me-E *	67.8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	80:20	175-184	175-178	XI Me-E *	213.8
			179-184	XII Me-E	93.8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	70:30	185-194	185-18	XIII Me-E	62.0
			189-194	XIV Me-E	33.5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	50:50	195-200	195-200	XV Me-E	43.0

\*Fraciones fungitóxicas; \*\*Fraciones fitotóxicas.

**Cuadro 4.** Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto del micelio en condiciones estáticas de *Xylaria* sp.

Sistema de elución	Proporción %	Fraciones obtenidos	Fraciones reunidas	Clave	Peso (mg)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-15	1-20	I Mi-E **	63.5
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	16-25	21-29	II Mi-E	147
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	26-35	30-39	III Mi-E	3.4
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	36-46	40-46	IV Mi-E **	0.4
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	47-55	47-50	V Mi-E	4.8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	56-73	51-59	VI Mi-E	1.2
			60-66	VII Mi-E	21.5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	99:1	74-91	67-91	VIII Mi-E *	63.0
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	98:2	92-103	92-94	IX Mi-E	2.3
			95-98	X Mi-E *	144.4
			99-100	XI Mi-E	92.4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	97:3	104-119	101-114	XII Mi-E *	112.7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	96:4	120-129	115-122	XIII Mi-E	15.2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	95:5	130-138	123-134	XIV Mi-E *	109.0
			135-138	XV Mi-E *	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	90:10	139-143	139-143	XVI Mi-E *	50.9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	80:20	144-150	144-150	XVII Mi-E	314.7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	50:50	151	151	XVIII Mi-E	92.0

\*Fraciones fungitóxicas; \*\*Fraciones fitotóxicas.



**Cuadro 5.** Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto del medio cultivo en condiciones de agitación de *Xylaria* sp.

Sistema de elución	Proporción %	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave	Peso (mg)
Hexano	100	1-10	1-15	I Me-A	2.9
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	11-22	16-25	II Me-A	6.3
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	23-28	26-40	III Me-A	3.6
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	29-34			
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	35-39			
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	40-44			
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	45-46	41-59	IV Me-A	2.9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	47-55	60-74	V Me-A	118.0
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	56-61			
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	97:3	62-65			
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	96:4	66-73			
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:6	74-83	75-84	VI Me-A	35.3
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	94:10	84-88	85-94	VII Me-A	34.2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	89-94			

**Cuadro 6.** Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto del micelio en condiciones de agitación de *Xylaria* sp.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidos	Fracciones reunidas	Clave	Peso (mg)
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-18	1-22	I Mi-A	70.4
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	19-28	23-71	II Mi-A **	49.6
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	29-38			
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	39-48			
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	49-58			
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	59-70	72-78	III Mi-A **	41.4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	71-80			
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	81-92	79-91	IV Mi-A	18.4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	97:3	93-102	92-96	V Mi-A *	17.8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	96:4	103-115	97-108 109-116	VI Mi-A * VII Mi-A *	163.5 78.4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	116-124	117-130	VIII Mi-A *	77.5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	94:6	125-134		IX Mi-A *	118.0
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	135-144	131-140	X Mi-A *	173.6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	145-156	141-146 147-156	XI Mi-A *	216.6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	157	157	XII Mi-A *	62.4

\*Fracciones fungitóxicas; \*\*Fracciones fitotóxicas.



---

## 9. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

### 9.1 Obtención de la punctaporonina B

La punctaporonina B (**35**) precipitó de manera espontánea a partir de los extractos crudos del medio de cultivo en condiciones estáticas y agitación, como un sólido cristalino incoloro. Tras sucesivos lavados con Hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt, Acetona y MeOH y posterior recristalización de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) se obtuvieron 30 mg de punctaporonina B (**35**) con un p.f. de 185-187°C (Anderson *et al.*, 1984, 1988; Edwards *et al.*, 1989, Deyup *et al.*, 2006).

### 9.2 Obtención del ácido succínico

El compuesto (**36**) precipitó de manera espontánea como un sólido cristalino de color blanco a partir del extracto del micelio del cultivo generado en condiciones estáticas. El sólido se lavó con diferentes disolventes (Hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, AcEtO, Acetona y MeOH), y se sometió a sucesivas recristalizaciones con una mezcla de acetona-MeOH (1:1), obteniéndose 137 mg de ácido succínico (**36**) con un p.f. de 184-188°C (Chen *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1973,).

### 9.3 Obtención de la 5-carboximeleina

De las fracciones primarias VI-Me-E (15.8 mg), VII-Me-E (4.6 mg) y VIII-Me-E (168.7mg), precipitó un sólido amorfo de color blanco, el cual, tras sucesivos lavados con diferentes disolventes orgánicos (Hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, AcEtO, Acetona y MeOH) y de una recristalización con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1) generó 6.3 mg de (-)-(3R)-5-carboxi-3,4-dihidro-8-hidroxy-3-metil isocumarina o 5-caboximelleina (**37**), con un p.f. de 247-249 °C (Klalklay *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2011; Rukachaisirikul *et al.*, 2009; Pongcharoen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003; Chinworrungsee *et al.*, 2001; Okuno *et al.*, 1986; Claydon *et al.*, 1985; Anderson *et al.*, 1983; Alvaranga *et al.*, 1978).



---

## **10. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS, ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS**

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se describen sin corregir. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RNM-<sup>1</sup>H) y de carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C) se generaron en un aparato Bruker DM X500. Todos los espectros se registraron en CDCl<sub>3</sub> y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se asignaron en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) empleado como referencia interna. Los espectros en el infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599B, en pastilla de KBr y en película. Los espectros en el ultravioleta (UV) se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 202. Los espectros de masas se registraron en un aparato JEOL JMS-AX505 HA mediante introducción directa a 70 eV. El análisis de difracción de rayos X se efectuó en el Instituto de Química, en un difractómetro Nicolet R3m.

## **11. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL CITOTÓXICO DE LOS COMPUESTOS PUROS**

La evaluación del potencial citotóxico de los compuestos aislados de *Xylaria* sp. se efectuó sobre seis líneas celulares cancerosas de humano: glía de sistema nervioso central (U25), próstata (PC-3), leucemia (K562), colon (HCT-15), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU), evaluados a una concentración de 50  $\mu$ g/mL. Este bioensayo se realizó en el laboratorio de pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM, por la M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan, siguiendo el protocolo descrito por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica.



---

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de determinar el efecto antagónico del hongo endófito *Xylaria* sp. sobre diferentes microorganismos endófitos y fitopatógenos, así como para estudiar el potencial aleloquímico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio, sobre el crecimiento de diferentes microorganismos y plantas, con el fin de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones que se establecen entre las plantas hospederas y los hongos endófitos. Asimismo, aportar al posible desarrollo de nuevos agentes de control de plagas y enfermedades.

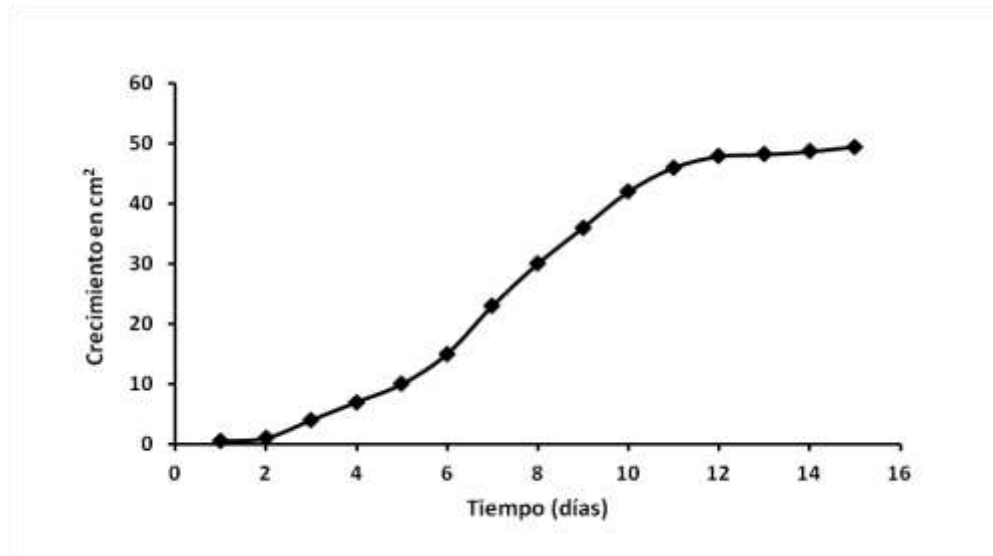
Para un mejor análisis, los resultados obtenidos se dividieron en seis secciones: 1) determinación del efecto antagónico sobre el crecimiento de microorganismos endófitos y fitopatógenos; 2) determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *Xylaria* sp., mediante la obtención de cultivos en pequeña escala en condiciones de incubación estáticas y con agitación; 3) evaluación cuantitativa del efecto alelopático (actividad antifúngica y fitotóxica) de los extractos orgánicos obtenidos del medio de cultivo y micelio; 4) obtención y evaluación biológica de los extractos orgánicos derivados de cultivos en mediana escala; 5) aislamiento, purificación y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos y fracciones activas del hongo endófito *Xylaria* sp. y 6) evaluación biológica de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas, mediante la determinación de su efecto sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos, tres plantas prueba y seis líneas celulares.

### 1. BIOENSAYO DE ANTAGONISMO DIRECTO

La determinación del potencial antagónico de *Xylaria* sp. se realizó mediante bioensayos de antagonismo directo entre este endófito y tres hongos fitopatógenos: *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. y *A. solani*; un oomiceto fitopatógeno: *P. capsici* y un hongo endófito, así como un fitopatógeno aislados de *C. acuminata*: *Phomopsis* sp. y *Pestalotiopsis* sp., respectivamente.



Con la finalidad de establecer la tasa de crecimiento del hongo endófito *Xylaria* sp., se realizó una curva de crecimiento en medio PDA. La tasa de crecimiento observada para este microorganismo es de 4.2 cm<sup>2</sup>/día (Figura 3). Con base en este resultado se estableció que el hongo endófito *Xylaria* sp. aislado de *P. aquilinum* es un microorganismo de crecimiento lento, por lo cual se sembró 7 días antes que los competidores de crecimiento medio (*F. oxysporum*, *A. solani*, *Pestalotiopsis* sp. y *Phomopsis* sp.) y 9 días antes que los competidores de crecimiento rápido (*P. capsici* y *Rhizoctonia* sp.) (Armendáriz, 2013).



**Figura 3.** Crecimiento en cm<sup>2</sup> de *Xylaria* sp. en cultivos en PDA en función del tiempo.

Los resultados de crecimiento e interacción macroscópica entre *Xylaria* sp. y los microorganismos de crecimiento medio se registraron e interpretaron 5 y 10 días después de haber sido sembrados, y después de 3 y 10 días para los bioensayos entre *Xylaria* sp. y los microorganismos de crecimiento rápido. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición del crecimiento de los diferentes competidores.



## 1.1 ANTAGONISMO COMPETITIVO ENTRE *Xylaria* sp. Y DOS HONGOS AISLADOS DE *Callicarpa Acuminata*.

### 1.1.1 Antagonismo entre *Xylaria* sp. y el endófito *Phomopsis* sp.

En la Figura 4 se observan los micelios en contacto de *Xylaria* sp. y del endófito *Phomopsis* sp. en el bioensayo de antagonismo directo. *Xylaria* sp. inhibió el crecimiento de *Phomopsis* sp. de una forma dependiente del tiempo, siendo el 40% a los 5 días de interacción (Figura 4A) y del 56% a los 10 días del ensayo (Figura 4B). Como resultado de esta interacción, el micelio de *Xylaria* sp. cambió de morfología y se tornó más oscuro.



A



B

**Figura 4. A.** Bioensayo de antagonismo entre los hongos endófitos *Xylaria* sp. (izq) y *Phomopsis* sp. (der) a los 5 días de interacción.  
**B.** Interacción antagónica a los 10 días.



### 1.1.2 Antagonismo entre *Xylaria* sp. y el fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp.

En la Figura 5 se observa que *Xylaria* sp. y *Pestalotiopsis* sp. crecen sin que sus micelios entren en contacto durante el bioensayo de antagonismo directo. En este caso *Xylaria* sp. inhibió el crecimiento de *Pestalotiopsis* sp. en un 44% después de 5 días de interacción (Figura 5A) y en un 40% a los 10 días del ensayo (Figura 5B).



A



B

**Figura 5. A.** Bioensayo de antagonismo entre *Xylaria* sp. (izq) y el hongo fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp. (der) a los 5 días de interacción. **B.** Interacción antagónica a los 10 días.

## 1.2. ANTAGONISMO COMPETITIVO ENTRE *Xylaria* sp. Y MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA

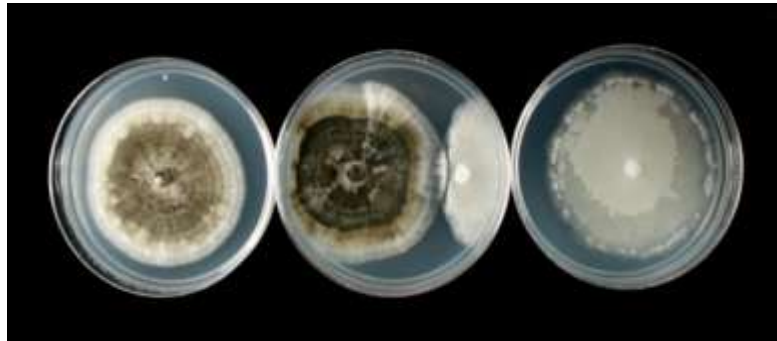
### 1.2.1 Antagonismo directo entre *Xylaria* sp. y *Phytophthora capsici*

En la Figura 6A se presenta la interacción antagónica entre *Xylaria* sp. y el oomiceto *P. capsici* a los 3 días de crecimiento. *Xylaria* sp. inhibió el crecimiento del oomiceto en un 76%. Sin embargo, *P. capsici* comenzó a crecer sobre *Xylaria* sp. El micelio de ambas especies cambió

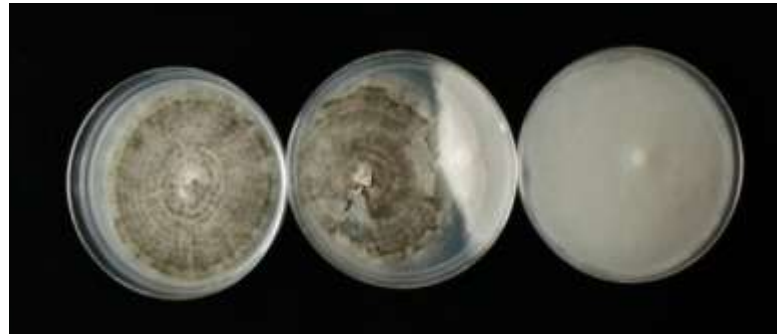




de morfología con respecto a los controles de crecimiento, observándose que el de *Xylaria* sp. se tornó más oscuro, mientras que el de *P. capsici* adquirió una apariencia más algodonosa. En la Figura 6B se muestra el antagonismo después de 10 días, observándose que *Xylaria* sp. mantuvo la inhibición sobre el crecimiento de *P. capsici* (60%) , a pesar de que el oomiceto continuó creciendo sobre el endófito.



A



B

**Figura 6. A.** Bioensayo de antagonismo entre *Xylaria* sp. (izq) y el oomiceto fitopatógeno *P. capsici* (der) a los 3 días de interacción. **B.** Interacción antagónica a los 10 días.

### 1.2.2 Antagonismo directo entre *Xylaria* sp. y *Rhizoctonia* sp.

En la Figura 7A se muestra la interacción antagónica entre *Xylaria* sp. y el fitopatógeno *Rhizoctonia* sp. a los 3 días de crecimiento. *Rhizoctonia* sp. se inhibió en un 32% por la presencia de *Xylaria* sp. Los micelios de ambos microorganismos crecieron en contacto observándose una proliferación abundante de hifas por parte del fitopatógeno, formándose así una barrera micelial de color blanco y textura plumosa bien definida entre ambos



competidores. Después de 10 días de crecimiento se observó una fuerte competencia entre los dos microorganismos (Figura 7B) y *Rhizoctonia* sp. se desarrolló sobre *Xylaria* sp., inhibiéndola en un 16%.



**A**



**B**

**Figura 7. A.** Bioensayo de antagonismo entre *Xylaria* sp. (izq) y el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia* sp. (der) a los 3 días de interacción. **B.** Interacción antagónica a los 10 días.

### 1.2.3 Antagonismo directo entre *Xylaria* sp. y *Alternaria solani*

En la Figura 8A se muestra la interacción antagónica entre *A. solani* y *Xylaria* sp. a los 5 días de crecimiento. Se observa una mayor proliferación de las hifas de *Xylaria* sp. en la zona de interacción, además de un crecimiento sobre *A. solani* que abarcó hasta la zona del inóculo. En este caso la inhibición del crecimiento del fitopatógeno fue del 52%. A los 10 días de



interacción, la proliferación de hifas de *Xylaria* sp. y el crecimiento sobre *A. solani* continuaron de manera evidente, inhibiéndolo en un 100% (Figura 8B).



A



B

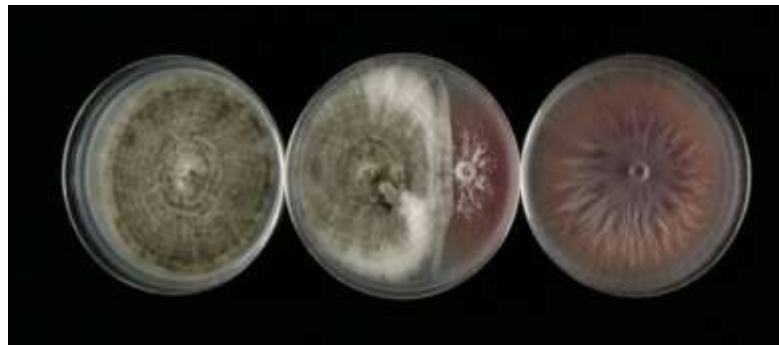
**Figura 8.** A. Bioensayo de antagonismo entre *Xylaria* sp. (izq) y el hongo fitopatógeno *A. solani* (der) a los 5 días de interacción. B. Interacción antagónica a los 10 días.

#### 1.2.4 Antagonismo directo entre *Xylaria* sp. y *Fusarium oxysporum*

En la Figura 9A se observa el bioensayo de antagonismo realizado entre *Xylaria* sp. y el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* a los 5 días de crecimiento. Los micelios de los microorganismos crecieron hasta entrar en contacto, formándose una barrera micelial blanca por parte de *Xylaria* sp. El crecimiento de *F. oxysporum* fue inhibido en un 52 % debido a la presencia de *Xylaria* sp. En la Figura 9B se representa el antagonismo a los 10 días de interacción. La barrera micelial de *Xylaria* sp. desarrolló una mayor superficie, extendiéndose sobre el fitopatógeno e inhibiendo su crecimiento en un 75%.



A



B

**Figura 9. A.** Bioensayo de antagonismo entre *Xylaria* sp. (izq) y el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* i (der) a los 5 días de interacción. **B.** Interacción antagónica a los 10 días.

En resumen, los resultados de los bioensayos de antagonismo entre el hongo endófito *Xylaria* sp. y los diferentes microorganismos competidores, permiten establecer que *Xylaria* sp. posee potencial antifúngico, ya que los inhibió significativamente. Por otra parte, los porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento de *Xylaria* sp., debidos a la presencia de los diferentes microorganismos competidores no son significativos, confirmando que este hongo endófito presenta importante potencial antifúngico.



**Cuadro 7.** Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los microorganismos competidores de *Xylaria* sp. en los bioensayos de antagonismo.

Tipo de microorganismo	Microorganismo competidor	% de inhibición inicial*	% de inhibición final**
Endófito	<i>Phomopsis</i> sp.	40	56
Fitopatógeno	<i>Pestalotiopsis</i> sp	44	40
	<i>P. capsici</i>	76	60
	<i>Rhizoctonia</i> sp	32	16
	<i>A. solani</i>	52	100
	<i>F. oxysporum</i>	52	76

\*5 días de interacción, \*\*10 días de interacción.

## 2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DE *Xylaria* sp. Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ALELOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL MEDIO DE CULTIVO Y MICELIO

Las condiciones óptimas de crecimiento del hongo endófito *Xylaria* sp. se establecieron mediante la realización de cultivos en pequeña escala (1 L), monitoreando el desarrollo del microorganismo en cuatro diferentes medios de cultivo utilizando diferentes condiciones de incubación: estáticas y con agitación orbital a 180 rpm, por un período de 2.5 y 1.5 meses respectivamente, empleando un fotoperiodo de luz artificial-obscuridad 12:12 h a una temperatura de 28 °C.

