



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO FITOTÓXICO, ANTIFÚNGICO Y ANTIOOMICETO DE METABOLITOS
SECUNDARIOS VOLÁTILES Y NO VOLÁTILES DEL AISLAMIENTO ENDOFÍTICO
SMEG4 DE *SAPIUM MACROCARPUM* (EUPHORBIACEAE)**

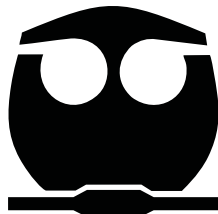
TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

GONZALO ROQUE FLORES

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



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. Martha Lydia Macías Rubalcava

VOCAL: Dr. José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Dra. Irma Susana Rojas Tomé

1er. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2° SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO.

INSTITUTO DE QUÍMICA

LABORATORIO 1-4, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES.

ASESORA DEL TEMA:

DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

SUPERVISORA TÉCNICA:

M. EN C. YOLI MARIANA MEDINA ROMERO

SUSTENTANTE:

GONZALO ROQUE FLORES

Agradecimientos

A la máxima casa de estudios **Universidad Nacional Autónoma de México** por proporcionar los medios que han permitido mi desarrollo académico y personal.

A la **Facultad de Química** por brindar los conocimientos que formaran parte de mí por toda la vida. Al **Instituto de Química** por permitir reforzar y poner en práctica los conocimientos adquiridos en mis estudios de licenciatura.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**), por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente trabajo a través de los proyectos 179194 y IN207117, respectivamente.

ÍNDICE DE CONTENIDOS







Índice de contenidos	i
Lista de Figuras	i
Lista de Cuadros.....	v
Lista de Abreviaturas	i
I Introducción	1
II Antecedentes	3
1.1 Enfermedades y malezas de cultivos mexicanos	3
2 Productos naturales como fuente de plaguicidas de origen natural	6
2.1 Importancia del estudio de los hongos como fuente de metabolitos secundarios bioactivos	7
2.2 Los hongos endófitos.....	9
3 Metabolitos secundarios de hongos endófitos.....	11
3.1 Metabolitos secundarios volátiles de hongos endófitos.	15
III Hipótesis.....	20
IV Objetivos.....	21
1 Objetivos generales.....	21
2 Objetivos particulares	21
VI Materiales y Métodos.....	23
1 Material fúngico	23
1.1 Hongo endófito Smeg4	23
1.2 Hongos endófitos y fitopatógenos de <i>S. macrocarpum</i>	23
1.3 Determinación de la tasa de crecimiento de los hongos aislados de <i>S. macrocarpum</i>	23

















1.4	Microorganismos fitopatógenos de prueba.....	24
2	Plantas de prueba.....	24
3	Medios de cultivo.....	25
3.1	Agar (2%)	25
3.2	Agar papa-dextrosa (PDA)	25
3.3	Caldo de papa-dextrosa (CPD).....	25
4	Caracterización macroscópica y microscópica del hongo endófito Smeg4 aislado de la planta <i>S. macrocarpum</i>.....	25
5	Bioensayos de antagonismo múltiple directo.....	26
5.1	Hongo endófito Smeg4 vs microorganismos fúngicos aislados de la misma planta hospedera.....	26
5.2	Endófito Smeg4 vs microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura.....	27
6	Evaluación cuantitativa del potencial antimicrobiano y fitotóxico de los compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito Smeg4.....	28
6.1	Potencial antifúngico y antioomiceto.....	29
6.2	Potencial fitotóxico.....	30
7	Cultivo en medio líquido del hongo endófito Smeg4	31
7.1	Cultivo a pequeña escala	31
7.2	Cultivo a mediana escala.....	31
8	Obtención de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio	31
8.1	Pequeña escala	31
8.2	Mediana escala.....	32
9	Determinación cuantitativa del potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4	32
10	Determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos del hongo Smeg4	33
VII	Resultados y Discusión	36

1	Caracterización e identificación del hongo Smeg4	37
1.1	Caracterización macroscópica y microscópica del hongo endófito Smeg4	37
2	Bioensayos de antagonismo múltiple directo.....	40
2.1	Microorganismos endófitos y fitopatógenos aislados de <i>S. macrocarpum</i>	40
2.2	Microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola.	44
3	Bioensayo de antagonismo en caja dividida.....	49
3.1	Actividad antifúngica y antioomiceto.....	49
3.2	Actividad fitotóxica	53
4	Cultivo en pequeña escala.....	55
4.1	Obtención de extractos orgánicos	55
4.2	Evaluación de los extractos orgánicos.....	56
5	Cultivo en mediana escala	61
5.1	Obtención de extractos orgánicos	61
5.2	Concentración inhibitoria media de la actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos del endófito Smeg4	63
5.3	Concentración inhibitoria media de la actividad fitotóxica de los extractos orgánicos del endófito Smeg4	68
VIII	Conclusiones	79
IX	Perspectivas	81
X	Bibliografía	82

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Incremento cronológico a nivel mundial, del número de malezas resistentes a los herbicidas sintéticos (modificado de Menne et al., 2007). **6**
- Figura 2.** Registro ante la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de nuevos ingredientes activos para su uso como plaguicidas convencionales de 1997 a 2010 (Modificado de Cantrell et al., 2012). **7**
- Figura 3.** Representación de una interacción planta-suelo-hongo en un ecosistema terrestre. El modelo muestra el efecto de los hongos en la planta. En la superficie del suelo se produce la descomposición de la hojarasca por la comunidad de hongos saprotróficos, con la consiguiente mineralización de los nutrientes en la piscina de nutrientes inorgánicos del suelo. Los nutrientes se inmovilizan en recursos orgánicos recalcitrantes (como el tronco a la derecha) y en la biomasa fúngica. Aquí puede haber redistribución temporal y espacial de los nutrientes dentro del hongo y entre los recursos utilizados por los hongos. Las micorrizas en las raíces de las plantas ayudan a la absorción de nutrientes minerales en la planta, ayudan a defender la planta contra los patógenos de las raíces y pueden afectar la descomposición de los residuos orgánicos. Tanto las hifas de hongos como las estructuras de fructificación (representadas por los hongos) son una fuente de alimento para los animales de pastoreo, influyendo así en la aptitud de los individuos y en la regulación de las poblaciones de animales. (Modificado de Dighton, 2003, 2016). **8**
- Figura 4.** Hipótesis del antagonismo balanceado (modificado de Schulz et al., 2015). **9**
- Figura 5.** Ejemplificación de la diversidad de microorganismos en los tejidos internos de una hoja, cada trama ejemplifica un microorganismo diferente (endófitos y fitopatógenos) (Herre et al., 2007). **10**
- Figura 6.** Ciclo de vida propuesto para los hongos endófitos foliares tropicales y sus plantas hospedantes. **11**
- Figura 7.** Diseño del bioensayo de antagonismo múltiple: a) Bioensayo con los microorganismos competidores en interacción antagonística; b) Bioensayo control de crecimiento de los hongos de prueba sin la presencia del endófito Smeg4. E= hongo endófito Smeg4; Microorganismos competidores: 1= Sme1, 2= Sme2, 3= Sme3, 4= Sme5, 5= Sme6, 6= Sme7, 7= Sme8, 8= Sme9, 9= Sme10, 10= Sme11, 11= Sme12, 12= Sme13 y 13= Smf1. **27**
- Figura 8.** Diseño del bioensayo de antagonismo múltiple: a) caja de Petri control de crecimiento del hongo endófito Smeg4; b) caja de Petri en interacción antagonística; c) caja de Petri control

del crecimiento de los microorganismos fitopatógenos. E= hongo endófito Smeg4, A= <i>A. alternata</i> , F= <i>F. oxysporum</i> , C= <i>P. capsici</i> , U= <i>P. ultimum</i>	28
Figura 9. Diseño del bioensayo en caja de Petri dividida para establecer el potencial antifúngico y antioomiceto de los VOCs producidos por el hongo endófito Smeg4: a) caja control de crecimiento del hongo endófito SMeg4; b) caja de la interacción antagónica; c) caja control de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos	29
Figura 10. Bioensayo en caja de dividida para la evaluación de la actividad fitotóxica de los VOCs producidos por el hongo endófito Smeg4: a) caja control de crecimiento del hongo endófito SMeg4; b) caja en interacción antagónica; c) Caja control de crecimiento de las semillas.	30
Figura 11. Hongo endófito Smeg4 creciendo sobre PDA: a) 5 días de crecimiento y b) 7 días de crecimiento. Los anversos se presentan de lado izquierdo y los reversos de lado derecho.	38
Figura 12. Micrografías del hongo endófito Smeg4 teñidas con rojo congo (a) y azul de lactofenol (b, c y d), observadas a 40x y 100x.	39
Figura 13. Bioensayo de antagonismo múltiple entre el hongo endófito Smeg4 y 12 hongos endófitos y un fitopatógenos aislados de <i>S. macrocarpum</i> . Microorganismos endófitos (1-12) y fitopatógeno (13). 1= Sme1, 2= Sme2, 3= Sme3, 4= Sme5, 5= Sme6, 6= Sme7, 7= Sme8, 8= Sme9, 9= Sme10, 10= Sme11, 11= Sme12, 12= Sme13 y 13= Smf1.	42
Figura 14. Potencial antagónico del hongo endófito Smeg4 contra hongos endófitos y fitopatógenos aislados de la misma planta hospedera. Tiempo de interacción: 3 días  , 5 días  y 10  días. * Datos estadísticamente significativos ANOVA ($p<0.05$).	43
Figura 15. Efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos (a) y oomicetos (b) fitopatógenos provocado por la presencia del hongo endófito Smeg4 de 3 días  , 5 días  y 10 días  de crecimiento, a los 3, 5 y 10 días de interacción antagónica. *Valores estadísticamente significativos. t-Student ($p<0.05$).	47
Figura 16. Bioensayo de antagonismo múltiple directo entre el hongo Smeg4 y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola: a) control de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos; b) control de crecimiento del hongo endófito de Smeg4 y c) interacción antagónica entre el endófito Smeg4 y cuatro microorganismos fitopatógenos. 1= <i>A. alternata</i> ; 2= <i>F. oxysporum</i> ; 3= <i>P. capsici</i> ; 4= <i>P. ultimum</i> . Las fotografías fueron tomadas a 10 días de interacción y en el bioensayo con el endófito Smeg4 de cinco días previos de crecimiento.	48

- Figura 17.** Efecto antifúngico y antioomiceto de los compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito Smeg4 a los 3  y 5  días de crecimiento en bioensayo de caja de Petri dividida, a los 5 días de interacción antagónica. * Valores estadísticamente significativos ANOVA ($p<0.05$)..... 51
- Figura 18.** Bioensayo de antagonismo en caja de Petri dividida entre el hongo endófito Smeg4 de 5 días de crecimiento y diferentes microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, a los 5 días de interacción antagónica..... 52
- Figura 19.** Efecto fitotóxico de los VOCs producidos por el hongo endófito Smeg4 a los 5 días de crecimiento en bioensayo de caja de Petri dividida, sobre los procesos de germinación , crecimiento de la raíz  y la respiración  de las plántulas de *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*. * Valores estadísticamente significativos ANOVA ($p<0.05$)..... 54
- Figura 20.** a) Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4. 1=Extracto del medio de cultivo (CH_2Cl_2); 2=Extracto micelio (CH_2Cl_2); 3=Extracto medio de cultivo (AcOEt); 4=Extracto micelio (AcOEt). Sistema de elución CH_2Cl_2 100%. Cromatoplaaca revelada con H_2SO_4 al 10%..... 56
- Figura 21.** Efecto antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos del medio de cultivo  y del micelio  del hongo endófito Smeg4 sobre el crecimiento de los hongos *A. alternata* (*A. alt*) y *F. oxysporum* (*F. oxy*) y de los oomicetos *P. capsici* (*P. cap*). y *P. ultimum* (*P. ult*). Controles positivos: **Prozicar® 50 P.H** . (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato), **Ridomil Gold 4E®**  (Metalaxil-m: (*R*)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino]propionato de metilo). *: Valores estadísticamente significativos ANOVA ($p<0.05$)..... 58
- Figura 22.** Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo () y del micelio () del hongo endófito Smeg4 sobre los procesos de germinación, crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus* (*A. hyp*), *P. miliaceum* (*P. mil*), *T. pratense* (*T. pra*) y *M. sativa* (*M. sat*). Control positivo **RIVAL®** . *: Valores estadísticamente significativos ANOVA ($p<0.05$). 60
- Figura 23.** Cultivo del hongo endófito Smeg4. a) Cultivo en pequeña escala y b) cultivo en mediana escala..... 62
- Figura 24.** Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito Smeg4 sobre el crecimiento de los hongos *A. alternata* y *F. oxysporum* evaluados a 250 $\mu\text{g/mL}$ , 500 $\mu\text{g/mL}$ , 750 $\mu\text{g/mL}$  y 1000 $\mu\text{g/mL}$ . El control positivo Prozicar®





50 P.H se evaluó a la misma concentración empleadas para los extractos orgánicos sobre *A. alternata*. Para *F. oxysporum* se utilizaron las concentraciones de 25 µg/mL , 50 µg/mL , 100 µg/mL  y 200 µg/mL . Todos los valores fueron estadísticamente significativos, ANOVA ($p < 0.05$). 64





Figura 25. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito Smeg4 sobre el crecimiento de los oomicetos *P. capsici* (*P. cap*) y *P. ultimum* (*P. ult*) evaluados a 250 µg/mL , 500 µg/mL , 750 µg/mL  y 1000 µg/mL . * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($p < 0.05$). 66

Figura 26. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo (colores claros) y micelio (colores oscuros) del hongo endófito Smeg4, evaluados a cinco concentraciones sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las semillas de a) *A. hypochondriacus* y b) *P. miliaceum*. 71

Figura 27. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo (colores claros) y micelio (colores oscuros) del hongo endófito Smeg4, evaluados a cinco concentraciones sobre la de germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las semillas de a) *T. pratense* y b) *M. sativa*. 72

Figura 28. Efecto del extracto orgánico del medio de cultivo del hongo endófito Smeg4 sobre el consumo de oxígeno de las semillas de a) *A. hypochondriacus* y b) *P. miliaceum*. 73

Figura 29. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos del medio de cultivo (A) y micelio (B) del hongo endófito Smeg4 sobre las semillas de *A. hypochondriacus*. 74

Figura 30. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos del medio de cultivo (A) y micelio (B) del hongo endófito Smeg4 sobre las semillas de *P. miliaceum*. 75

Figura 31. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos del medio de cultivo (A) y micelio (B) del hongo endófito Smeg4 sobre las semillas de de *T. pratense*. 76

Figura 32. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos del medio de cultivo (A) y micelio (B) del hongo endófito Smeg4 sobre las semillas de *M. sativa*. 77

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos con actividad biológica.	13
Cuadro 2. Compuestos comúnmente identificados en las mezclas VOCs producidos por diversos géneros de hongos endófitos (modificado de Kanchiswamy et al., 2015).	16
Cuadro 3. Compuestos orgánicos volátiles mayoritarios producidos por hongos endófitos del género <i>Muscodor</i> e <i>Hypoxylon</i>	18
Cuadro 4. Tasa de crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógeno aislados de hojas de <i>S. macrocarpum</i>	24
Cuadro 5. Efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, provocado por la presencia del hongo endófito Smeg4 en bioensayo de antagonismo directo múltiple.	46
Cuadro 6. Efecto antifúngico y antioomiceto de los VOCs producidos a los 3 y 5 días de crecimiento del hongo endófito Smeg4, a los 5 días de interacción de antagonista.	50
Cuadro 7. Efecto fitotóxico de los VOCs producidos a 5 días de crecimiento del hongo endófito Smeg4 sobre semillas de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>P. miliaceum</i> , <i>T. pratense</i> y <i>M. sativa</i>	54
Cuadro 8. Rendimientos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos del cultivo en mediana escala (1.2 L) del hongo endófito Smeg4.	55
Cuadro 9. Efecto antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos del hongo Smeg4 sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura.	57
Cuadro 10. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio del hongo endófito Smeg4 sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>P. miliaceum</i> , <i>T. pratense</i> y <i>M. sativa</i>	59
Cuadro 11. Rendimientos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito Smeg4 obtenidos a partir de un cultivo en mediana escala.	61
Cuadro 12. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4 y el control positivo Prozar® sobre el crecimiento de <i>A. alternata</i> y <i>F. oxysporum</i>	64
Cuadro 13. Efecto antioomiceto de los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4 y del control positivo Ridomil Gold 4E® sobre el crecimiento de <i>P. capsici</i> y <i>P. ultimum</i>	66
Cuadro 14. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4, sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>P. miliaceum</i> , <i>T. pratense</i> y <i>M. sativa</i>	70

Cuadro 15. Concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) de los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4 sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*..... **78**

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>A. hypochondriacus</i>	<i>Amarantus hypochondriacus</i>
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
°C	Grados Celsius
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado
CPD	Caldo papa dextrosa
E.M.	Espectrometría de masas
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
g	Gramos
h	Horas
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media
L	litros
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
<i>P. capsici</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
P.M.	Peso molecular
<i>P. miliaceum</i>	<i>Panicum miliaceum</i>
<i>P. ultimum</i>	<i>Pythium ultimum</i>
PDA	Agar papa dextrosa
pm	Picómetro
REBIOSH	Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla
<i>S. macrocarpum</i>	<i>Sapium macrocarpum</i>
SPME	Microextracción en fase sólida
<i>T. pratense</i>	<i>Trifolium pratense</i>
T.R	Tiempo de retención
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetro
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles



I INTRODUCCIÓN

La población humana está en continuo crecimiento, se estima que para el año 2050 existirán diez mil millones de personas. Este aumento poblacional traerá consigo una mayor demanda de servicios básicos necesarios para su desarrollo, como lo es la alimentación y los servicios de salud (Alexandratos & Bruinsma, 2012).

Para poder solucionar el problema concerniente a la alimentación, la agricultura juega un papel importante, debido a que es imprescindible aumentar la calidad y el rendimiento de los cultivos utilizados en la elaboración de alimentos y otros productos útiles para la industria (Alexandratos et al., 2012). Desde las primeras décadas del siglo XX, los avances tecnológicos y científicos han sido sumamente útiles en el mejoramiento de la productividad y calidad de los cultivos de interés agrícola (Mazoyer & Roudart, 2006). Con el uso de agroquímicos se ha logrado controlar enfermedades y plagas que anteriormente mermaban las cosechas, causando escases de alimentos y pérdidas económicas (Horst, 2013). Aunado al beneficio, se ha generado un deterioro al medio ambiente como consecuencia del uso indiscriminado de plaguicidas, además de que estos compuestos han demostrado ser perjudiciales para la salud de la especie humana, lo que ha motivado la búsqueda intensiva de agroquímicos alternativos con menor impacto sobre el medio ambiente y que además no representen un factor de riesgo para la salud del hombre y de los animales (Dimetry, 2014).

Los productos naturales prometen ser una fuente de compuestos químicos útiles en el desarrollo no solo de agroquímicos, sino también de medicamentos (Cantrell et al., 2012; Cutler & Cutler, 1999; Cutler & Cutler, 2000). Las plantas y los microorganismos sintetizan una amplia gama de metabolitos secundarios con actividad biológica contra depredadores, microorganismos patógenos y sobre otras especies vegetales. Con respecto a los microorganismos, son de destacar a los hongos endófitos, por constituir una fuente valiosa y rica de metabolitos secundarios bioactivos estructuralmente novedosos (Deshmukh & Misra, 2016). Estos microorganismos colonizan los tejidos internos de las plantas durante todo su ciclo de vida o gran parte de él, sin causar, aparentemente, enfermedad, y pueden establecer una relación de simbiosis con su hospedera (Kusari et al., 2012). Los endófitos



obtienen nutrición y protección de su hospedera y en retribución algunos de ellos ayudan a la defensa química de la misma a través de los metabolitos secundarios que biosintetizan (Kharwar & Strobel, 2011; Waqas et al., 2012). Por otra parte, los hongos endófitos compiten por espacio y nutrientes de manera constante contra otros microorganismos, por lo que producen compuestos antagónicos que garantizan su supervivencia dentro de la planta (Schulz et al., 2015). Estas características los hacen un grupo prometedor de microorganismos para el aislamiento de compuestos potencialmente útiles en la agricultura y la medicina.

Bajo este contexto, el presente proyecto de tesis tiene la finalidad de evidenciar *in vitro* el potencial fitotóxico, antifúngico y antioomiceto a nivel de extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4 aislado de hojas sanas de *Sapium macrocarpum*, colectadas de una zona de alta biodiversidad, lo que podría evidenciar compuestos químicos útiles para el desarrollo de bioplaguicidas y/o de agentes de control biológicos, con menor impacto sobre el medio ambiente y más seguros para el ser humano y los animales.



II ANTECEDENTES

La agricultura juega un papel importante dentro del sector económico primario. México exporta productos agroalimentarios a más de 150 destinos internacionales, y en los últimos 10 años estas exportaciones se han incrementado considerablemente, llegando a superar a las petroleras por más de 3,170 millones de dólares (SAGARPA, 2016).

En el año 2014, en el país se destinaron 26.9 millones de hectáreas para la agricultura y, con esta extensión de tierra, México se ha colocado como el principal productor de sorgo y aguacate, el segundo productor de chile verde, y figura en el tercer lugar como productor de espárragos, fresa y alfalfa verde. A nivel nacional, el cultivo de mayor importancia es el maíz blanco, destinando anualmente un promedio de 12 millones de toneladas para el consumo humano y 4.1 millones de toneladas para el consumo pecuario (SAGARPA, 2016).

Del 2007 al 2014 se registró una disminución de 3.1 millones de hectáreas en el área destinada para la agricultura (SAGARPA, 2016), por lo que la producción de algunos productos fue insuficiente para abastecer la demanda de ciertos alimentos básicos, afectando la economía de las familias mexicanas, debido al encarecimiento de los productos, y con ello fomentando la desnutrición de determinados sectores de la población (FAO, 2003). Aunado a la disminución de tierra empleada para cultivos de importancia económica, se encuentran los daños provocados por las plagas, enfermedades ocasionadas por microorganismos fitopatógenos, y la invasión por malezas, que afectan directamente los rendimientos de los cultivos, ocasionando una pérdida económica mayor, y la escases del producto para el consumidor final (Aguado-Santacruz, 2012; SAGARPA, 2016).

1.1 Enfermedades y malezas de cultivos mexicanos

Las enfermedades que afectan los cultivos son causados por una gran variedad de organismos como los hongos verdaderos o Eumycota, representados esencialmente por los *Ascomycota* y *Basidiomycota*; los Oomycota, que son organismos filogenéticamente relacionados a los hongos verdaderos, y en particular las especies pertenecientes a los géneros *Phytophthora* y *Pythium*; los *Plasmodiophora*, las bacterias, los virus y los nematodos (Hewitt & Oliver, 2014).



En México, las afecciones de mayor recurrencia en los cultivos son causadas por hongos y oomicetos. Por ejemplo, algunas de las enfermedades causadas en el tomate como: podredumbre negra (*Sclerotium rolfsii*), ahogamiento de la planta (*Pythium* spp.), marchitez de plantas (*Fusarium oxysporum*) y tizón temprano de la planta (*Alternaria solani*) (Gómez Jaimes et al., 2011); enfermedades del chile como: marchitez de la planta (*Phytophthora capsici*), mancha foliar (*Alternaria solani*) y cenicilla (*Leveillula taurica*) (CESAVEG, 2011a); enfermedades del jitomate como: ahogamiento de la planta o 'damping off' (*Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* sp, *Fusarium* sp.), pudrición radicular y marchitez (*Fusarium oxysporum*), moho gris (*Botryotinia fuckeliana*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*), tizón temprano (*Alternaria tomatophila* Simmons, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler) y cenicilla (*L. taurica*) (CESAVEG, 2011b); enfermedades del maíz como: carbón de la espiga (*Sphacelotheca reiliana*), pudrición de la raíz (*Pythium aphanidermatum*, *Diplodia maydis*, *Fusarium* spp.), pudrición del tallo (*Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* spp, *D. maydis*, *P. aphanidermatum*), manchas foliares o tizón (*Helmintosporium maydis*) y roya del maíz (*Puccinia sorghi*, *P. polyspora*, *Physopella zae*) (CESAVEG, 2011c).

Para combatir o prevenir las infecciones de los cultivos de importancia agrícola y forestal, se utiliza una amplia variedad de fungicidas sintéticos. El término fungicida es utilizado para referirse a los compuestos que controlan a los hongos verdaderos, los oomicetos y los plasmodiíferos (Hewitt et al., 2014), siendo los compuestos inorgánicos, como la cal de azufre o sales de cobre (mezcla Bordeaux), algunos de los primeros compuestos usados durante el siglo XIX para contrarrestar las enfermedades causadas por hongos sobre los árboles frutales (Kuck et al., 2012). A principios del siglo XX, se usaron intensivamente compuestos organomercuriales para el tratamiento preventivo contra el ataque por hongos en cultivos de cereales, y no fue hasta 1930, cuando compuestos de origen sintético como las ditiocarbamidas (Mancozeb® y Thiram®) y ftalimidias (Captán® y Captafol®), comenzaron a tener auge como fungicidas (Brent, 2012). No obstante, en las décadas de 1960 y 1970, se introdujeron nuevas clases de fungicidas más selectivos para los patógenos y también se comenzaron a observar cepas de patógenos resistentes a los fungicidas comerciales (Kuck et al., 2012), lo que ha impulsado la constante búsqueda de compuestos para contrarrestar a estos patógenos.



Además de los microorganismos fitopatógenos que afectan seriamente los cultivos agrícolas, las malezas también ocasionan pérdidas importantes, ya que compiten por espacio y nutrientes con el cultivo de interés agrícola (Villaseñor Mir & Espitia Rangel, 2000). Las malezas son especies vegetales que afectan los intereses del hombre en un lugar y tiempo determinado (SENASICA, 2014), esta definición incluye tanto a las especies silvestres como a los cultivos voluntarios indeseables (Rosales Robles & Medina Cazares, 2000). Las malezas han existido desde mucho antes que el hombre cultivara plantas para su alimentación, obtención de fibras y combustibles (Nandula, 2010). El efecto adverso que las malezas causan a los cultivos se le conoce como “interferencia”, este término engloba la competencia por factores de crecimiento y la alelopatía resultante de la liberación de compuestos químicos tóxicos a las plantas de interés (Qasem & Foy, 2001). Antes de la invención de compuestos sintéticos, la erradicación de las malezas se realizaba principalmente por la mano del hombre y mediante trabajo mecánico (Griepentrog & Dedousis, 2010). En el año de 1942 se introdujo al mercado el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, un regulador del crecimiento de las plantas y el primer herbicida selectivo. Actualmente, es el herbicida más utilizado en Estados Unidos, y a nivel mundial (Pohanish, 2015). Desde entonces, se han sintetizado una gran cantidad de herbicidas con diferentes mecanismos de acción y clases químicas, elevando considerablemente los rendimientos de los cultivos y las ganancias de los agricultores (Nandula, 2010). Debido a este aumento en la “efectividad”, se han utilizado los mismos herbicidas sobre las malezas durante años y se han aumentado las concentraciones de manera progresiva e indiscriminada, ocasionando la aparición de malezas resistentes a los productos comerciales al grado de ser ineficaces (Busi et al., 2013; Caseley et al., 1991; Menne & Köcher, 2007). En la **Figura 1**, se muestra una representación gráfica del incremento cronológico de las malezas resistentes a los herbicidas de origen sintético a nivel mundial (Menne et al., 2007).