Los medios de crecimiento seleccionados (Cuadro 2, sección Parte Experimental) para la optimización de las condiciones de cultivo de *Xylaria* sp. se utilizan ampliamente en el cultivo de microorganismos fúngicos (Frisvad *et al.*, 2008; Ulloa y Hanlin, 1978). En trabajos previos realizados por el grupo de trabajo, se demostró que el medio de cultivo papa dextrosa natural, es eficaz para el crecimiento de los hongos endófitos (Armendáriz, 2013; 2011; Macías Rubalcava *et al.*, 2010, 2008; Sánchez 2010).

Los extractos orgánicos se obtuvieron a partir del medio de cultivo mediante un proceso de partición y del micelio húmedo mediante maceración exhaustiva, utilizando como disolventes



orgánicos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt. En el Cuadro 8 se presentan los rendimientos de los extractos orgánicos obtenidos y la biomasa producida, de los cuatro medios de cultivo seleccionados.

Con excepción del cultivo en papa dextrosa, no se obtuvo un desarrollo adecuado de *Xylaria* sp. en condiciones de incubación estáticas. Respecto a los cultivos en condiciones de agitación, en general, se observan diferencias considerables en el rendimiento de la biomasa generada, así como en la cantidad de extractos orgánicos en función del medio de cultivo empleado. Los mayores rendimientos se obtuvieron utilizando los medios de cultivo caldo papa dextrosa (CPD) y Sabourau, mientras que el medio caldo papa (CP) presentó el menor rendimiento de extractos orgánicos (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de los cultivos de *Xylaria* sp. en pequeña escala (1 L).

Medio de cultivo	Condiciones de fermentación	Periodo de incubación (meses)	Extracto medio (mg/L)	Extracto micelio (mg/L)	Biomasa (g)
Caldo papa dextrosa (CPD)	Estático	2.5	131.7*	300.0*	7.76
	Agitación	1.5	648.0*	869.7*	38.8
V8	Agitación	1.5	27.8	33.1	4.5
Sabouraud	Agitación	1.5	248.6*	171.8*	6.8
Caldo papa (CP)	Agitación	1.5	11.8	25.8	1.13

\* Mayor rendimiento de extractos orgánicos, producido por los medios de cultivo seleccionados.

Posteriormente, el análisis cromatográfico en capa fina (CCF) de los extractos obtenidos evidenció las diferencias en la composición metabólica entre los extractos del medio de cultivo y del micelio, por lo que se decidió evaluarlos por separado. Por otra parte, el perfil metabólico de los extractos orgánicos derivados de los cultivos PDA tanto en condiciones de incubación estáticas como en agitación, se observó una composición más compleja, indicando una mayor producción de metabolitos secundarios.

Con el objetivo de confirmar si el efecto demostrado por *Xylaria* sp. en los bioensayos de antagonismo directo se debe a los metabolitos secundarios que produce, se evaluó el efecto antifúngico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio, sobre el crecimiento



---

radial de diversos microorganismos de prueba. De manera paralela se evaluó el efecto de los extractos sobre la germinación y la longitud de la raíz de tres plantas modelo.

## 2.1 EFECTO ANTIFÚNGICO

La determinación cuantitativa del potencial alelopático de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio del endófito *Xylaria* sp., se llevó a cabo mediante el registro de su efecto sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica, tres hongos verdaderos (*F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. y *A. solani*) y un oomiceto (*P. capsici*).

En el Cuadro 9 se presenta el efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio a una concentración de 250 µg/mL. En general, todos los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio inhibieron significativamente el crecimiento radial de los cuatro fitopatógenos. El crecimiento de los hongos *Rhizoctonia* sp., *F. oxysporum* y del oomiceto *P. capsici* fueron los más afectados, mientras que *A. solani* es la especie menos afectada por la presencia de los extractos fúngicos.

Cabe destacar que los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, derivados de los cultivos empleando como medio de crecimiento CPD en condiciones estáticas y con agitación son los que presentaron los mayores efectos inhibitorios sobre el crecimiento radial de los cuatro fitopatógenos de prueba, constituyendo así, el medio de cultivo idóneo para la obtención de metabolitos secundarios con actividad antifúngica (Cuadro 9).

El efecto antifúngico demostrado por los extractos orgánicos obtenidos a partir de los cultivos en los distintos medios de crecimiento empleados, confirman que el efecto antagónico de *Xylaria* sp., demostrado en los bioensayos de antagonismo directo, es mediado por la producción de metabolitos secundarios bioactivos.



**Cuadro 9.** Efecto antifúngico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de *Xylaria* sp., a una concentración de 250 µg/mL, sobre el crecimiento radial de cuatro fitopatógenos de importancia económica.

Medio de cultivo	% de inhibición del crecimiento radial			
	Hongo fitopatógeno de prueba			
	<i>P. capsici</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>A. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
CPD (est)	38.6 ± 0.06 *	41.8 ± 0.04 *	33.07 ± 0.06 *	21.4 ± 0.04 *
CPD (agit)	49.5 ± 0.025 *	44.5 ± 0.03 *	11.2 ± 0.025 *	26.2 ± 0.07 *
V8 (agit)	28.7 ± 0.06 *	12.3 ± 0.3 *	0.9 ± 0.04	25.1 ± 0.025 *
Sabouraud (agit)	20.6 ± 0.05 *	36.3 ± 0.06 *	16.0 ± 0.03 *	14.1 ± 0.04 *
Caldo papa (agit)	33.7 ± 0.02 *	13 ± 0.04 *	-15.5 ± 0.06 **	23.1 ± 0.06 *
Micelio	% de inhibición del crecimiento radial			
CPD (est)	16.3 ± 0.03 *	67.1 ± 0.04 *	38.1 ± 0.03 *	22.3 ± 0.04 *
CPD (agi)	23 ± 0.03 *	11.0 ± 0.03 *	37.4 ± 0.02 *	28.8 ± 0.03 *
V8 (agit)	34.9 ± 0.03 *	64.0 ± 0.02 *	36.2 ± 0.025 *	21.0 ± 0.04 *
Sabouraud (agit)	17.0 ± 0.02 *	65.5 ± 0.04 *	33.1 ± 0.03 *	21.1 ± 0.04 *
Caldo papa (agit)	0 ± 0	21.5 ± 0.03 *	9.6 ± 0.07	14.6 ± 0.04 *

\*Valores estadísticamente significativos, ANOVA ( $p < 0.05$ ),  $n=4$ . \*\* Los valores negativos indican estimulación del crecimiento.

## 2.2 EFECTO FITOTÓXICO

El potencial fitotóxico de los extractos orgánicos de *Xylaria* sp. se determinó cuantitativamente, evaluando su efecto sobre la germinación y la longitud de la raíz de las especies de semillas (*S. lycopersicum*, *A. hypocondriacus* y *L. multiflorum*).

En el Cuadro 10 se muestran los porcentajes de inhibición de los extractos orgánicos de los cultivos obtenidos bajo condiciones de agitación, sobre el crecimiento de las semillas prueba, a una concentración de 100 µg/mL. Los resultados correspondientes a los extractos derivados del cultivo en medio CPD se muestran para ambas condiciones de incubación (estáticas y agitación).





**Cuadro 10.** Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de *Xylaria* sp., sobre el crecimiento de la raíz de tres especies de semillas, a una concentración de 100 µg/mL.

Medio de cultivo	% de inhibición del crecimiento radial		
	Semilla de prueba		
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>L. multiflorum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
CPD (est)	13.5 ± 0.5 *	-16.8 ± 1.072*	48.7 ± 1.6 *
CPD (agit)	17.3 ± 0.36 *	6.7 ± 0.9	42.0 ± 0.85 *
V8 (agit)	-6.6 ± 0.5	-3.0 ± 1.1	32.5 ± 1.4 *
Sabouraud (agit)	39.0 ± 0.2 *	-12.0 ± 1.07	42.0 ± 0.9 *
Micelio	% de inhibición del crecimiento radial		
CPD (est)	19.4 ± 0.4 *	-1.1 ± 1.0	2.8 ± 1.2
CPD (agi)	22.9 ± 0.3 *	4.4 ± 1.0	14.7 ± 1.2
V8 (agit)	-30.0 ± 0.4 *	9.9 ± 0.97	1.8 ± 1.5
Sabouraud (agit)	38.7 ± 0.3 *	-10.0 ± 0.7	42.1 ± 0.8 *
Caldo papa (agit)	-10.0 ± 0.3	44.8 ± 0.5 *	-22.3 ± 0.*

\* Valores estadísticamente significativos, ANOVA ( $p < 0.05$ ),  $n=4$ . \*\* Los valores negativos indican estimulación del crecimiento.

En general, los extractos del medio de cultivo y micelio inhibieron selectiva y significativamente el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*, siendo esta última semilla la más afectada por los extractos del medio de cultivo (%inhibición  $\approx$  40%). Los extractos provenientes de los medios CPD y Sabouraud, mostraron el mayor efecto fitotóxico.

Con excepción del extracto de micelio proveniente del medio CP, que inhibió un 44.8%, el crecimiento de la raíz de *L. multiflorum*, no se observó un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de la raíz de esta semilla, a la concentración de prueba que fue de 100 µg/mL. Con respecto al proceso de germinación, ninguno de los extractos evaluados inhibió significativamente la germinación de las semillas de prueba.

De acuerdo con la actividad biológica demostrada por los extractos orgánicos obtenidos de la incubación de *Xylaria* sp. en diferentes medios de cultivo, se puede inferir que los metabolitos secundarios producidos por este endófito también pueden estar involucrados en la defensa de su hospedera, ejerciendo su efecto fitotóxico sobre plantas que habitan en su mismo



ecosistema y que son consideradas invasoras (Mogollón *et al.*, 2013; Davis *et al.*, 2003; Arnol *et al.*, 2003).

Cabe destacar que *Xylaria* sp. demostró poseer un mayor potencial antifúngico que fitotóxico, ya que se obtuvieron mayores porcentajes de inhibición sobre el crecimiento radial de los microorganismo fitopatógenos que sobre las semillas de prueba.

### 3. CULTIVO EN MEDIANA ESCALA

Con base en en la actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de *Xylaria* sp., derivados de su crecimiento en cultivos en pequeña escala (1 L) en medio CPD, incubado en condiciones estáticas o agitación, aunados a los rendimientos obtenidos, se estableció el CPD como el medio de cultivo idóneo para la obtención de metabolitos secundarios con actividad biológica (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Condiciones óptimas de crecimiento para *Xylaria* sp.

Condiciones óptimas de crecimiento	
Medio de cultivo	Papa dextrosa
Temperatura de incubación	28°
Condiciones de cultivo y período de incubación	Estáticas 2.5 meses
	Agitación 1.5 meses

A continuación se obtuvieron dos cultivos en mediana escala utilizando las condiciones óptimas de crecimiento establecidas. El primero de ellos, fue un cultivo de 20 L incubado por 2.5 meses en condiciones estáticas y obteniéndolo a través de tres cultivos paralelos; dos de 5 L y uno de 10 L. El segundo cultivo fue de 4.5 L y se obtuvo bajo condiciones de incubación con agitación a 180 rpm, por un periodo de 1.5 meses.

En el Cuadro 12 se muestra el rendimiento obtenido para los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los cultivos en mediana escala. Los rendimientos alcanzados en todos los casos fueron menores a los derivados de los cultivos en pequeña escala (Cuadro 8), lo que indica que el crecimiento de *Xylaria* sp. depende también de las condiciones de cultivo, de la



calidad del inóculo, es decir, del estado metabólico o de la recombinación de genes del fragmento de micelio seleccionado. Por otra parte, este resultado puede deberse a que *Xylaria* sp. sea sensible a las variaciones en el medio de cultivo, ya que al ser preparado con insumo naturales, pudieron presentarse diferencias en la composición final.

**Cuadro 12.** Rendimiento de los extractos del medio de cultivo y del micelio, correspondientes al cultivo de *Xylaria* sp. en mediana escala, empleando condiciones de incubación estáticas y en agitación.

Extractos/ Biomasa	Cultivos en condiciones estáticas, (20 L) g de extracto por cultivo			Rendimiento (mg/L)	g Totales de Extracto
	Cultivo 1 (5L ) (4 meses)	Cultivo 2 (5L) (4 meses)	Cultivo 3 (10L) (4 meses)		
Medio	0.456	0.55	1.5	125	2.5
Micelio	0.4	1.04	0.5	97	1.94
Biomasa	31.3	27.2	60.0	5925	118.5*
Cultivo en agitación (4.5 L) (2 meses) Rendimiento (mg/L)					g Totales de Extracto
Medio	131.5				0.69
Micelio	248.8				1.98
Biomasa	6.8				30.6*

\*Biomasa total

Los extractos obtenidos de las fermentaciones en mediana escala se analizaron por CCF, observándose diferencias en la composición metabólica de los extractos derivados del medio de cultivo en condiciones de agitación y estáticas y los extractos del micelio en ambas condiciones de incubación. Por lo anterior, se decidió trabajar por separado los cuatro extractos, dos extractos pertenecientes al medio de cultivo, uno en condiciones estática y otro en agitación y dos extractos correspondientes al micelio en iguales condiciones.

Posteriormente, se verificó cuantitativamente la actividad biológica de los extractos orgánicos obtenidos en mediana escala, mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos y las tres plantas prueba utilizadas en la evaluación preliminar.



### 3.1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

El efecto antifúngico de los extractos de *Xylaria* sp. se corroboró analizando el crecimiento de los fitopatógenos *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. y *A. solani* y del oomiceto *P. capsici*, en presencia de 250 µg extracto/mL. En el Cuadro 13 se presentan los resultados obtenidos. Con excepción de *Rhizoctonia* sp., en donde se obtuvieron porcentajes de inhibición significativos, pero menores a los demostrados por los extractos derivados de los cultivos en pequeña escala, en general, el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. solani* y *P. capsici* fue inhibido de manera similar al ocasionado por los extractos de los cultivos en pequeña escala, siendo *F. oxysporum* y *P. capsici* los microorganismos más afectados.

La disminución en la actividad antifúngica observada principalmente sobre el crecimiento de *Rhizoctonia* sp., posiblemente se deba a dos componentes: el primero de ellos, es que los cultivos en mediana escala se mantuvieron en incubación por un periodo mayor de tiempo, debido a que *Xylaria* sp. tardó más tiempo en llenar la superficie de los contenedores, y en consecuencia el periodo prolongado de incubación disminuyó la cantidad de metabolitos secundarios activos, debido posiblemente a que se transformaron en otros metabolitos menos activos. Esto indica que un periodo de incubación prolongado de *Xylaria* sp. no es favorable para la obtención de extractos bioactivos. El segundo componente, es el menor rendimiento obtenido para los extractos orgánicos de los cultivos en mediana escala, en comparación con los de del cultivo en pequeña escala, y por ende la posibilidad de una menor cantidad de los metabolitos secundarios bioactivos.

**Cuadro 13.** Efecto antifúngico de los extractos del medio de cultivo y del micelio, a 250 µg/mL, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos.

Medio de Cultivo	% de inhibición del crecimiento radial			
	Hongo fitopatógeno de prueba			
	<i>P. capsici</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>A. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
CPD(est)	40.5 ± 0.06 *	13.7 ± 0.06 *	24.8 ± 0.1 *	22.0 ± 0.7 *
CPD (agit)	46.7 ± 0.07 *	11.5 ± 0.17 *	9.1 ± 0.04	30.5 ± 0.06 *
Micelio	% de inhibición del crecimiento radial			
CPD (est)	27.7 ± 0.06 *	12.0 ± 0.05 *	43.0 ± 0.09 *	24.7 ± 0.25 *
CPD (agit)	22.7 ± 0.06 *	8.7 ± 0.07 *	-5.8 ± 0.05 **	31.5 ± 0.03 *

\* Valores estadísticamente significativos, ANOVA ( $p < 0.05$ ),  $n=4$ . \*\* Los valores negativos indican estimulación del crecimiento.



### 3.2 ACTIVIDAD FITOTÓXICA

Se verificó la actividad fitotóxica de los extractos orgánicos obtenidos del cultivo en mediana escala del endófito *Xylaria* sp., sobre la germinación de *A. hypochondriacus*, *L. multiflorum* y *S. lycopersicum*.

El efecto fitotóxico (Cuadro 14) de los extractos del medio de cultivo presentó una disminución con respecto al provocado por los extractos de los cultivos obtenidos en pequeña escala.

**Cuadro 14.** Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y del micelio, derivados de los cultivos en mediana escala, a 100 µg/mL, sobre el crecimiento de la raíz de tres semillas.

Medio de Cultivo	% de inhibición del crecimiento radial		
	Semilla de prueba		
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>L. multiflorum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
CPD (est)	41.3± 0.2 *	4.3 ± 0.9	-4.5± 1.17
CPD (agit)	20.2 ± 0.4 *	19.5± 0.7	13.3± 1.123
Micelio	% de inhibición del crecimiento radicular		
CPD (est)	-16.6 ± 0.4 **	11.6 ± 0.8	-16.4 ± 1.6**
CPD (agit)	0.44 ± 0.3	6.6 ± 0.6	-25.4 ± 1.06 **

\* Valores estadísticamente significativos, ANOVA ( $p < 0.05$ ),  $n=4$ . \*\* Los valores negativos indican estimulación del crecimiento.

### 4. FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO EN MEDIANA ESCALA

Una vez confirmando el potencial aleloquímico de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los cultivos en mediana escala, se procedió a realizar un estudio químico biodirigido con el objetivo de aislar los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica observada a nivel de extracto orgánico. Para monitorear la actividad antifúngica y fitotóxica, se utilizó el método de dilución en agar (Armendáriz, 2013; Macías-Rubalcava *et al.*, 2010, 2008).

En el Cuadro 15 se resumen las cantidades de extractos orgánicos utilizadas para el fraccionamiento biodirigido, empleado cromatografía en columna abierta, así como las fracciones obtenidas y número de fracciones reunidas de acuerdo a su perfil cromatográfico.



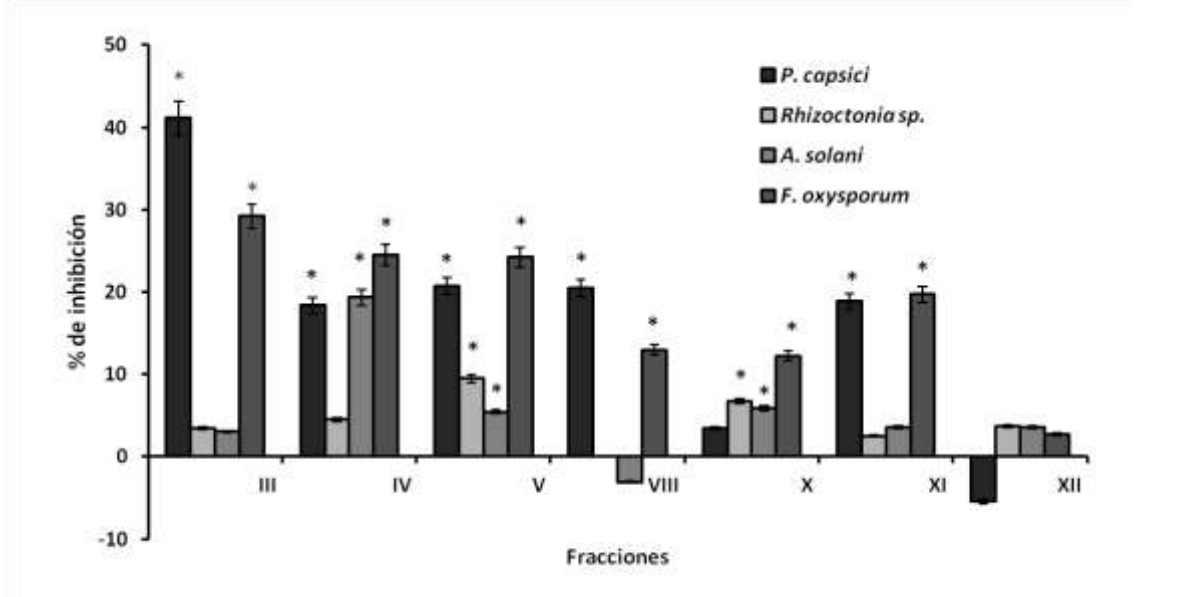
En los Cuadros 3-6 de la sección experimental, se presentan los rendimientos de dichas fracciones.

**Cuadro 15.** Cantidad de los extractos orgánicos utilizados, así como número de fracciones obtenidas en el fraccionamiento biodirigido.