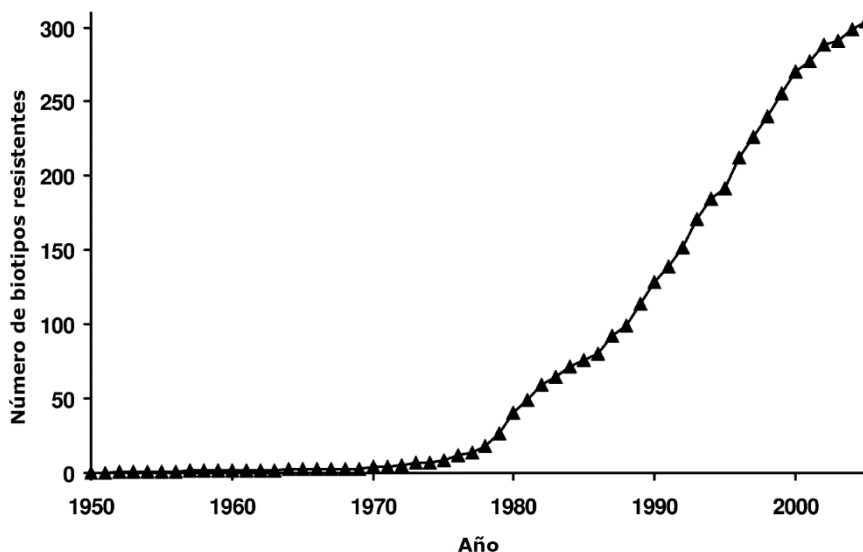


Figura 1. Incremento cronológico a nivel mundial, del número de malezas resistentes a los herbicidas sintéticos (modificado de Menne et al., 2007).

Por otra parte, el uso indiscriminado de los plaguicidas incluidos los herbicidas, puede ocasionar la disminución de la salud debido a la exposición directa o indirecta de estos compuestos, contaminación del suelo y del agua, contaminación por trazas de herbicidas en la cadena alimentaria de los consumidores finales, así como de las familias de los agricultores (Pingali, 1995). En consecuencia, en las últimas décadas se han buscado compuestos activos en los productos naturales, como una fuente alternativa a los plaguicidas sintéticos, que sean menos tóxicos y con menor impacto ambiental (Koul & Dhaliwal, 2001; Nollet & Rathore, 2015; Strobel et al., 2004).

2 Productos naturales como fuente de plaguicidas de origen natural

Existe un poco más de un millón de productos naturales conocidos, de los cuales del 20-25% son biológicamente activos y de estos, el 10% se han obtenido a partir de microorganismos. De los 22,500 compuestos producidos por organismos microscópicos, el 40% tiene origen fúngico, lo que pone en evidencia la importancia del estudio de los productos naturales fúngicos, no sólo por su importancia en la medicina sino también en otros sectores de importancia económica como la agricultura (Demain, 2014; Kumar et al., 2008) y la industria alimentaria (Abrahão et al., 2013).



Es importante destacar que en años recientes, se ha incrementado notablemente el número de ingredientes activos de origen natural contenidos en las formulaciones de los plaguicidas convencionales (Cantrell et al., 2012). En la **Figura 2** se representa gráficamente el registro de nuevos ingredientes activos para uso como plaguicidas convencionales ante la Agencia de Protección del Medio Ambiente (en inglés: Environmental Protection Agency más conocida por las siglas EPA), de 1997 a 2010 (Modificado de Cantrell et al., 2012). Así por ejemplo, el cinamaldehído, un compuesto aislado en abundancia de *Cassia obtusifolia* y que hoy en día se produce sintéticamente para su uso en la agricultura por su actividad antifúngica (Vertigo™, Cinnacure™), o los aceites esenciales de jojoba (*Simmondsia californica*, E-Rase™), romero (*Rosemarinus officianali*, Sporan™) y tomillo (*Thymus vulgaris*, Promax™), comercializados como fungicidas para la agricultura orgánica (Dayan et al., 2009).

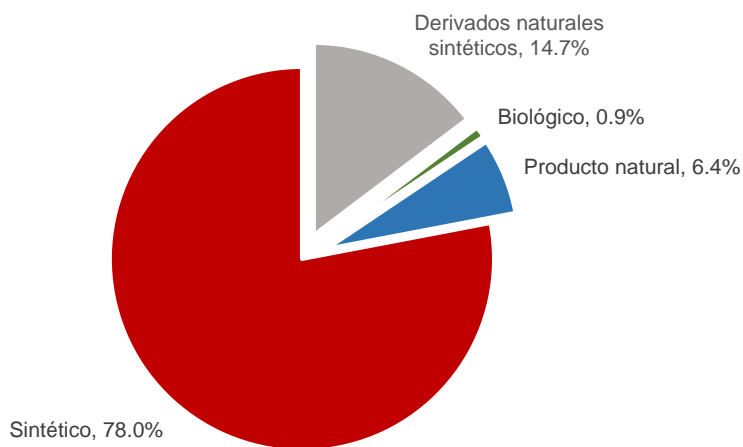


Figura 2. Registro ante la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de nuevos ingredientes activos para su uso como plaguicidas convencionales de 1997 a 2010 (Modificado de Cantrell et al., 2012).

2.1 Importancia del estudio de los hongos como fuente de metabolitos secundarios bioactivos

Los hongos son un grupo de organismos que no pueden fijar energía y nutrientes directamente, por lo que usan la energía almacenada en la biomasa de otros organismos



para su desarrollo (Dadachova & Casadevall, 2008). Estos organismos son un grupo importante que interactúan con otros organismos del entorno abiótico para regular los procesos de los ecosistemas (Dighton, 2016). En la **Figura 3** se muestra una representación esquemática de algunas de las funciones que los hongos llevan a cabo en los ecosistemas terrestres (Dighton, 2016)

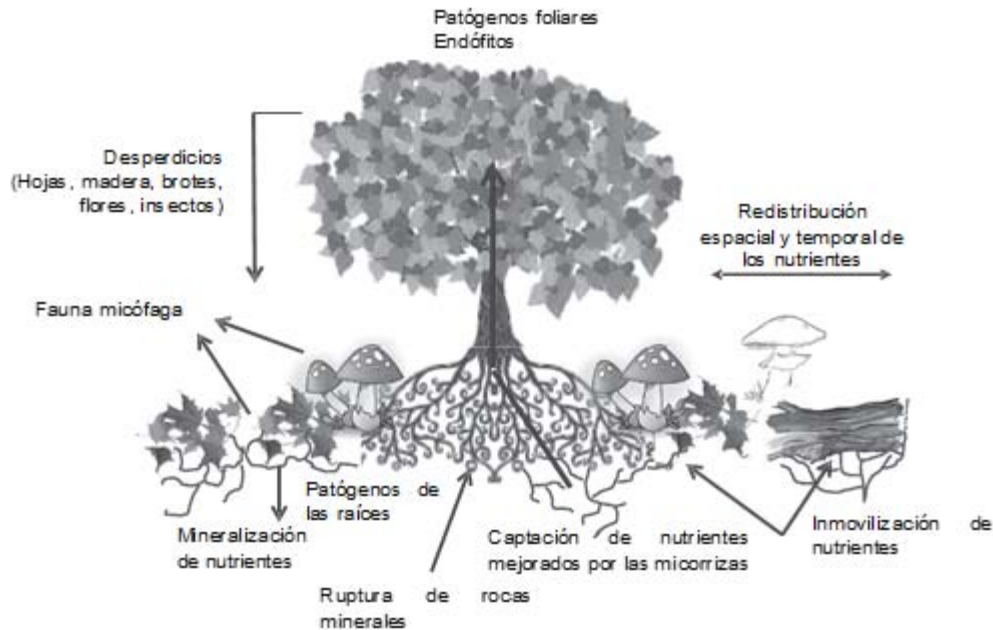


Figura 3. Representación de una interacción planta-suelo-hongo en un ecosistema terrestre. El modelo muestra el efecto de los hongos en la planta. En la superficie del suelo se produce la descomposición de la hojarasca por la comunidad de hongos saprotróficos, con la consiguiente mineralización de los nutrientes en la piscina de nutrientes inorgánicos del suelo. Los nutrientes se inmovilizan en recursos orgánicos recalcitrantes (como el tronco a la derecha) y en la biomasa fúngica. Aquí puede haber redistribución temporal y espacial de los nutrientes dentro del hongo y entre los recursos utilizados por los hongos. Las micorrizas en las raíces de las plantas ayudan a la absorción de nutrientes minerales en la planta, ayudan a defender la planta contra los patógenos de las raíces y pueden afectar la descomposición de los residuos orgánicos. Tanto las hifas de hongos como las estructuras de fructificación (representadas por los hongos) son una fuente de alimento para los animales de pastoreo, influyendo así en la aptitud de los individuos y en la regulación de las poblaciones de animales. (Modificado de Dighton, 2003, 2016).

Los hongos están ampliamente distribuidos por toda la tierra. La mayoría son saprobios y descomponen materia orgánica muerta; otros se especializan en atacar e infectar organismos vivos, como las plantas. Los hongos que colonizan a las plantas se subdividen en dos grupos: a) hongos patógenos, que colonizan y producen síntomas de enfermedad



trascurrido un tiempo de incubación y b) hongos endófitos, que son microorganismos que infectan a las plantas y, al menos una parte de su ciclo de vida, viven dentro de los tejidos internos de la planta sin causar, aparentemente, enfermedad (Herre et al., 2007; Kusari, Hertweck, & Spiteller, 2012; Sieber, 2007).

2.2 Los hongos endófitos

Los hongos endófitos establecen diferentes relaciones con las plantas hospederas, como el mutualismo, comensalismo y el parasitismo (Sánchez-Fernández et al., 2013). En las diferentes relaciones, el endófito tiene la capacidad de crecer sin causar síntomas de enfermedad a la hospedera, surgiendo así la pregunta, ¿cómo lo hace? La hipótesis del “antagonismo balanceado” (**Figura 4**) responde esta cuestión y propone que, por un lado, los hongos endófitos producen metabolitos secundarios tóxicos para la hospedera que están en equilibrio con los mecanismos de defensa constitutivos de las plantas y, por otra parte, los microorganismos endófitos secretan enzimas líticas para la desintoxicación por metabolitos secundarios producidos por la planta, como mecanismo de defensa, y de esta manera se permite el desarrollo tanto del huésped como de la hospedera en ausencia de síntomas de enfermedad o daño (Kusari et al., 2012; Schulz et al., 1999).

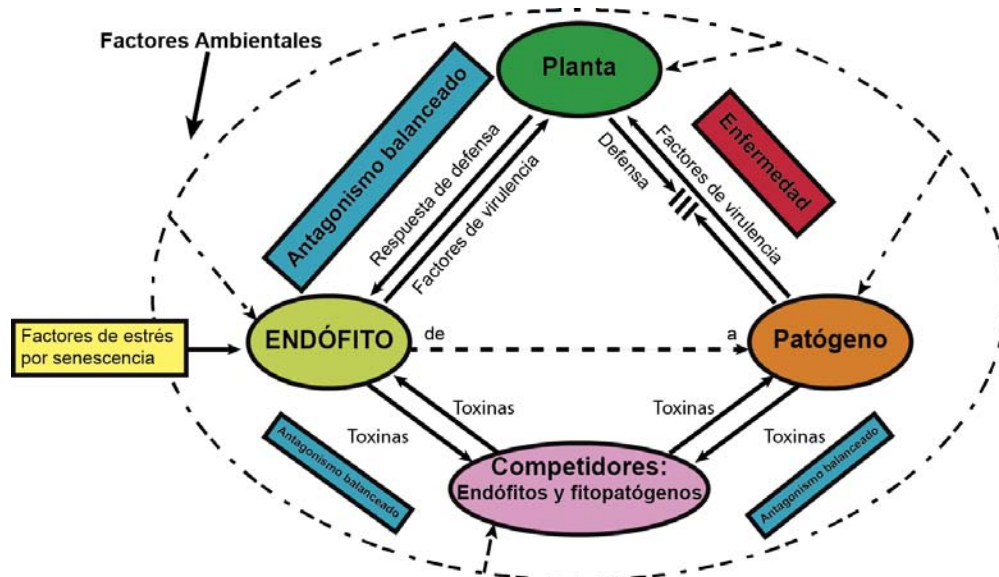


Figura 4. Hipótesis del antagonismo balanceado (modificado de Schulz et al., 2015).

Los microorganismos endófitos y fitopatógenos, por la competencia de espacio y nutrientes (**Figura 5**), han desarrollado mecanismos físicos (Cao et al., 2009) y químicos (Schulz et al., 2015) para garantizar su supervivencia en la hospedera. De esta manera, los hongos endófitos representan una fuente extremadamente rica de productos naturales incluyendo compuestos bioactivos con potencial aplicación en la medicina, la industria y la agricultura, incluyendo el control de patógenos y malezas (Mousa & Raizada, 2013).

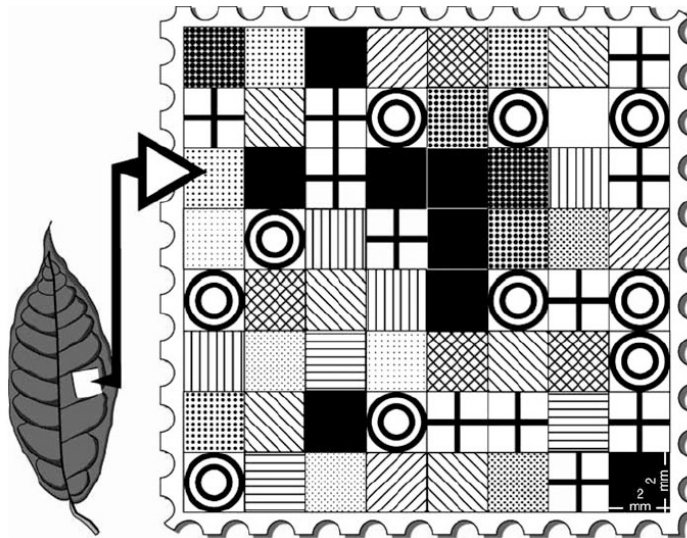


Figura 5. Ejemplificación de la diversidad de microorganismos en los tejidos internos de una hoja, cada trama ejemplifica un microorganismo diferente (endófitos y fitopatógenos) (Herre et al., 2007).

Finalmente, en la **Figura 6** se muestra el ciclo de vida propuesto para los hongos endófitos foliares tropicales y la colonización de su planta hospedera.

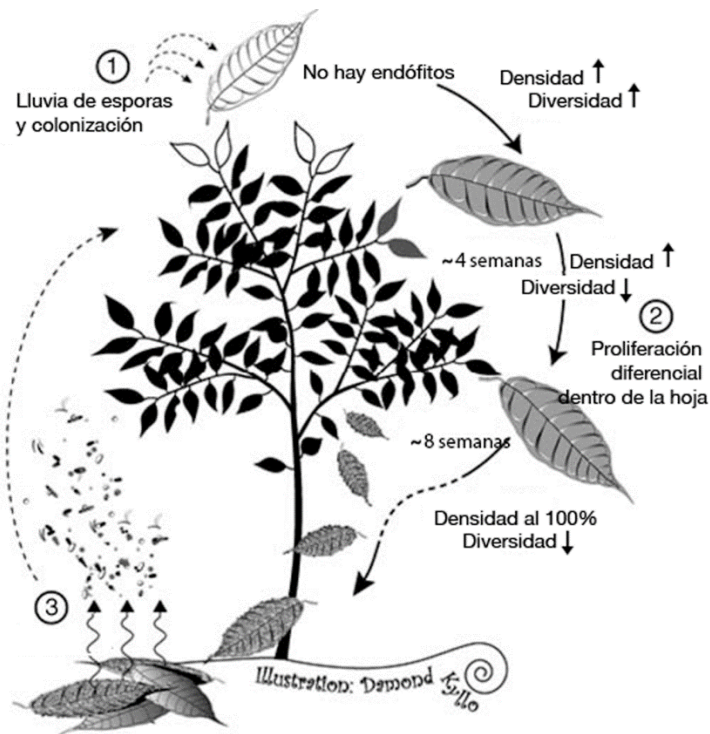


Figura 6. Ciclo de vida propuesto para los hongos endofíticos foliares tropicales y sus plantas hospedantes.

1) Las esporas aterrizan sobre la superficie de las hojas y, al mojarse, germinan y penetran en la cutícula de la hoja. Después de unas semanas, la densidad de infección por hongos endófitos dentro de la hoja parece saturarse con una diversidad muy alta. 2) Después de varios meses, la diversidad de hongos endófitos por lo general disminuye. 3) Al llegar a la senescencia y abscisión foliar, los endófitos esporulan y el ciclo comienza de nuevo. (Modificado de Herre et al., 2007)

3 Metabolitos secundarios de hongos endófitos

La naturaleza química de los metabolitos secundarios bioactivos producidos por hongos endófitos es diversa. Los principales grupos químicos corresponden a terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides, compuestos aromáticos, policétidos, quinonas, compuestos alifáticos y péptidos (Guo et al., 2008; Mousa et al., 2013; Strobel et al., 2004). Los metabolitos producidos por los hongos endófitos pueden tener un papel importante en el desarrollo de la hospedera como la producción de fitohormonas. Tal es el caso de las giberelinas producidas por los endófitos *Fusarium fujikuroi* (Kharwar et al., 2011), *Phoma glomerata* LWL2 (Kurepin et al., 2014) y *Penicillium funiculosum* (Khan & Lee, 2013), que además de estimular el crecimiento de las hospederas, la presencia de los endófitos y sus metabolitos mejoran el desempeño de las hospederas en condiciones de estrés abiótico (Waqas et al., 2012). En algunas simbiosis “planta-hongo endófito” se ha observado que los microorganismos endófitos confieren protección contra el ataque de herbívoros (vertebrados e invertebrados), mediante la producción de compuestos tóxicos para los depredadores,

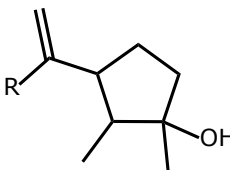
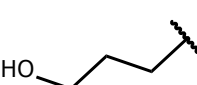
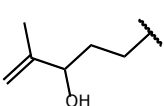
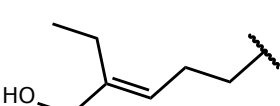
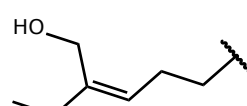
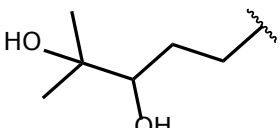
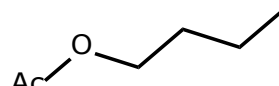
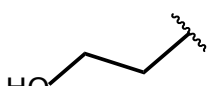
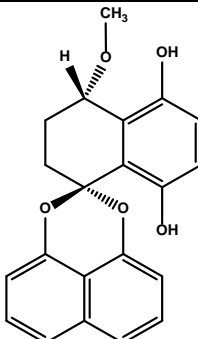


como los alcaloides ergonovina y ácido lisérgico, producidos por hongos endófitos del género *Epichloë* en *Achnatherum robustum* (Shymanovich et al., 2015), o la síntesis de compuestos alelopáticos que inhiben el crecimiento de los competidores de la hospedera (Hao et al., 2015), o confiriendo a la hospedera de protección contra el ataque de patógenos como hongos y bacterias, como es el caso de la altersetina, un alcaloide producido por *Alternaria* spp. y que tiene actividad antagónica contra bacterias Gram positivas (Hellwig et al., 2002).

Como se mencionó en el inciso anterior, la hipótesis del antagonismo balanceado (**Figura 5**) pone en evidencia el potencial que tienen los hongos endófitos para la biosíntesis de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y/o fitotóxica, entre otras, como resultado de las complejas interacciones que establecen con su hospedera y con otros microorganismos competidores, siendo estos compuestos de gran importancia para el desarrollo de agroquímicos alternativos, de origen natural que tengan menores efectos tóxicos para el ser humano y el ambiente.

A continuación, en el **Cuadro 1** se muestran ejemplos selectos de metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos, con actividad antifúngica y/o fitotóxica.

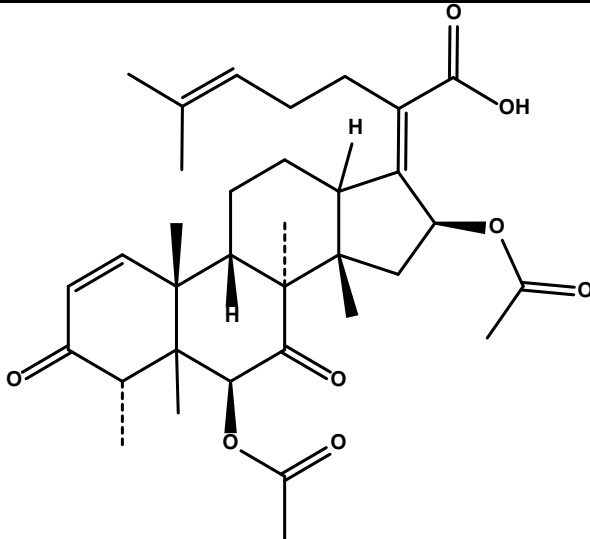
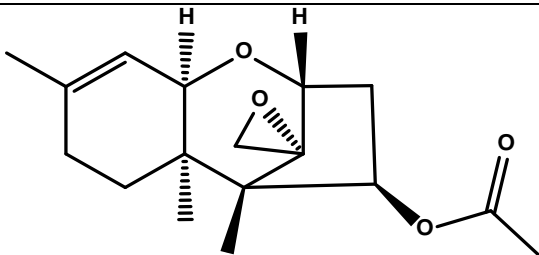
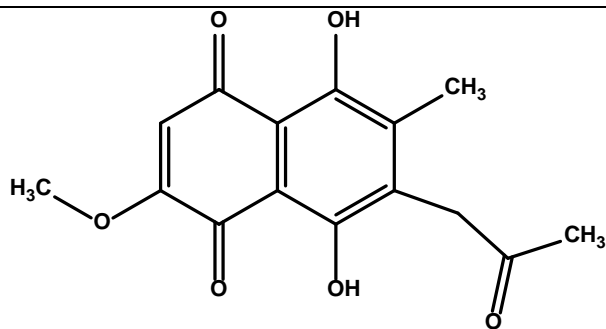
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos con actividad biológica.

Metabolito secundario *endófito §hospedera	Estructura	Actividad biológica
	Chokol 	
Chokoles A-G * <i>Epichloë typhina</i> § <i>Phleum pratense</i> (Koshino et al., 1989)	A 	Fungitóxicos
	B 	
	C 	
	D 	
	E 	
	F 	
	G 	
Palmarumicina EG1 * <i>Edenia gomezpompae</i> § <i>Callicarpa acuminata</i> (Macías-Rubalcava et al., 2014)		Fitotóxica



Metabolito secundario *endófito §hospedera	Estructura	Actividad biológica
Nodulisporinas A y B <i>*Nodulisporium sp</i> <i>§Juniperus cedrus</i> (Dai et al., 2006)	<p>A</p> <p>B</p>	Antifúngica
Helmidiol (pirenoforol) <i>* Phoma sp.</i> <i>§Fagonia cretica</i> (Krohn et al., 2007)		Antifúngica
Pestacina <i>*Pestalotiopsis microspora</i> <i>§ Terminalia morobensis</i> (Harper et al., 2003)		Antifúngica y antioxidante
Jesterona <i>*Pestalotiopsis jesteri</i> <i>§ Fragraea bodenii</i> (Li & Strobel, 2001)		Antioomiceto



Metabolito secundario *endófito §hospedera	Estructura	Actividad biológica
Ácido helvólico * <i>Aspergillus fumigatus</i> § <i>Melia azedarach</i> (Li et al., 2012) * <i>Pichia guilliermondii</i> § <i>Paris polyphylla</i> (Zhao et al., 2010)		Antifúngico
Tricodermina * <i>Trichoderma brevicompactum</i> § <i>Allium sativum</i> (Shentu et al., 2014)		Antifúngica
Javanicina * <i>Chloridium</i> sp § <i>Azadirachta indica</i> (Kharwar et al., 2009)		Antibacterial

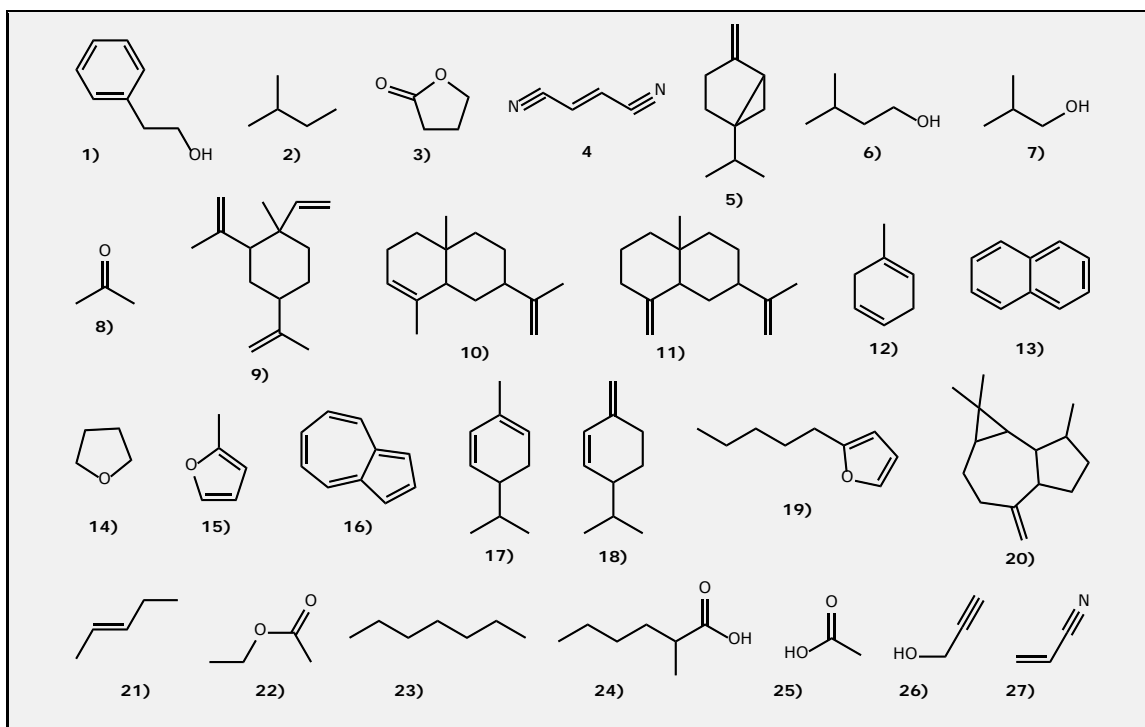
3.1 Metabolitos secundarios volátiles de hongos endófitos.