Condiciones de cultivo en CPD y tipo de extracto	Peso del extracto orgánico (g)	Peso del gel sílice (g)	Número de fracciones obtenidas	Número de fracciones reunidas	Clave de las fracciones reunidas
Medio (est)	2.5	150	200	15	I Me-E - XV Me-E
Micelio(est)	2.2	150	151	18	I Mi-E - XVIII Mi-E
Medio (agit)	0.69	40	94	7	I Me-A – VII Me-A
Micelio(agit)	1.98	150	157	12	I Mi-A1 – XII Mi-A

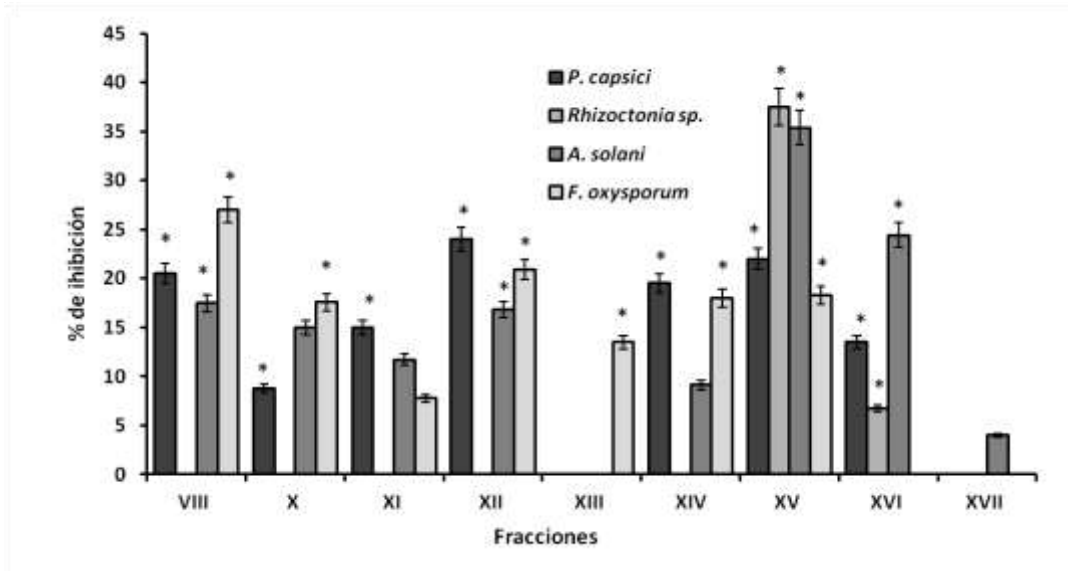
#### 4.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

En la Figura 10 se muestra el perfil de la actividad antifúngica de las fracciones primarias obtenidas del extracto del medio de cultivo en condiciones estáticas, sobre el crecimiento radial de *P.capsici*, *Rhizoctonia* sp., *F. oxysporum* y *A.solani*. El mayor efecto antifúngico se presentó en las fracciones menos polares y de polaridad intermedia. Las fracciones Me-E III a Me-E VIII y Me-E XI inhibieron, en general, selectiva y significativa el crecimiento de *P. capsici* y *F. oxysporum*, siendo esta actividad similar a la demostrada por los extractos de los cultivos en mediana escala donde también se presentó una actividad antifúngica selectiva. Los fitopatógenos *Rhizoctonia* sp. y *A. solani* fueron los menos afectados por las fracciones primarias, sin embargo la fracción Me-E IV inhibió de manera significativa el crecimiento radial de *A. solani*.



**Figura 10.** Actividad antifúngica de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo en CPD de *Xylaria sp.*, incubado en condiciones estáticas, a 250 µg/mL.

En la Figura 11 se muestra la actividad antifúngica demostrada por las fracciones primarias derivadas del extracto del micelio incubado en condiciones estáticas. Con excepción de la fracción Mi-E-XVII, en general, las fracciones inhibieron de manera significativa el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba. La fracción Mi-E XV es la que mostró la mayor inhibición sobre los microorganismos de prueba.

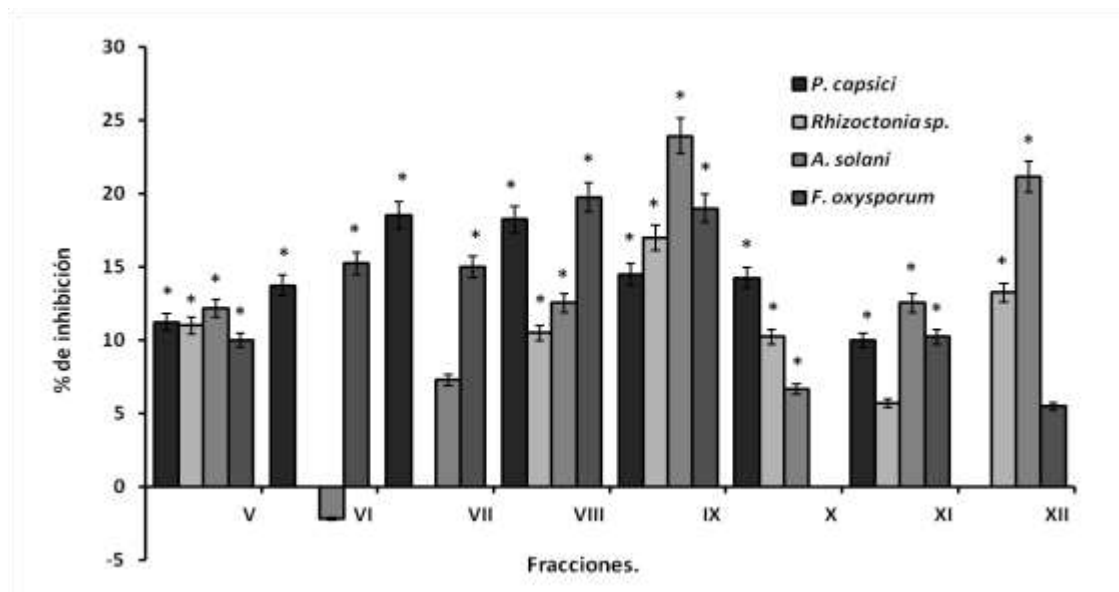


**Figura 11.** Actividad antifúngica de las fracciones primarias del extracto de micelio del cultivo en CPD de *Xylaria sp.*, incubado en condiciones estáticas, a 250 µg/mL.



Por otra parte, en la Figura 12 se observa el efecto antifúngico de las fracciones primarias del extracto del micelio en condiciones de agitación. En general, las fracciones Mi-A V a Mi-A XII inhibieron de manera significativa el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, siendo la fracción Mi-A IX la de mayor actividad. Debido a que las fracciones menos polares (I a IV) no son solubles en un disolvente adecuado para la realización de los bioensayos, como es el metanol, la acetona o el agua, no se pudo determinar el efecto antifúngico.

Cabe mencionar que no fue posible establecer la actividad antifúngica de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo en condiciones de agitación, debido a que su rendimiento fue muy bajo y no fueron suficientes para llevar a cabo el bioensayo.



**Figura 12.** Actividad antifúngica de las fracciones primarias del extracto del micelio del cultivo en CPD de *Xylaria sp.*, incubado en condiciones de agitación, a 250 µg/mL.

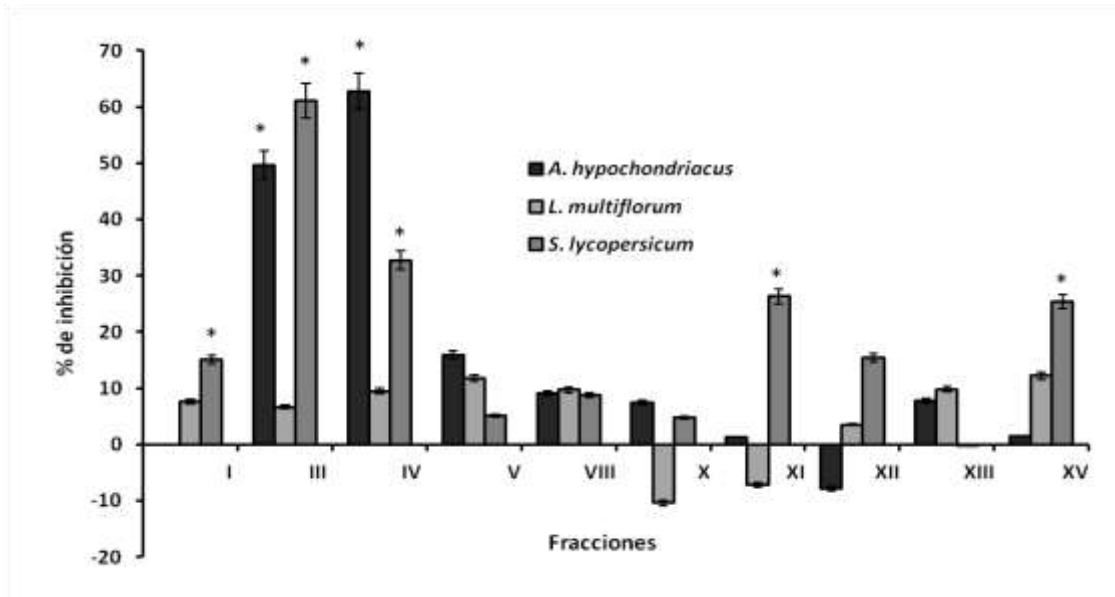
#### 4.2 ACTIVIDAD FITOTÓXICA

En la Figura 13 se presenta el efecto fitotóxico de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo en condiciones estáticas, sobre el crecimiento de las tres plantas prueba. Las fracciones menos polares Me-E III y Me-E IV inhibieron significativamente el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y de *S. lycopersicum*.





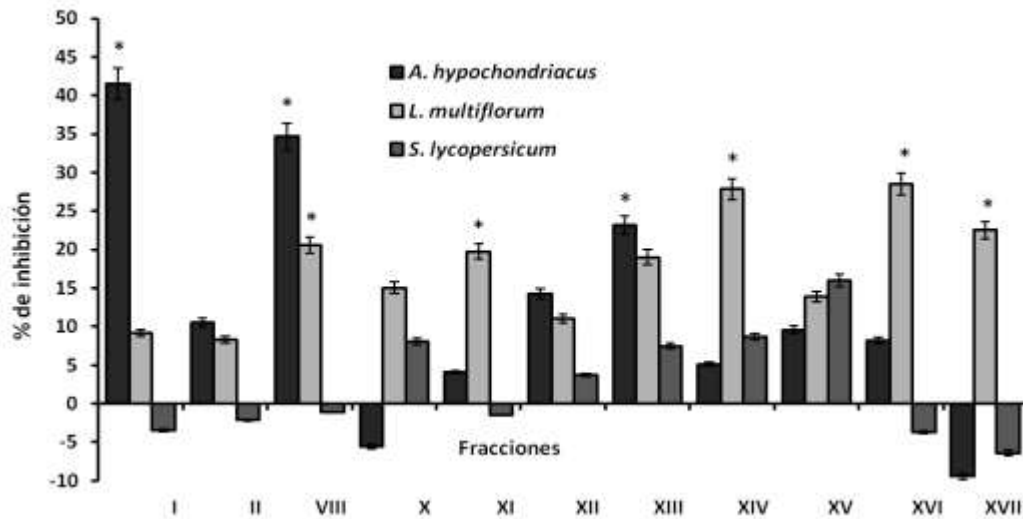
Con excepción de las fracciones Me-E XI y Me-E XV que si inhibieron el crecimiento de *S. lycopersicum*, las fracciones más polares Me-E X a la Me-E XV, en general no presentaron actividad fitotóxica.



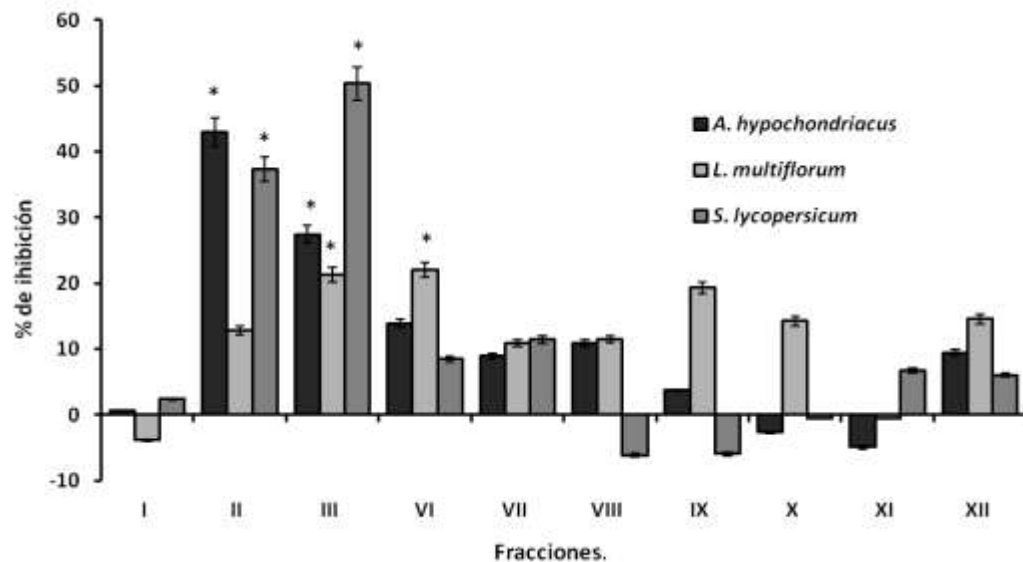
**Figura 13.** Actividad fitotóxica de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo en CPD de *Xylaria* sp., incubado en condiciones estáticas a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En la Figura 14 se observa el efecto fitotóxico de las fracciones primarias del extracto del micelio en condiciones estáticas. *A. hypochondriacus* fue inhibida significativamente por las fracciones Mi-E I y Mi-E VIII, mientras que *L. multiflorum* fue inhibida por las fracciones más polares Mi-E VIII a Mi-E XVII. Debido al poco rendimiento obtenido de las fracciones Mi-E III a Mi-E VII no se realizaron los bioensayos para determinar su potencial fitotóxico.

En la Figura 15 se muestra el potencial fitotóxico de las fracciones primarias del extracto del micelio en condiciones de agitación, observándose que las fracciones de menor polaridad, Mi-A II y Mi-A III, inhibieron significativamente el crecimiento de *A. hypochondriacus* y de *S. lycopersicum*. Las fracciones Mi-A VII y Mi-A XII, a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no resultaron fitotóxicas para ninguna de las plantas de prueba.



**Figura 14.** Actividad fitotóxica de las fracciones primarias del extracto del micelio del cultivo en CPD de *Xylaria sp.*, incubado en condiciones estáticas, a 100  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 15.** Actividad fitotóxica de las fracciones primarias del extracto del micelio del cultivo en CPD de *Xylaria sp.*, incubado en condiciones de agitación, a 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Los resultados de estas evaluaciones confirman que los metabolitos secundarios producidos por el hongo endófito *Xylaria sp.*, posee mayor potencial como agente fungitóxico que fitotóxico.



De nueva cuenta, no fue posible establecer la actividad fitotóxica de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo en condiciones de agitación, debido a su bajo rendimiento.

## 5 CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES ACTIVAS

### 5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA PUNCTAPORONINA B (35)

A continuación, se muestra la caracterización de la punctaporonina B (**35**) aislada previamente en nuestro grupo de trabajo por Huelgas-Marroquín (2011).

El compuesto **35**, se aisló como un sólido cristalino incoloro, soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y con un p.f. de 187-188 °C. La fórmula molecular de este compuesto se determinó por espectrometría de masas de alta resolución. El espectro de masas presenta un ión molecular en una relación de masa carga ( $m/z$ ) de 234 ( $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ ) [Figura 21] y permite establecer una fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3$ , con un índice de insaturación de cuatro (Cuadro 16).

El espectro en el infrarrojo (IR) [Figura 20] presenta bandas de absorción asociadas con grupos hidroxilo ( $\nu_{\text{max.}} 3397 \text{ cm}^{-1}$ ), grupos metilo ( $\nu_{\text{max.}} 2962 \text{ cm}^{-1}$ ) y con la presencia de dobles enlaces ( $\nu_{\text{max.}} 3060 \text{ cm}^{-1}$ ) (Cuadro 16).

Los espectros de resonancia magnética unidimensionales ( $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  y  $\text{RMN}^{-13}\text{C}$ ) y bidimensionales (HSQC, HMBC, COSY y NOESY) permitieron establecer que el producto natural contienen un núcleo cariofileno (Anderson *et al.*, 1984b; Edwards, *et al.*, 1989; Deyrup, *et al.*, 2006). A continuación se discute en detalle las características principales de los espectros:

El espectro de  $\text{RMN}^{-13}\text{C}$  [Figura 22 y 23] presenta señales para 15 átomos de carbono en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas. El análisis del espectro en su modalidad DEPT permitió establecer que cuatro señales corresponden a metinos en  $\delta_{\text{C}}$  42.0 (C-9), 123.2 (C-6), 125.4 (C-7) y 142.5 (C-5) ppm, cuatro a metilenos en  $\delta_{\text{C}}$



28.9, 33.2, 34.1 y 64.2 ppm, tres a grupos metilos en  $\delta_C$  22.3, 24.0 y 31.4 ppm y cuatro a carbonos cuaternarios en  $\delta_C$  40.4, 73.7, 80.1 y 139.7 ppm (Cuadro 17).

El espectro de RMN- $^1H$  (Cuadro 17; Figura 24) de la punctaporonina B (**35**) muestra señales para tres grupos hidroxilo en  $\delta_H$  3.53 (OH-1, s),  $\delta_H$  5.10 (OH-4, s) y  $\delta_H$  5.5 (OH-14; *dd*,  $J_1=3.6$  Hz,  $J_2=5.10$  Hz, H-1). En la región de los protones vinílicos se encuentra un grupo de señales correspondientes a tres protones que conforman un sistema ABC en  $\delta_H \sim 5.67$  (H-6, *dt*,  $J_1=13.2$  Hz,  $J_2=2.7$  Hz, H-1); en  $\delta_H$  5.80 (H-7, *dt*,  $J_1=13.2$  Hz,  $J_2=1.7$  Hz, H-1) y en  $\delta_H$  5.80 *m* (H-1) y que correlacionan con los carbonos de los metinos C-5 ( $\delta_C$  142.5), C-6 ( $\delta_C$  123.2) y C-7 ( $\delta_C$  125.4), en el espectro de correlación heteronuclear HSQC, respectivamente. A campo alto, el espectro presenta tres señales múltiples centradas en  $\delta_H$  1.57 (2 H), 1.84 (1 H) y 2.40 (1 H), asignables a los metilenos de carácter alifático CH<sub>2</sub>-2 y CH<sub>2</sub>-3 del núcleo base de la molécula, presentando cada uno de ellos una correlación en el espectro HSQC con los carbonos en  $\delta_C$  34.1 y 28.9, respectivamente. También se observa una señal múltiple y una señal doble de doble, la primera en  $\delta_H$  1.5 (*m*, H-1) y la segunda en 2.16 (*dd*,  $J_1=12$  Hz,  $J_2=9.9$  Hz, H-1), que integran cada una para un hidrógeno, asignables al metileno CH<sub>2</sub>-10, el cual correlaciona con la señal en  $\delta_C$  33.6 en el espectro HSQC; el segundo grupo de señales se aprecia en  $\delta_H$  3.88 (*dd*,  $J_1=11.4$  Hz,  $J_2=5.1$  Hz, H-1) y en  $\delta_H$  4.10 (*dt*,  $J_1=11.1$  Hz,  $J_2=2.4$  Hz, H-1) asignables al metileno CH<sub>2</sub>-12 del núcleo base y que se encuentra geminal a uno de los grupos hidroxilo evidenciado anteriormente ( $\delta_H$  5.50) y que muestra una correlación con la señal en  $\delta_C$  64.2 en el espectro HSQC. Por último, en esta zona del espectro se observa un señal en  $\delta_H$  3.45 (*dd*,  $J_1=12$  Hz,  $J_2=8.1$  Hz, H-1) que integra para un hidrógeno, asignable al metino CH-9, el cual correlaciona con la señal en  $\delta_C$  42.0 en el espectro HSQC (Cuadro 17). En  $\delta_H$  1.00 (CH<sub>3</sub>-11), 1.11 (CH<sub>3</sub>-11) y 1.20 (CH<sub>3</sub>-4) se observan tres señales simples atribuibles a tres grupos metilo cada uno de ellos presenta una correlación con los carbonos en  $\delta_C$  22.3, 24.0 y 31.4 en el espectro HSQC, respectivamente (Cuadro 17).

Finalmente, los carbonos restantes observados en el espectro de RMN- $^{13}C$  se asignaron a cuatro carbonos cuaternarios en  $\delta_C$  73.7 (C-1), 80.1 (C-4), 139.7 (C-8) y 40.4 (C-11). De acuerdo

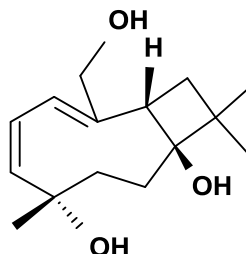
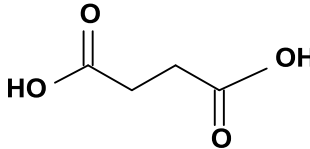
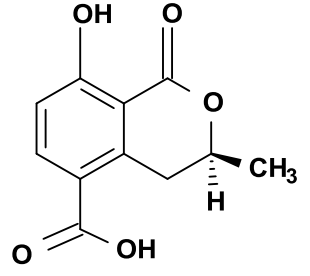


con los desplazamientos químicos observados, dos de estos carbonos se encuentran unidos a funciones oxigenadas (C-1, C-4) (Cuadro 17).

Con base en el análisis espectroscópico anterior, la estructura del producto natural (**35**) se estableció como la de la punctaporonina B (Cuadro 16). Cabe señalar que todos los datos espectroscópicos del producto natural **35** se encuentran en armonía con los descritos previamente en la literatura (Huelgas-Marroquín, 2011, Edward *et al.*, 1989 Anderson *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1984).

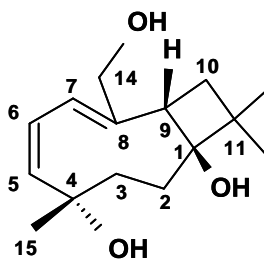
La estructura de punctaporonina B (**35**) se confirmó de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X [Figura 16].

**Cuadro 16** Constantes espectroscópicas de IR y espectrométricas de la punctaporonina B (**35**), del ácido succínico (**36**).Y de la 5- carboximeleina (**37**)

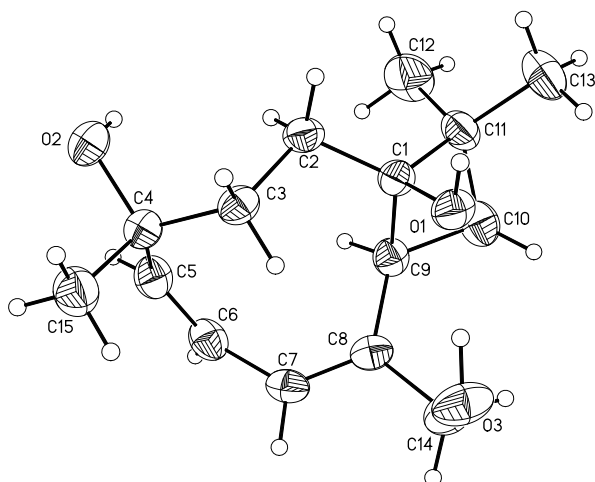
Metabolito Secundario	IR $\nu_{\max}$ . (KBr) $\text{cm}^{-1}$	EM-IE m/z (intensidad relativa)	UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ $\text{nm cm}^{-1}$
 ( <b>35</b> )	3397, 3060, 2962,	43 (100), 131 (65), 91 (63), 117 (40), 146 (39), 79 (39), 41 (37), 77 (34), 185 (28), 28 (25), 173 (14), 160 (12), 230 (12), 18 (9), 201 (9), 216 (8), 234 (1)	---
 ( <b>36</b> )	2927, 2629, 1719, 1417	---	---
 ( <b>37</b> )	3179, 2923, 1694, 1657.	222 (100), 189 (42), 150 (29), 207 (19); 28(12), 179 (11), 175 (10), 77(8), 121 (8), 133 (7), 51 (7), 43(6), 103 (6), 4 (6)	225, 278, 313



**Cuadro 17** Datos espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$ ) y de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$ ) de la punctaporonina B (**35**).



Posición	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	Multiplicidad (DEPT)	$^1\text{H}$ ( $\delta$ mult., $J$ en Hz)
1	73.7	C	-----
2a	34.1	$\text{CH}_2$	2.40 ( <i>m</i> , 1H)
2b			1.57 ( <i>m</i> , 1H)
3a	28.9	$\text{CH}_2$	1.84 ( <i>m</i> , 1H)
3b			1.57 ( <i>m</i> , 1H)
4	80.1	C	-----
5	142.5	CH	5.80 ( <i>m</i> , 1H)
6	123.2	CH	5.67 ( <i>dt</i> , $J_1=13.2$ , $J_2=2.7$ , 1H)
7	125.4	CH	5.80 ( <i>dt</i> , $J_1=13.2$ , $J_2=1.7$ , 1H)
8	139.7	C	-----
9	42.0	CH	3.45 ( <i>dd</i> , $J_1=12$ , $J_2=8.1$ , 1H)
10a	33.2	$\text{CH}_2$	2.16 ( <i>dd</i> , $J_1=12$ , $J_2=9.9$ , 1H)
10b			1.5 ( <i>m</i> , 1H)
11	40.4	C	-----
12a	64.2	$\text{CH}_2$	3.88 ( <i>dd</i> , $J_1=11.4$ , $J_2=5.1$ , 1H)
12b			4.10 ( <i>dt</i> , $J_1=11.1$ , $J_2=2.4$ , 1H)
$\text{CH}_3$ -4	31.4	$\text{CH}_3$	1.20 ( <i>s</i> , 3H)
$\text{CH}_3$ -11	24.0	$\text{CH}_3$	1.11 ( <i>s</i> , 3H)
$\text{CH}_3$ -11	22.3	$\text{CH}_3$	1.00 ( <i>s</i> , 3H)
OH-1	-----	---	3.53 ( <i>s</i> )
OH-4	-----	---	5.1 ( <i>s</i> )
OH-14	-----	---	5.50 ( <i>dd</i> , $J_1=3.6$ , $J_2=5.10$ , 1-H)



**Figura 16.** Proyección ORTEP al 40% de probabilidad de la punctaporonina B (**35**).

La punctaporonina B (**35**) se aisló en trabajos previos en tres hongos, un coprófilo la *Poronia punctata* (Anderson *et al.*, 1984a; Anderson *et al.*, 1984b) y dos saprófitos el *Hipoxylon terrícola* (Edward *et al.*, 1989) y la *Pestalotiopsis disseminata* (Deyrup *et al.*, 2006). Este sesquiterpeno posee actividad antimicrobiana, sin embargo, no se describen los microorganismos blanco (Edward *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1984a).

## 5.2 CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO SUCCÍNICO (**36**)

El ácido succínico (**36**), se aisló como un sólido cristalino incoloro soluble en MeOH y con un p.f. de 182-184 °C. Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas de alta resolución. Su espectro de masas muestra un ión molecular en una relación masa carga ( $m/z$ ) de 118 que permite establecer una fórmula molecular de  $C_4H_6O_4$ . El espectro en el IR presenta bandas de absorción asociadas con grupos hidroxilo ( $\nu_{max}$ . 2927  $cm^{-1}$ ) y con la presencia de carbonilos de ácido ( $\nu_{max}$ . 1719  $cm^{-1}$ ) [Cuadro 16; Figura 25].

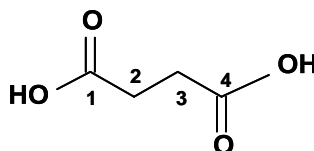
El espectro de RMN- $^{13}C$ , presenta dos señales equivalentes, una en  $\delta_c$  30.3 y que corresponde a los metilenos en C-2 y C-3 y la segunda a campo bajo en  $\delta_c$  176.7 y que pertenece a los



carbonilos de ácido en C-1 y C-4. Por otra parte, el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **36** muestra una señal simple en  $\delta_H$  2.60 que integra para 4 hidrógenos y que corresponde a los metilenos CH<sub>2</sub>-2 y CH<sub>2</sub>-3. Finalmente, las señales correspondientes a los dos hidroxilos quelatados no se observan bajo las condiciones experimentales empleadas. Con base en el análisis espectroscópico anterior, la estructura del producto natural se estableció como la del ácido succínico (**36**) (Cuadro 18). Cabe señalar que todos los datos espectroscópicos del producto natural (**36**) se encuentran en armonía con los descritos previamente en la literatura (Keller, 1986; Schader Bernhard, 1989). Cabe mencionar que el compuesto (**36**) se comparó con una muestra auténtica.

Wang y colaboradores (1979) reportan al ácido succínico como un compuesto aislado del helecho *Pteridium aquilinum*, la planta hospedera en estudios de la cual se aisló el hongo endófito *Xylaria* sp., además de otros metabolitos secundarios como la astragalina, isoquercetina y la tilirosida.

**Cuadro 18.** Datos espectroscópicos de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) y de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD), del ácido succínico (**36**).



Posición	<sup>13</sup> C (δ) 125 MHz	Multiplicidad (DEPT)	<sup>1</sup> H (δ, multiplicidad) 500 MHz
<b>1</b>	176.7	C	----
<b>2</b>	30.3	CH <sub>2</sub>	2.60 (4H, s, H-2, 3).
<b>3</b>	30.3	CH <sub>2</sub>	2.60 (4H, s, H-2, 3).
<b>4</b>	176.7	C	----
<b>1, 4-OH*</b>	----	----	-----

\*No observado en las condiciones experimentales

Cabe destacar que tanto el ácido succínico (**36**) como la 5-carboximeleina (**37**) que fueron aislados juntos por primera vez a partir del hongo endófito *Xylaria* sp YC-10, ambos compuestos muestran actividad insecticida contra *Plutella xylostella* (Wu *et al.*, 2011).





También se reporta que el ácido succínico disminuye la germinación de las conidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Wu et al., 2011), este resultado puede ser el mecanismo de acción del efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento radial del fitopatógeno *F. oxysporum* observado en el presente trabajo [Figura 9].

### 5.3 CARACTERIZACIÓN DE LA 5-CARBOXIMELEINA (37)

La 5-carboximeleina (**37**), se aisló como un sólido cristalino incoloro soluble en MeOH y con un p.f. de 184-188 °C. Su fórmula molecular se determinó por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de masas se observa el ión molecular en una relación masa carga ( $m/z$ ) de 222 [Figura 26] que permite establecer una fórmula molecular de  $C_{11}H_{10}O_5$ , la cual admite un índice de insaturación de 3 (Cuadro 16).

El espectro del IR [Figura 27] presenta bandas de absorción asociadas con la presencia de grupos carbonilos ( $\nu_{\max}$ . 1694, 1657  $cm^{-1}$ ), con grupos hidroxilo ( $\nu_{\max}$ . 3179  $cm^{-1}$ ) y grupos metilo ( $\nu_{\max}$ . 2923  $cm^{-1}$ ) (Cuadro 16).

Los espectros de resonancia magnética unidimensionales (RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$ ) y bidimensionales (HSQC, HMBC, COSY y NOESY) permitieron establecer que el compuesto **37** contiene un núcleo dihidroisocumarina. A continuación se discute en detalle las características principales de los espectros:

El espectro de RMN- $^{13}C$  [Figura 29] presenta señales para 11 átomos de carbono en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas. El análisis del espectro DEPT permitió confirmar que dos señales corresponden a metinos aromáticos en  $\delta_C$  116.7 (CH-7) y 139.9 (CH-6) ppm, una a metino alifático en  $\delta_C$  75.1 ppm (CH-3), una a metileno alifático en  $\delta_C$  33.8 (CH<sub>2</sub>-4), una a grupo metilo en  $\delta_C$  20.1 (CH<sub>3</sub>-3) y seis a carbonos cuaternarios ( $\delta_C$  110.1, 120.1, 145.0, 166.4, 169.0 y 171.5 ppm), (Cuadro 19).

En la región de los protones aromáticos el espectro de RMN- $^1H$  de la 5-carboximeleina (**37**) (Cuadro 19, Figura 28) muestra dos protones *orto* acoplados en  $\delta_H$  6.92 (*d*, H-7,  $J_1=9.0$  Hz) y



8.14 (*d*, H-6,  $J_1=9.0$  Hz) y que correlacionan con los carbonos de los metinos C-7 ( $\delta_c$  116.7) y C-6 ( $\delta_c$  139.9), respectivamente, en el espectro de correlación heteronuclear HSQC.

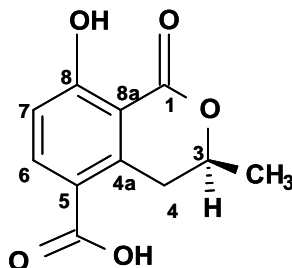
A campo alto, el espectro presenta una señal doble en  $\delta_H$  1.53 ( $J_1=6.5$  Hz) asignable a un metilo en CH<sub>3</sub>-3 del núcleo base de la molécula y que muestra una correlación en el espectro HSQC con el carbono en  $\delta_c$  20.1. También se observa dos señales dobles de dobles que integran cada una para un hidrógeno en  $\delta_H$  3.92 ( $J_1=3.3$ ,  $J_2=18.0$  Hz) y  $\delta_H$  3.03 ( $J_1=11.5$ ,  $J_2=18.0$  Hz), asignables al metileno CH<sub>2</sub>-4, el cual correlaciona con la señal en  $\delta_c$  33.8 en el espectro HSQC. Por último, en esta zona del espectro se observa un señal múltiple en  $\delta_H$  4.69 que integra para un hidrógeno, asignable al metino CH-3, el cual correlaciona con la señal en  $\delta_c$  75.1 en el espectro HSQC y que se encuentra geminal al metileno evidenciado anteriormente ( $\delta_c$  33.8). Finalmente, el espectro de RMN-<sup>1</sup>H muestra una señal a campo bajo en  $\delta_H$  11.5 atribuible a un grupo hidroxilo en (OH-8, *s*), (Cuadro 19).

Los carbonos restantes observados en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se asignaron a seis carbonos cuaternarios en  $\delta_c$  110.1, (C-8a), 120.1 (C-5), 145.0 (C-4a), 166.4 (C-8), 169.0 (5-COOH) y 171.5 (C-1). De acuerdo con los desplazamientos químicos observados, dos de estos carbonos se encuentran unidos a funciones oxigenadas (C-1, 5-COOH), (Cuadro 19).

Con base en el análisis espectroscópico anterior, la estructura del producto natural **37** se estableció como la de la 5-carboximeleina (**37**) o (-)-(3*R*)-5-carboxi-3,4-dihidro-8-hidroxy-3-metil isocumarina (Cuadro 16). Cabe señalar que todos los datos espectroscópicos del producto natural **37** se encuentran en armonía con los descritos previamente en la literatura (Rukachaisirikul *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2011; Opong *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003; Chinworrungsee *et al.*, 2001; Okuno *et al.*, 1986; Claydon *et al.*, 1985; Anderson *et al.*, 1983; De Alvarenga *et al.*, 1978.)

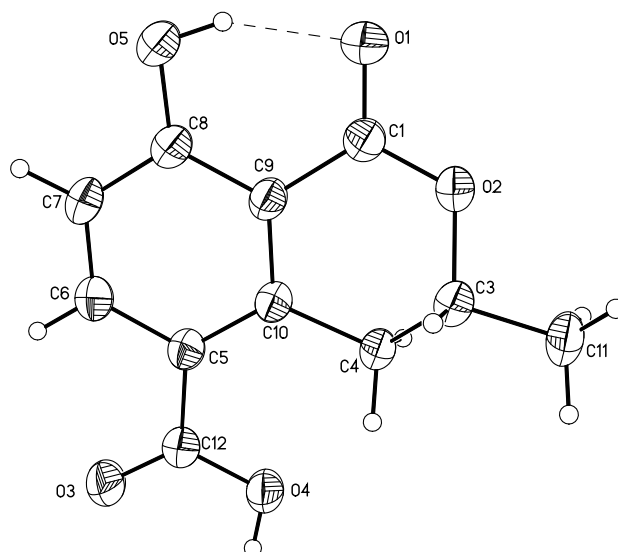


**Cuadro 19.** Datos espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, CD $_3$ OD) y de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, CD $_3$ OD) de la 5-carboximeleina (**37**).



Posición	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ) 125 MHz	Multiplicidad (DEPT)	$^1\text{H}$ ( $\delta$ , mult. $J$ en Hz) 500 MHz
1	171.5	C	----
2	----	----	----
3	75.1	CH	4.69 m
4 $\alpha$	33.8	CH $_2$	3.92 dd ( $J_1=3.3$ , $J_2= 18.0$ Hz)
4 $\beta$		CH $_2$	3.03 dd ( $J_1=11.5$ , $J_2= 18.0$ Hz)
4a	145.0	C	----
5	120.1	C	----
6	139.9	CH	8.14 d ( $J_1=9.0$ Hz)
7	116.7	CH	6.92 d ( $J_1=9.0$ Hz)
8	166.4	C	----
8a	110.1	C	----
3-CH $_3$	20.1	CH $_3$	1.53 d ( $J_1=6.5$ Hz)
5-COOH	169.0	C	----
8-OH	----	----	11.5 s

La estructura del compuesto (**37**) se confirmó de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X. En la Figura 17 se muestra una vista estereoscópica de la 5-carboximeleina (**37**).



**Figura 17.** Proyección ORTEP de la 5-carboximeleina aislada de *Xylaria* sp, al 40% de probabilidad.

Las dihidroisocumarinas están ampliamente distribuidas dentro de la familia Xylariaceae (Whalley *et al.*, 1995) y poseen diversas actividades biológicas principalmente como antifúngicos, antimicrobianos, antimaláricos, antialérgicos, antileucémicos, citotóxicos, gastoprotectores y también como fitotóxicos, insecticidas y reguladores del crecimiento en plantas (Oliveira *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2010). La 5-carboximeleina ha sido aislada de varios hongos de la familia Xylariaceae como son los de los géneros *Rosellina* spp. (Oppong *et al.*, 2009), *Halorosellinia* spp. (Chinworrungsee *et al.*, 2001), *Hypoxylon* spp. y *Nummuraria* spp. (Anderson *et al.*, 1983). También se ha aislado de especies del género *Xylaria* como *Xylaria* sp. BCC 9635 (Pongcharoen *et al.*, 2007), *Xylaria* sp. PSU G12 (Rukachaisirikul *et al.*, 2013) *Xylaria* sp.YC-10 (Wu *et al.*, 2011) y, *Xylaria* sp. PSU-F100 (Rukachaisirikul *et al.*, 2009).

Específicamente, la 5-carboximeleina (**37**) presenta actividad insecticida contra *Plutella xylostella* (Wu *et al.*, 2011), actividad antimalárica contra *Plasmodium falsiparum* (Pongcharoen *et al.*, 2007) actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Rukachaisirikul *et al.*, 2009) y es fitotóxica sobre brotes de manzana (Okuno *et al.*, 1986).

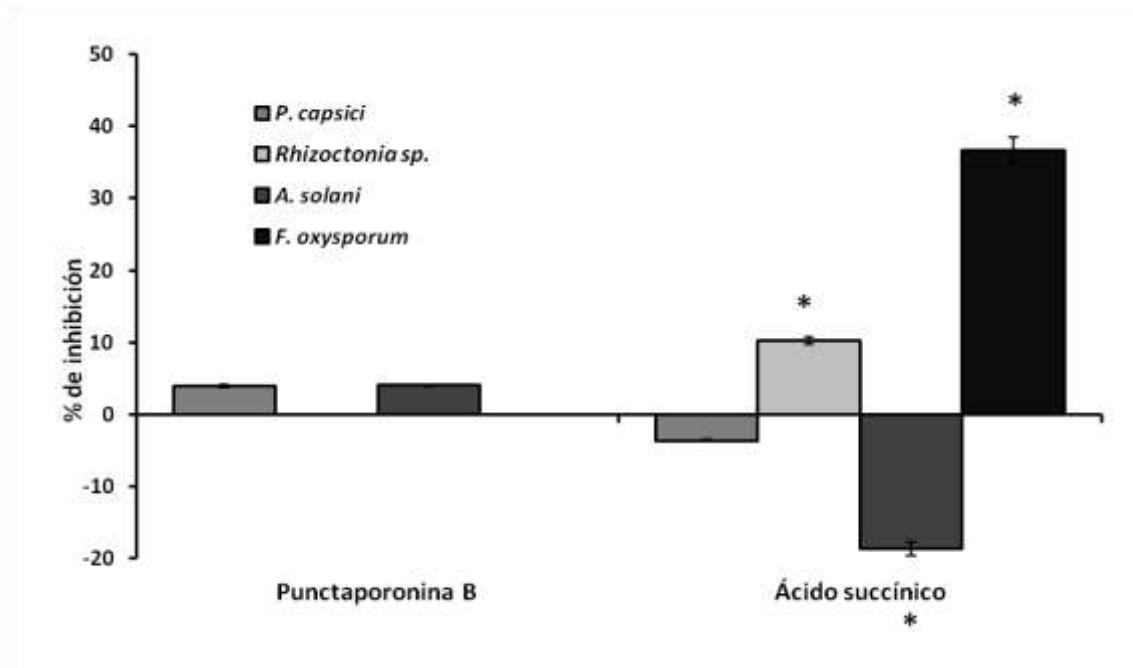


## 6. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE *Xylaria* sp.

A continuación se procedió a cuantificar la actividad biológica de los metabolitos secundarios puros de *Xylaria* sp., mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos y de plantas prueba. Así como su toxicidad sobre seis líneas celulares.