De los productos naturales con gran interés en la actualidad para el desarrollo de agentes de control biológico o de bioplaguicidas, son los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés), producidos particularmente por bacterias y hongos (Hung et al., 2015;



Morath et al., 2012; Müller et al., 2013). Los hongos endófitos son capaces de producir una enorme variedad de compuestos volátiles, incluyendo terpenos, derivados de azulenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, furanos, ésteres, entre otros, que pueden tener actividad antagónica sobre otros organismos (Kramer & Abraham, 2012; Sánchez-Fernández et al., 2016; Sánchez-Ortiz et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016) y, además, algunos VOCs pueden fungir como reguladores del crecimiento de su hospedera (Bailly & Weisskopf, 2012; Kanchiswamy et al., 2015). En el **Cuadro 2** se muestran ejemplos selectos de los principales VOCs producidos por hongos endófitos.

Cuadro 2. Compuestos comúnmente identificados en las mezclas VOCs producidos por diversos géneros de hongos endófitos (modificado de Kanchiswamy et al., 2015).



1 = alcohol feniletílico; 2 = 2-metil-butano; 3 = β -butirolactona; 4 = 2-butendinitrilo; 5 = sabineno; 6 = 3-metil-1-butanol; 7 = 2-metil-propanol; 8 = acetona; 9 = β -elemeno; 10 = α -selineno; 11 = β -selineno; 12 = 2,5-dihidrotolueno; 13 = naftaleno; 14 = tetrahydrofurano; 15 = 2-metil-furano; 16 = azuleno; 17 = α -felandreno; 18 = β -felandreno; 19 = 2-pentil-furano; 20 = aromandreno; 21 = 2-penteno; 22 = etil acetato; 23 = heptano; 24 = 2-metil-hexanoato; 25 = ácido acético; 26 = 2-propil-1-ol.

Los VOCs son sustancias con bajo peso molecular y alta presión de vapor; su alta volatilidad a temperatura ambiente los hace adecuados para la biofumigación postcosecha, una técnica utilizada en el control de plagas y/o enfermedades en la que no se humedece al producto y se minimiza la manipulación (Spadoni et al., 2015). Una ventaja en el uso de



VOCs producidos por microorganismos es que son mezclas de compuestos pertenecientes a diversas clases químicas y las propiedades biocidas o biostáticas que estas mezclas ejercen son el resultado del efecto sinérgico o aditivo que no se obtendrían con compuestos puros (Deshmukh & Misra, 2016; Medina-Romero, datos no publicados).

Quizás el ejemplo más representativo de hongos endófitos productores de VOCs son los pertenecientes al género *Muscodor* (**Cuadro 3**), en especial *M. albus*, un endófito aislado de diversas hospederas que habitan esencialmente en clima tropical (Atmosukarto et al., 2005; Ezra & Strobel, 2003; Worapong et al., 2002), cuyos VOCs son altamente bioactivos contra bacterias y hongos (Ezra et al., 2003). Actualmente, *M. albus* es utilizado como método de micofumigación para la conservación de frutas y verduras, como las uvas (Mercier et al., 2017) o alimentos como la carne de res y pavo (Faith et al., 2015).

Por otra parte, los hongos endófitos del género *Hypoxylon*, también producen una amplia variedad de VOCs bioactivos. Así por ejemplo, *Hypoxylon* sp. aislado de *Persea indica* (Tomscheck et al., 2010), *Hypoxylon anthochroum* (aislamiento Blaci) aislado de *Bursera lancifolia* (Ulloa-Benítez et al., 2016) y *Nodulisporium* sp. aislamiento GS4d2II1a (*Hypoxylon anthochroum*) (Sánchez-Fernández et al., 2016) aislado de *Gliricidia sepium* (Sánchez-Fernández et al., 2016), biosintetizan entre otros VOCs al 1,8-cineol como constituyente mayoritario. Este compuesto ha demostrado tener importante actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica (Morcia et al., 2011; Ulloa-Benítez et al., 2016), por lo que las especies del género *Hypoxylon* poseen un elevado potencial para su uso como agentes de control biológico o micofumigación.

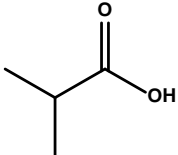
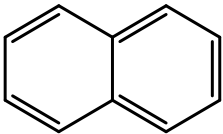
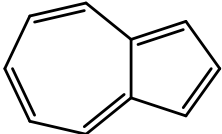
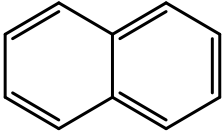
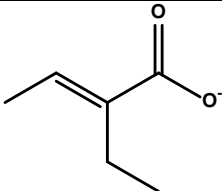
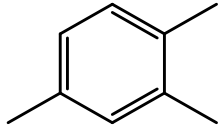
En el **Cuadro 3** se muestran ejemplos selectos de VOCs mayoritarios presentes en las mezclas de VOCs analizados e identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, de algunas especies de hongos endófitos pertenecientes a los géneros *Muscodor* e *Hypoxylon*.



ANTECEDENTES



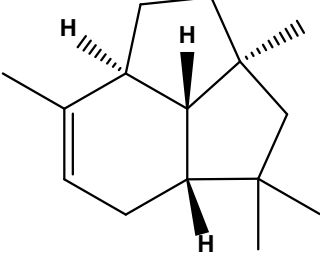
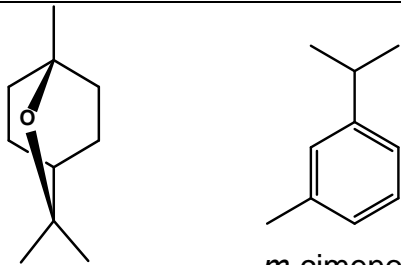
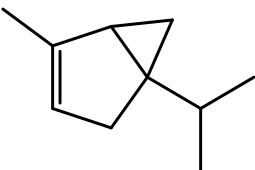
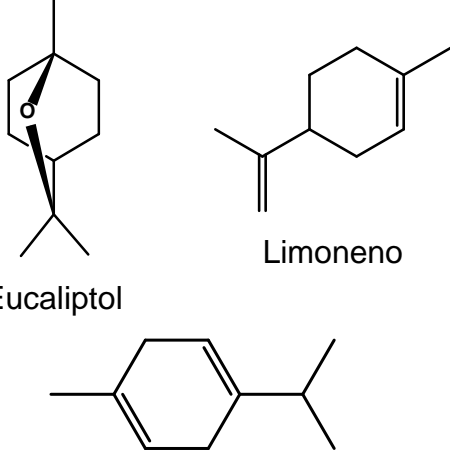
Cuadro 3. Compuestos orgánicos volátiles mayoritarios producidos por hongos endófitos del género *Muscodora* e *Hypoxylon*.

*Hongo endófito / §Hospedera	Metabolitos mayoritarios	Actividad de la mezcla de VOCs
* <i>M. albus</i> § <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Worapong et al., 2001)	 Ácido 2-metilpropanoico	Antibacterial Antifúngica
	 Derivados de naftaleno	
	 Derivados de azuleno	
* <i>M. vitigenus</i> § <i>Paullinia paullinioides</i> (Daisy et al., 2002)	 Naftaleno	Repelente antiinsectos
* <i>M. roseus</i> § <i>Grevillea pteridifolia</i> (Worapong et al., 2002)	 2-etilbutanoato	Antifúngicos
	 1,2,4-trimetilbenceno	



ANTECEDENTES



*Hongo endófito / §Hospedera	Metabolitos mayoritarios	Actividad de la mezcla de VOCs
<p><i>*M. yucatanensis</i> <i>§Bursera simaruba</i> (Macías-Rubalcava et al., 2010)</p>	 <p>1R,4S,7S,11R-2,2,4,8- Tetrametiltricyclo[5.3.1.0(4,11)]undec- 8-eno</p>	<p>Fitotóxico</p>
<p><i>*Hypoxylon anthochroum</i> aislamiento Blaci <i>§Bursera lancifolia</i> (Ulloa-Benítez et al., 2016)</p>	 <p>Eucaliptol</p>  <p>α-tujeno</p>	<p>Antifúngico Fitotóxico</p>
<p><i>*Nodulisporium</i> sp. aislamiento GS4d2II1a (<i>Hypoxylon</i>) <i>§Gliricidia sepium</i> (Sánchez-Fernández et al., 2016)</p>	 <p>Eucaliptol</p> <p>Limoneno</p> <p>γ-terpineno</p>	<p>Antifúngico Antioomiceto</p>



III HIPÓTESIS

Los hongos endófitos tienen que sintetizar metabolitos secundarios para poder competir contra otros microorganismos que coexisten en su nicho ecológico, además de producir compuestos que contrarresten las defensas de las plantas hospederas, con el fin por un lado de garantizar su subsistencia dentro de los tejidos vegetales y por otro, contender con las defensas químicas de su hospedera. *Por ello, el estudio de los hongos endófitos podría evidenciar compuestos novedosos con actividad biológica, incluyendo compuestos fitotóxicos, antifúngicos y antioomicetos.*



IV OBJETIVOS

1 Objetivos generales

- Realizar la descripción macroscópica y microscópica del hongo endófito Smeg4 aislado de *Sapium macrocarpum*, y estudiar su potencial antagonico mediante bioensayos de antagonismo directo múltiple contra endófitos y fitopatógenos de la misma planta hospedera, y contra fitopatógenos con importancia económica.
- Establecer el potencial antifúngico, antioomiceto y fitotóxico de la mezcla de compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito Smeg4 y de los metabolitos secundarios no volátiles biosintetizados por el endófito, a través de la evaluación de su efecto sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos y cuatro plantas con importancia económica en la agricultura, con la finalidad de evidenciar metabolitos secundarios con actividad antifúngica, antioomiceto y herbicida que puedan ser usados en el desarrollo de agroquímicos de origen natural, cuyo impacto ambiental y toxicológico sea menor.

2 Objetivos particulares

- Realizar la descripción detallada de las características macroscópicas y microscópicas del hongo endófito Smeg4, para establecer en lo posible el género y especie.
- Establecer el potencial antagonico de los metabolitos secundarios producidos por el hongo Smeg4 en competencia con hongos aislados de la misma planta hospedera, mediante bioensayos de antagonismo directo múltiple.
- Evidenciar la producción de compuestos orgánicos volátiles con actividad antifúngica y antioomiceto del hongo Smeg4 en diferentes días de crecimiento, sobre cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Pythium ultimum*, mediante bioensayos de antagonismo directo múltiple y en caja de Petri dividida.



- Demostrar la producción de compuestos orgánicos volátiles con actividad fitotóxica del hongo Smeg4 en diferentes días de crecimiento, sobre los procesos de germinación, respiración y crecimiento de la raíz de cuatro plantas prueba: *Amaranthus hypochondriacus*, *Panicum miliaceum*, *Trifolium pratense* y *Medicago sativa*, mediante bioensayos de antagonismo en caja de Petri dividida.
- Cultivar al hongo endófito Smeg4 en medio caldo papa dextrosa bajo condiciones de incubación estáticas, y obtener los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, mediante procesos sucesivos de reparto y maceración, respectivamente.
- Realizar la comparación cualitativa de los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo Smeg4, mediante cromatografía en capa fina.
- Establecer cuantitativamente el potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo Smeg4, sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, mediante la técnica de dilución en agar.
- Establecer cuantitativamente el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos sobre los procesos de germinación, respiración y crecimiento de la raíz de las cuatro plantas prueba, empleando el método de dilución en agar.
- Determinar las concentraciones inhibitorias medias sobre el crecimiento de los hongos, oomicetos y plantas de prueba.
- Poner en evidencia al hongo endófito Smeg4 asilado de *S. macrocarpum* como una fuente de metabolitos secundarios que conduzcan al desarrollo de nuevos agentes antifúngicos, antioomicetos o herbicidas alternativos y/o al desarrollo de un agente de control biológico.



VI MATERIALES Y MÉTODOS

1 Material fúngico

1.1 Hongo endófito Smeg4

El hongo endófito Smeg4 fue aislado a partir de hojas sanas de la planta *Sapium macrocarpum* recolectadas en septiembre de 2010 en una zona de alta biodiversidad, la 'Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla' (REBIOSH) ubicada en el municipio de Quilamula (18° 30' 4.1" N 98° 51' 52" O y 18° 32' 12.2" N 99° 02' 05" O; 1080-1230 m sobre el nivel del mar), estado de Morelos, México (Sánchez-Fernández, 2016).

1.2 Hongos endófitos y fitopatógenos de *S. macrocarpum*

Los bioensayos de antagonismo múltiple directo contra competidores aislados de la misma planta hospedera, se llevaron a cabo utilizando 12 hongos endófitos obtenidos previamente de hojas sanas de *S. macrocarpum* y de un hongo fitopatógeno aislado de hojas con signos de enfermedad, pero sin daño por herbívoros (Sánchez-Fernández et al., 2016; Villanueva Silva, 2014).

1.3 Determinación de la tasa de crecimiento de los hongos aislados de *S. macrocarpum*

La tasa de crecimiento de todos los microorganismos en estudio se determinó efectuando dos mediciones perpendiculares de las colonias de los hongos creciendo en cajas de Petri de 10 cm de diámetro en medio PDA por cuadruplicado. El diámetro promedio del micelio se graficó en función de los días de crecimiento y se estableció su tasa de crecimiento en cm por día. El crecimiento de los 13 hongos de *S. macrocarpum* (**Cuadro 4**) fue clasificado arbitrariamente de acuerdo a su tasa de crecimiento en lento (≤ 1.00 cm/día), moderado ($>1.01 < 2.00$) y rápido (≥ 2.00 cm/día) (Villanueva Silva, 2014). Los bioensayos de antagonismo se realizaron de acuerdo con las tasas de crecimiento de los microorganismos competidores.



Cuadro 4. Tasa de crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógeno aislados de hojas de *S. macrocarpum*.

Clave	Tasa de crecimiento (cm/día)	Clave	Tasa de crecimiento (cm/día)
Sme1	3.2	Sme9	0.8
Sme2	1.2	Sme10	0.9
Sme3	1.1	Sme11	0.8
Sme5	1.0	SMe12	0.8
Sme6	0.8	Sme13	1.3
Sme7	1.3	Smf1	0.9
Sme8	0.9	Smeg4	0.6

La letra que antecede al número en la clave indica el tipo de hongo: e= endófito, f= fitopatógeno y eg= endófito generalista.

1.4 Microorganismos fitopatógenos de prueba

Como microorganismos de prueba para establecer el potencial antimicrobiano se utilizaron cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, dos hongos verdaderos: *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* (Eumycota); y dos oomicetos: *Phytophthora capsici* y *Pythium ultimum* (Oomycota). Las cepas de los microorganismos fueron donadas por la Dra. Olga Gómez y la M. en C. Bertha Tlapal Bolaños, del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México (Sánchez-Fernández et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016).

2 Plantas de prueba

Para los bioensayos de fitotoxicidad se emplearon tres especies dicotiledóneas: *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae), *Trifolium pratense* y *Medicago sativa* (Fabaceae); además una especie monocotiledónea: *Panicum miliaceum* (Poaceae). Las semillas fueron adquiridas en Casa Cobos S.A. de C.V., Central de Abastos, Ciudad de México, México (García-Méndez et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016).



3 Medios de cultivo

3.1 Agar (2%)

Para la preparación del medio sólido agar al 2% se pesaron 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) y se colocaron en un frasco de vidrio al cual se le agregó 1 L de agua destilada (Sánchez-Ortiz, 2016). El medio se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C (Leslie & Summerell, 2006).

3.2 Agar papa-dextrosa (PDA)

Cada litro de PDA se preparó pesando 200 g de papa picada, previamente lavada y descortezada. Posteriormente, se realizó la cocción de la papa con 1 L de agua destilada, permitiendo la ebullición por 20 minutos. Transcurrido el tiempo de cocción, se filtró el caldo con un colador de malla fina. Al caldo de papa se le adicionaron 20 g de dextrosa, 12 g de agar para obtener PDA al 1.2% o 20 g para obtener PDA al 2% y agua suficiente hasta completar un volumen final de 1 L (Sánchez-Ortiz, 2016). El medio se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C (Leslie et al., 2006).

3.3 Caldo de papa-dextrosa (CPD)

Para obtener 1 L de CPD se empleó la misma metodología utilizada en la preparación de PDA, con la modificación de no agregar agar (Sánchez-Fernández, 2016).

4 Caracterización macroscópica y microscópica del hongo endófito Smeg4 aislado de la planta *S. macrocarpum*

Para la descripción macroscópica y microscópica del hongo endófito Smeg4 se utilizaron cuatro cultivos en cajas de Petri de 10 cm sobre medio de cultivo PDA al 2%. Al centro de cada caja, se colocó un inóculo de 5 mm de diámetro realizado con un sacabocados estéril. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente y en condición de luz artificial-oscuridad de 12:12 h.

Las características macroscópicas fueron descritas mediante la observación periódica de los microorganismos hasta cubrir la totalidad de la superficie del medio de cultivo. Las



características descritas fueron: color del micelio (anverso y reverso), textura, consistencia, tipo de crecimiento, presencia de estructuras de reproducción, producción de exudado y pigmentos difusibles en el medio de cultivo. Las observaciones se hicieron empleando un microscópico estereoscópico (MOTIC 102M) (Leslie et al., 2006; Sánchez-Fernández, 2016; Sánchez-Ortiz, 2016).

Las características microscópicas fueron descritas mediante preparaciones de micelio fresco que se obtuvieron por la técnica de impronta con cinta adhesiva Scotch®. Las preparaciones se tiñeron con rojo congo o azul de lactofenol y se realizaron observaciones con un microscopio óptico (MOTIC® modelo BA410), con los objetivos 40x y 100x. Las características descritas fueron: tipo de hifas y formación de estructuras de reproducción sexuales o asexuales, además se tomaron fotografías con una cámara MOTICAM® 2000 (Sánchez-Fernández, 2016; Sánchez-Ortiz, 2016).

5 Bioensayos de antagonismo múltiple directo

5.1 Hongo endófito Smeg4 vs microorganismos fúngicos aislados de la misma planta hospedera

El potencial antagónico *in vitro* del endófito Smeg4 se estableció mediante bioensayos de antagonismo múltiple sobre 12 microorganismos fúngicos aislados de la misma planta hospedera. El experimento se realizó en refractarios marca Pyrex® de 33 x 22 cm, conteniendo 200 mL de medio de cultivo PDA al 2% como sustrato. Al centro del refractario se pusieron 15 inóculos de 5 mm de diámetro del hongo endófito Smeg4, distribuidos equidistantemente en 3 filas y 5 columnas (**Figura 7**). El hongo endófito de prueba se incubó durante dos días, libre de competidores, a temperatura ambiente y en condiciones de luz artificial-oscuridad de 12:12 h. Trascurrido este periodo, se colocaron alrededor de los inóculos de Smeg4 a los microorganismos competidores (hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *S. macrocarpum*). El experimento se realizó por triplicado, bajo un diseño completamente al azar. Como control negativo de crecimiento se inocularon los microorganismos competidores sin la presencia del hongo endófito de prueba. El crecimiento de los microorganismos competidores se monitoreó periódicamente realizando

mediciones de los diámetros de los hongos competidores a los 3, 5 y 10 días de interacción. Se designó con la letra “a” al crecimiento radial (diámetro en cm) del competidor en interacción antagónica con el endófito de prueba y con la letra “b” al crecimiento radial del competidor sin la presencia del endófito de prueba. El porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos de prueba se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{b - a}{b} * 100$$

Los promedios del porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de cada microorganismo competidor se analizaron mediante una t de student pareada con una significancia de $p < 0.05$ (Sánchez-Fernández, 2016; Zar, 2010).

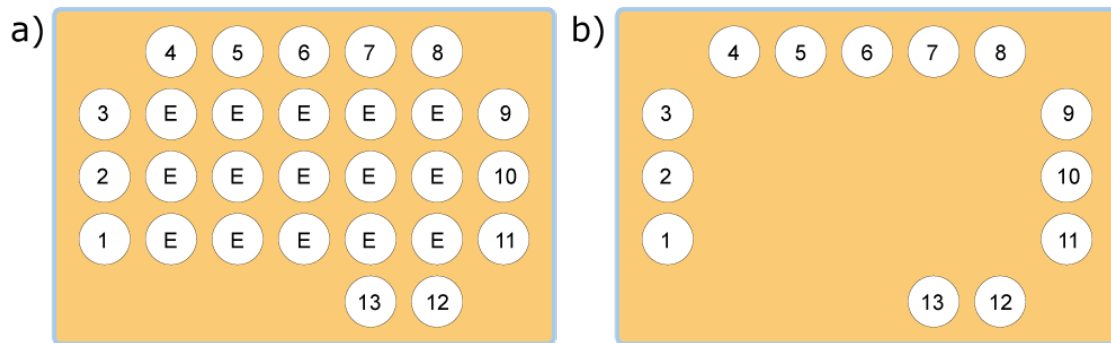


Figura 7. Diseño del bioensayo de antagonismo múltiple: a) Bioensayo con los microorganismos competidores en interacción antagónica; b) Bioensayo control de crecimiento de los hongos de prueba sin la presencia del endófito Smeg4. E= hongo endófito Smeg4; Microorganismos competidores: 1= Sme1, 2= Sme2, 3= Sme3, 4= Sme5, 5= Sme6, 6= Sme7, 7= Sme8, 8= Sme9, 9= Sme10, 10= Sme11, 11= Sme12, 12= Sme13 y 13= Smf1.

5.2 Endófito Smeg4 vs microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura

El potencial antagónico del hongo endófito Smeg4 sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura se llevó a cabo a través de bioensayos de antagonismo múltiple directo *in vitro*, empleando cajas de Petri de 15 cm de diámetro conteniendo 40 mL de medio de cultivo PDA al 2%. El experimento consistió en colocar una fila de cuatro inóculos de 5 mm de diámetro del hongo endófito Smeg4 en el centro de las cajas de Petri, colocados de forma equidistante. Las cajas se incubaron a 28 °C en condiciones de luz artificial-oscuridad de 12:12 h durante 3, 5 y 10

días. Trascurrido el tiempo de incubación, se colocaron dos inóculos por microorganismo fitopatógeno de prueba en las orillas de la caja de Petri como se muestra en la **Figura 8**. Los microorganismos fitopatógenos utilizados fueron: *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. ultimum*. Las cajas se incubaron nuevamente a 28 °C bajo condiciones de luz artificial-oscuridad de 12:12 h. El experimento se realizó por cuadruplicado bajo un diseño completamente al azar (Sánchez-Fernández, 2016).

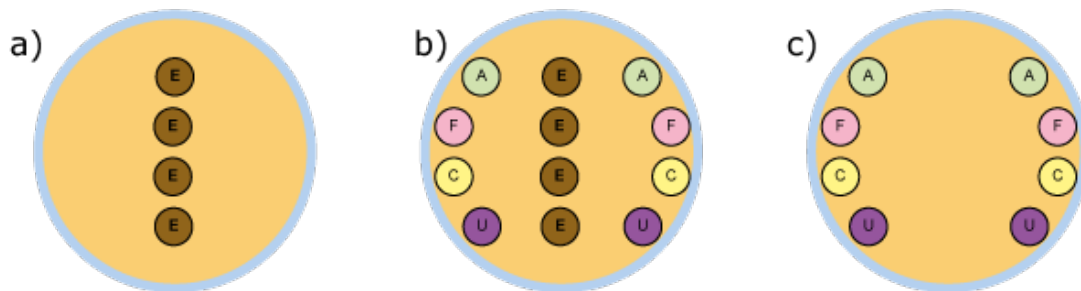


Figura 8. Diseño del bioensayo de antagonismo múltiple: a) caja de Petri control de crecimiento del hongo endófito Smeg4; b) caja de Petri en interacción antagonista; c) caja de Petri control del crecimiento de los microorganismos fitopatógenos. E= hongo endófito Smeg4, A= *A. alternata*, F= *F. oxysporum*, C=*P. capsici*, U=*P. ultimum*.

Los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos se calcularon y analizaron como se describe en la sección **5.1** de Materiales y Métodos.

6 Evaluación cuantitativa del potencial antimicrobiano y fitotóxico de los compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito Smeg4

El potencial antimicrobiano y fitotóxico de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por el hongo endófito Smeg4, se estableció empleando cajas de Petri de 10 cm de diámetro con una división. En uno de los compartimentos de la caja se colocó una fila de cuatro inóculos equidistantes del hongo endófito Smeg4, sobre 10 mL de PDA al 2% como sustrato. Las cajas se incubaron a temperatura controlada de 28 °C en condiciones de luz artificial-oscuridad de 12:12 h, por 3, 5 y 10 días. Después del tiempo de incubación, se colocaron diferentes especies de semillas o microorganismos fitopatógenos de prueba.

Cada experimento se realizó por cuadruplicado bajo un diseño completamente al azar (Sánchez-Fernández, 2016; Sánchez-Ortiz, 2016).

6.1 Potencial antifúngico y antioomiceto

La actividad antimicrobiana de los VOCs producidos por el endófito Smeg4 se estableció sobre el crecimiento radial de los cuatro fitopatógenos con importancia económica en la agricultura. Transcurrido el periodo de incubación del hongo endófito Smeg4, se colocaron 10 mL de PDA al 2% en el compartimento vacío de la caja de Petri, y se inocularon los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba como se muestra en la **Figura 9**. Los controles de crecimiento utilizados para establecer los porcentajes de inhibición correspondieron a cajas de Petri incubadas sin la presencia del hongo endófito Smeg4. Los hongos verdaderos *A. alternata* y *F. oxysporum* se incubaron por cuatro días y los oomicetos fitopatógenos *P. capsici* y *P. ultimum* por dos días (Sánchez-Fernández, 2016; Sánchez-Ortiz, 2016).

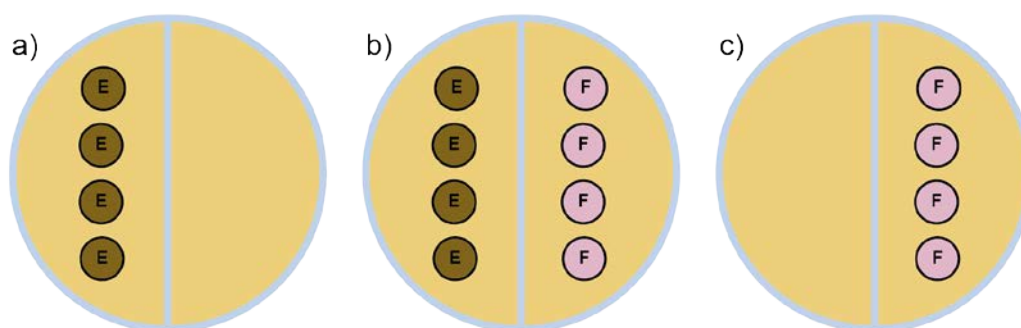


Figura 9. Diseño del bioensayo en caja de Petri dividida para establecer el potencial antifúngico y antioomiceto de los VOCs producidos por el hongo endófito Smeg4: a) caja control de crecimiento del hongo endófito SMeg4; b) caja de la interacción antagonista; c) caja control de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos

Los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba se calcularon y analizaron como se señaló en la sección **5.1** de Materiales y Métodos.

6.2 Potencial fitotóxico.

La actividad fitotóxica de los VOCs producidos por el endófito Smeg4 se evaluó monitoreando su efecto sobre los procesos de germinación, crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las plantas de prueba. Para cada experimento se colocaron 30 semillas sobre 10 mL de agar al 1% como medio de cultivo. Como control se utilizaron cajas con las semillas sin la presencia del hongo endófito Smeg4. Las cajas se incubaron a 27 °C por 24 h para semillas de *A. hypochondriacus* y 48 h para las semillas de *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*.

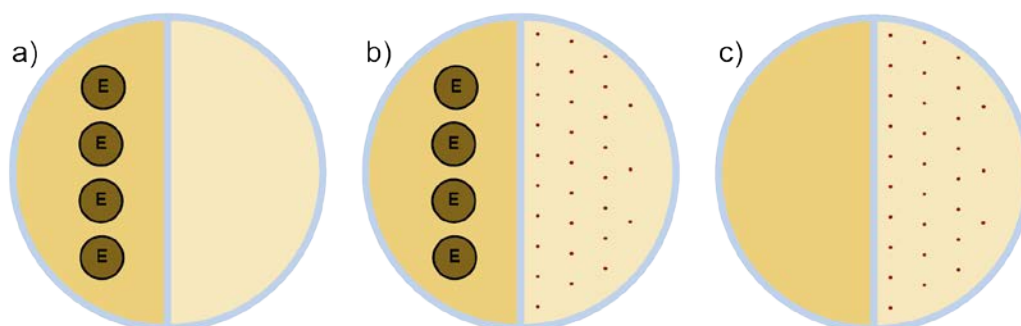


Figura 10. Bioensayo en caja de dividida para la evaluación de la actividad fitotóxica de los VOCs producidos por el hongo endófito Smeg4: a) caja control de crecimiento del hongo endófito SMeg4; b) caja en interacción antagonista; c) Caja control de crecimiento de las semillas.

Trascurrido el periodo de incubación, se contabilizaron las semillas no germinadas y se midió la longitud de la raíz. El efecto sobre la respiración se evaluó colocando las 30 semillas o plántulas en un contenedor de vidrio con 3-5 mL de agua destilada dependiendo de la semilla de prueba, y se monitoreó la cantidad de oxígeno consumido por las plántulas empleando un oxímetro YSI® modelo 5300A, cada 5 s por 3 min. La cantidad de oxígeno consumido por las plántulas se determinó mediante un análisis de regresión lineal simple de la curva generada.

Los resultados de germinación, crecimiento de la raíz y consumo de oxígeno, se analizaron mediante ANOVA de una vía, modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD, utilizando el programa GraphPad Prism versión 7.00 (Ibarra-Martínez, 2015; Sánchez-Fernández, 2016).



7 Cultivo en medio líquido del hongo endófito Smeg4

7.1 Cultivo a pequeña escala

El cultivo en medio líquido del hongo Smeg4 en pequeña escala se realizó empleando un matraz Fernbach de 3 L y como sustrato 1.2 L del medio de cultivo caldo papa dextrosa (CPD). En el medio de cultivo se colocaron 10 inóculos de micelio de 10 mm de diámetro, provenientes de un cultivo sobre medio sólido de 7 días de crecimiento (PDA al 1.2%) obtenidos con un sacabocados estéril. El endófito Smeg4 se incubó por un lapso de 30 días a temperatura ambiente bajo condiciones estáticas y de luz artificial-oscuridad de 12:12 h (Sánchez-Fernández, 2016).

7.2 Cultivo a mediana escala

Los cultivos a mediana escala se realizaron utilizando dos garrafones de vidrio de 20 L de capacidad y como sustrato 4 L de CPD por contenedor. En el medio de cultivo de cada uno de los garrafones se colocó un cultivo en caja de Petri de 10 cm de diámetro sobre medio sólido de 7 días de crecimiento (PDA al 1.2%), cortado en pedazos de no más de 1 cm. El endófito Smeg4 se incubó por un lapso de 30 días a temperatura ambiente bajo condiciones estáticas y de luz artificial-oscuridad de 12:12 h (Sánchez-Fernández, 2016).

8 Obtención de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio

8.1 Pequeña escala

Finalizados los 30 días de incubación del hongo endófito Smeg4 en medio CPD, se realizó la separación del medio de cultivo y del micelio, mediante una filtración rápida utilizando gasa. Para la obtención de los extractos orgánicos del micelio, se realizaron maceraciones sucesivas con CH_2Cl_2 (500 mL, 24 h; x 5), y posteriormente se usó AcOEt (500 mL, 24 h; x 5). El medio de cultivo, se sometió a particiones sucesivas con los mismos disolventes orgánicos empleados en las maceraciones. Cada extracto orgánico se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío con un rotaevaporador.



Los extractos obtenidos a partir del medio de cultivo y micelio del hongo endófito Smeg4, se analizaron por cromatografía en capa fina para determinar las similitudes en sus perfiles químicos entre los extractos de CH₂Cl₂ y los de AcOEt. Finalmente, se registraron los rendimientos de los extractos orgánicos (Sánchez-Fernández, 2016; Sánchez-Ortiz, 2016).

8.2 Mediana escala

Para la obtención de los extractos orgánicos de los cultivos en mediana escala, se cuadruplicó el volumen de los disolventes orgánicos utilizados para la obtención de extractos de los cultivos a pequeña escala, y se siguió la metodología descrita en el inciso anterior (Sánchez-Fernández, 2016).

9 Determinación cuantitativa del potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4, se realizó mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, empleando la técnica de dilución en agar (Ulloa-Benítez et al., 2016).

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Las muestras se prepararon pesando 20 mg de cada uno de los extractos y se disolvieron en la mínima cantidad de MeOH en un rango de 100 µL-300 µL. Posteriormente, se adicionaron 40 mL de agua destilada y 40 mL de PDA al 2%, obteniéndose una concentración final de 250 µg/mL de extracto. A cada caja de Petri se le adicionaron 5 mL de agar con extracto diluido (250 µg/mL) y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. A continuación, se colocó en el centro de cada caja de Petri un inóculo de 5 mm de diámetro del microorganismo fitopatógeno de prueba, el cual tenía 8 días de crecimiento previo sobre medio de cultivo sólido (PDA al 1.2%). Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Una vez inoculadas, las cajas de Petri se incubaron de 2 a 4 días, dependiendo del microorganismo de prueba como se indica en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos, a una temperatura de 28 °C bajo condición de luz artificial-oscuridad de 12:12 h. Como controles negativos se utilizaron PDA al 1% y PDA al 1% con MeOH



(100 μ L-300 μ L). Como controles positivos se utilizaron a una concentración de 250 μ g/mL los antimicrobianos comerciales: Prozicar® 50 P.H. (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato), para los hongos verdaderos y el Ridomil Gold 4E® (Metalaxil-m: (R)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino]propionato de metilo) para los oomicetos (Ibarra-Martínez, 2015; Sánchez-Fernández et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016).

Por otra parte, se estableció la concentración inhibitoria media (CI_{50}) del efecto antifúngico y antioomiceto, mediante la obtención de una curva concentración de extracto vs inhibición sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos de prueba, utilizando cuatro diferentes concentraciones de extracto orgánico en un rango de 250-1000 μ g/mL. Paralelamente, se determinaron las CI_{50} de los antimicrobianos Prozicar® 50 P.H y Ridomil Gold 4E®, en un rango de concentraciones de 250 -1000 μ g/mL, sobre los microorganismos *A. alternata*, *P. capsici* y *P. ultimum*, y en un intervalo de 25-200 μ g/mL para el hongo *F. oxysporum*.

Las concentraciones evaluadas para realizar la curva concentración de extracto vs efecto inhibitorio fueron establecidas con base en los resultados obtenidos previamente a la concentración de 250 μ g/mL de extracto fúngico o del antimicrobiano comercial.

Terminado el periodo de incubación, se realizaron dos mediciones perpendiculares del crecimiento del micelio de cada uno de los fitopatógenos, con la finalidad de obtener el porcentaje de inhibición promedio por microorganismo respecto a los controles negativos. Los promedios se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HDS (utilizando el programa GraphPad Prism versión 7.0, 2016) (Ibarra-Martínez, 2015; Sánchez-Fernández et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016; Zar, 2010).

10 Determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos del hongo Smeg4

La determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio se determinó evaluando los procesos de germinación, crecimiento de la raíz



y respiración, durante el proceso de germinación de las plantas prueba: *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*, utilizando la técnica de dilución en agar.

Los bioensayos se realizaron en cajas Petri de 5 cm de diámetro. Las diluciones de los extractos se prepararon con 8 mg del extracto de prueba, el cual se disolvió en la cantidad mínima necesaria de MeOH (50-150 μ L). A esta mezcla, se le agregaron 40 mL de agua destilada y 40 mL de agar al 2%, para tener una concentración final de 1% de agar y 100 μ g/mL de extracto. Posteriormente, se colocaron 5 mL de la mezcla en cada una de las cajas y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. A continuación, para cada una de las plantas prueba se colocaron 30 semillas por caja. Se utilizaron dos controles negativos: agar al 1% y agar 1% - MeOH (50-150 μ L); y un control positivo utilizando el herbicida comercial RIVAL® (glifosato: sal monoamónica de *N*-(fosfometil) glicina) a la misma concentración de prueba que los extractos fúngicos. Cada una de las determinaciones se realizó por cuadruplicado, bajo un diseño completamente al azar. Las semillas de *A. hypochondriacus* fueron incubadas por 24 h, y las de *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa* por 48 h a una temperatura de 27 °C y en condiciones de completa oscuridad.

Trascurrido el lapso de incubación, se contabilizaron las semillas no germinadas y se midió la longitud de la raíz. El efecto sobre la respiración se evaluó colocando las 30 semillas o plántulas en un contenedor de vidrio con 3-5 mL de agua destilada y se monitoreó la cantidad de oxígeno consumido por las plántulas empleando un oxímetro YSI® modelo 5300A, cada 5 s por 3 min. La cantidad de oxígeno consumido por las plántulas se determinó mediante un análisis de regresión lineal simple de la curva generada.

Además, se estableció la CI_{50} del efecto fitotóxico de los extractos orgánicos sobre las plantas prueba, mediante la obtención de una curva concentración de extracto vs efecto inhibitorio sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración, durante el proceso de germinación de las plantas prueba, utilizando cinco diferentes concentraciones de los extractos fúngicos en un intervalo de 50–500 μ g/mL. Las concentraciones de prueba fueron establecidas con base en los resultados obtenidos previamente en la evaluación del potencial fitotóxico a 100 μ g/mL. Como controles negativos se utilizaron: agar al 1% y agar al 1%-MeOH (50-150 μ L). El control positivo empleado fue el herbicida RIVAL® a cuatro



concentraciones en un intervalo de 75-500 $\mu\text{g/mL}$ (Ibarra-Martínez, 2015; Sánchez-Fernández et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016).

Los resultados de germinación, crecimiento de raíz y consumo de oxígeno, se analizaron mediante ANOVA de una vía, modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD, utilizando el programa GraphPad Prism versión 7.00 (Ibarra-Martínez, 2015; Sánchez-Fernández et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016; Zar, 2010).



VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo se desarrolló con el propósito de establecer el potencial antagónico del hongo endófito Smeg4 aislado de la planta *Sapium macrocarpum*, proveniente de una zona de alta diversidad. El endófito Smeg4 comparte características macroscópicas y microscópicas similares a otros hongos aislados de plantas hospederas de la misma reserva ecológica, lo que permitirá contribuir con el conocimiento de los hongos endófitos generalistas que se establecen en esta zona, así como aportar información al estudio de metabolitos secundarios de hongos endófitos de plantas mexicanas y al desarrollo de plaguicidas alternativos de origen natural.

Los resultados obtenidos se dividen en seis secciones: **1)** caracterización macroscópica y microscópica del hongo endófito Smeg4, **2)** bioensayos de antagonismo múltiple directo contra hongos endófitos aislados de la misma hospedera, y contra microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, **3)** determinación del potencial antimicrobiano y fitotóxico provocado por los compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo Smeg4, **4)** cultivo en pequeña y mediana escala del hongo endófito Smeg4 y obtención de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, y **5)** evaluación del potencial fitotóxico y antimicrobiano de los extractos fúngicos sobre los organismos blanco, y determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀).



1 Caracterización e identificación del hongo Smeg4

1.1 Caracterización macroscópica y microscópica del hongo endófito Smeg4

El hongo endófito Smeg4 fue aislado en el grupo de trabajo a partir de hojas sanas de la planta *S. macrocarpum* y fue categorizado como un hongo endófito generalista, por compartir características macro y microscópicas similares a las observadas en otros hongos endófitos aislados de plantas hospederas de la misma reserva ecológica, por lo que se realizó la caracterización detallada del aislamiento Smeg4 con la finalidad de establecer un posible género.

En la **Figura 11** se muestra un cultivo en medio PDA del hongo endófito Smeg4 a los 5 y 7 días de crecimiento. El crecimiento del hongo es irregular con bordes lobulados. En el anverso de la colonia, el micelio es de apariencia algodonosa, el centro es de color café y el borde es de color blanco. Por el reverso, se observan anillos de color café-amarillentos, con diferentes tonalidades dependientes de la edad del cultivo. La tasa de crecimiento del hongo es de 0.6 cm/día, y de manera arbitraria se categorizó a este hongo como de crecimiento “lento” (**Cuadro 4**, sección **1.2**).

En la **Figura 12** se muestran las fotografías de las preparaciones microscópicas en fresco, del micelio de 5 días de crecimiento del endófito Smeg4. Se observan principalmente hifas macrosifonadas, septadas, de color café claro a hialinas. Además, en las preparaciones A-D, es posible observar conidióforos ramificados. En la preparación D se observan esporas ovaladas de color café.

Las características macroscópicas y microscópicas presentes en el aislamiento Smeg4 pertenecen a las descritas para el género *Nodulisporium*, un anamorfo de *Hypoxyton* (Barnett & Hunter, 1998; Sánchez-Fernández et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016). Actualmente, se están realizando estudios de biología molecular con la finalidad de establecer de manera inequívoca el género y la especie del aislamiento Smeg4, mediante la secuenciación de la región ITS1-5.8s-ITS2 del DNA ribosomal (Sánchez-Fernández et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016).

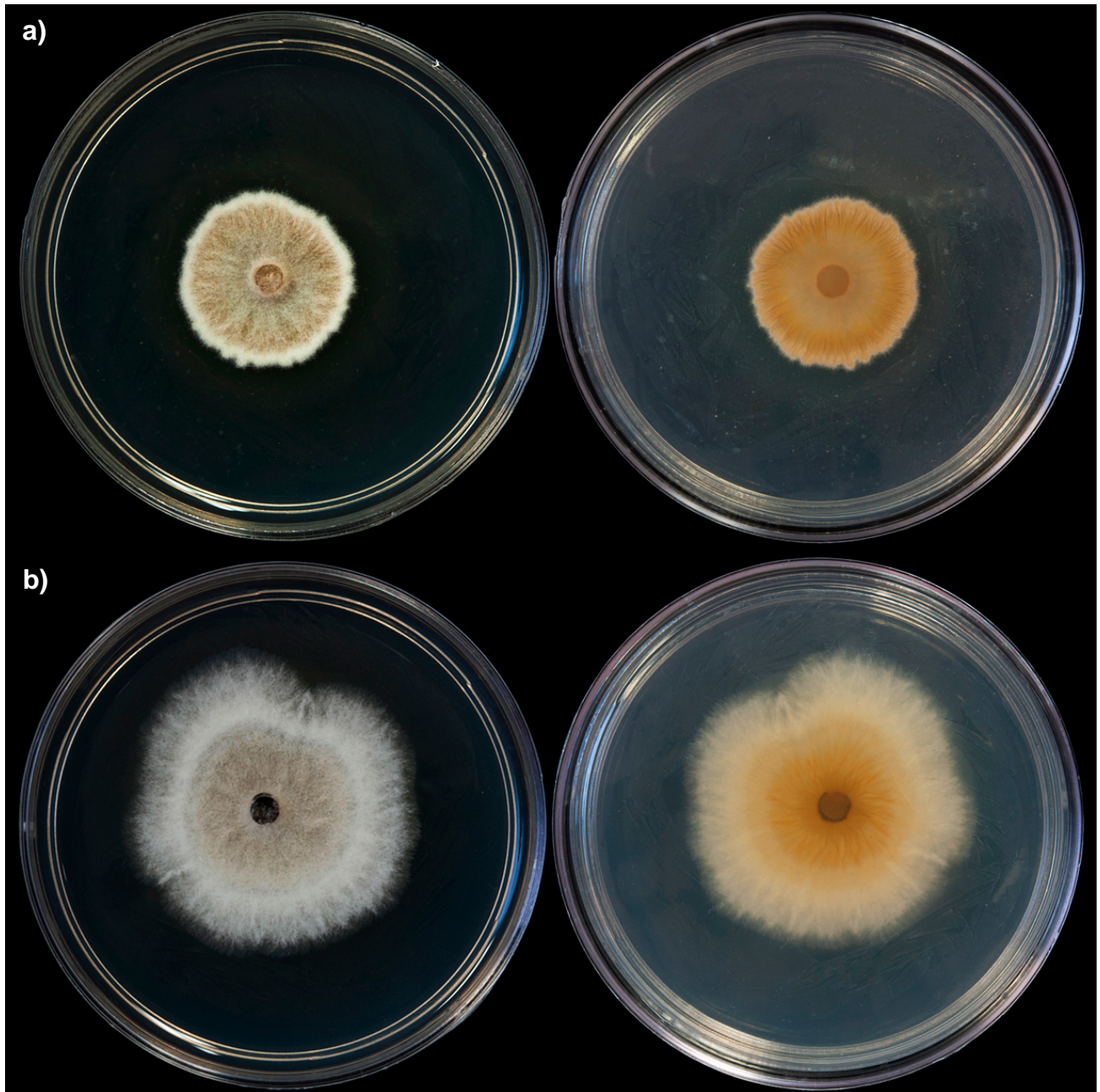


Figura 11. Hongo endófito Smeg4 creciendo sobre PDA: a) 5 días de crecimiento y b) 7 días de crecimiento. Los anversos se presentan de lado izquierdo y los reversos de lado derecho.

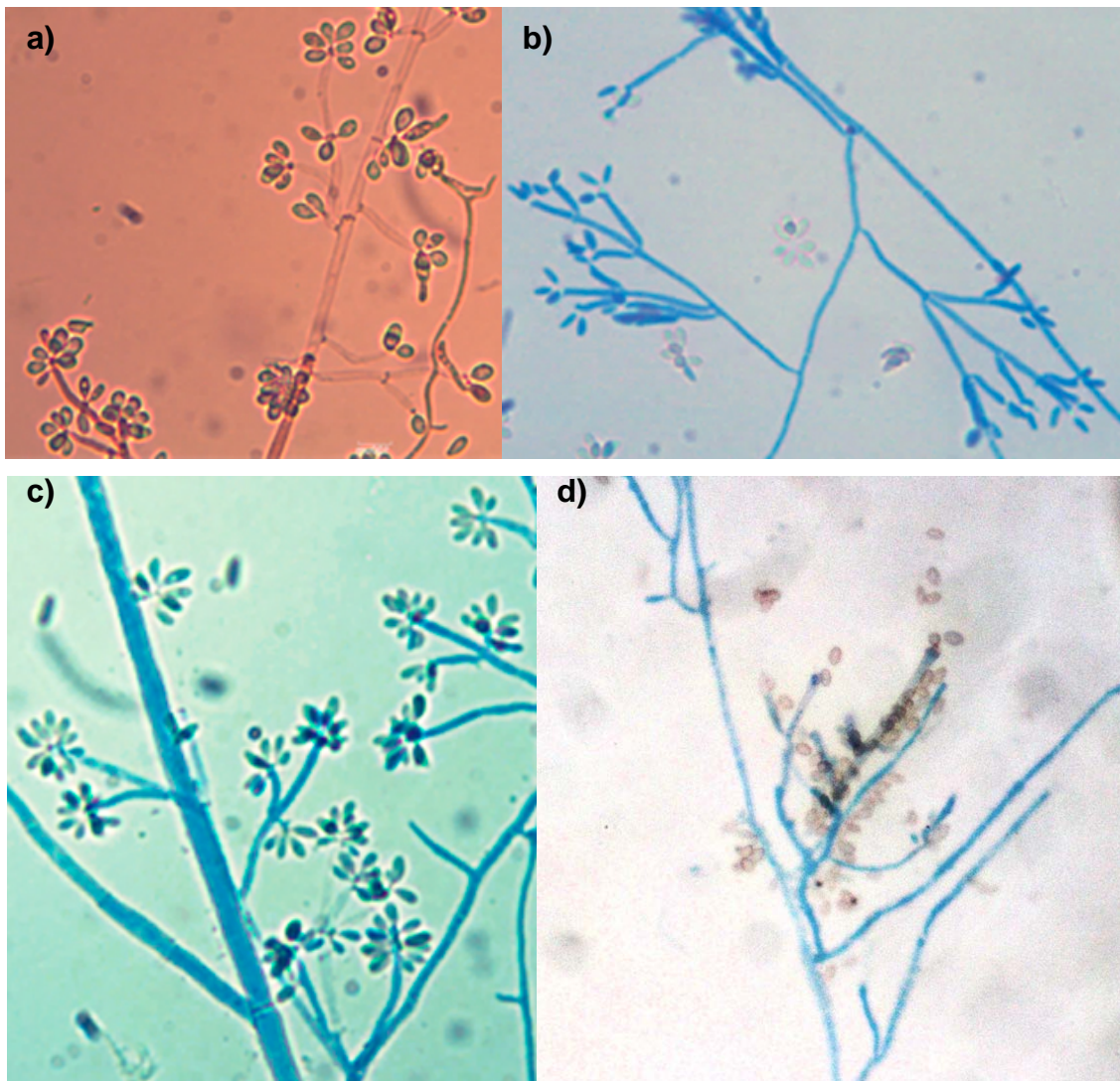


Figura 12. Micrografías del hongo endófito Smeg4 teñidas con rojo congo (a) y azul de lactofenol (b, c y d), observadas a 40x y 100x.



2 Bioensayos de antagonismo múltiple directo

2.1 Microorganismos endófitos y fitopatógenos aislados de *S. macrocarpum*

Durante la etapa de asilamiento y purificación de los hongos endófitos y fitopatógenos de la planta *S. macrocarpum*, el endófito Sme4 mostró actividad inhibitoria sobre el crecimiento de aislamientos fúngicos obtenidos de la misma hospedera. Con la finalidad de cuantificar el potencia antagónico observado, se realizó el bioensayo de antagonismo múltiple entre 12 diferentes aislamientos de hongos endófitos y un aislamiento de hongo fitopatógeno, provenientes de *S. macrocarpum*, la misma planta hospedera del aislamiento endofítico Smeg4 (Sánchez-Fernández, 2016).

En la **Figura 13** se muestra la actividad antagónica del hongo endófito Smeg4 sobre el crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógenos de prueba, inoculados al mismo tiempo y cuando el endófito Smeg4 tenía 3 días de crecimiento previo. A la izquierda se muestran los controles de crecimiento de los microorganismos competidores sin la presencia del endófito de prueba, y a la derecha se muestra el bioensayo de antagonismo múltiple del hongo endófito Smeg4, contra sus competidores a los mismos días de interacción antagónica. Al día tres, no se observa inhibición significativa sobre el crecimiento de los hongos competidores. Los micelios de los hongos Sme1, Sme2, Sme3, Sme7 y Sme13 con crecimiento moderado y rápido, entran en contacto con el micelio del hongo Smeg4. Al día cinco de interacción, la inhibición provocada por la presencia del hongo Smeg4 sobre sus competidores es significativa, además se observa la formación de barreras miceliales en las zonas de interacción entre el hongo Smeg4 y los competidores Sme1, Sme2, Sme3, Sme5, Sme6, Sme7, Sme8 y Sme13. La mayor inhibición se aprecia al día diez de interacción, en donde el hongo endófito Smeg4, además de inhibir el crecimiento de los hongos, tiene la capacidad de crecer sobre los competidores Sme5, Sme11 y Smf1. A los 5 y 10 días de interacción, se observa en el reverso de las interacciones la presencia de compuestos difusibles en el medio de cultivo producidos por el hongo Smeg4 los cuales son más evidentes en la zona interacción antagónica. Esta coloración podría indicar la presencia de metabolitos secundarios bioactivos producidos por Smeg4 responsables de la inhibición de los competidores (Gasong & Tjandrawinata, 2016; Mani et al., 2015). Cabe mencionar que,



en primera instancia, se realizaron los bioensayos de antagonismo múltiple tomando en cuenta las tasas de crecimiento de los competidores, sin embargo, el hongo Smeg4 y algunos de los competidores esporulan abundantemente, contaminando el bioensayo en cada etapa de inoculación de los 12 competidores, motivo por el cual se inocularon todos al mismo tiempo, es decir, cuando el endófito Smeg4 tenía 3 días crecimiento.