### 6.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

En la Figura 18 se muestra el efecto de la punctaporonina B (**35**) sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica. Con excepción del ácido succínico (**36**) que inhibe de manera significativa el crecimiento radial de *F. oxysporum* en un 37%, ninguno de los dos compuestos evaluados inhibe significativamente el crecimiento de los microorganismos de prueba a la concentración de 250 µg/mL. También se observa que el crecimiento de la raíz de *A. solani* es estimulado significativamente en un 18 % por la presencia del ácido succínico (**36**).



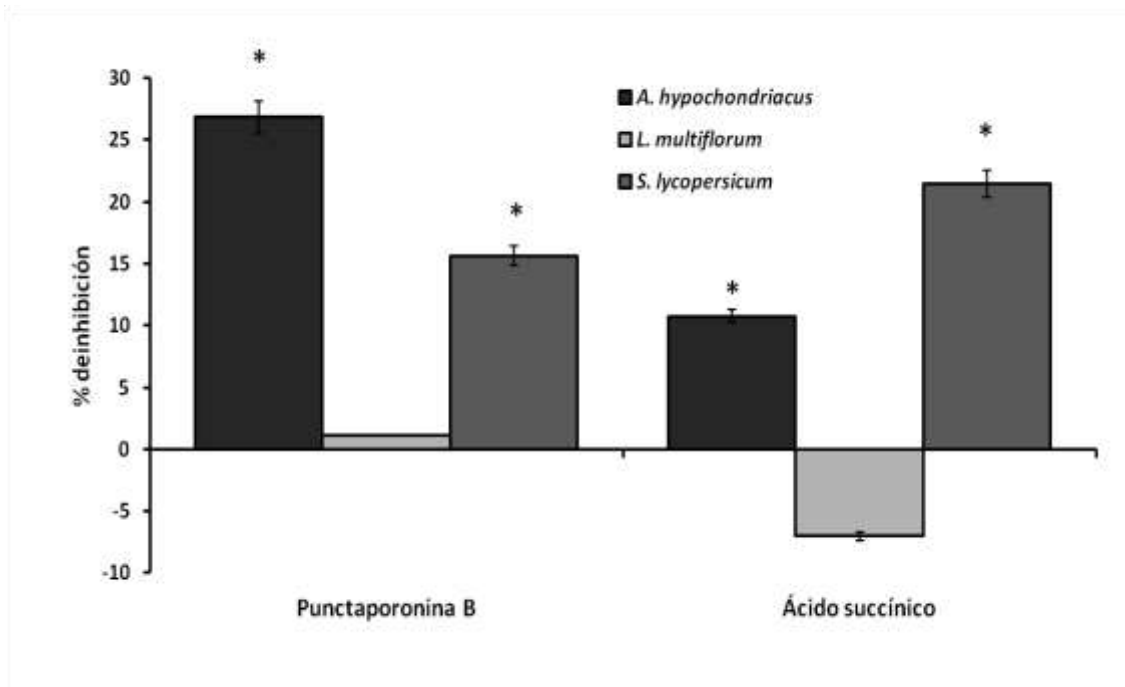
**Figura 18.** Actividad antifúngica (250 µg/mL) de los metabolitos secundarios aislados de *Xylaria* sp.



## 6.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FITOTÓXICA

La determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de la punctaporonina B (**35**) se llevó a cabo sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus*, *L. multiflorum* y *S. lycopersicum*, empleando el método de dilución en agar.

En La Figura 19 se muestra la actividad fitotóxica de los compuestos puros aislados de *Xylaria* sp., observándose que los dos metabolitos inhiben selectivamente el crecimiento de las raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*, ya que inhiben moderada y significativamente su crecimiento a la concentración de prueba que fue de 100 µg/mL.



**Figura 19.** Actividad fitotóxica de los metabolitos secundarios aislados de *Xylaria* sp., a 100 µg/mL.

## 6.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Con el objetivo de explorar el potencial anticancerígeno de los metabolitos secundarios puros producidos por el endófito *Xylaria* sp., se determinó la actividad citotóxica sobre seis líneas celulares cancerosas humanas.



En el Cuadro 16 se muestran los resultados de la actividad citotóxica de la punctaporonina B (35) y de la 5-carboximeleina (37), sobre las líneas celulares tumorales, de glía del sistema nervioso central (U25), de próstata (PC-3), de leucemia (k562), de colon (HCT-15), de mama (MCF-7) y de pulmón (SKLU), evaluando su efecto a una concentración de 50 µg/mL. Los dos compuestos evaluados no demostraron actividad citotóxica significativa sobre el crecimiento de ninguna de las líneas celulares evaluadas ni sobre la viabilidad de macrófagos a la concentración de prueba, indicando claramente que no son tóxicos.

**Cuadro 20.** Resultados del ensayo de evaluación de la actividad citotóxica de los metabolitos secundarios de *Xylaria* sp., sobre seis líneas celulares cancerosas humanas.

Metabolito Secundario	Línea celular	% de inhibición del crecimiento por la línea celular a 50µg/mL					% viabilidad macrófagos a 100 µg/mL
		U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	
<b>Punctaporonina B (35)</b>	SA	9.08	9.29	6.39	1.06	1.37	100
<b>5-Carboximeleina (37)</b>	SA	5.91	9.07	13.42	5.48	8.34	100

U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama, SKLU= pulmón. SA= sin actividad



---

## VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mediante los bioensayos de antagonismo directo realizados entre el hongo endófito *Xylaria* sp. aislado de *Pteridiun aquilinum* y sus competidores de prueba, demostró que *Xylaria* sp. posee un importante potencial antifúngico sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos *F. oxysporum* y *A. solani* y el endófito *Phomopsis* sp. (aislado de *C. acuminata*). Ninguno de los competidores inhibió significativamente el crecimiento de *Xylaria* sp., confirmando que este endófito presenta importante potencial antifúngico.

Las interacciones antagónicas demostradas por *Xylaria* sp. sugieren que la actividad antifúngica que presenta, posiblemente forma parte de los diversos mecanismos de defensa de su hospedera, ya sea por medio de mecanismos físicos (formación de barreras miceliales, cordones hifales, etc.) o químicos (producción de metabolitos secundarios difusibles en los medios de cultivos y volátiles) y que al mismo tiempo representan las posibles interacciones entre hongos endófitos.

Los microorganismos fitopatógenos *Rhizoctonia* sp. y *P. capsici*, presentaron una interacción más competitiva hacia *Xylaria* sp.

La determinación de las condiciones óptimas de crecimiento del hongo endófito *Xylaria* sp. permitió establecer que el endófito crece adecuadamente en medio caldo papa dextrosa, en condiciones de incubación estáticas y con agitación orbital a 180 rpm, por un periodo de 1.5 y 2.5 meses, respectivamente, empleando un fotoperiodo de luz artificial-obscuridad 12:12 h y una temperatura de 28 °C.

En general, los extractos fúngicos derivados de los cultivos a pequeña y mediana escala muestran un mayor potencial antifúngico que fitotóxico, confirmando que los metabolitos producidos por *Xylaria* sp. son los responsables del potencial antagónico demostrado por *Xylaria* sp. en los bioensayos de antagonismo.





---

El estudio químico biodirigido del extracto del medio de cultivo del hongo endófito *Xylaria* sp. permitió el aislamiento de tres compuestos, el sesquiterpeno puntaporonina B, la dihidroisocumarina 5- carboximeleina y el ácido succínico.

La puntaporonina B no muestra potencial antifúngico significativo sobre el crecimiento radial de los fitopatógenos *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. y *A. solani* y del oomiceto *P. capsici*, a la concentración de prueba de 250 µg/mL.

La puntaporonina B inhibe moderadamente el crecimiento de *A. hypochondriacus* y de *S. lycopersicum*.

El ácido succínico inhibe el crecimiento radial de *F. oxysporum* en un 37%.

El ácido succínico inhibe moderada y significativamente el crecimiento de la raíz de las semillas *A. hypochonriacus* y de *S. lycopersicum*.

El presente proyecto de investigación aporta al conocimientos sobre las posibles interacciones que se establecen entre la planta hospedera y los microorganismos endófitos, entre endófitos y entre endófitos-fitopaógenos, demostrando la presencia de una gran diversidad metabolitos secundarios bioactivos producidos por los hongos endófitos, y en particular por *Xylaria* sp.



---

## VII. BIBLIOGRAFÍA.

Abate, D; Wolf-Rainer, A. and Meyer, H. **1997**. Cytochlaasins and phytotoxins from he fungus *Xylaria obovata*. *Phytochemistry*. Vol. 44, pp. 1443-1448.

Abello, Javier-Francisco y Segenet Kelemu. **2006**. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. Vol. 7, No. 2, pp. 55-57

Allen, E; Mejía, L; Kylló, D; Rojas, E; Maynard, Z; Butler, A. and Van Bael, S. **2007**. Ecological implications of anti-pathogen effects of Tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*. Vol. 88, Issue 3, pp. 550-558.

Alvarenga, M; Braz, R; Gottlieb, O; Dias, J; Magalhaes, A; Magalhaes, G; Magalhaes, M; Maia, J; Marques, R; Marsajoli, A; Mesquita, A; Moraes, A; Oliveira, A; Oliveira, G; Pedreira, G; Pereira, S; Pinho, S; Sant'Ana, A and Santos, C. **1978**. Dihydroisocumarins and pthalide from Wood samples infested by fungi. *Phytochemistry*, Vol. 17, pp. 511-516.

Anderson, John R. and Edwards, Raymond. **1983**. Metabolites of the higher fungi. Part 21. 3-Methyl-3,4-dihydroisocumarins and related compounds from the ascomycete family Xylareaceae. *Journal Chemistry Social Perkin Transactions*. I. pp. 2185-2192.

Anderson, J.R.; Edwards, R. L.; Freer, A.A.; Mabelis, R.P.; Poyser, J.P.; Spencer, H., and Whalley, A.J.S. **1984**. Punctatins B and C (antibiotics M95154 and M95155): Further sesquiterpene alcohols from the fungus *Poronia punctata*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, pp. 917- 919

Anderson, John R.; Edwards, R.L.; Poyser, J.P., and Whalley, A.J. **1988**. Metabolites of the higher fungi. Part 23. The Puntaporonins. Novel Bi-Tri-, and Tetra-cyclic Sesquiterpenes related to Caryophyllene, from the fungus *Poronia punctata* (Linnaeus: Fries) Fries. *Journal Chemistry Society Perkin Transactions I*. pp. 823-831.

Álvarez, J y Naranjo, E (Eds.) **2003**. *Ecología del suelo en la selva tropical Húmeda de México*. Instituto de Ecología, A.C., Instituto de Biología y Facultad de Ciencias, UNAM. Xalapa, México. pp. 263-237.

Armendariz-Guillén, Beatriz. **2013**. Hongos endófitos productores de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico y antifúngico. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.

Arnol, A.E.; Maynard, Z; Gilbert, G.S.; Coley, P.D., and Kursar, T.A. **2000**. Are tropical endophytes hyperdiverse. *Ecology Letters*. Vol. 3, pp. 267-274

Arévalo, R.A., Bertoncini, E.I., Aranda, E.M. y González, T.A. **2011**. Allelopathy in *Saccharum spp.* (Sugar Cane). *Avances en Investigación Agropecuaria*, Vol. 15(1), pp. 51-60.



---

Arnol, A.E.; Maynard, Z., and Gilbert, G.S. **2001**. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research*, Vol. 105, No. 12, pp. 1502-1507

Arnold, Elizabeth. **2001**. Fungal endophytes in neotropical trees: Abundance, diversity and ecological implications. In Ganeshiah, K.N.; Shaanker, U., and Bawa, K.S. (Eds.). *Tropical Ecosystems: Structure, diversity and human welfare*. Proceedings of the international conference on Tropical Ecosystems. Oxford-IBH, New Delhi, pp. 739-743

Arnold, E.A.; Mejia, L.C.; Kylo, D.; Rojas, E. I.; Maynard, Z.; Robbins, N., and Herre, E. A. **2003**. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 100, No. 26, pp. 15649-15654

Arnold, Elizabeth and Lewis, Leslie. **2005**. Ecology and Evolution of fungal Endophytes and their roles against insects. In Vega, F.E.; Blackwell, M. (Eds.) *Insect fungal associations, Ecology and Evolution*. New York, N Y. Oxford Press, pp. 74-96

Arnold, A.E. **2005**. Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. In current trends in *Mycological Research*, D. Deshmukh. S and Rai, M.K. (eds.) *Biodiversity of Fungi: Their role in human life*. Science Publishers, Inc., India, pp. 49-68.

Abello, Francisco y Kelemu, Segenet. **2006**. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. Vol.7/2), pp. 55-57.

Baby, Joseph and Priya, Mini R. **2011**. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: A review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 1, Issue 3, pp. 291-309.

Backman. Paul A., and Sikora, Richard A. **2008**. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, Vol. 46, pp. 1-3

Bayman, P. **2006**. Diversity, scale and variation of endophytic fungi in leaves of Tropical Plants. In Bailey, M; Lilley, A; Timms-Wilson, T and Spencer-Phillips, P. (Edts). *Microbial Ecology of Aerial plants surfaces*. CAB International. United Kindom. p. 37

Bhadoria, P.B.S. **2011**. Allelopathy: A natural way towards weed management. *American Journal of Experimental Agriculture*. Vol. 1, Issue 1, pp. 7-20.

Barnerjee, Debdulal. **2011**. Endophytic fungal diversity in Tropical and Subtropical plants. *Research Journal of Microbiology*, Vol. 6 (1), pp.54-62

Blanco, Yaisys. **2006**. La utilización de la Aleopatía y sus efectos en diferentes cultivo agrícolas (Revisión Bibliográfica). *Cultivos Tropicales*, Vol. 27, No. 3, pp. 5-16.



Boonphong, S., Kittakoop, P., Isaka, M., Pittayakhajonwut, D., Tanticharoen, M. & Thebtaranonth, Y. **2001**. Multiplolides A and B, new antifungal 10-membered lactones from *Xylaria multiplex*. *Journal Natural Products*, Vol. 64, 965-967.

Cafêu, M; Silva, G; Helder, L; Vanderlan da S, B e Araújo, Â. **2005**. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Quim. Nova*, Vol. 28. No. 6, pp. 991-995.

Chang-Hung Chou. **2009**. Biochemical Interactions among plants: Allelopathy as ecosystem regulator. *Physiology and Maintenance*, Vol. V. recuperado en el mes de marzo de 2014 en <http://www.eolss.net/sample-chapters/c03/e6-54-10-05.pdf>

Chaves-Méndez, Nancy Patricia. **2007**. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis de *Magister Scientiae* en Agricultura Ecológica. Programa de educación para el desarrollo y la conservación. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza(CATIE)Escuela de Posgrado. Costa Rica, pp. 11.

Chen, W.L; Qian, Y; Meng, W.F; Pang, J.Y; Lin, Y-G; Guan, Y-Y; Chen, S-P; Pei, Z and Wang, G-L. **2009**. A novel marine compound xyloketal B protects against oxidize LDL-induced cell injury in vitro. *Biochemistry Pharmacology*. Vol. 78, pp 941-950

Chen, G; Lin, Y; Vrijmoed, L.L. P; Fong, W.F. **2006**. A new isochroman from the marine endophytic fungus 1893#. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 42, No. 2, pp. 138-141.

Chen, G.; Zhu, Y.; Wnag, S.- J., and Zhang, R.-Q. **2007**. The metabolites of mangrove endophyte fungus, *Penicillium thomi*. *Journal of Asian Natural Products Research*, Vol. 9, No. 2, pp. 159-164.

Chengxu, W; Mingxing, Z; Xuhui, C. and Bo, C. **2011**. Review on Allelopathy of exotic invasive plants. *Procedi Engineering*. Vol 18, pp. 240-246.

Chirinos, Jenny. **2009**. Uso de extractos naturales como alternativa ecológica para el control de enfermedades en plantas. INIA Divulga, *Revista de difusión de tecnología agrícola, pecuaria, pesquera y acuícola*, No. 14, pp. 40-46.

Chinworrungsee, M; Kittakoop, P; Isaka, M; Rungrod, A; Tanticharoen, M; Thebtaranonth, Y. **2001**. Antimalarial Halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanic*. *Bioorganic & Medicinal Letters*, Vol. 11, pp. 1965-1969.

Davis, Rohan. **2005**. Isolation and structure elucidation of the new Fungal Metabolite (-)-Xylariamide A. *Journal Natural Products*. Vol. 68, pp. 769-772



---

Davis, E; Franklin, J; Shaw, J. and Vilgalys, R. **2003**. Endophytic *Xylaria* (Xylareaceae) among liverworts and angiosperms: Phylogenetics, distribution, and symbiosis. American Journal of Botany, Vol. 90, Issue 11, pp. 1661-1667.

Dennis, R.W.G. **1956**. Some Xylarias of tropical America. Kew Bulletin, Vol. 11, No. 3, pp. 401-444.

Devaraju Rakshith and Satish Sreedharamurthy. **2010**. Endophytic fungi: "Trapped" or "hidden" store houses of bioactive compounds within plants: A Review. Journal of Pharmacy Research, Vol. 3(12), pp. 2986-2989.

Deyrup, S.T.; Swenson, D.C.; Gloer, J.B., and Wicklow, D.T. **2006**. Caryophyllene Sesquiterpenoids from a fungicolous isolated of *Pestalotiosis disseminata*. Journal of Natural Products, Vol. 69, pp. 608-611

Dighton, J; White, J & Oudemans, P (Eds.). **2005**. The fungal community. It's organization and role in the ecosystem. Third edition. Taylor & Francis Group. U.S.A. pp. 105-109 and pp. 181-191

Edwards, R.L.; Maitland, D.J., and Whalley, A.J. **1989**. Metabolites of the higher fungi. Part 24. Cytochalasin N,O,P,Q, and R. New Cytochalasins from the fungus *Hypoxylon terricola* Mill. Journal Chemistry Society Perkin Transactions I. pp. 57-65

Edwards, R.L.; Maitland, D.J., and Whalley, A.J.S. **1991**. Metabolites of the Higher Fungi. Part 26. Cubensic Acid, 3,7,11,15-Tetrahydroxy-18-(hydroxymethyl)-2,4,6,10,14,16,20-heptamethyldocosa-4E,8E,12E,16E-tetraenoic acid, a Novel Polysubstituted C<sub>22</sub> fatty acid from the Fungus *Xylaria cubensis* (Mont.) Fr. With substituents and substitutio pattern similar to the Macrolide antibiotics. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, pp. 1411-1417.

Erach, R; Vishwas, B; Totaram, R. **2011**. A Review: Natural products from plants associated endophytic fungi. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. Vol 1, Issue 2, pp. 21-32.

Ferguson, J.; Rathinasabapathi, B. and Chase, C. **2003**. Allelopathy: How plants suppress other plants. Agricultural Sciences, University of Florida. Original publication date July 2003. Revised March 2013. Visit the EDIS website at <http://edis.ifas.ufl.edu>.

Ferreira, Alfredo e Alves-Aquila, Maria. **2000**. Alelopatia: Um área emergente da Ecofisiologia. Revista. Brasileira de. Fisiologia Vegetal, Vol. 12 (Edição Especial), pp. 174-204

Gamboa-Gaitán, Miguel A. **2006**. Tropical Endophytic Fungi: Current Knowledge and Perspectives. Acta Biológica Colombiana. Vol. 11, Suppl., pp. 3-20.



---

Gangulli, B.N., and Deshmukh, S.K. **2007**. Fungi multifaceted microbes. Anamaya Publishers. New Delhi, India, pp. 189-207.

Hawksworth, David.L. **2001**. The magnitude of fungal diversity: The 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research, Vol 105, No. 12, pp 1422-1432.