La evaluación cuantitativa del potencial antagónico del hongo endófito Smeg4 se realizó comparando el diámetro de los hongos en interacción antagónica contra el diámetro de crecimiento de su respectivo control. En la **Figura 14** se muestran los porcentajes de inhibición a los 3, 5 y 10 días de interacción antagónica. En general, los hongos competidores fueron inhibidos significativamente en un intervalo del 20-40% a los tres días de bioensayo. Cabe destacar que, a los tres días de interacción, el único competidor inhibido en más del 50% fue el Sme10. Por otra parte, el análisis de Tukey mostró que en la mayoría los porcentajes de inhibición provocados por el endófito Smeg4 a los 3 y 5 días de interacción, no son significativos, es decir, la inhibición no depende del día de interacción. A los 10 días de interacción, el crecimiento de los hongos competidores Sme1, Sme3, Sme6, Sme13 y Smf1 fue inhibido significativamente (>50%). Estos valores también fueron estadísticamente significativos con respecto a los días 3 y 5 de interacción.

La inhibición causada por el hongo Smeg4 sobre el crecimiento radial de los hongos competidores, pone en evidencia los mecanismos de defensa físicos (barreras miceliares) y químicos (metabolitos secundarios difusibles en el medio) con los que cuenta el endófito para garantizar su supervivencia dentro de su hospedera y que, posiblemente, contribuye con la defensa de la misma y, al mismo tiempo, pueden ser útiles para el desarrollo de fármacos y/o agroquímicos (Deshmukh et al., 2016; Strobel et al., 2004; Tuininga, 2005).

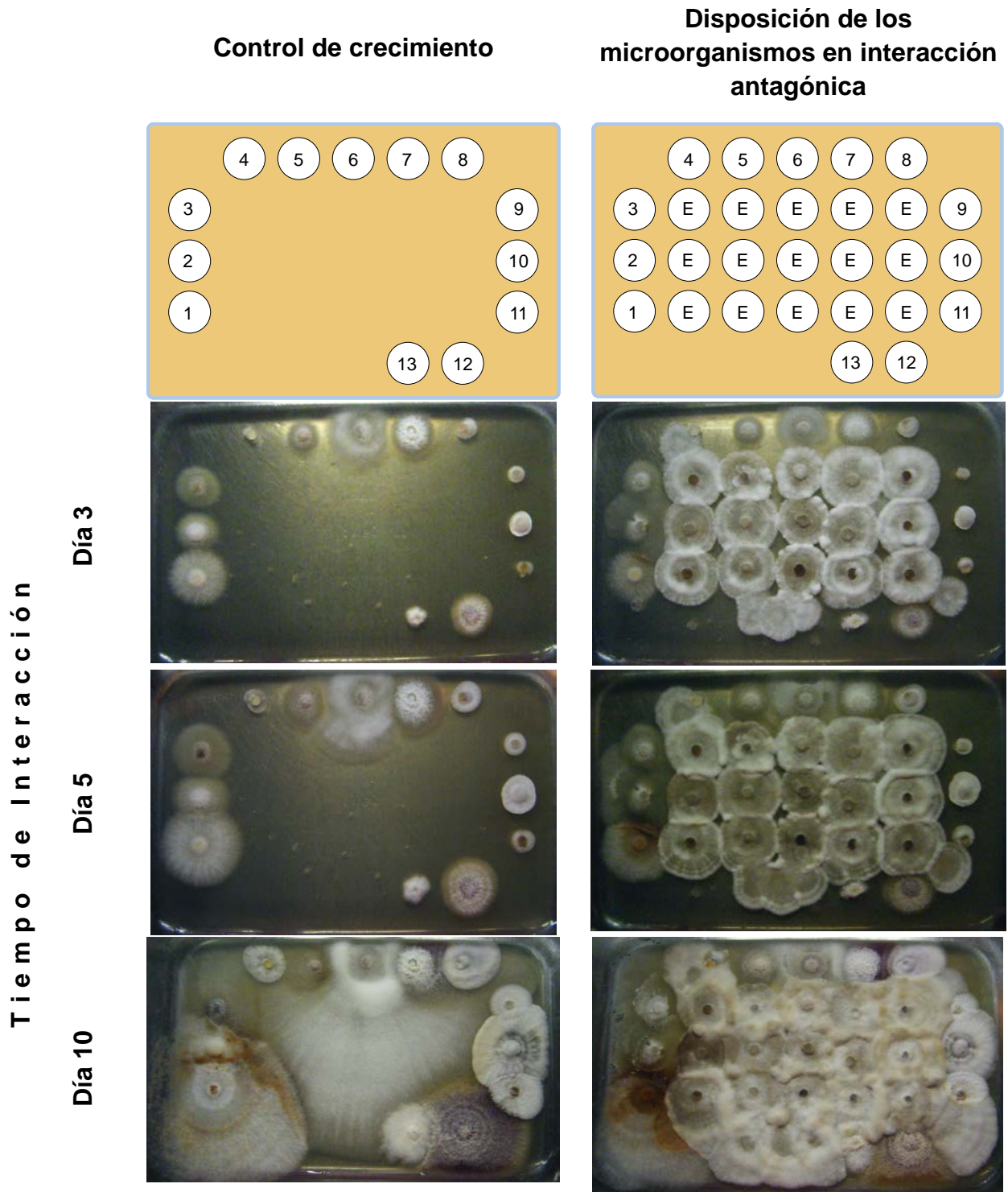


Figura 13. Bioensayo de antagonismo múltiple entre el hongo endófito Smeg4 y 12 hongos endófitos y un fitopatógeno aislados de *S. macrocarpum*. Microorganismos endófitos (1-12) y fitopatógeno (13). 1= Sme1, 2= Sme2, 3= Sme3, 4= Sme5, 5= Sme6, 6= Sme7, 7= Sme8, 8= Sme9, 9= Sme10, 10= Sme11, 11= Sme12, 12= Sme13 y 13= Smf1.

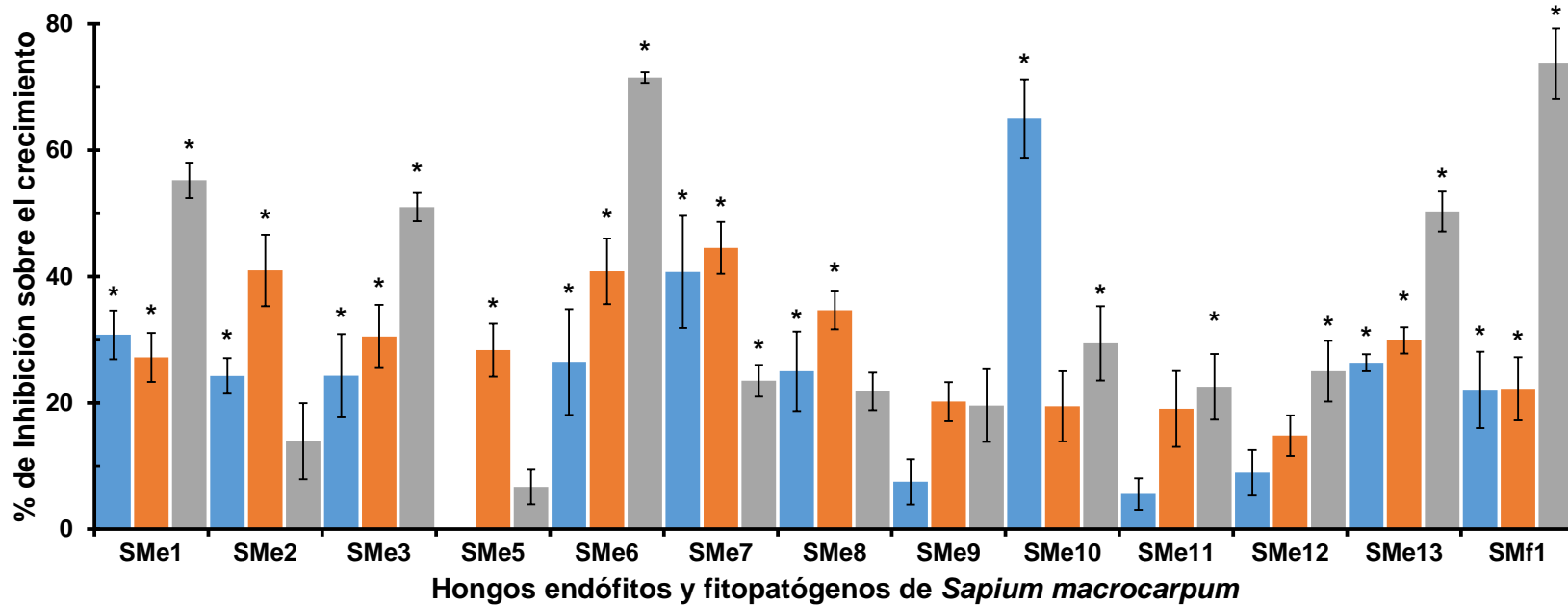


Figura 14. Potencial antagonístico del hongo endófito Smeg4 contra hongos endófitos y fitopatógenos aislados de la misma planta hospedera. Tiempo de interacción: 3 días ■, 5 días ■ y 10 ■ días. * Datos estadísticamente significativos ANOVA ($p < 0.05$).





2.2 Microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola.

El hongo Smeg4 evidenció potencial antagónico contra microorganismos aislados de la misma hospedera, por lo que fue seleccionado para el estudio de su actividad biológica sobre el crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos de importancia agrícola. El bioensayo se llevó a cabo a los 3, 5 y 8 días de crecimiento del endófito Smeg4 (tratamientos), registrando la interacción antagónica en cada caso.

En el **Cuadro 5** y en la **Figura 15** se resumen los porcentajes de inhibición causados por el endófito Smeg4 sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba. En general, los cuatro fitopatógenos fueron inhibidos significativamente, con valores superiores al 25% en los tres tratamientos y a los tres tiempos de interacción antagónica. Con respecto a los hongos verdaderos, *A. alternata* fue el microorganismo más afectado con una inhibición superior al 50% bajo los tres tratamientos y a los tres tiempos de bioensayo. Por otra parte, el oomiceto con mayor inhibición fue *P. capsici*, con valores superiores al 50% a partir del quinto día de interacción, sin importar el tiempo previo de incubación del hongo Smeg4. Además, en la **Figura 15** se observa que el efecto inhibitorio causado por el endófito Smeg4 sobre el crecimiento fitopatógenos blanco es similar en los diferentes tratamientos y tiempos de interacción. El análisis de contraste de grupos de Tukey, mostró que el efecto antagónico ocasionado por el endófito Smeg4 sobre los hongos fitopatógenos *A. alternata* y *F. oxisporum* y sobre el oomiceto *P. ultimum* no es dependiente del tiempo de crecimiento del endófito Smeg4, ni del tiempo de interacción antagónica. Por otra parte, el efecto antagónico ocasionado por Smeg4 sobre el oomiceto *P. capsici* se incrementa significativamente a mayor tiempo de interacción, mientras que a un mismo tiempo de interacción no hay diferencia significativa en la actividad antagónica cuando el tiempo de crecimiento de Smeg4 es de 3 y 5 días.

A manera de ejemplo, en la **Figura 16** se muestra el efecto causado por el hongo Smeg4 a los 5 días de crecimiento previo al bioensayo de antagonismo, sobre el crecimiento de los fitopatógenos de prueba, a los diez días de interacción antagónica. Se observa que hay un efecto antagónico sobre el crecimiento de los microorganismos a distancia, es decir, no se presentó contacto entre el micelio del hongo de prueba Smeg4 y los microorganismos



competidores, lo que sugiere que, además de los metabolitos secundarios difusibles en el medio de cultivo, se encuentran presentes compuestos orgánicos volátiles (VOCs). La inhibición observada, puede ser resultado del efecto sinérgico de los metabolitos secundarios difusibles en el medio de cultivo y de los VOCs producidos por el endófito Smeg4 (Sánchez-Fernández et al., 2016).

La actividad antagónica que mostró el hongo endófito Smeg4 sobre los diferentes microorganismos fitopatógenos, podría ser parte de los mecanismos de defensa con los que la hospedera cuenta como beneficio de la relación simbiótica que establece con el hongo en estudio (Ulloa-Benítez et al., 2016). Con la finalidad de conocer si existe producción de VOCs bioactivos en interacción antagónica entre el hongo Smeg4 y los competidores fitopatógenos de prueba, y así evidenciar si Smeg4 puede constituir un candidato para el desarrollo de un agente de control biológico, se realizaron bioensayos de antagonismo en caja de Petri dividida.



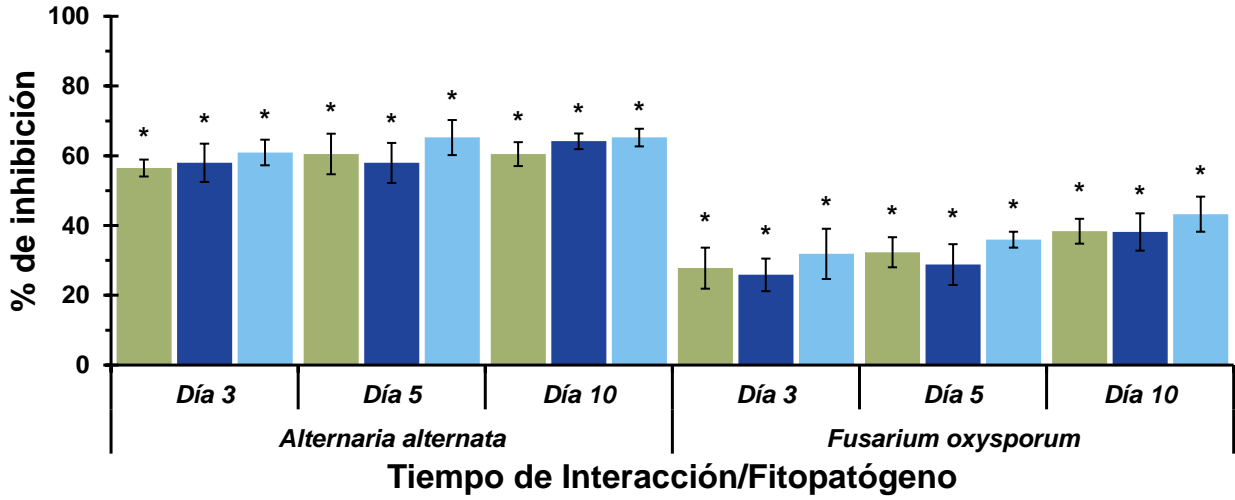
Cuadro 5. Efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura, provocado por la presencia del hongo endófito Smeg4 en bioensayo de antagonismo directo múltiple.

Días de interacción	Microorganismo	Días de crecimiento del endófito Smeg4		
		3	5	10
3	<i>A. alternata</i>	56.5 ± 2.4	60.5 ± 5.8	60.5 ± 3.4
	<i>F. oxysporum</i>	27.8 ± 5.9	32.3 ± 4.3	38.4 ± 3.6
	<i>P. capsici</i>	35.8 ± 4.5	48.5 ± 5.7	59.8 ± 4.6
	<i>P. ultimum</i>	36.9 ± 4.6	34.2 ± 7.0	41.8 ± 4.6
5	<i>A. alternata</i>	58.0 ± 5.5	58.0 ± 5.7	64.2 ± 2.3
	<i>F. oxysporum</i>	25.8 ± 4.6	28.8 ± 5.9	38.1 ± 5.4
	<i>P. capsici</i>	34.0 ± 3.7	52.9 ± 6.0	65.6 ± 5.8
	<i>P. ultimum</i>	33.3 ± 4.8	31.1 ± 4.8	44.7 ± 5.3
10	<i>A. alternata</i>	60.9 ± 3.6	65.2 ± 5.0	65.2 ± 2.5
	<i>F. oxysporum</i>	31.9 ± 7.2	35.9 ± 2.3	43.2 ± 5.0
	<i>P. capsici</i>	53.4 ± 5.0	66.6 ± 3.3	75.4 ± 5.3
	<i>P. ultimum</i>	46.5 ± 4.2	48.8 ± 7.4	52.6 ± 6.6

Se representa el promedio de cuatro repeticiones. Todos los valores de porcentajes de inhibición fueron estadísticamente significativos. t-Student ($p < 0.05$).



a)



b)

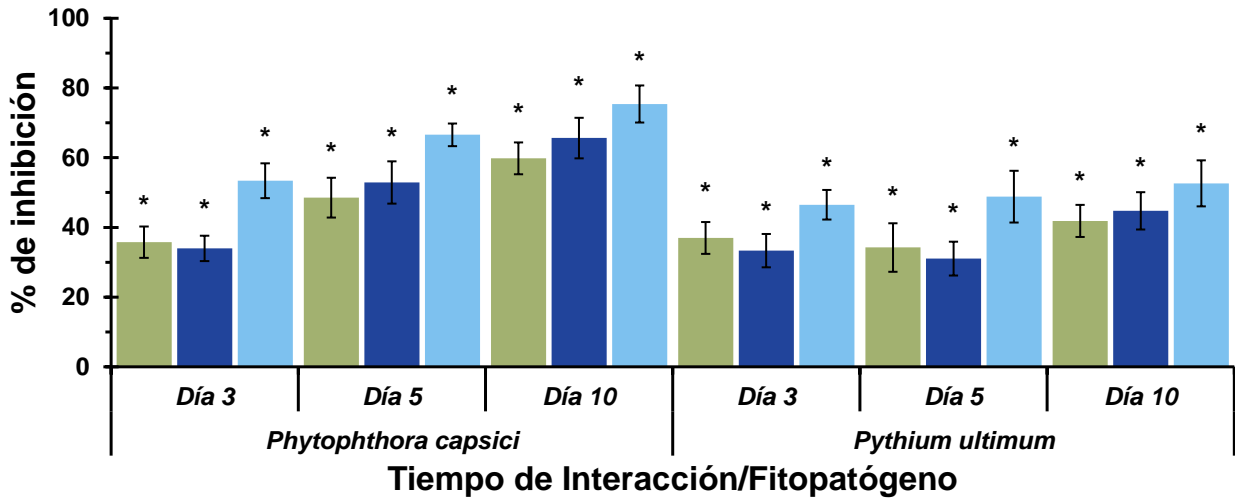





Figura 15. Efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos (a) y oomicetos (b) fitopatógenos provocado por la presencia del hongo endófito Smeg4 de 3 días , 5 días  y 10 días  de crecimiento, a los 3, 5 y 10 días de interacción antagonista. *Valores estadísticamente significativos. t-Student ($p < 0.05$).

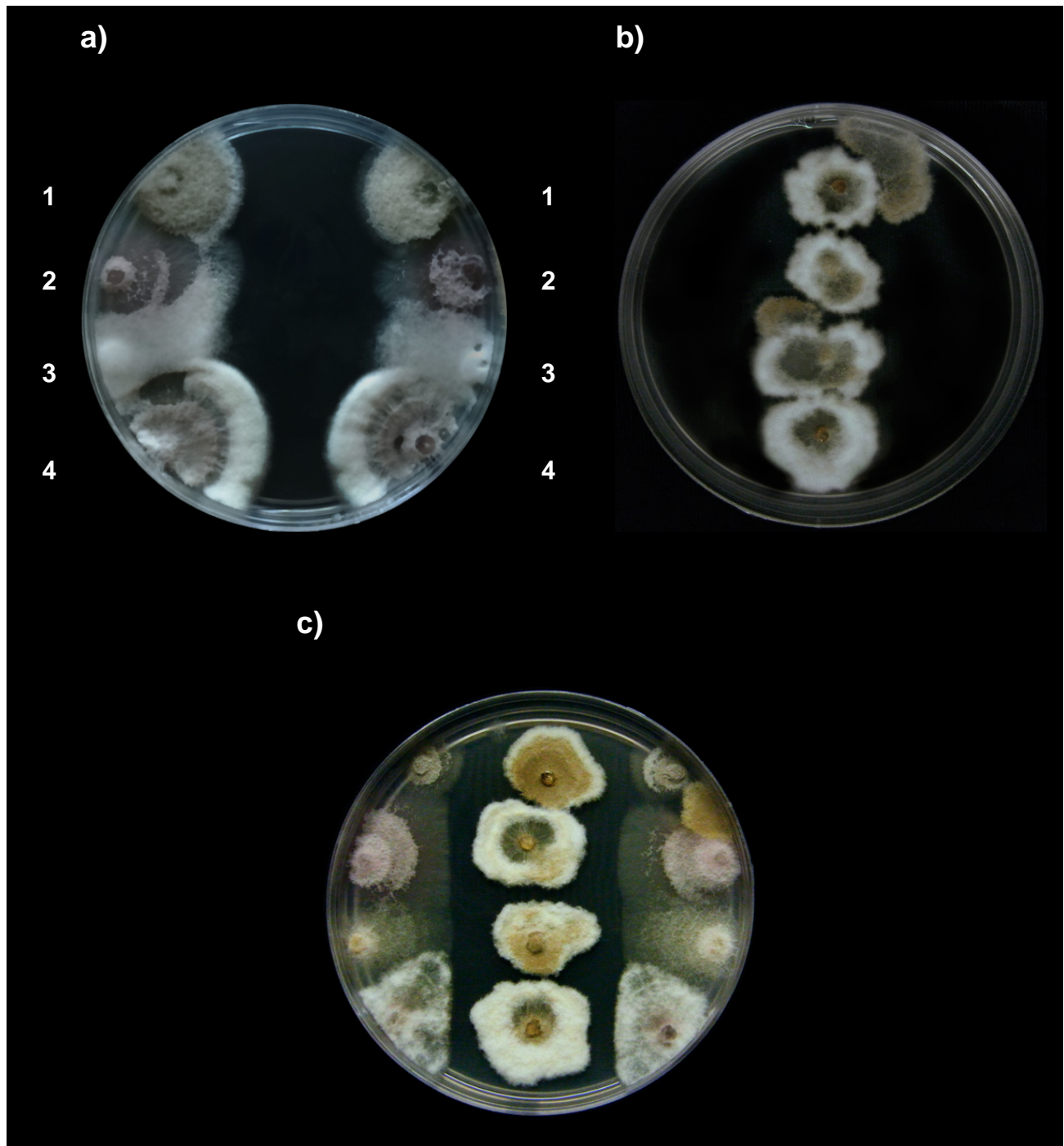


Figura 16. Bioensayo de antagonismo múltiple directo entre el hongo Smeg4 y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola: a) control de crecimiento de los microorganismos fitopatógenos; b) control de crecimiento del hongo endófito de Smeg4 y c) interacción antagónica entre el endófito Smeg4 y cuatro microorganismos fitopatógenos. 1= *A. alternata*; 2= *F. oxysporum*; 3= *P. capsici*; 4= *P. ultimum*. Las fotografías fueron tomadas a 10 días de interacción y en el bioensayo con el endófito Smeg4 de cinco días previos de crecimiento.



3 Bioensayo de antagonismo en caja dividida

3.1 Actividad antifúngica y antioomiceto

Debido a que se registró inhibición a distancia en los bioensayos de antagonismo múltiple directo llevados a cabo entre el hongo *Smeg4* y los microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, se realizaron bioensayos de antagonismo en caja de Petri dividida a los 3, 5 y 10 días de crecimiento del endófito *Smeg4* (tratamientos) y se registró el efecto antagónico a los 3, 5 y 10 días de interacción con los diferentes competidores, con la finalidad de evidenciar la producción de VOCs bioactivos.

A los tres días de interacción antagónica, en ninguno de los tratamientos se detectó un efecto inhibitorio significativo por la presencia de VOCs. Con respecto a las cajas de bioensayo en donde el endófito *Smeg4* tenía 10 días de crecimiento, no fue posible registrar el antagonismo debido a que el endófito invadió el compartimento del competidor, por lo que se descartó del estudio, ya que no se podía considerar una inhibición exclusiva por los VOCs. Por otra parte, al día 10 de interacción, en los bioensayos en donde el hongo *Smeg4* tenía 3 y 5 días de cultivo previo, los microorganismos fitopatógenos de prueba llenaron los dos compartimentos de las cajas de Petri en interacción, lo que no permitió determinar el efecto antagónico a estos tiempos.

En el **Cuadro 6** se muestran los resultados de la interacción antagónica al quinto día de bioensayo en presencia de los VOCs producidos por el endófito *Smeg4*, a los 3 y 5 días de crecimiento. Con excepción del hongo *F. oxysporum*, que no fue inhibido por la presencia de los VOCs, y del oomiceto *P. capsici* a los 5 días de crecimiento del endófito *Smeg4* (17.7% de inhibición), los VOCs producidos por *Smeg4* provocaron porcentajes de inhibición significativos y superiores al 27%.

En la **Figura 18** se muestra una serie fotográfica de los controles de crecimiento y del bioensayo de antagonismo en caja de Petri dividida, a los 5 días de interacción antagónica entre el endófito *Sme4* de 5 días de crecimiento y cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba. Además del efecto inhibitorio observado sobre el crecimiento de los fitopatógenos en presencia de los VOCs producidos por *Smeg4*, se observaron cambios morfológicos en el color y en la apariencia del micelio de los competidores.



El efecto antagónico causado por las mezcla VOCs producidos por el endófito Smeg4 fue menor al efecto inhibitorio provocado en los bioensayo de antagonismo múltiple directo, corroborando que el efecto antagónico de los metabolitos secundarios biosintetizados por el endófito Smeg4 es el resultado de un efecto de los metabolitos difusibles en el medio de cultivo y de los VOCs producidos por Smeg4.

Cuadro 6. Efecto antifúngico y antioomiceto de los VOCs producidos a los 3 y 5 días de crecimiento del hongo endófito Smeg4, a los 5 días de interacción de antagónica.

Microorganismo	Crecimiento de Smeg4	
	Día 3	Día 5
<i>A. alternata</i>	27.7 ± 3.3 *	29.7 ± 4.8 *
<i>F. oxysporum</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>P. capsici</i>	27.9 ± 1.7 *	17.7 ± 1.5 *
<i>P. ultimum</i>	28.5 ± 1.7*	30.6 ± 3.6*

Se representa el promedio de cuatro repeticiones. * Valores estadísticamente significativos ANOVA (<0.05).

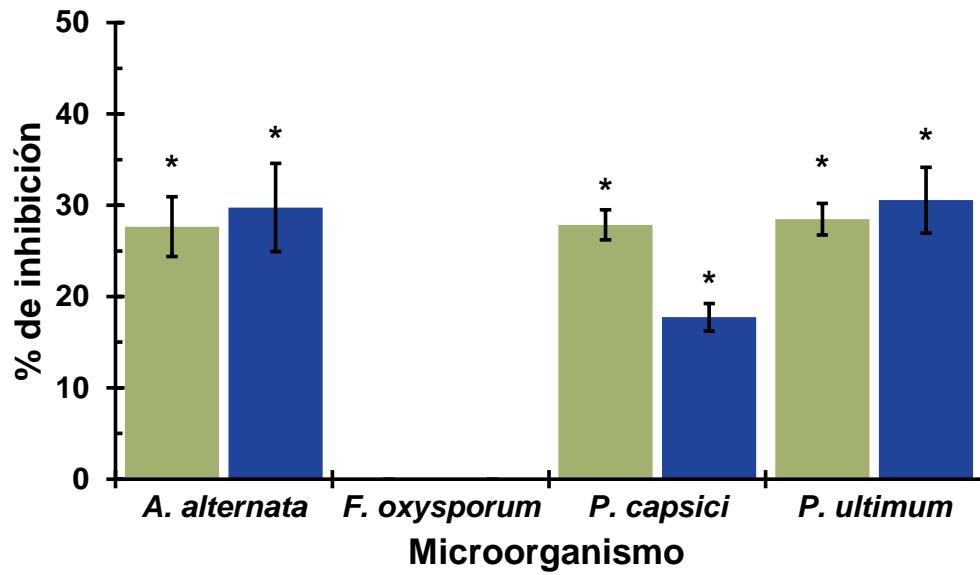


Figura 17. Efecto antifúngico y antioomiceto de los compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito Smeg4 a los 3 y 5 días de crecimiento en bioensayo de caja de Petri dividida, a los 5 días de interacción antagonista. * Valores estadísticamente significativos ANOVA ($p < 0.05$).

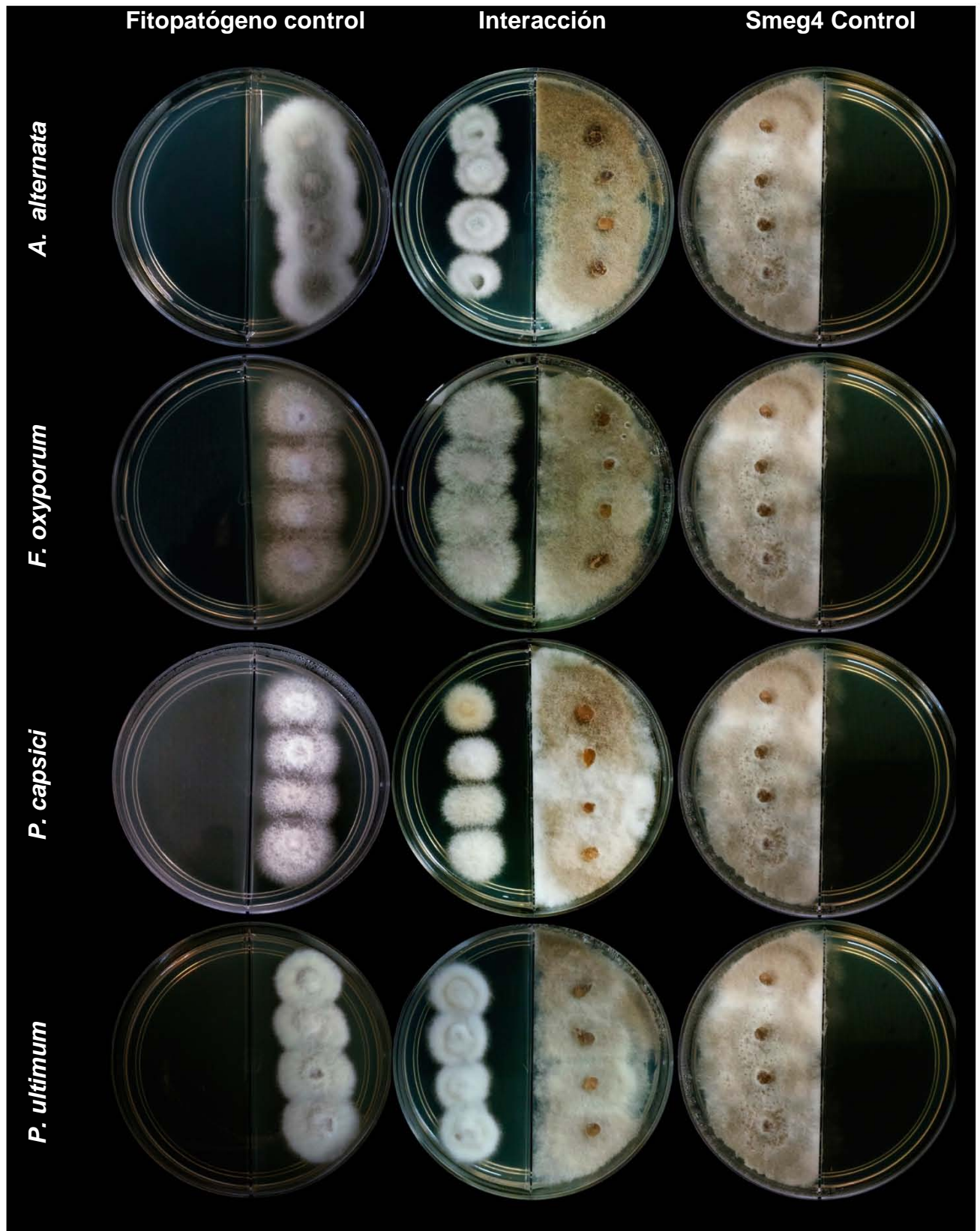


Figura 18. Bioensayo de antagonismo en caja de Petri dividida entre el hongo endófito Smeg4 de 5 días de crecimiento y diferentes microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura, a los 5 días de interacción antagonística.



3.2 Actividad fitotóxica

El hongo endófito Smeg4, además de contribuir con metabolitos secundarios volátiles involucrados en la defensa de la planta hospedera contra el ataque de fitopatógenos, podría producir VOCs con actividad fitotóxica, y así garantizar el éxito de *S. macrocarpum* en la reserva ecológica, en la competencia de espacio y nutrientes (Sánchez-Fernández et al., 2016) y/o producir compuestos fitotóxicos que garanticen la colonización de su hospedera (Ulloa-Benítez et al., 2016). En consecuencia, se realizó la determinación de la actividad fitotóxica de los VOCs producidos por Smeg4 a 5 días de crecimiento sobre los procesos de germinación, crecimiento de la raíz y respiración de cuatro plantas blanco, consideradas por la CONABIO como malezas en nuestro país (CONABIO, 2017). El tiempo de crecimiento para el endófito Smeg4 se estableció tomando en consideración los resultados en la evaluación del potencial antifúngico y antioomiceto.

En el **Cuadro 7** se muestran los porcentajes de inhibición causados por los VOCs sobre las cuatro semillas de prueba en los tres procesos fisiológicos evaluados. En general, el efecto fitotóxico sobre los tres procesos fue significativo y superior al 40% de inhibición. Las semillas de *A. hypochondriacus* fueron las más afectadas, obteniéndose porcentajes de inhibición de la germinación y de la respiración de las plántulas superiores al 80%. El proceso de elongación de raíz de las semillas de *P. miliaceum* fue el más afectado inhibiéndose en un 75%. La germinación de las semillas de *T. pratense* fue el proceso más afectado inhibiéndose en un 68.5%. Por último, el crecimiento de la raíz de las semillas de *M. sativa* fue el proceso fisiológico más afectado inhibiéndose en un 40.6%.



Cuadro 7. Efecto fitotóxico de los VOCs producidos a 5 días de crecimiento del hongo endófito Smeg4 sobre semillas de *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*.

Semilla	% de Inhibición		
	Germinación	Raíz	Respiración
<i>A. hypochondriacus</i>	80.2 ± 1.3	58.9 ± 2.8	82.7 ± 1.6
<i>P. miliaceum</i>	32.5 ± 0.9	75.4 ± 4.6	45.7 ± 2.6
<i>T. pratense</i>	68.5 ± 1.6	40.9 ± 1.6	48.0 ± 1.5
<i>M. sativa</i>	38.8 ± 1.0	40.6 ± 3.2	-17.7 ± 1.1

Se representa el promedio de cuatro repeticiones. Todos los valores son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

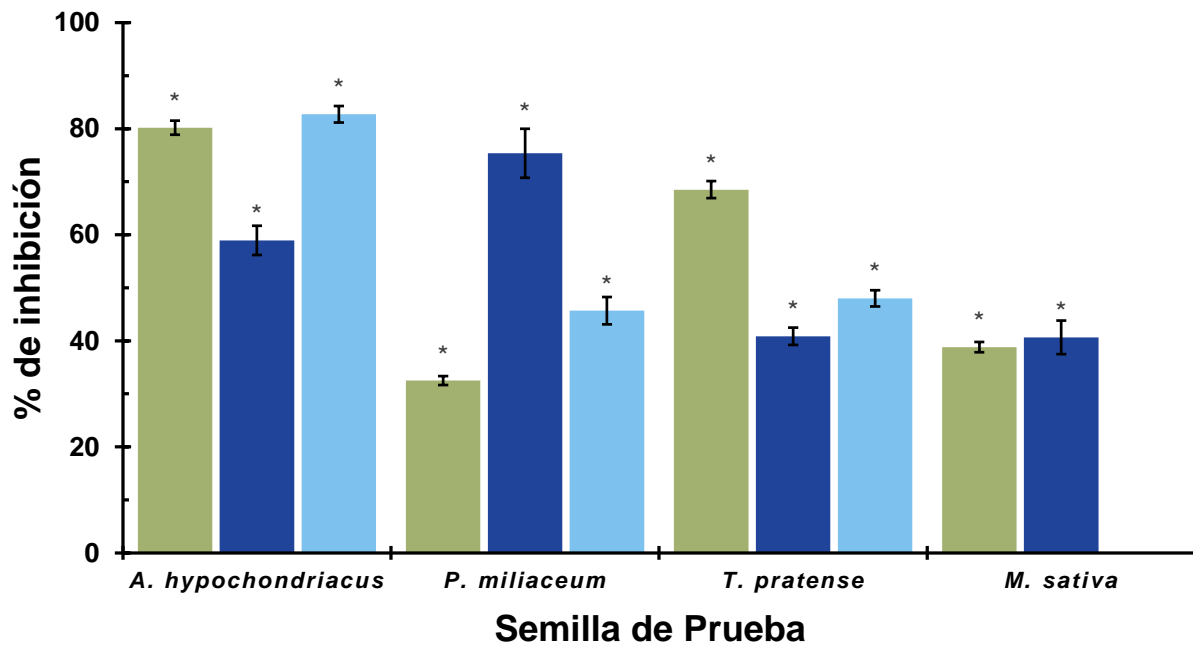


Figura 19. Efecto fitotóxico de los VOCs producidos por el hongo endófito Smeg4 a los 5 días de crecimiento en bioensayo de caja de Petri dividida, sobre los procesos de germinación (■), crecimiento de la raíz (■) y la respiración (■) de las plántulas de *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*. * Valores estadísticamente significativos ANOVA ($p < 0.05$).



4 Cultivo en pequeña escala

4.1 Obtención de extractos orgánicos

Con el propósito de confirmar si los metabolitos secundarios no volátiles biosintetizados por el hongo endófito Smeg4 son los responsables de los efectos antifúngicos, antioomiceto y fitotóxicos observados en los bioensayos de antagonismo directo, se realizó el cultivo a pequeña escala del endófito en estudio. El hongo Smeg4 se cultivó en pequeña escala sobre 1.2 L de medio líquido CPD por 30 días bajo condiciones estáticas y periodos de luz-oscuridad 12:12 h. Se utilizó CPD como medio de crecimiento debido a que en la literatura se encuentra documentado que los ascomicetos, incluyendo los hongos endófitos, producen metabolitos secundarios con buenos rendimientos bajo estas condiciones de cultivo e incubación (Sánchez-Fernández, 2016; Sandoval-Espinosa, 2014). Finalizado el tiempo de incubación, se realizaron extracciones exhaustivas del medio de cultivo y del micelio, empleando CH_2Cl_2 y AcOEt como disolventes. El rendimiento del extracto del micelio fue superior al del extracto del medio de cultivo, los resultados se resumen en el

Cuadro 8.

Cuadro 8. Rendimientos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio obtenidos del cultivo en mediana escala (1.2 L) del hongo endófito Smeg4.

Disolvente de extracción	Medio de cultivo (mg)	Micelio (mg)
CH_2Cl_2	56.3	103.1
AcOEt	107.9	156.2
Total	164.2	259.3
Rendimiento (mg/L)	136.8	216.1

Los extractos fúngicos correspondieron a sólidos amorfos de color café oscuro. El perfil cromatográfico de los extractos fue comparado mediante cromatografía en capa fina (CCF), lo que permitió reunir a los extractos del medio de cultivo obtenidos con CH_2Cl_2 y AcOEt, al presentar perfiles cromatográficos similares, además de compartir características físicas. Por la misma razón, se reunieron los extractos derivados de la maceración del micelio con CH_2Cl_2 y AcOEt (**Figura 20 a**). La diferencia en los perfiles cromatográficos de los extractos

reunidos de micelio y de medio de cultivo, dio pie a que la evaluación de la actividad biológica se realizara de manera independiente (**Figura 20 b**).

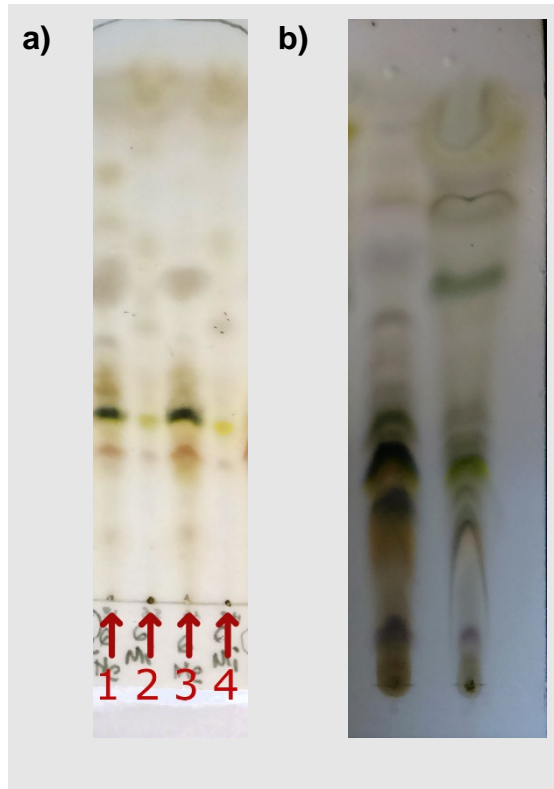


Figura 20. a) Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4. 1=Extracto del medio de cultivo (CH_2Cl_2); 2=Extracto micelio (CH_2Cl_2); 3=Extracto medio de cultivo (AcOEt); 4=Extracto micelio (AcOEt). Sistema de elución CH_2Cl_2 100%. Cromatoplaqa revelada con H_2SO_4 al 10%.

b) Perfil cromatográfico de los extractos reunidos del medio de cultivo (izquierda) y del micelio (derecha). Sistema de elución 95:5 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$). Cromatoplaqa revelada con H_2SO_4 al 10%.

4.2 Evaluación de los extractos orgánicos

Los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio derivados del cultivo en pequeña escala del hongo endófito Smeg4, fueron evaluados de manera preliminar, con la finalidad de evidenciar cuantitativamente la actividad antifúngica y antioomiceto causada por metabolitos secundarios producidos por el hongo Smeg4. Además, se exploró el potencial fitotóxico de los mismos sobre las cuatro semillas de plantas prueba.

4.2.1 Actividad antifúngica y antioomiceto

El efecto antifúngico y antioomiceto de los extractos fúngicos se evaluó sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola, a una concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, utilizando la técnica de dilución en agar.



En el **Cuadro 9** y en la **Figura 21** se muestran los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. ultimum*. El extracto del medio de cultivo fue el más activo sobre todos los fitopatógenos de prueba, mostrando porcentajes de inhibición significativos (20-30%), siendo el hongo *F. oxysporum* y el oomiceto *P. capsici*, los microorganismos más afectados (25% y 29% de inhibición, respectivamente).

Cuadro 9. Efecto antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos del hongo Smeg4 sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura.

Microorganismo	Extracto Orgánico		Controles Positivos	
	Medio de cultivo	Micelio	Prozicar® 50 P.H	Ridomil Gold 4E®
<i>A. alternata</i>	20.2 ± 1.8*	11.6 ± 5.3	36.5 ± 2.0*	-----
<i>F. oxysporum</i>	25.3 ± 2.7*	13.6 ± 1.3	100.0 ± 0.0*	-----
<i>P. capsici</i>	29.3 ± 2.5*	19.3 ± 2.3*	-----	34.8 ± 3.1*
<i>P. ultimum</i>	22.6 ± 2.9*	16.7 ± 3.7*	-----	24.9 ± 1.8*

Se representa el promedio de cuatro repeticiones. *Valores son estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Prozicar® 50 P.H. (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato), Ridomil Gold 4E® (Metalaxil-m: (R)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino]propionato de metilo).

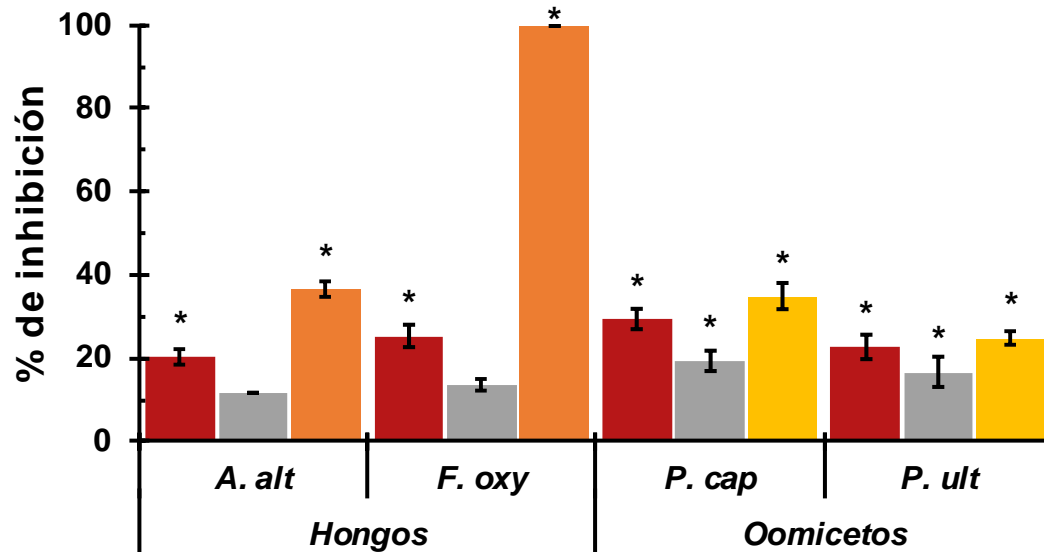


Figura 21. Efecto antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos del medio de cultivo ■ y del micelio ■ del hongo endófito Smeg4 sobre el crecimiento de los hongos *A. alternata* (*A. alt*) y *F. oxysporum* (*F. oxy*) y de los oomicetos *P. capsici* (*P. cap*) y *P. ultimum* (*P. ult*). Controles positivos: **Prozicar® 50 P.H** ■ (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato), **Ridomil Gold 4E®** ■ (Metalaxil-m: (R)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino]propionato de metilo). *: Valores estadísticamente significativos ANOVA ($p < 0.05$).

4.2.2 Actividad fitotóxica

El potencial fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y micelio del hongo Smeg4 se determinó a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, mediante la técnica de dilución en agar. Los procesos evaluados fueron la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las plántulas de cuatro plantas.

En el **Cuadro 10** y en la **Figura 22** se presentan los porcentajes de inhibición de los extractos orgánicos de Smeg4 sobre los tres procesos fisiológicos evaluados. Las semillas de *A. hypochondriacus* fueron las más afectadas por la presencia de los extractos fúngicos, obteniendo inhibiciones superiores al 64%. La germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* y *T. pratense* fueron las más afectadas mostrando porcentajes de inhibición mayores al 50% y superiores al provocado por el control positivo **RIVAL®** (glifosato: sal monoamónica de N-(fosfometil) glicina). En general, el crecimiento de la raíz fue el proceso fisiológico más afectado por los extractos, generando inhibiciones superiores al



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



65%, lo cual representa un efecto comparable o superior al obtenido con el control positivo. Con respecto a la respiración de las plántulas, los extractos fúngicos mostraron los mayores efectos fitotóxicos sobre las plántulas de *A. hypochondriacus* y *P. miliaceum*, inhibiendo en más de 35%.

Cabe señalar que los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio derivados del cultivo en pequeña escala del hongo endófito Smeg4 poseen mayor actividad fitotóxica que antimicrobiana.

Cuadro 10. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio del hongo endófito Smeg4 sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*.

Proceso Fisiológico	Tratamiento	Semilla [§]			
		<i>A. hypochondriacus</i>	<i>P. miliaceum</i>	<i>T. pratense</i>	<i>M. sativa</i>
Germinación	Exto. Medio de cultivo	85.2 ± 1.3*	12.5 ± 0.9*	58.5 ± 1.5*	18.8 ± 1.0*
	Exto. Micelio	78.7 ± 0.9*	6.3 ± 0.6	55.3 ± 1.8*	28.7 ± 1.6*
	RIVAL®	0.9 ± 0.6	16.6 ± 1.2*	16.8 ± 2.1*	19.4 ± 0.9*
Crecimiento de la raíz	Exto. Medio de cultivo	68.9 ± 4.8*	65.4 ± 4.6*	44.8 ± 5.6*	70.6 ± 3.2*
	Exto. Micelio	72.7 ± 6.6*	66.0 ± 2.6*	79.9 ± 4.1*	78.9 ± 3.0*
	RIVAL®	51.6 ± 3.8*	65.8 ± 3.2*	51.4 ± 2.8*	46.3 ± 3.4*
Respiración	Exto. Medio de cultivo	72.7 ± 1.6*	35.7 ± 2.6*	8.0 ± 4.5	-7.7 ± 2.1
	Exto. Micelio	64.2 ± 1.1*	44.6 ± 4.2*	58.1 ± 3.9*	28.1 ± 2.0*
	RIVAL®	16.7 ± 2.4*	1.5 ± 0.9	6.2 ± 0.9	8.2 ± 0.9

[§]Se representa el promedio de cuatro repeticiones. Exto.= Extracto. *: Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$). RIVAL® (glifosato: sal monoamónica de *N*-(fosfometil) glicina)

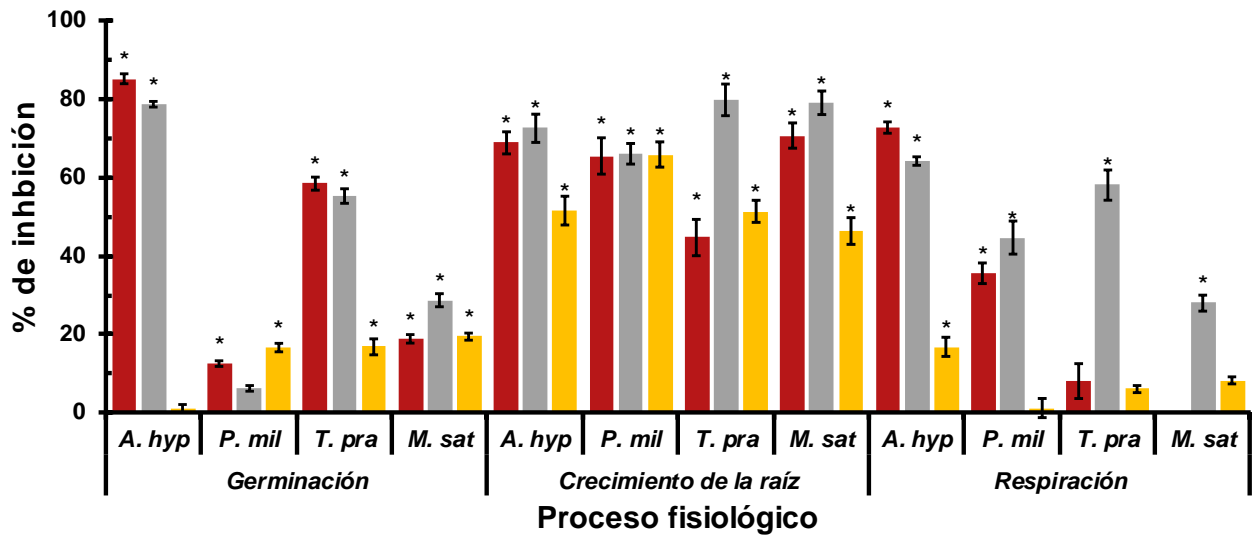


Figura 22. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo (■) y del micelio (■) del hongo endófito Smeg4 sobre los procesos de germinación, crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus* (*A. hyp*), *P. miliaceum* (*P. mil*), *T. pratense* (*T. pra*) y *M. sativa* (*M. sat*). Control positivo RIVAL® (■). *: Valores estadísticamente significativos ANOVA ($p < 0.05$).



5 Cultivo en mediana escala

5.1 Obtención de extractos orgánicos

Una vez establecida la actividad biológica preliminar de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito Smeg4 y, con la finalidad de obtener la concentración inhibitoria media de los mismos, sobre el crecimiento de plantas y microorganismos fitopatógenos, se realizó un cultivo a mediana escala empleando dos garrafones de 20 L con 4 L de CPD, utilizando las mismas condiciones de incubación y extracción empleadas en el cultivo a pequeña escala. Los rendimientos de los extractos se resumen en el **Cuadro 11**.

Cuadro 11. Rendimientos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito Smeg4 obtenidos a partir de un cultivo en mediana escala.

Disolvente de extracción	Medio de Cultivo (mg)	Micelio (mg)
CH ₂ Cl ₂	49.2	220.3
AcOEt	1012.8	2387.4
Total	1062.0	2607.7
Rendimiento (mg/L)	132.8	326.0

El rendimiento del extracto orgánico del medio de cultivo derivado de la fermentación del endófito Smeg4 en pequeña escala y en mediana escala fue similar, obteniéndose 134 mg/mL. Con respecto a los extractos del micelio, el rendimiento obtenido a partir del cultivo en mediana escala fue superior (326.0 mg/L) al rendimiento derivado del cultivo en pequeña escala (216.1 mg/L), lo cual podría deberse a una mayor superficie disponible para el crecimiento del hongo en condiciones de mediana escala (**Figura 23**).