Healy, P. C., Hocking, A., Tran-Dinh, N., Pitt, John, I., Shivas, R. G., Mitchell, J. K., Kotiw, M. & Davis, R.A. **2004**. Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*. Phytochemistry, Vol 65, No 16, pp. 2373-2378.

Huelgas-Marroquín, Paulette. **2011**. Potencial Aleloquímico del hongo endófito *Xylaria* sp., Aislado de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae) sobre el crecimiento de microorganismos y plantas (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.

Hui-Li, Z; Wang, Q; Ruan, X; Cun, D-P and Jiang, D-A. **2010**. Phenolics and plants Allelopathy. Molecules, Vol. 15, pp. 8933-8952.

Hyde, K.D. and Soyong, K. **2008**. The fungal endophyte dilemma. Fungal Diversity. Vol. 33, pp. 163-173.

Hundley, Nicholas, **2005**. Structure elucidation of bioactive compound isolated from endophytes of *Alstonia scholaris* and *Acmena graveolensis*. Tesis Master of Science, Brigham Young University.

Isaka, Masahiko; Chinthanom, P; Boonrungrapa, T; Rungjindamai, N and Pinruan, U. **2010**. Eremophilane-type sesquiterpenes from the fungus *Xylaria* sp. BCC 21097. Journal Natural Products. Vol 73, pp. 683-687

Jiménez, C; Ortega, E; Arnold, E; Cubilla, L. **2008**. Activity against *Plasmodium falciparum* of Lactones isolated from the Endophytic fungus *Xylaria* sp. Pharmaceutical Biology. Vol 46, Nos. 10-11, pp. 700-703

Joong-Hyeop, Park., et al. **2005**. Griseofulvin from *Xylaris* sp. Strain F0010, an Endophytic Fungus of *Abies holophylla* and its antifungal Activity against plant pathogenic fungi. Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 15, No. 1, pp. 112-117.

Kaul, S; Gupta, M; Ahmed, M. and Dhar, M. **2012**. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. Phytochemistry Reviews. Vol 11, Issue 4, pp. 487-505.

Keller, Roger. **1986**. The Sigma Library of FT- IR Spectra. Edición I, Vol 2. Sigma Chemical Company. U.S.A. pp 892

Kende, A.S.; Kaldor, I., and Aslanian, R. **1988**. Total synthesis of (±)-Punctaporonin B. Journal of American Chemistry Society, Vol. 110, pp. 6265-6266.



---

Klayklay, S; Rukachaisirikul, V; Sukpondma, Y; Phongpaichit, S; Buatong, J and Bussaban, B. **2012**. Metabolites from the Mangrove-derived Fungus *Xylaria cubensis* PSU-MA34. Archives of Pharmacal Research, Vol. 35, No 7, pp. 1127-1131

Kruse, M.; Strandberg, M., and Beate, S. **2000**. Ecological effects of Allelopathic plants- a Review. National Environmental Research Institute, Silkeborg, Denmark, 66 pp. NERITechnical Report No. 315.

Kumar, P; Singh, S; Singh Yadav, R; Kumar, A, Kumar, C, **2014**. Fungal endophytes: Promising tools for pharmaceutical Science, International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. Article No. 25, pp. 128-138.

Kumar, S; Prasad, R; Shukla, H; Rajak, H and Sing, S. **2014**. Endophytic fungi: As source of antimicrobials bioactive compounds. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences. Vol. 3, Issue 2, pp. 1179-1197.

Kumari, R., Bala, M., and Arya, V. **2013**. Endophytic fungus: A potential source of biologically synthesized nanoparticle. Basic Research Journal of Microbiology. Vol 1, Issue 1, pp. 01-07.

Kusari, S; Hertweck, C. and Spiteller, M. **2012**. Chemical Ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites, Chemistry & Biology. Vol. 19, pp. 792-98.

Li, Z-X; Chen, J.W; Yuang, F; Huang, Y-Y; Zhao, L-Y; Li, J; Su. H-X; Liu, J; Pang, J-L; Lin, Y-C; Lu, X-L; Pei, Z; Wang, G-L and Guan, Y-Y. **2013**. Xyloketal B exhibits its antioxidant activity through induction of HO-1 in vascular Endotelial cells and Zebrafish. Marine Drugs, Vol. 11, pp. 504-522.

Li, Y; Lu, C; Huang, Y; Li. Y; Shen, Y. **2012**. Cytochalasin H2, a new Cytochalasin, isolated from the endophytic fungus *Xylaria* sp. A23. Records of Natural Products. Vol. 6, no. 2, pp. 121-126.

Liu, X; Dong, M; Chen, X; Jiang, M; Zhou, J. **2008**. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. Applied Microbiological Biotechnology. Vol 7, pp. 241-247

Lin, Y; Wu, X; Jiang, G; Luo, J; Zhou, L; Jones, E; Krohn, K; Steingröver, K; Zsila, F. **2001**. Five unique compounds: Xyloketals from mangrove Fungus *Xylaria* sp. from the south China Sea Coast. Journal. Organic Chemistry. Vol. 66, pp. 6252-6256

Lorenzo, P; González, L. **2010**. Alelopatía: una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales. Ecosistemas, Vol. 19 No. 1, pp. 79-91.

Luna-Geller, Luz Alba y Lara-Acevedo, Guillermo. **2007**. Alelopatía y extractos vegetales: alternativas para el manejo de insectos plagas y enfermedades en los cultivos. Corporación



---

Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Centro de Investigación Palmira. Boletín Técnico. Produmedios, Bogota, Colombia, pp. 5-10

Mc Donal, L; Barbieri, L; Bernan, V; Janso, J; Lassota, P and Carter, G. **2004**. 07H239-A, a New Cytotoxic Eremophilane Sesquiterpene from the Marine-Derived Xylariaceous Fungus LL-07H239. *Journal Natural Products*. Vol. 67(9), pp. 1565-1567.

Macías-Rubalcava, M.L.; Hernández- Bautista, B.E.; Jiménez-Estrada, M.; González, M.C.; Glenn, A.E.; Hanlin, R.T.; Hernández-Ortega, S.; Saucedo-García, A.; Muria-González, J.M.; Anaya-Lang, A. **2008**. Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry*, Vol. 69, pp. 1185-1196 .

Macías-Rubalcava, M; Hernández-Bautista, B.; Oropeza, F.; Duarte, G.; González, M.; Glenn, A.; *et al.* 2010. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodoryucatanensis*; a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 36(10): pp. 1122–1131.

Macías, F; Marín, D, Oliveros-Bastida, A; Varela, R; Simonet, A, Carrera, C and Molinillo, J. **2003**. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. *Biological, Sciences in Space*, Vol. 17 No. 1, pp. 18-23.

Macías, F; Galindo, J; Molinillo, J. and Cutler, H. Edits. **2004**. Allelopathy, chemistry and mode of action of Allelochemicals. CRC Press, pp. 2.

Macías-Sámano, Jorge E. **2001**. Interacciones químicas *entre Hypsipyla grandella* y sus plantas hospedantes. *Manejo Integrado de Plagas* No. 60, pp. 15-21

Maheshwari, Ramesh. **2006**. What is an endophytic fungus? *Current Science*, Vol. 90, No. 10, pp. 1309

Medel, R; Guzmán, G; Castillo, R. **2010**. Adiciones al conocimiento de *Xylaria* (Ascomycota, Xylariales) en México. *Revista Mexicana de Micología*. Vol. 31, pp. 9-18.

Menéndez, A; Bertoni, M. D; Cabral, D. **1997**. Endófitos fúngicos en *Juncus imbricatus* var *chamissonis*: identificación de los patrones de colonización. *Revista Iberoamericana de Micología*, Vol. 14, pp. 125-128.

Mogollón, I., Moreno, S., Iturriaga, T. Taddei, A. **2013**. Análisis químico preliminar y actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de cuatro especies del género *Xylaria*. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, Vol. 4, No. 1, pp. 75-83.

Montes-Belmont, Roberto. **2009**. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos. *Revista Mexicana de Micología* 29: 73-82.





---

Mueller, G.; Brills, G.; Foster, M. **2004**. Biodiversity of Fungy. Inventory and monitoring methods. Ed. Elsevier Academic Press. China, pp. 241-270.

Oliveira, C; Regasini, L; Silva, G; Pfenning, L; Young, M; Berlinck, R; Bolzani, V; Araujo, A. **2011**. Dihydroisocumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aducum* and *Alibertia macrophylla*. Phytochemistry Letters, Vol. 4, pp. 93-96.

Oliveros-Bastida, Alberto. **2008**. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. Revista Química Viva. Número 1, año 7, pp 1-34.

Okuno, T; Oikawa, S; Goto, T; Sawai, K; Shirahama, H; Matsumoto, T. **1986**. Structures and phytotoxicity of metabolites from *Valsa ceratosperma*. Agricol Biology. Chemistry, Vol. 50, No. 4, pp. 997-1001.

Padhi, Laxmiprya; kishore, Yugal and Kumar, Panda. **2013**. Endophytic fungi with great promises: A review. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research. Vol 3, Issue 3, pp. 152-170.

Pittayakhajonwut, P; *et al.* **2005**. An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). Tetrahedron Letters 46:1341-1344.

Premjanu, N Chellam, J. **2012**. Endophytic fungi a repository of bioactive compounds- a review. International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences, Vol. 2, Issue 1, pp 135-162.

Pongcharoen, W; Rukachaisirikul, V; Phongpaichit, S; Kün, T; Pelzing, M; Sakayaroj, J; Taylor, W. **2008**. Metabolites from the edophytic fungus *Xylaria* sp. SPU-D14. Phytochemistry. Vol. 69, pp. 1900-1902

Peláez, F; González, V; Platas, G; *et al.* **2008**. Molecular phylogenetic studies within the familia Xylareaceae based on ribosomal DNA sequences. Fungal Diversity 31: 111-134

Pinheiro de Carvaho-Ribeiro, F.; Sousa-Fonseca, F.; Alves-Reis, I.; Santos-Araújo, I.; Mitoshi, H.; Branco, A., and Trovatti-Uetanabaro, A. **2012**. Xylareaceae endophytic fungi. Metabolites against *Salmonella*. Salmonella-A diversified Superbug, Mr. Yashwant Kumar (Ed.) ISBN: 978-953-307-781-9. Recuperado el 16 de Junio de 2014 en: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-diversified-superbug/xylarieceae-fungi-metabolites-against-salmonella>.

Pongcharoen, W; Rukachaisirikul, V; Isaka, M; Sriklung, K. **2008**. Citotoxic metabolites from the Wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC 9653. Chem. Pharm. Bull. Vol. 55 (11): 1647-1648



---

Qadri, M., Johri, S; Shah, B; Khajuria, A; Sidiq, T; Latto, S; Abdin, M; Riyaz, S. **2013**. Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. Springerplus. Vol. 2, Issue 8, pp 1-14.

Ramírez-Trejo, M; Pérez-García, B., y Orozco-Segovia, A. **2007**. Helechos invasores y sucesión secundaria post-fuego. Ciencias, Vol. 85, pp. 18-25

Redlin, S.C and Carris, L.M. (Eds.). **1996**. Endophytic fungi in grasses and woody plants. Systematics, ecology and evolution. Amer Phitopathological society, U.S.A.

Rosa, L., Vieiria, M.; Cota, B.; Johann, S.; Alves, T.; Zani, C., and Rosa, C. **2011**. Endophytic Fungi of Tropical Forest: A promising source of bioactive prototype molecules for the treatment of Neglected diseases Drug Development. A case study based insight into modern strategies, Dr. Chris Rundfeldt (Ed.). In. Tech, available from: <http://www.intechopen.com/books/drug-development-a-case-study-based-insinght-into-modern-strategies/endophytic-fungi-of-tropical-forest-a-promising-source-of-bioactive-prototype-molecules-for-the-tre>

Rekha, K.J.; Bala, M and Ayra, V., **2013**. Endophytic fungus: a potencial source of biologically synthesized nanoparticle. Basic Research journal of Microbiology, Vol. 1 (1), pp. 1-7 available from: <http://www.basicresearchjournals.org>

Roberto Montes-Belmont. **2009**. Diversidad de compuestos químicos producidos por plantas contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Micología, Vol. 29, pp. 73-82

Rodríguez, R.J.; White Jr., J.F; Arnold, A.E and Redman, R.S. **2009**. Fungal endoytes: diversity and functional roles. Tansley Review. New Phytologist, pp. 1-17.

Rogers, J.D. **1979**. The Xylariaceae. Systematic, biological and evolucionary aspects. Mycologia, Vol. 71, pp. 1-42.

Rukachaisirikul, V; Khamthong, N; Sukpondma, Y; Pakawatchal, C; Phongpaichit, S; Sakayaroj, J and Kirtikara, K. **2009**. An [11]Cytochalasin derivative from the marine-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-F100. Chemistry and Pharmacology Bulletin, Vol. 57 No. 12, pp. 1409-1411.

Rukachaisirikul, V.; Buadam, S.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J., and Hutadilok-Towatana, N. **2013**. Indanone and mullein derivatives from the *Garcinia*-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-G12. Phytochemistry Letters, Vol. 6, pp. 135-138.

San Martín, F; Rogers, J.D and Yu-Ming, J. **1998**. Clave dicotómica provisional para los géneros de la familia Xylareaceae ( Pyrenomycetes, Sphaeriales) de México.

Sánchez-Fernández, R; Sánchez-Ortiz, B; Sandoval-Espinosa, Y, Ulloa-Benítez, A; Armendaríz-Guillén, B; García-Méndez, M y Macías-Rubalcava, M. **2013**. Hongos endófitos: Fuente



---

potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 16(2): pp. 102-116

Sánchez-Fernández, R.E. **2010**. Potencial aleloquímico de extractos de micelio y medio de cultivo de un hongo endófito aislado de *Lonchocarpus castilloli* (Fabaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Smith, G.J.D; Liew, E.C.Y., and Hyde, K.D. **2003**. The *Xylariales*: a monophyletic order containing 7 families. Fungal Diversity, Vol. 13, pp. 185-218

Siddique, A.B. and Ismail, B.S. **2013**. Rice ecosystem, Allelopathy and Environment-A review. The Agriculturist, Vol. 11, Issue 1, pp. 112-121.

Shiono, Yoshihito and Muramaya, Tetsuya. **2005**. New Eremophilane-Type sesquiterpenoids, eremoxylarins A and B Xylariaceous endophytic fungus YUA-026. Z. Naturforsch, Vol 60b, pp. 885-890.

Silva, G; Oliveira, C; Teles, H; Pauletti, P; Caastro, I; Silva, D; Bolzani, V; Young, M; Costa, C; Pfenning, L; Berlinck, R; Araujo, A. **2010**. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aducum* (Piperaceae). Phytochemistry Letters, Vol. 3, pp. 164-167

Silva, G; Oliveira, C; Teles, H; Bolzani, V; Araujo, A. **2010**. Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper anducum* (Piperaceae). Quimica Nova, Vol 33, No. 10, pp. 2038-2041.

Song, Y; Wang, J; Huang, H; Ma, L; Wang, J; Gu, Y; Liu, L and Lin, Y. **2012**. Four eremophilane sesquiterpene from the Mangrove endophyte fungus *Xylaria* sp. BL321. Marine Drugs, Vol. 10, pp. 340-348.

Sánchez-Márquez, Ma. Salud. **2009**. Estudio de la microbiota endofítica asociada a las gramíneas. *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*. Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Salamanca. Facultad de Biología.

Sandoval-Espinoza Y. K. M. **2014**. Asilamientos y Purificación de hongos endófitos con Potencial Antifúngico y Fitotóxico de *Lysiloma acapulcense* (Tesis de licenciatura). Facultad de Química UNAM.

Schader, Bernhard. **1989**. Raman/Infrared Atlas of Organic Compounds. 2<sup>nd</sup> Edition, VHC. Federal Republic of Germany, pp B3-10.

Schulz, B; Boyle, C. **2006**. What are Endophytes? In Schulz, B; Boyle, C., and Sieber, T.N. (Eds.). Microbial Root Endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. Soil Biology. Vol. 9, pp. 1-13.



Schulz, B; Boyle, C; Draeger, S.; Römmert, A.K., and Kronh, K. **2002** Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, Vol. 106, No. 9, pp. 996-1004

Schulz, Barbara and Boyle, Christine. **2005**. The endophytic continuum. *Mycological Research*, Vol. 109, No. 6, pp. 661-686.

Sung-Lee, J; Soo-ko, K., and Sung-Jung. **2000**. Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *FEMS Microbiology Letters*

Soltys, D; Krasuska, U; Bogatek, R. and Gniazdowska, A. **2013**. Allelochemicals as Bioherbicides-present and perspectives. *INTECH*, <http://dx.doi.org/10.5772/56185>. Chapter 20, pp. 517-540.

Song, Y; Wang, J; Huang, H; Ma, L; Wang, J; Gu, Y; Liu, L and Lin, Y. **2012**. Four Eremophilane Sesquiterpenes from the Mangrove Endophytic fungus *Xylaria* sp. BL321. *Marine Drugs*, Vol. 10, pp. 340-348.

Staniek, A; Woerdenbag, H and Kayser, O. **2008**. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *Journal of Plant Interactions*. Vol 3, No. 2, pp. 75-93.

Strobel, G., Bryn, D., Castillo, U., and Harper, J. **2004**. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal Natural Products*, Vol. 67, pp. 257-268.

Suryanarayanan, T. S.; Venkatesan, G. and Murali, T.S. **2003**. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: Diversity and distribution patterns. *Current Science*. Vol 85, No. 4, pp. 489-493

Tansuwan, S; Pornpakakul, S; Roengsumran, S; Petsom, A; Muangsin, N. **2007**. Antimalarian Benzoquinones from an Endophytic fungus, *Xylaria* sp. *Journal Natural Products*. Vol 70, pp. 1620-1623.

Tejesvi, M. V; Nalini, M.S.; Mahesh, B; Prakash, H.S; Kini, K.R.; Shetty, H.S., and Subbiah, V. **2007**. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. *Boletín de la sociedad Química de México*. Vol. 1(1), pp. 19-26

Toledo, F; García, A; León, F; Bermejo, J. **2004**. Ecología química en hongos y líquenes. *Academia Colombiana de Ciencias*, Vol. 28 (109):509.

Ulloa y Hanlin. **1978**. Atlas de micología básica. Concepto, pag. 150-155.

Walley, A.J.S. **1996**. The xylariaceous way of life. *Mycological Research*. Vol. 8, Issue 8, pp. 897-922.



Walley, A.J.S. and Edwards, R.L. **1995**. Secondary metabolites and systematic arrangement within the Xylariaceae. *Canadian Journal Botanical*, Vol. 73(Suppl. 1), pp. S802-S810.

Wang J.F; Fang, M.J; Su, W.J and Ng, S.W. **2003**. 8-Hydroxy-(S)-3- methyl-1-oxoisochromane-5-carboxyl acid (5-carboxymelleina). *Acta Crystallographica Sección E*, Vol. E59, m1208-m1209.

Wang, C-Y; Pamukcu, A.M., and Bryant, G.T. **1973**. Isolation of fumaric acid, succinic acid, astragalin, isoquercitrin and tiliroside from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry*, Vol. 12, pp. 2298-2299

Webster, John and Weber, Roland. **2007**. Introduction to Fungi. Third edition. Cambridge University Press, New York, U.S.A., pp. 226, 332

Weir, T; Wook-Park, S and Vivanco, J. **2004**. Biochemicals and physiological mechanism mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 7, pp. 472, 479.

Whalley, A.J.S., and Edwards, R.L. The Xylariaceae: A case study in biological and chemical diversity. **1999**. Recuperado el 17 de Junio de 2013 en: <http://www.lupac.org/symposia/proceedings/phunket97/whalley.html>

Wiyakrutta, S.; Sriubolmas, N.; Panphut, W.; Thongon, N.; Danwisetkanjana, K.; Ruaugrunsi, N., and Meevootisom, V. **2004**. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World journal of Microbiology & biotechnology*, Vol. 20, pp. 265-272

Wu, S.H; Chen, Y.W and Miao, C.P. **2011**. Secondary metabolites of endophytic fungus *Xylaria* sp. YC-10 of *Azadirachta indica*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 47, No. 5, pp. 858-861.

Wu, H.-S.; Liu, Y.-D.; Zhao, G.-M.; Chen, X.-Q.; Yang, X.-N., and Zhou, X.-D. **2011**. Succinic acid inhibited growth and pathogenicity of *in vitro* soil-borne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil and Plant Science*, Vol. 61, pp. 404-409

Xu, F; Zhang, Y; Wnag, J; Pang, J; Huang, C; Wu, X; She, Z and Vrijmoed, L. **2008**. Benzofuranes derivatives from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. (#2508). *Journal Natural Products*, Vol. 71, pp. 1251-1273.