El análisis comparativo por CCF entre los extractos orgánicos derivados del cultivo del hongo Smeg4 en pequeña escala y los obtenidos en mediana escala, demostró que no existían diferencias en los perfiles cromatográficos. A continuación, se procedió a la evaluación de las concentraciones inhibitorias medias de la actividad antimicrobiana y fitotóxica sobre las especies de prueba.

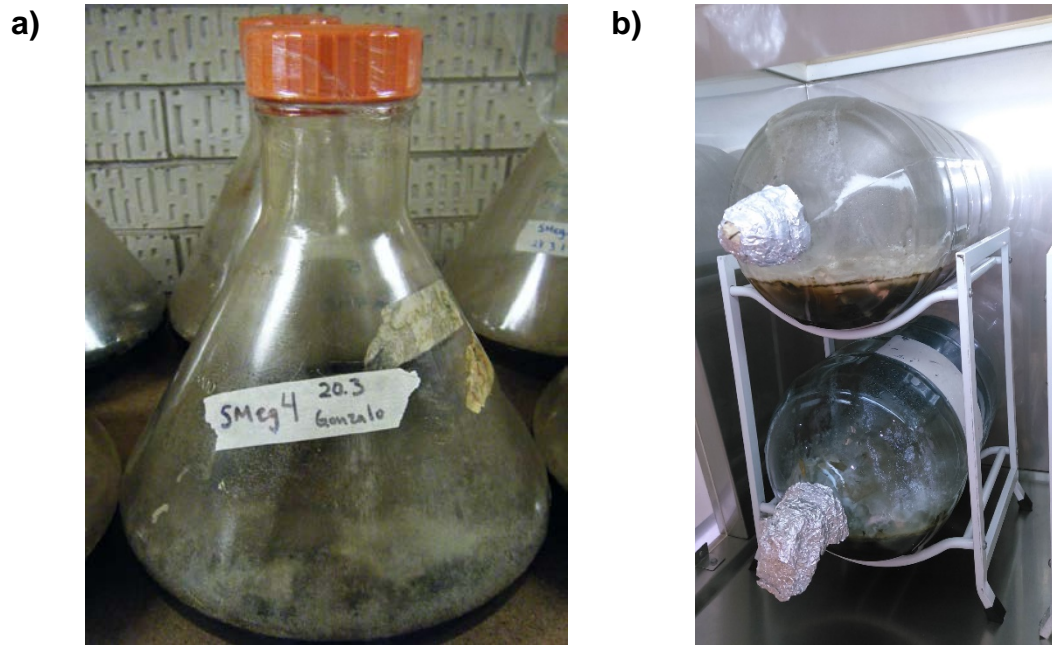


Figura 23. Cultivo del hongo endófito Smeg4. a) Cultivo en pequeña escala y b) cultivo en mediana escala.



5.2 Concentración inhibitoria media de la actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos del endófito Smeg4

La concentración inhibitoria media (CI_{50} $\mu\text{g/mL}$) de los extractos fúngicos del hongo Smeg4, sobre el crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos con importancia agrícola, se estableció empleando cuatro concentraciones en un rango de 250-1000 $\mu\text{g/mL}$, utilizando la técnica de dilución en agar, sobre el crecimiento radial de los dos hongos y los dos oomicetos empleados durante la determinación preliminar de la actividad biológica a nivel de extractos orgánicos en mediana escala. Como control positivo para los hongos verdaderos se empleó el fungicida comercial Prozicar® 50 P.H (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato), y para los oomicetos el agroquímico comercial Ridomil Gold 4E® (Metalaxil-m: (*R*)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino]propionato de metilo), en el mismo rango de concentraciones que para los extractos orgánicos, con excepción del efecto sobre el hongo *F. oxysporum* que se evaluó a las concentraciones de 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$.

En la **Figura 24** y en el **Cuadro 12** se observa el efecto antifúngico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito Smeg4. En general, los extractos inhibieron significativamente y de manera dependiente de la concentración. Sin embargo, el efecto antifúngico producido por los extractos orgánicos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos de prueba, a la máxima concentración evaluada (1000 $\mu\text{g/mL}$) es menor al 50%. El extracto del medio de cultivo es más activo que el del micelio, inhibiendo el crecimiento de *A. alternata* en un 47% y el de *F. oxysporum* en un 41.5%, a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Cuadro 12. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4 y el control positivo Prozicar® sobre el crecimiento de *A. alternata* y *F. oxysporum*.

Microorganismo	Tratamiento	Concentración (µg/mL) §				IC ₅₀ (µg/mL)
		250	500	750	1000	
<i>A. alternata</i>	Exto. Medio de cultivo	16.1 ± 0.6*	24.2 ± 1.9*	39.9 ± 0.4*	47.0 ± 2.5*	>1000
	Exto. Micelio	17.0 ± 1.7*	27.3 ± 2.3*	34.5 ± 1.7*	34.9 ± 1.2*	>1000
	Prozicar® 50 P.H	38.6 ± 1.8*	50.7 ± 1.3*	63.7 ± 1.9*	88.4 ± 0.6*	480.5
<i>F. oxysporum</i>	Exto. Medio de cultivo	17.7 ± 2.6*	22.8 ± 1.3*	30.3 ± 0.9*	41.5 ± 1.9*	>1000
	Exto. Micelio	17.7 ± 1.9*	18.2 ± 3.3*	19.1 ± 1.3*	23.8 ± 2.3*	>1000
	Prozicar® 50 P.H*	100 ± 0.0*	100 ± 0.0*	100 ± 0.0*	100 ± 0.0*	<25

§Se representa el promedio de cuatro repeticiones. Exto. = Extracto. *: Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Prozicar® 50 P.H. (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato). *Las concentraciones de Prozicar® evaluadas sobre *F. oxysporum* fueron 25, 50, 100 y 200 µg/mL.

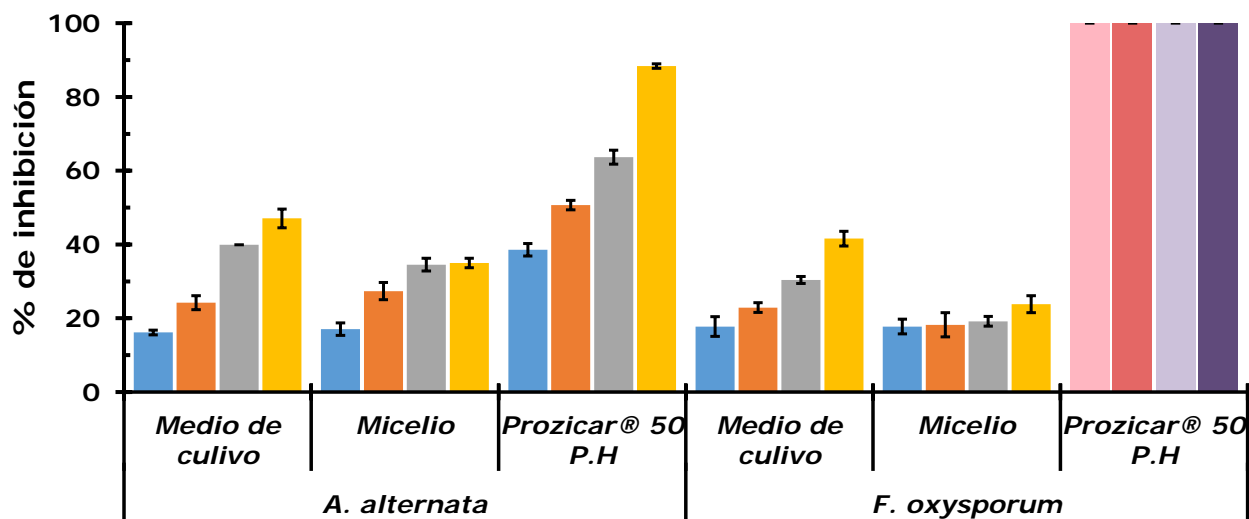


Figura 24. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito Smeg4 sobre el crecimiento de los hongos *A. alternata* y *F. oxysporum* evaluados a 250 µg/mL ■, 500 µg/mL ■, 750 µg/mL ■ y 1000 µg/mL ■. El control positivo Prozicar® 50 P.H se evaluó a la misma concentración empleadas para los extractos orgánicos sobre *A. alternata*. Para *F. oxysporum* se utilizaron las concentraciones de 25 µg/mL ■, 50 µg/mL ■, 100 µg/mL ■ y 200 µg/mL ■. Todos los valores fueron estadísticamente significativos, ANOVA ($p < 0.05$).



En la **Figura 25** y en el **Cuadro 13** se observa el efecto antioomiceto de los extractos orgánicos del hongo Smeg4 sobre el crecimiento de *P. capsici* y *P. ultimum*. De nueva cuenta, los extractos del medio de cultivo y micelio inhibieron de manera significativa y de forma dependiente de la concentración, sin alcanzar porcentajes de inhibición superiores al 50% a la máxima concentración ensayada (1000 µg/mL). El extracto del medio de cultivo fue más activo sobre *P. capsici*, inhibiendo su crecimiento en un 39.5%, mientras que el extracto del micelio tuvo mayor actividad sobre *P. ultimum*, inhibiendo su crecimiento en un 35.2%.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Cuadro 13. Efecto antioomiceto de los extractos orgánicos del hongo endófito *Smeg4* y del control positivo Ridomil Gold 4E® sobre el crecimiento de *P. capsici* y *P. ultimum*.

Microorganismo	Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) [§]				IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
		250	500	750	1000	
<i>P. capsici</i>	Exto. Medio de cultivo	18.3 ± 2.4*	22.5 ± 3.0*	26.8 ± 2.5*	39.5 ± 1.2*	>1000
	Exto. Micelio	14.8 ± 2.2*	17.8 ± 2.9*	26.9 ± 1.8*	34.9 ± 2.9*	>1000
	Ridomil Gold 4E®	32.6 ± 2.7*	39.0 ± 3.6	42.9 ± 2.9	48.5 ± 3.7	> 1000
<i>P. ultimum</i>	Exto. Medio de cultivo	7.1 ± 2.8*	12.3 ± 4.0*	18.5 ± 0.9*	22.3 ± 2.0*	>1000
	Exto. Micelio	16.6 ± 2.0*	24.5 ± 2.6*	32.3 ± 3.3*	35.2 ± 1.3*	>1000
	Ridomil Gold 4E®	22.9 ± 2.6*	31.9 ± 2.8*	35.2 ± 1.5*	43.4 ± 1.3*	> 1000

[§]Se representa el promedio de cuatro repeticiones. *: Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($p < 0.05$).

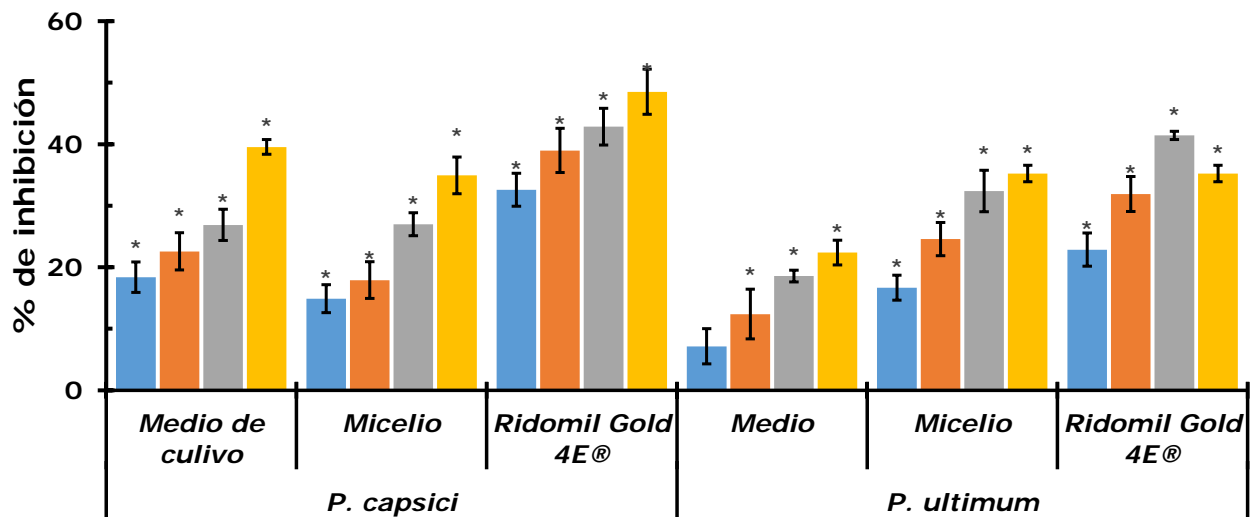


Figura 25. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito *Smeg4* sobre el crecimiento de los oomicetos *P. capsici* (*P. cap*) y *P. ultimum* (*P. ult*) evaluados a 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 750 $\mu\text{g/mL}$ y 1000 $\mu\text{g/mL}$. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($p < 0.05$).



Tanto en los bioensayos de antagonismo múltiple directo entre el endófito Smeg4 y diferentes microorganismos competidores, así como en los bioensayos a nivel de extractos del medio de cultivo y micelio empleando el método de dilución en agar, se puso en evidencia que el hongo endófito Smeg4 produce metabolitos secundarios volátiles y no volátiles con actividad antimicrobiana, útiles para el desarrollo de un agente de control biológico y/o de bioplaguicidas.



5.3 Concentración inhibitoria media de la actividad fitotóxica de los extractos orgánicos del endófito Smeg4

Con base en los resultados preliminares de la evaluación de la actividad fitotóxica de los extractos del medio de cultivo y micelio, se diseñó una curva concentración vs efecto fitotóxico, empleando cinco concentraciones en el intervalo de 50-500 $\mu\text{g/mL}$, con la finalidad de establecer la CI_{50} sobre los procesos de germinación, crecimiento de la raíz y la respiración durante la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*. Como control positivo se utilizó el herbicida comercial RIVAL®, en el mismo rango de concentraciones que para los extractos orgánicos.

En el **Cuadro 14** y en la **Figura 26** y en la **Figura 27**, se observa el efecto fitotóxico de los extractos fúngicos del hongo endófito Smeg4, sobre los tres procesos fisiológicos evaluados, expresado como porcentaje de inhibición. En general, los extractos orgánicos inhibieron significativamente y de forma dependiente de la concentración la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las cuatro semillas blanco. Asimismo, los extractos del medio de cultivo son más fitotóxicos que los derivados del micelio, siendo más evidente este efecto, sobre los tres procesos evaluados en semillas de *A. hypochondriacus*. A la máxima concentración evaluada (500 $\mu\text{g/mL}$), la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* y de *M. sativa* fueron las más afectadas por la presencia del extracto del medio de cultivo, inhibiéndose en un 99% y 90%, respectivamente, y mostrando valores de $\text{CI}_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$. El crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *T. pratense* fueron las más afectadas por el extracto del medio de cultivo, mostrando porcentajes de inhibición superiores al 90%. Con respecto a la respiración de las plántulas, el extracto orgánico del medio de cultivo mostró los mayores efectos fitotóxicos sobre las semillas de *A. hypochondriacus* y *P. miliaceum*, inhibiéndose en más de 85%.

Con respecto al efecto fitotóxico provocado por el extracto del micelio a la máxima concentración de prueba (500 $\mu\text{g/mL}$), la germinación de las semillas de *M. sativa* y *T. pratense* fueron las más afectadas, inhibiéndose en un 60% y 51%, respectivamente. El crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *T. pratense* también fueron las más afectadas por el extracto orgánico del micelio, inhibiéndose en un 100% y 86%, respectivamente. Por último, la respiración de las plántulas de *P. miliaceum* y *A.*



hypochondriacus, mostraron los mayores efectos inhibitorios sobre el consumo de oxígeno (>70%).

A manera de ejemplo, en la **Figura 28** se muestra el efecto fitotóxico provocado por el extracto de medio de cultivo sobre el consumo de oxígeno de las plántulas de *A. hypochondriacus* y *P. miliaceum*. En ambas especies, se observa claramente que a mayor concentración del extracto orgánico, la pendiente de las curvas generadas durante el registro del consumo de oxígeno durante 3 min, tiende a cero evidenciando de esta manera que la respiración de las plántulas fue afectada significativamente y de manera dependiente de la concentración.

En el **Cuadro 15** se resumen las CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de los extractos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito Smeg4 sobre *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*, determinadas empleando el programa estadístico GraphPad Prism Version 7.00. Los valores marcados con $CI_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ indican que el efecto fitotóxico demostrado por los extractos orgánicos a la máxima concentración de prueba ($500 \mu\text{g/mL}$) no superó el 50% de inhibición. En contraste, los valores de $CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$, corresponden a los extractos orgánicos cuyo efecto fitotóxico fue mayor al 50% de inhibición a la mínima concentración de prueba ($50 \mu\text{g/mL}$).

En las **Figura 29** a la **Figura 32** se muestra el registro fotográfico del efecto fitotóxico provocado por los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de hongo Smeg4 derivados de su cultivo en mediana escala, sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de las cuatro semillas de prueba.

De nueva cuenta, los bioensayos empleando el método de dilución en agar corroboraron que los extractos fúngicos derivados del cultivo en pequeña escala del hongo endófito Smeg4, contienen metabolitos secundarios no volátiles que poseen mayor actividad fitotóxica que antimicrobiana.

Con base en la actividad fitotóxica demostrada a nivel de extractos del medio de cultivo y micelio del hongo Smeg4, es evidente que los metabolitos secundarios biosintetizados por este endófito constituyen candidatos importantes para el desarrollo de herbicidas potenciales, a través de su estudio químico biodirigido.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Cuadro 14. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del hongo endófito *Smeg4*, sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las semillas de *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*.

Tratamiento	Proceso fisiológico	Semilla	Concentración de extracto ($\mu\text{g/mL}$) [§]				
			50	75	125	250	500
Medio de cultivo	Germinación	<i>A. hypochondriacus</i>	42.1 \pm 3.7*	47.3 \pm 5.1*	71.9 \pm 2.9*	95.6 \pm 3.1*	99.1 \pm 1.3*
		<i>P. miliaceum</i>	25 \pm 1.7*	28 \pm 1.1*	30 \pm 2.0*	31 \pm 0.5*	34 \pm 0.5*
		<i>T. pratense</i>	21.6 \pm 0.5*	26.5 \pm 2.4*	31.6 \pm 0.9*	37.7 \pm 3.2*	47.9 \pm 1.7*
		<i>M. sativa</i>	34.4 \pm 1.5*	50.5 \pm 2.4*	52.8 \pm 0.9*	62.0 \pm 3.2*	90.8 \pm 2.6*
	Crecimiento de la raíz	<i>A. hypochondriacus</i>	73.3 \pm 6.0*	76.2 \pm 5.7*	77.3 \pm 6.6*	87.8 \pm 3.9*	99.2 \pm 4.9*
		<i>P. miliaceum</i>	32.6 \pm 4.5*	37.3 \pm 3.9*	49.3 \pm 2.1*	64.9 \pm 3.1*	76.6 \pm 3.0*
		<i>T. pratense</i>	61.9 \pm 2.7*	75.8 \pm 3.1*	80.0 \pm 4.3*	78.2 \pm 3.0*	92.2 \pm 3.8*
		<i>M. sativa</i>	44.8 \pm 6.3*	56.3 \pm 4.2*	66.7 \pm 5.3*	77.8 \pm 3.6*	80.8 \pm 6.9*
	Respiración	<i>A. hypochondriacus</i>	35.4 \pm 2.1*	49.2 \pm 4.6*	65.3 \pm 1.7*	78.3 \pm 4.0*	85.1 \pm 3.5*
		<i>P. miliaceum</i>	39.7 \pm 4.3*	62.2 \pm 5.4*	73.2 \pm 2.2*	78.9 \pm 6.2*	85.7 \pm 4.8*
		<i>T. pratense</i>	11.2 \pm 3.3	20.6 \pm 5.1*	23.7 \pm 1.9*	30.2 \pm 0.8*	36.1 \pm 0.3*
		<i>M. sativa</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 2.5	8.90 \pm 2.8	19.8 \pm 1.1*
Micelio	Germinación	<i>A. hypochondriacus</i>	8.77 \pm 1.1	13.1 \pm 1.8*	14.9 \pm 1.4*	21.0 \pm 0.7*	28.9 \pm 2.6*
		<i>P. miliaceum</i>	20 \pm 1*	22 \pm 1.4*	28 \pm 3.0*	32 \pm 0.8*	33 \pm 0.8*
		<i>T. pratense</i>	22.4 \pm 1.7*	22.4 \pm 0.5*	24.4 \pm 2.6*	29.5 \pm 1.2*	51.0 \pm 3.1*
		<i>M. sativa</i>	32.1 \pm 1.7*	37.9 \pm 0.5*	41.3 \pm 2.6*	51.7 \pm 1.2*	60.9 \pm 3.1*
	Crecimiento de la raíz	<i>A. hypochondriacus</i>	47.6 \pm 1.6*	51.9 \pm 4.9*	71.3 \pm 3.0*	77.2 \pm 7.8*	100 \pm 0*
		<i>P. miliaceum</i>	17.0 \pm 2.9*	33.1 \pm 2.6*	49.7 \pm 6.9*	62.3 \pm 3.1*	67.6 \pm 2.8*
		<i>T. pratense</i>	62.0 \pm 4.7*	75.0 \pm 3.5*	77.5 \pm 2.7*	73.4 \pm 3.3*	86.6 \pm 2.6*
		<i>M. sativa</i>	46.1 \pm 5.6*	49.3 \pm 6.2*	60.8 \pm 3.7*	67.8 \pm 4.2*	76.0 \pm 4.1*
	Respiración	<i>A. hypochondriacus</i>	3.66 \pm 1.2	16.4 \pm 4.8*	33.3 \pm 3.4*	44.7 \pm 5.2*	71.4 \pm 1.5*
		<i>P. miliaceum</i>	43.9 \pm 5.0*	56.9 \pm 7.9*	56.9 \pm 3.8*	62.7 \pm 5.7*	77.1 \pm 5.3*
		<i>T. pratense</i>	10.5 \pm 4.5	18.0 \pm 1.3*	22.0 \pm 5.7*	25.8 \pm 4.3*	29.2 \pm 3.4*
		<i>M. sativa</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	9.67 \pm 1.8	28.3 \pm 1.1*	39.0 \pm 2.4*

[§]Se representa el promedio de cuatro repeticiones. *: Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

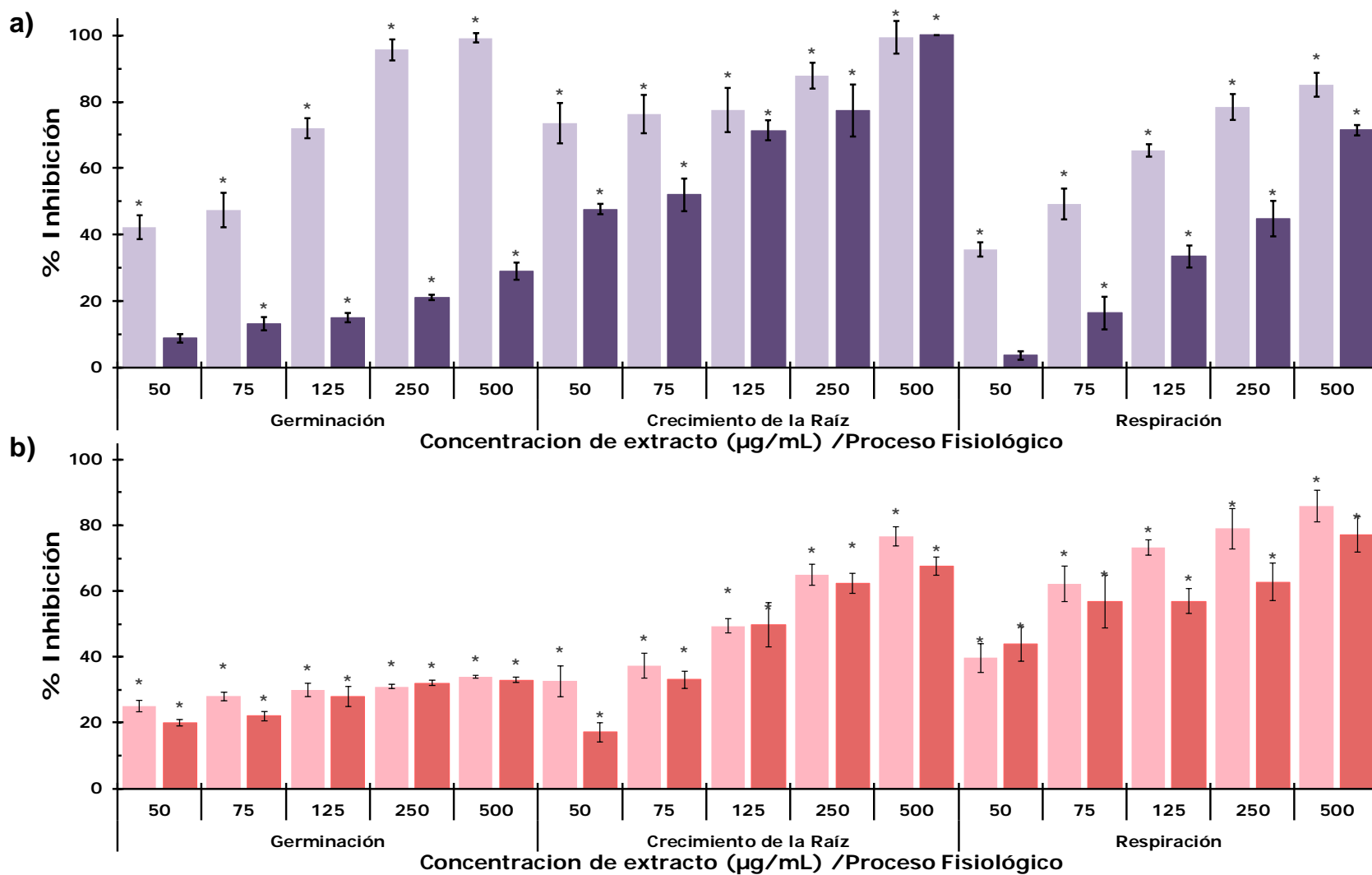


Figura 26. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo (colores claros) y micelio (colores oscuros) del hongo endófito Smeg4, evaluados a cinco concentraciones sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las semillas de a) *A. hypochondriacus* y b) *P. miliaceum*.