Yu, H; Zhang, L; Li, L; Zheng, Ch; Guo, L; Li, W; Sun, P and Qin, L. **2010**. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, Vol 165, Issue 6, pp. 437-449

Yuen, T.K.; Hyde, K.D., and Hodgkiss, I.J. **1999**. Interspecific interactions among Tropical and subtropical freshwater fungi. *Microbial Ecology*, Vol. 37, pp. 257



---

Yu-Wu, X; Xiao, H; Lin, Y; Luo, J; She, Z; Houjin, L; Chan, W; Antus, S; Kurtan, T; Elsässer, B and Krohn, K. **2005**. Xylaketol F: a strong L- calcium channel blocker from the mangrove fungus *Xylaria* sp. (#2508) from the south China sea coast. *European Journal Organic Chemistry*, pp. 4061-4064.

Yu-Hu, Z; Li, Y.Y; Huang, Y.J; Su, W-J and Shen, Y.M. **2008**. Three new Sesquiterpenoids from *Xylaria* sp. NCY2. *Helvetica Chimica Acta*, Vol. 91, pp. 46-52.

Yang, L.H.; Lau, S.C.K.; Lee, O.O.; Tsoi, M.M.Y., and Qian, P.Y. **2007**. Potential roles of succinic acid against colonization by a tubeworm. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Vol. 349, pp. 1-11

Zabalgogezcoa, I. **2008**. Review. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)*, Vol. 6 (Special issue), pp. 138-146.

Zabalgogezcoa, I y Vázquez de Aldana, B.R. **2007**. Potencial del hongo endófito *Epichloë fetuscae* para la mejora del césped. *Innovación y tecnología alimentaria* No. 2. Pp. 145-157

Zamorano, Carolina. **2006**. Alelopatía: Un nuevo reto en la ciencia de las arvenses en el trópico. *Agronomía*. Vol. 14 (1): pp.7-15

Zhao, J.; Zhou, L.; Wang, J.; Shan, L.; Liu, X., and Gao, X. **2010**. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Current Research. Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. pp. 567-576

Zhao, J; Li, L; Ling, C; Pang, J-Y; Lin, Y-Ch; Liu, J; Huang, R; Wang, G-L; Pei, Z & Zeng, J. **2009**. Marine compound Xylaketol B PC12 cells against OGD-induced cell damage. *Brain Research*. Vol 13, Issue 02, pp. 240, 247.

Zhenhua, X; Dongmei, G, Xiuli, S., and Ying, X **2012**. A review of endophyte and its use and function. *Advances in Biomedical Engineering*, Vol. 8, pp. 124-130.



# **VIII. ANEXO**

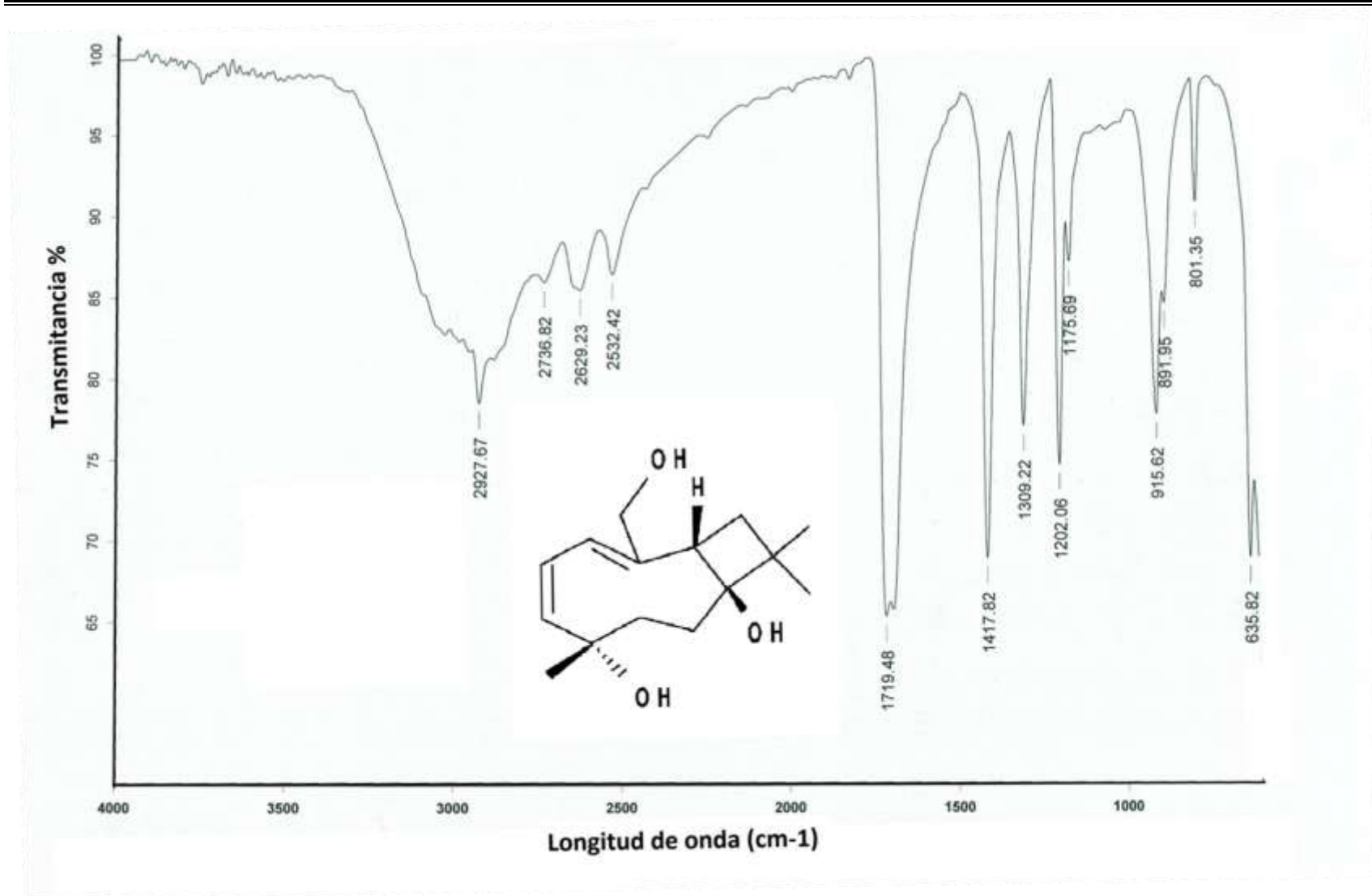
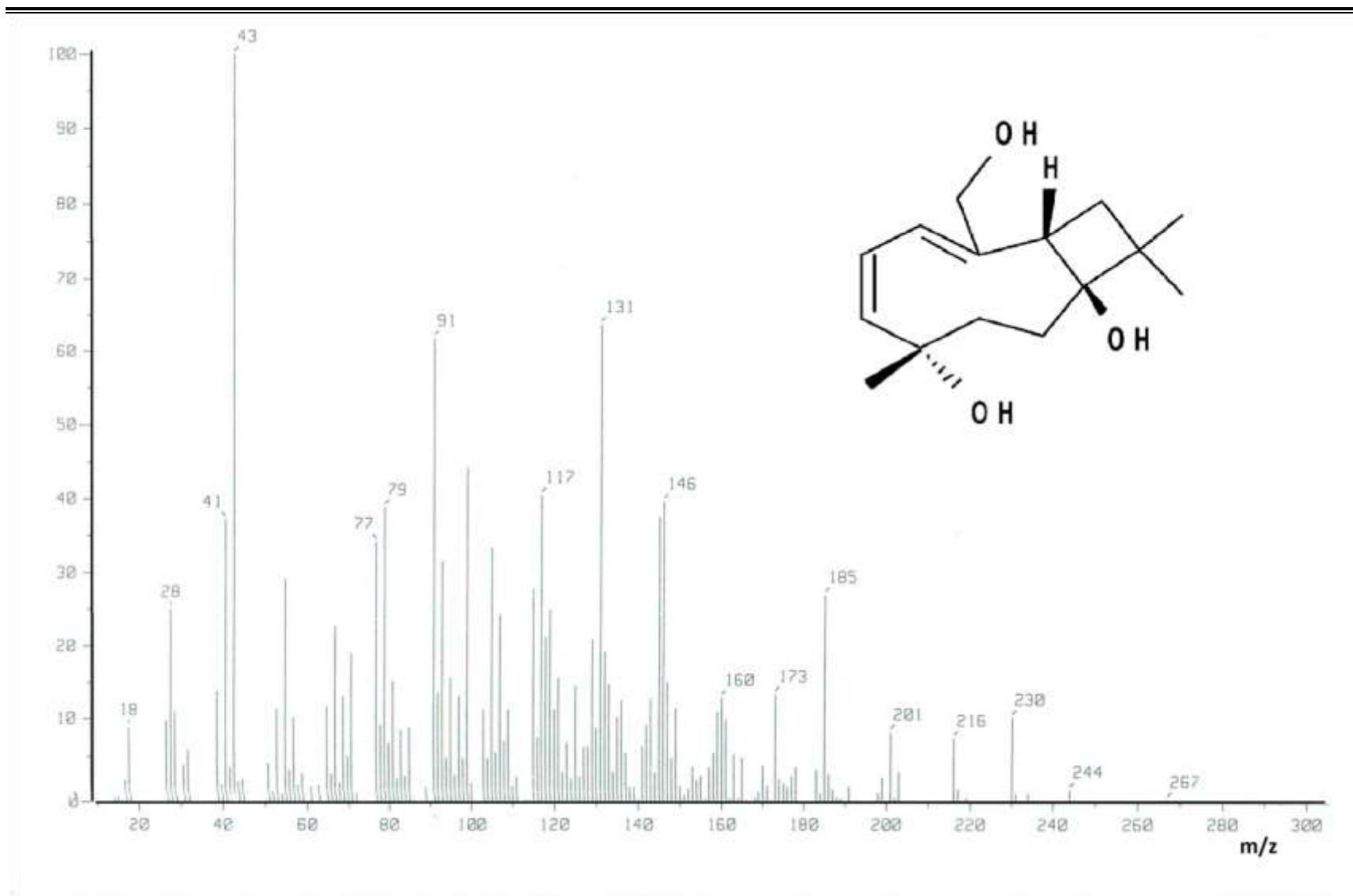
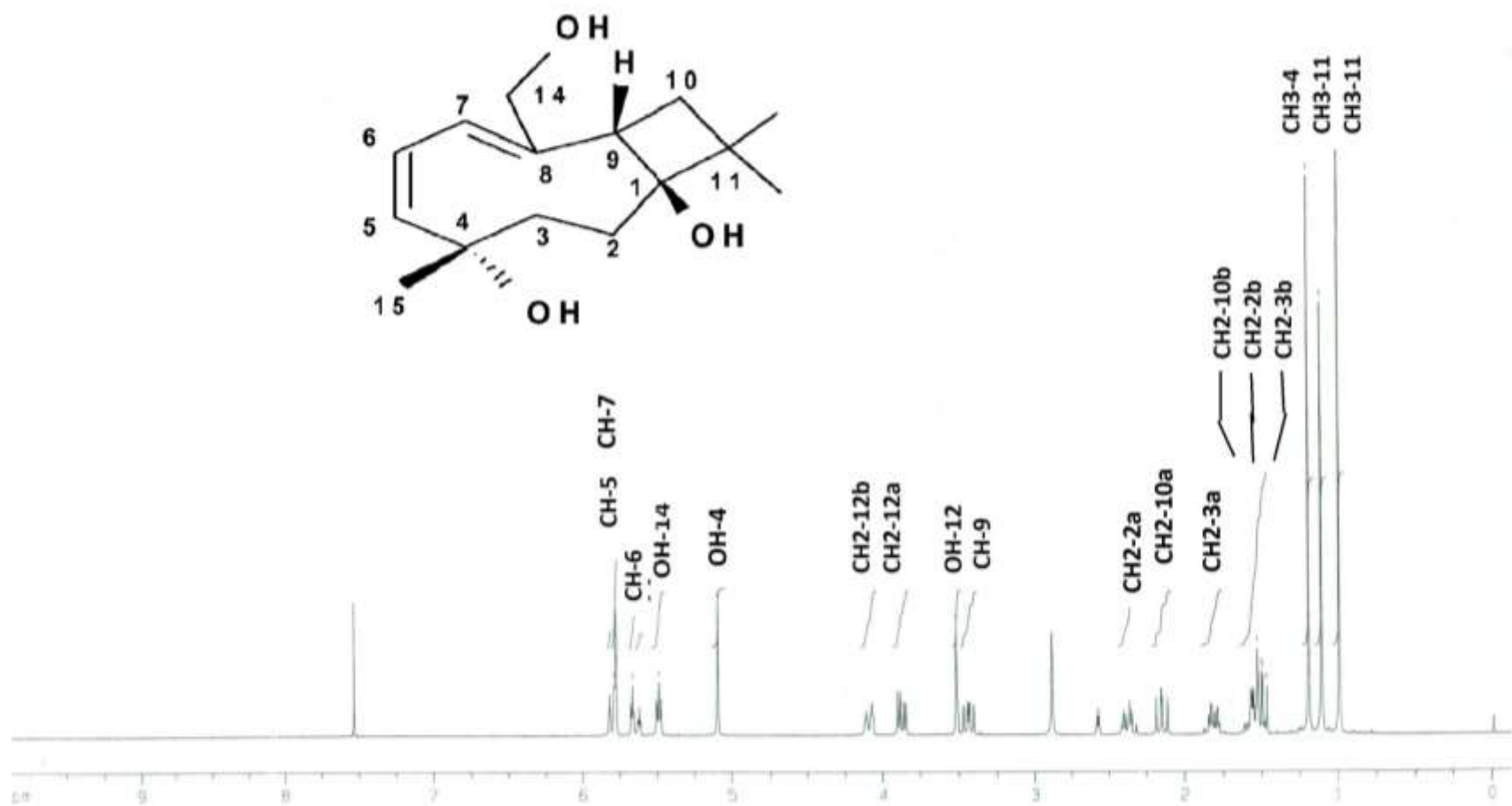


Figura 20. Espectro IR de del punctaporonina B (35).





**Figura 21.** Espectro de masas de la punctaporonica B (35).



**Figura 22.** Espectro  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$ ) de la punctaporonina B (35)

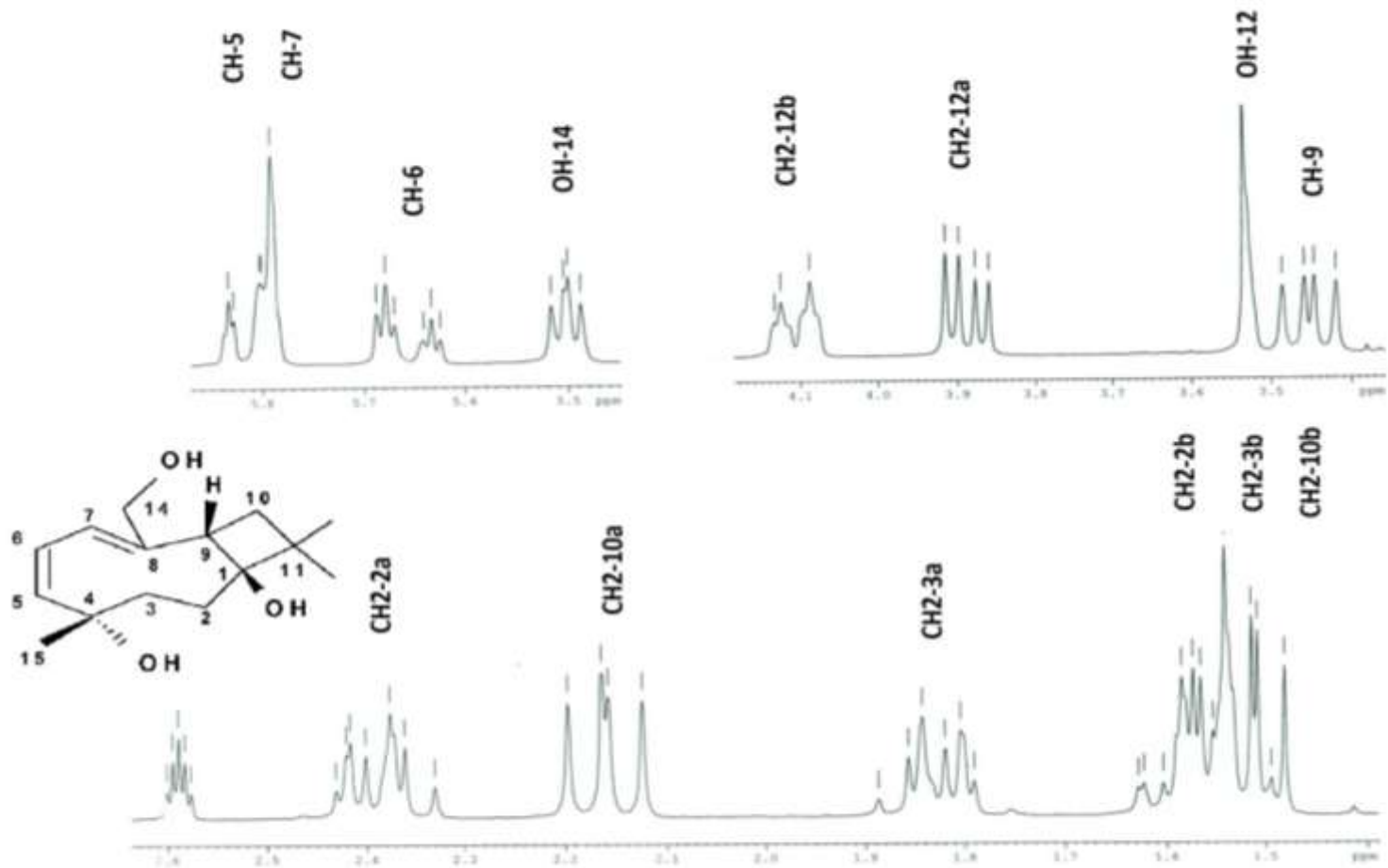


Figura 23. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$ ) de la punctaporonina B (ampliación) (35).

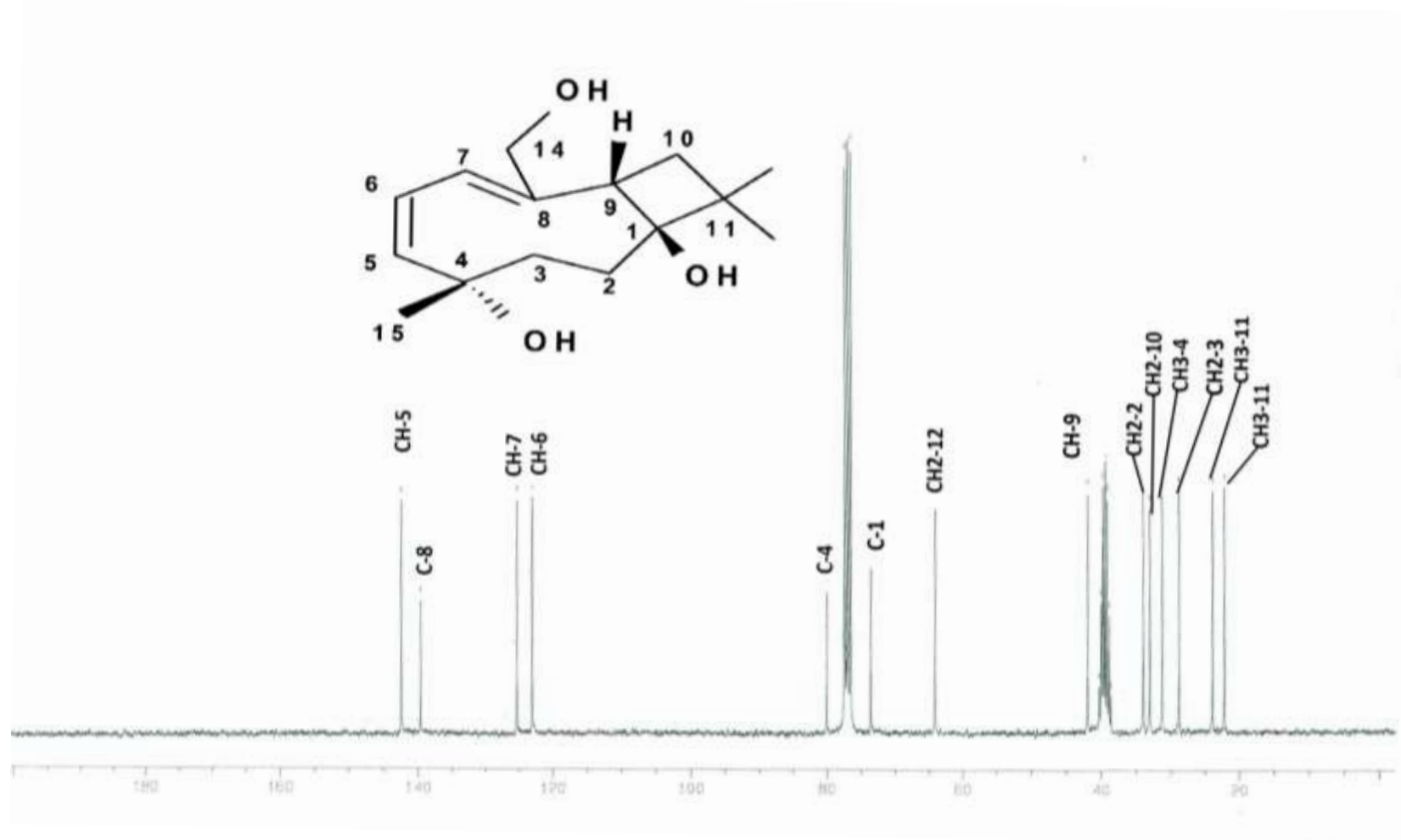


Figura 24. RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$ ) de la punctaporonina B (35)

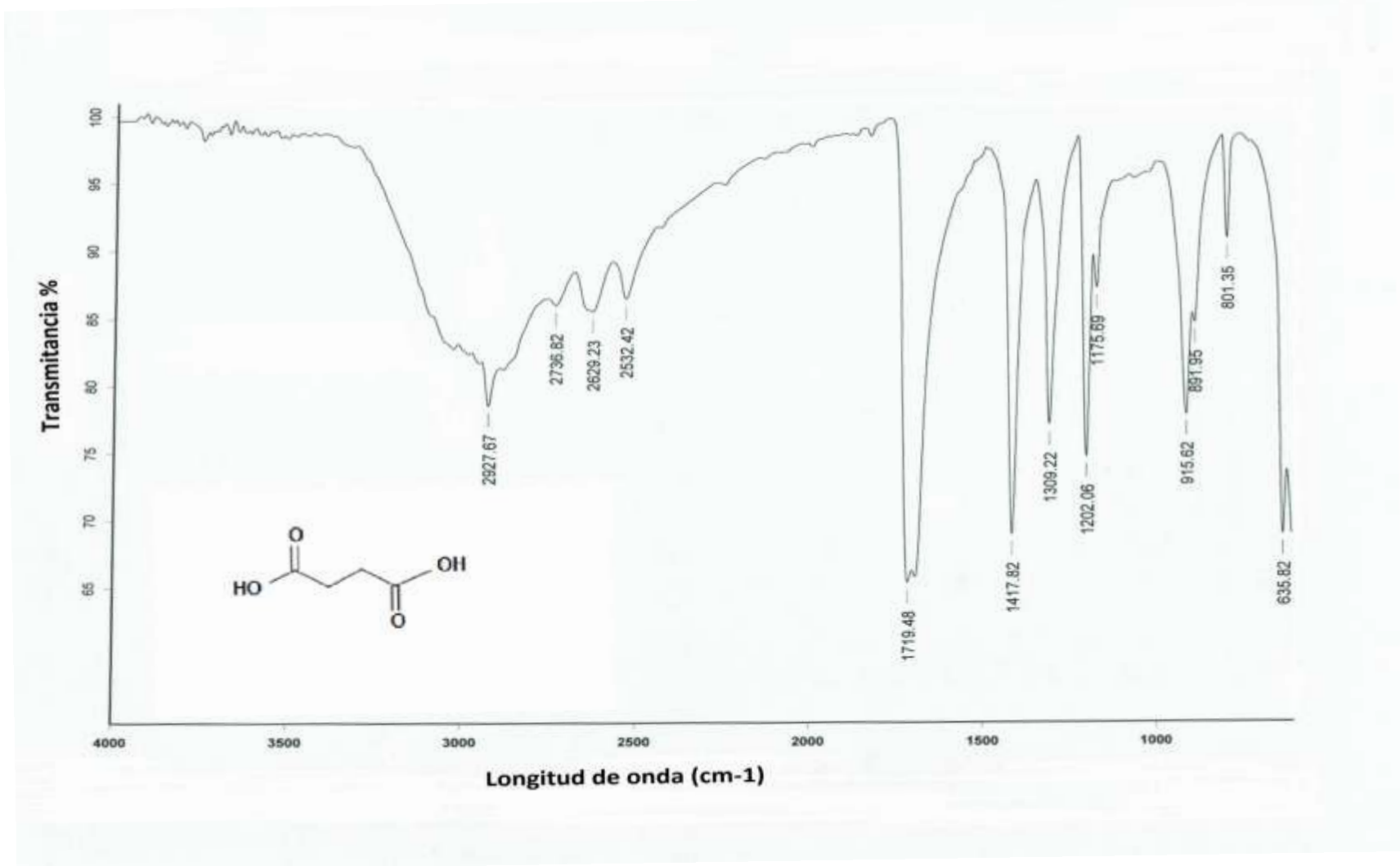
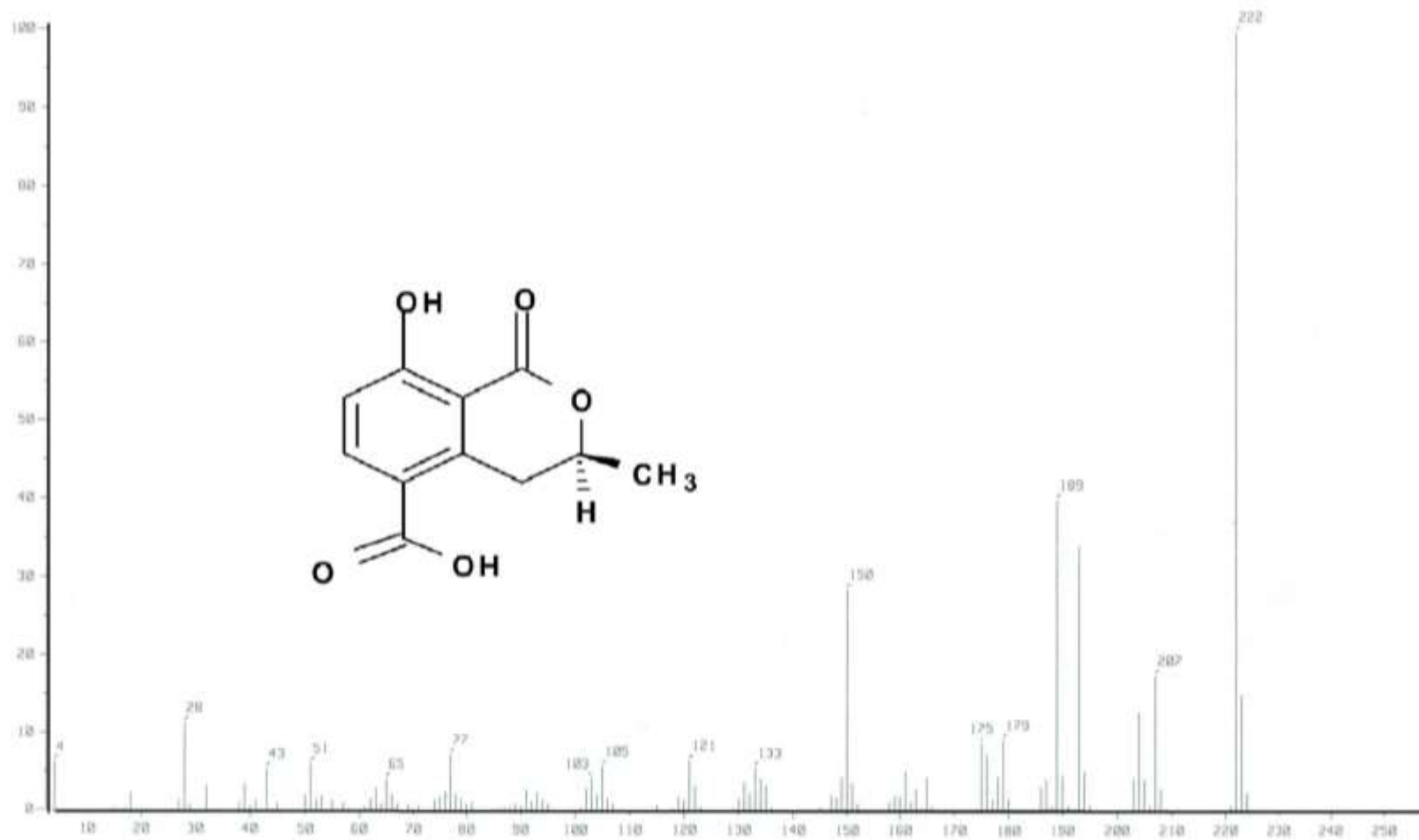


Figura 25. Espectro de IR del ácido succínico (36).



**Figura 26.** Espectro de masas de la 5-carboximeleina (**37**).

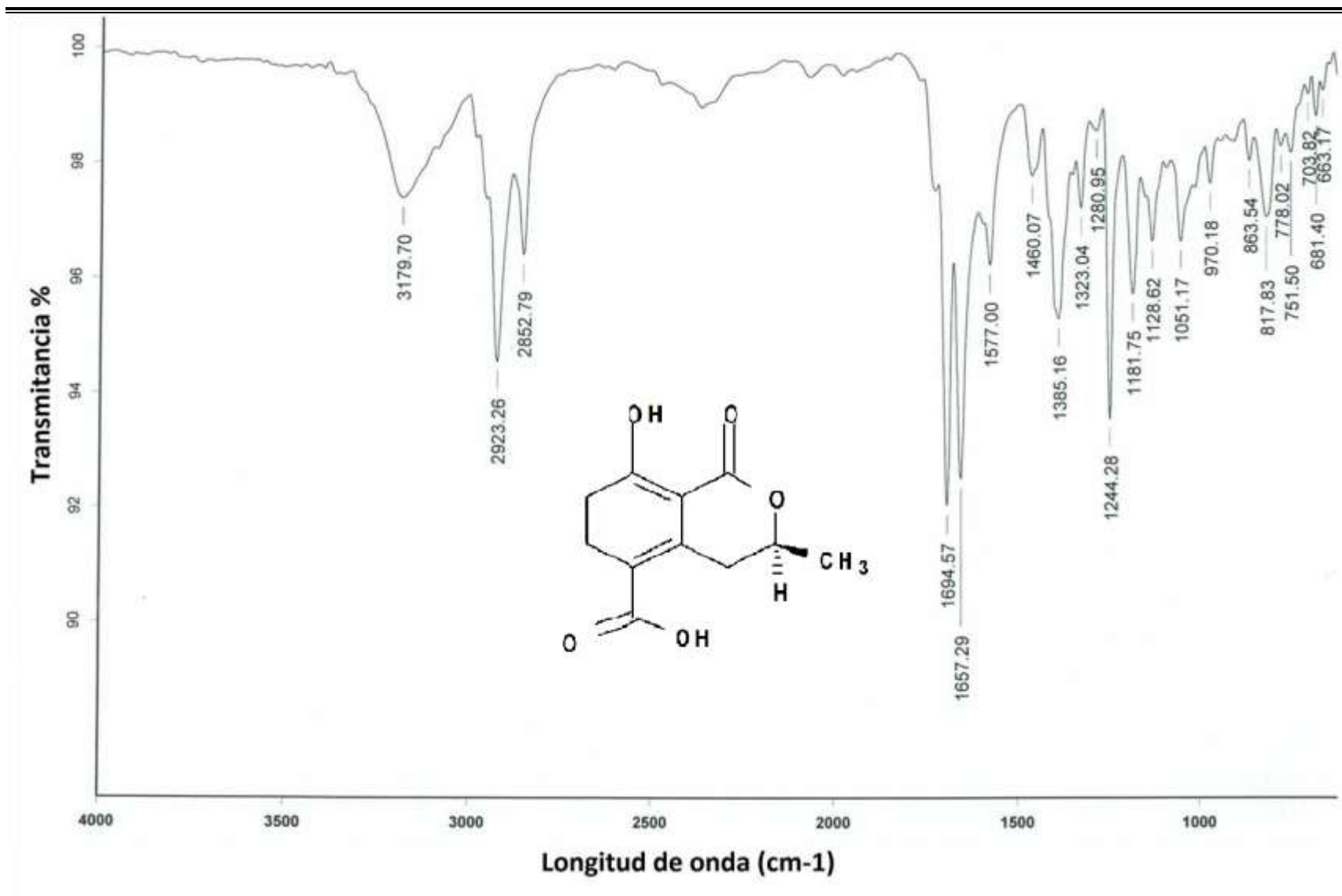


Figura 27. Espectro de IR de la 5-carboximeleina (37).

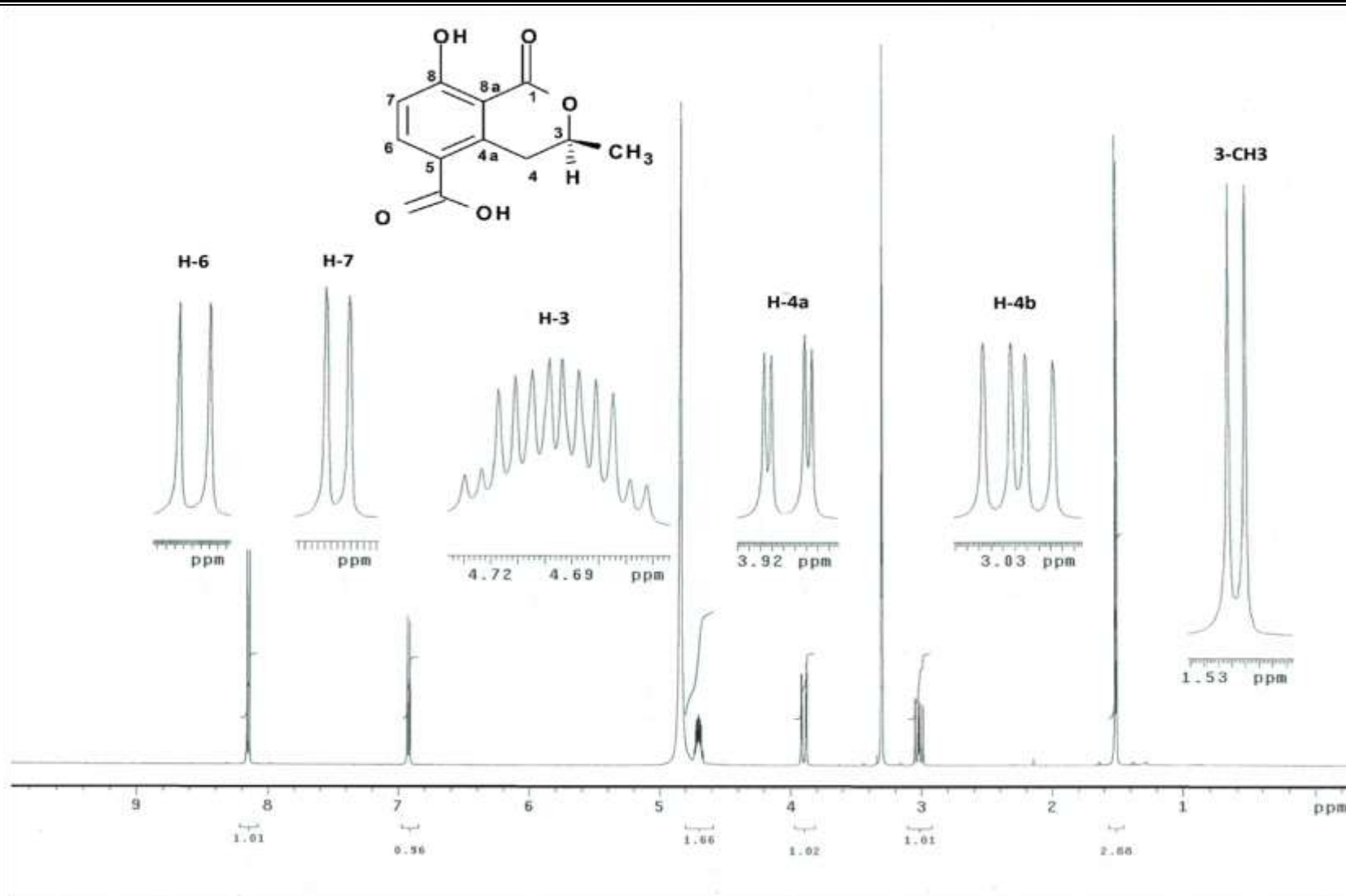


Figura 28. RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la 5-carboximeleina (37).



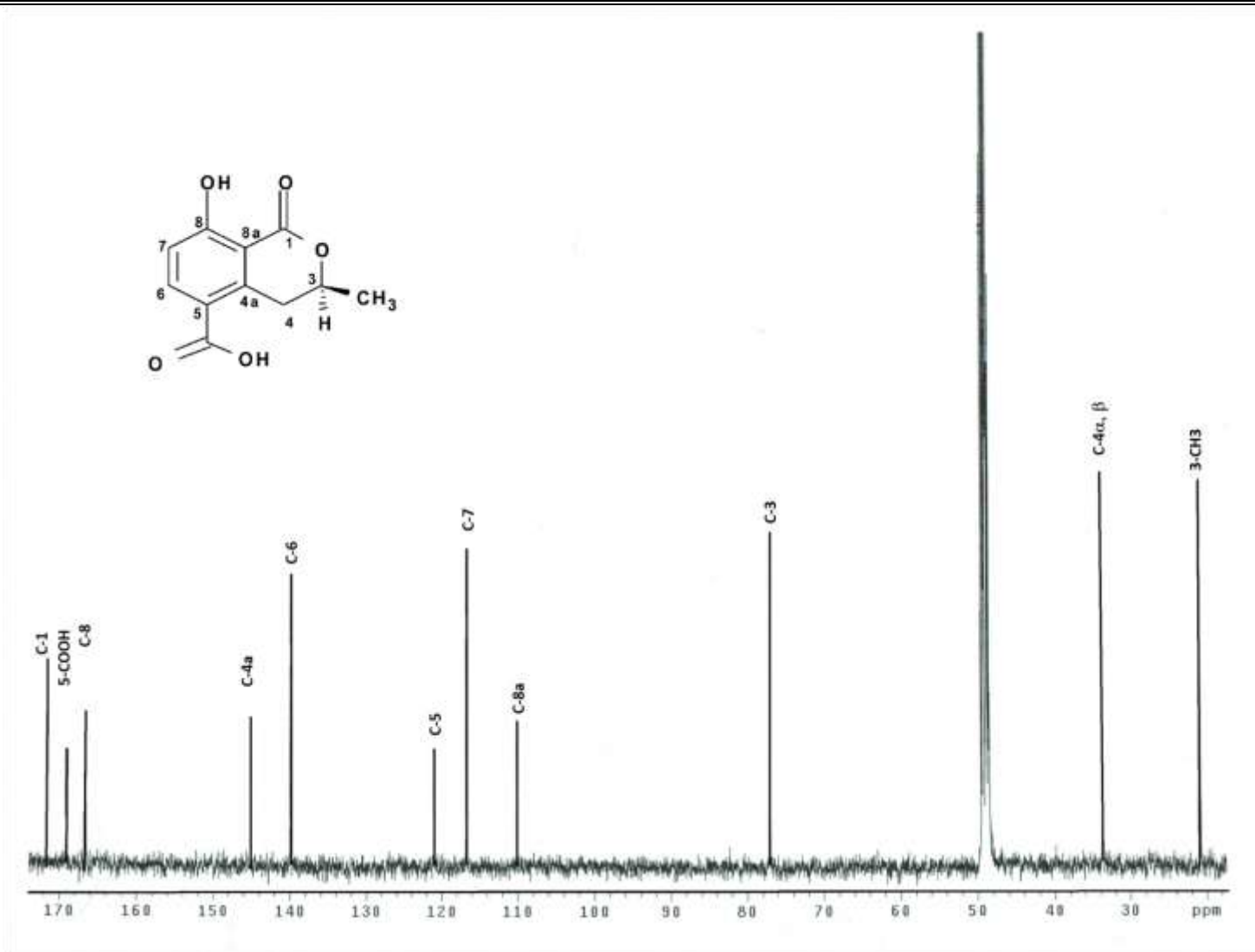


Figura 29. RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD3OD) de la 5- carboximeleina (37).