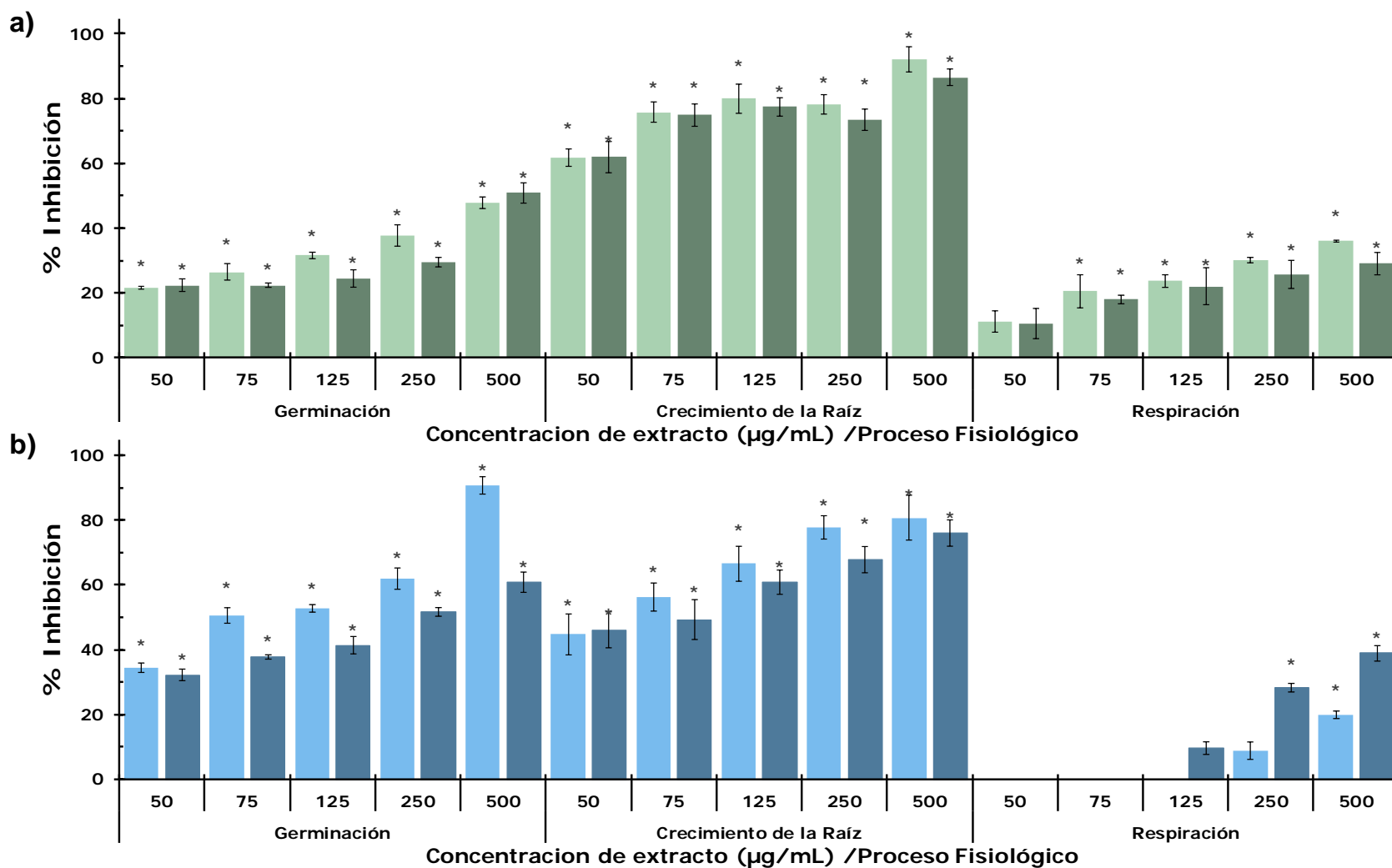


Figura 27. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo (colores claros) y micelio (colores oscuros) del hongo endófito Smeg4, evaluados a cinco concentraciones sobre la de germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las semillas de a) *T. pratense* y b) *M. sativa*.

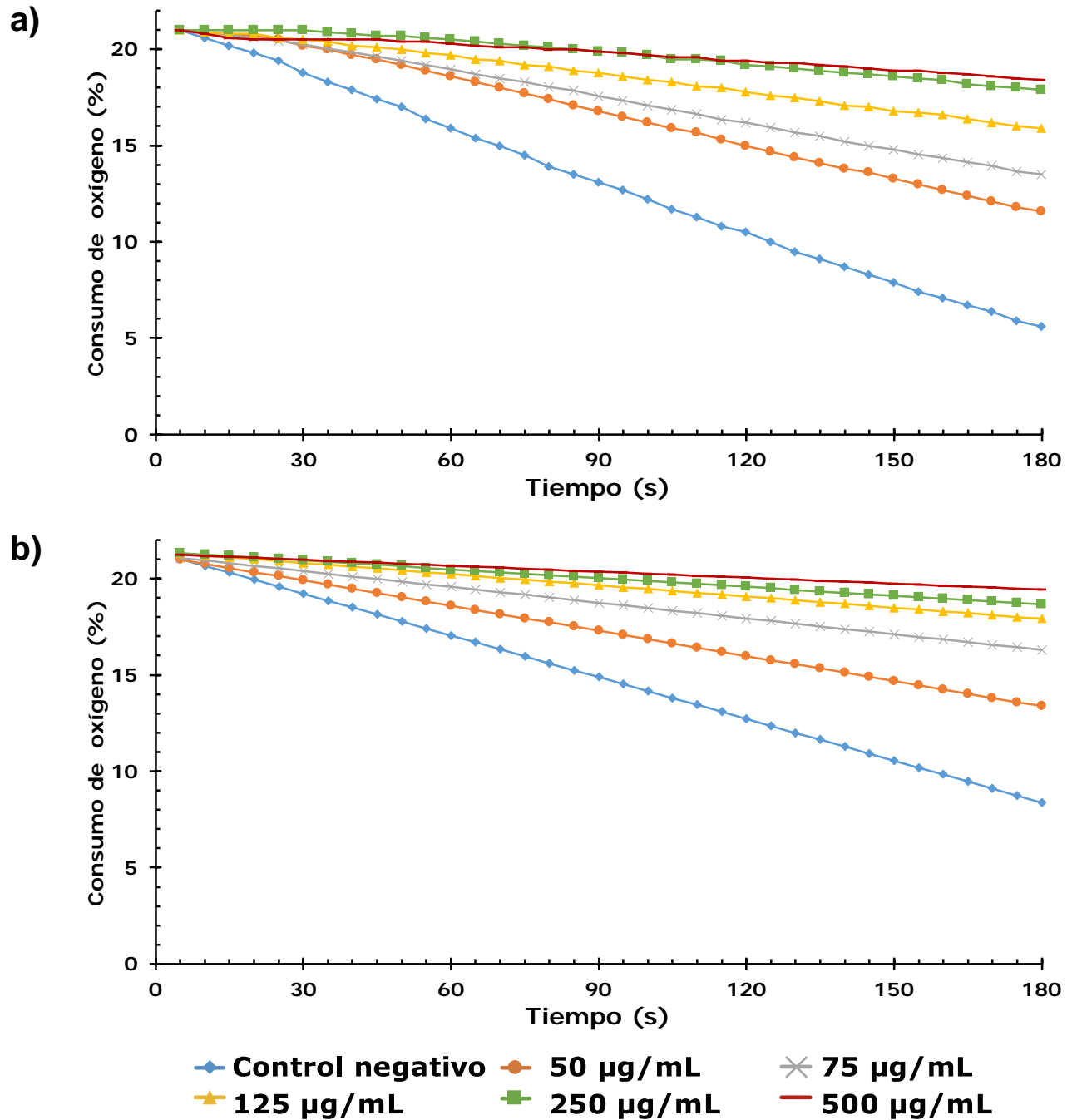


Figura 28. Efecto del extracto orgánico del medio de cultivo del hongo endófito Smeg4 sobre el consumo de oxígeno de las semillas de a) *A. hypochondriacus* y b) *P. miliaceum*.

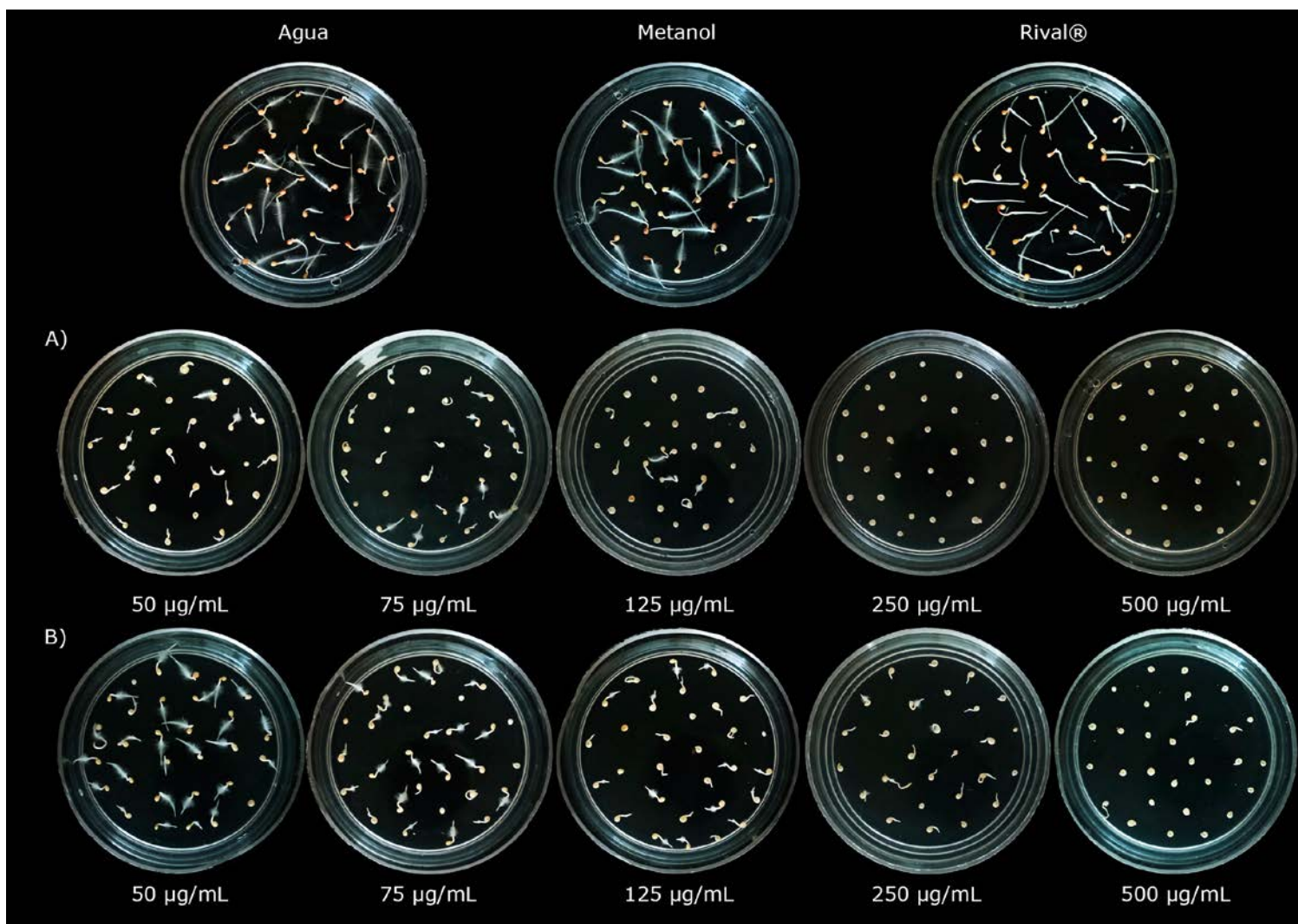


Figura 29. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos del medio de cultivo (A) y micelio (B) del hongo endófito Smeg4 sobre las semillas de *A. hypochondriacus*.

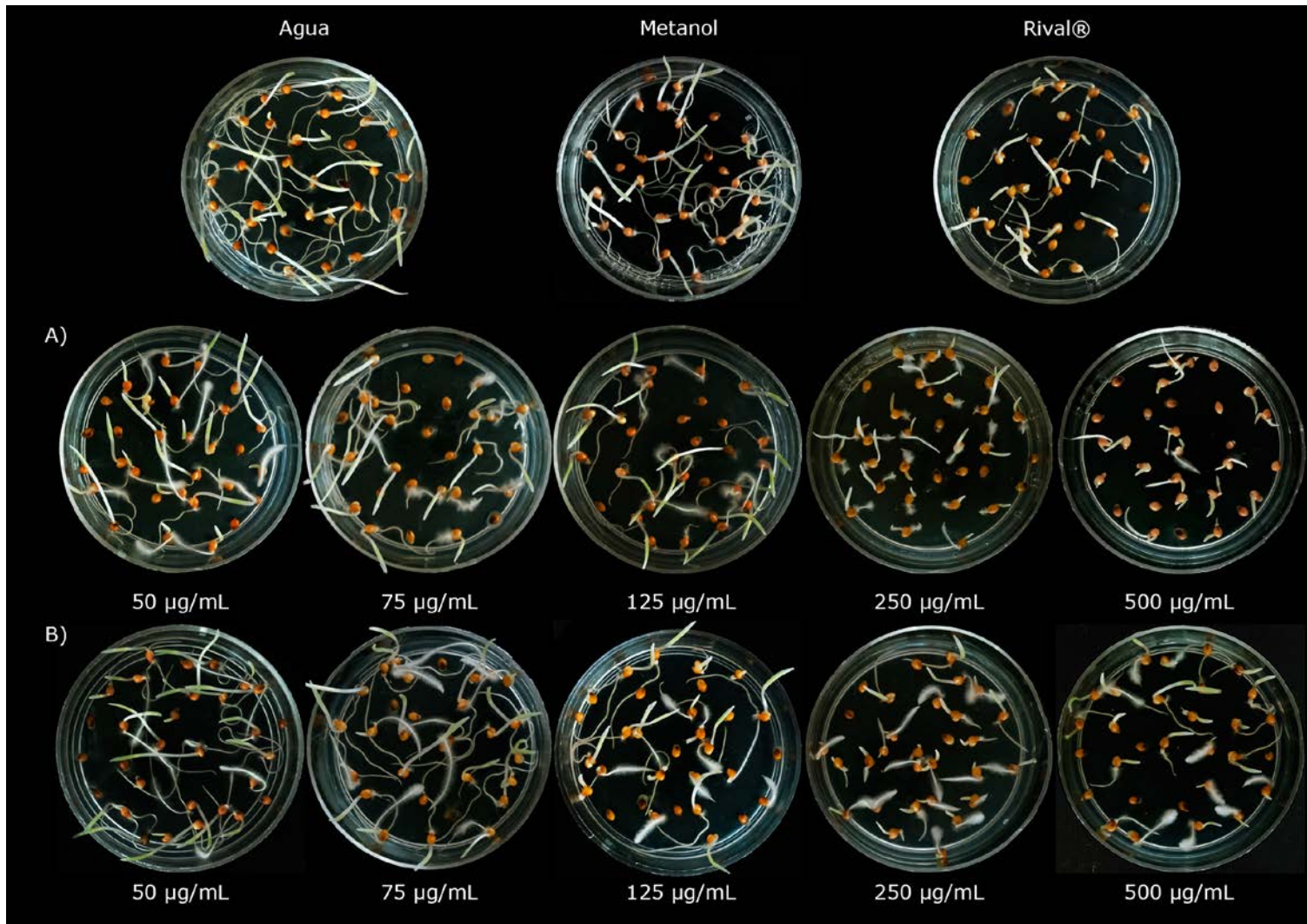


Figura 30. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos del medio de cultivo (A) y micelio (B) del hongo endófito Smeg4 sobre las semillas de *P. miliaceum*.

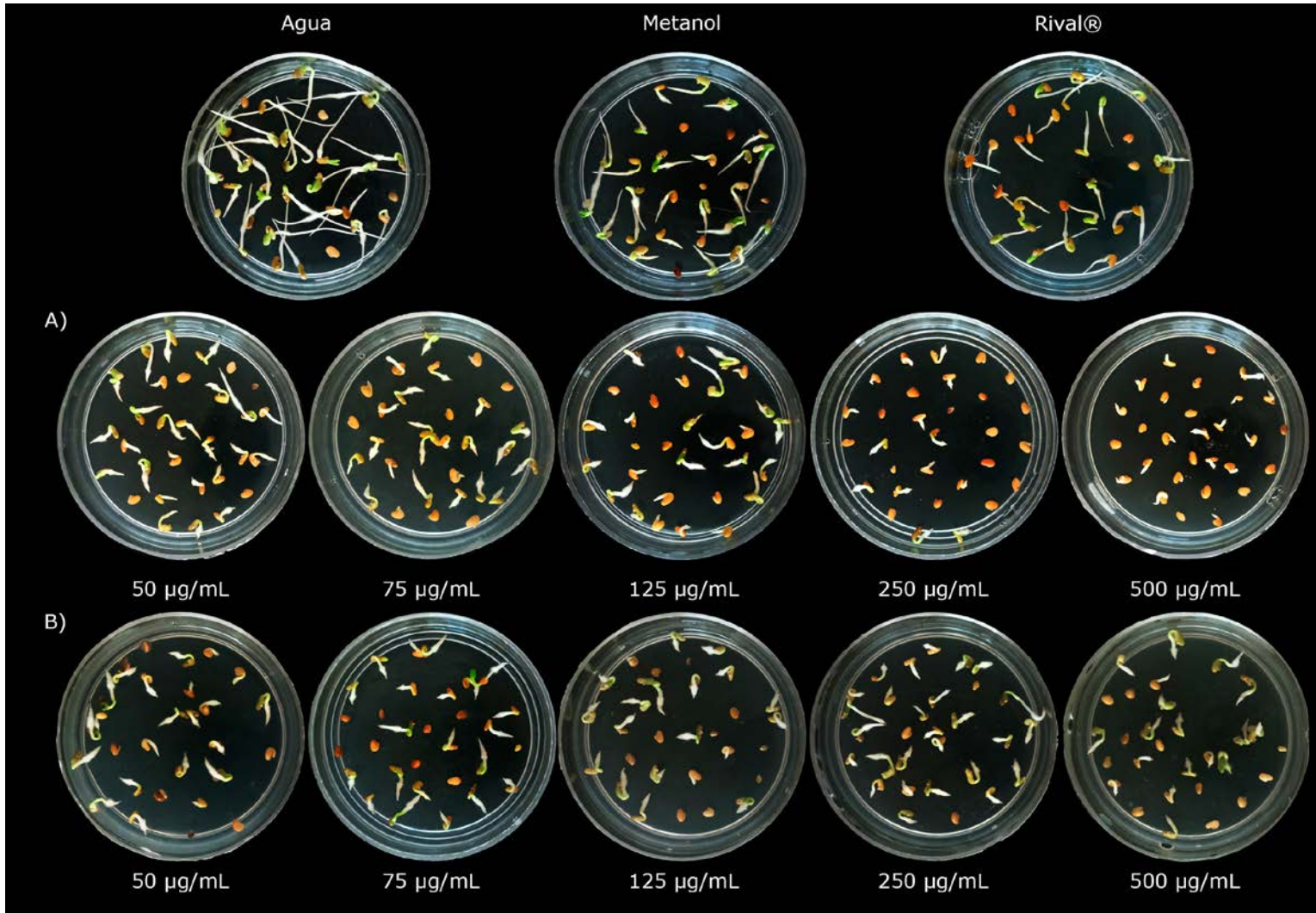


Figura 31. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos del medio de cultivo (A) y micelio (B) del hongo endófito Smeg4 sobre las semillas de *T. pratense*.





Figura 32. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos del medio de cultivo (A) y micelio (B) del hongo endófito Smeg4 sobre las semillas de *M. sativa*.



RESULTADOS y Discusión



Cuadro 15. Concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) de los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4 sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*.

Tratamiento	Semilla	CI ₅₀ (µg/mL)		
		Germinación	Elongación de raíz	Respiración
Extracto de medio de cultivo	<i>A. hypochondriacus</i>	91.9 ± 1.0	< 50	78.8 ± 1.1
	<i>P. miliaceum</i>	> 500	126.5 ± 1.1	57.7 ± 1.2
	<i>T. pratense</i>	> 500	< 50	> 500
	<i>M. sativa</i>	95.7 ± 1.2	57.4 ± 1.1	> 500
Extracto de micelio	<i>A. hypochondriacus</i>	> 500	57.29 ± 1.1	288.1 ± 1.2
	<i>P. miliaceum</i>	> 500	164.9 ± 1.1	66.1 ± 1.2
	<i>T. pratense</i>	428.2 ± 1.2	< 50	> 500
	<i>M. sativa</i>	217.8 ± 1.0	82.7 ± 1.2	> 500
Control Positivo (Rival®)	<i>A. hypochondriacus</i>	243.6 ± 1.1	152.7 ± 1.1	271.9 ± 1.2
	<i>P. miliaceum</i>	237.1 ± 1.0	78.5 ± 1.0	450.3 ± 1.0
	<i>T. pratense</i>	202.0 ± 1.2	105.3 ± 1.1	279.6 ± 1.2
	<i>M. sativa</i>	275.8 ± 1.2	108.5 ± 1.2	329.3 ± 1.3

RIVAL® (glifosato: sal monoamónica de *N*-(fosfonometil) glicina)

Finalmente, es importante señalar que a la fecha no existen estudios químicos ni biológicos sobre los microorganismos asociados a *S. macrocarpum*. El estudio del potencial antagónico del hongo endófito Smeg4 evidenció la presencia de compuestos orgánicos volátiles y no volátiles con actividad fitotóxica, antifúngica y antioomiceto. Los compuestos orgánicos volátiles producidos por este microorganismo, serán útiles para el desarrollo de agentes de biocontrol, debido a que exhibieron importante efecto inhibitorio sobre las especies de prueba, similar o superior al demostrado por los compuestos orgánicos volátiles de los hongos pertenecientes a los géneros *Muscodor* (Faith et al., 2015; Hanlon et al., 2012) e *Hypoxylon* (Sánchez-Fernández et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016). De igual manera, los compuestos orgánicos no volátiles serán de gran utilidad para el desarrollo de bioplaguicidas, en particular de agentes fitotóxicos (García-Méndez et al., 2016; Macías-Rubalcava et al., 2014).



VIII CONCLUSIONES

Las características macroscópicas y microscópicas del aislamiento Smeg4 de hojas de *S. macrocarpum*, sugieren que el hongo endófito en estudio pertenece al género *Hypoxylon*.

El hongo endófito Smeg4 cuenta con mecanismos de defensa físicos (formación de barreras miceliales) y químicos (difusión de pigmentos en el medio) contra hongos endófitos y fitopatógenos aislados de la misma hospedera.

El hongo Smeg4 inhibió en bioensayos de antagonismo múltiple directo a los microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. ultimum*.

El endófito Smeg4 produce compuestos orgánicos volátiles con propiedades antifúngicas, antioomiceto y fitotóxicas, potencialmente útiles para el uso de este microorganismo como agente de biofumigación.

Los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4, poseen potencial antifúngico, antioomiceto y fitotóxico sobre los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, y sobre las malezas *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa* con importancia agrícola. El extracto derivado del medio de cultivo fue el más activo sobre la mayoría de los organismos blanco.

El extracto del medio de cultivo del hongo endófito Smeg4, es más activo sobre el oomiceto *P. capsici*, y el extracto del micelio cultivado en mediana escala sobre el oomiceto *P. ultimum*, inhibiendo significativamente el crecimiento de los oomicetos.

El extracto del medio de cultivo del endófito Smeg4, cultivado en mediana escala es más antifúngico que el del micelio, inhibiendo significativamente el crecimiento de *A. alternata* y *F. oxysporum*.

El efecto antagónico evidenciado en los bioensayos de antagonismo múltiple por el hongo endófito Smeg4, sobre los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, es resultado de un efecto sinérgico entre los compuestos orgánicos volátiles y los metabolitos secundarios difusibles en el medio de cultivo, producido por el hongo Smeg4.



CONCLUSIONES



En general, los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4 cultivado en mediana escala, inhibieron significativamente y de forma dependiente de la concentración la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las cuatro semillas prueba.

Los extractos del medio de cultivo son más fitotóxicos sobre los tres procesos fisiológicos evaluados, que los derivados del micelio.

Las semillas de *A. hypochondriacus* son las más afectadas por la presencia de los extractos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito Smeg4.

Los extractos orgánicos del hongo endófito Smeg4 constituyen candidatos para su estudio químico biodirigido con el fin de obtener compuestos útiles para el desarrollo de antifúngicos, antioomicetos y herbicidas, cuyo impacto toxicológico y ambiental sea menor.



IX PERSPECTIVAS

Efectuar la identificación taxonómica del aislamiento Smeg4 por medio de la secuenciación de la región ITS1-5.8s-ITS2 del DNA ribosomal.

Realizar el cultivo a mayor escala del hongo endófito Smeg4 para la obtención como mínimo de 5 g de extracto del medio de cultivo y de 5 g de extracto de micelio, para llevar a cabo su estudio químico biodirigido e identificar por técnicas espectroscópicas y espectrométricas a los compuestos responsables de la actividad biológica de cada uno de los extractos.

Identificar los compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito Smeg4, empleando microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, y a los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, con la finalidad de evidenciar metabolitos secundarios con actividad antifúngica, antioomiceto y herbicida que puedan ser usados en el desarrollo de bioplaguicidas de origen natural cuyo impacto ambiental y toxicológico sea menor.

**X BIBLIOGRAFÍA**

- Abrahão, M. R. E., Molina, G., & Pastore, G. M. (2013). Endophytes: Recent developments in biotechnology and the potential for flavor production. *Food Research International*, 52(1), 367–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.007>
- Aguado-Santacruz, G. A. (2012). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura*. Celaya Guanajuato.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). World Agriculture Towards 2030/2050. Retrieved January 1, 2017, from <http://www.fao.org/economic/esa>
- Atmosukarto, I., Castillo, U., Hess, W. M., Sears, J., & Strobel, G. (2005). Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. *Plant Science*, 169(5), 854–861. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.06.002>
- Bailly, A., & Weisskopf, L. (2012). The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth. *Plant Signaling & Behavior*, 7(1), 79–85. <https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18418>
- Barnett, H. L. (Horace L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th Ed.). Minnesota: APS Press.
- Brent, K. (2012). Historical perspectives of fungicide resistance. In *Fungicide resistance in crop protection: risk and management* (pp. 3–18). Wallingford: CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845939052.0003>
- Busi, R., Vila-Aiub, M. M., Beckie, H. J., Gaines, T. A., Goggin, D. E., Kaundun, S. S., ... Powles, S. B. (2013). Herbicide-resistant weeds: from research and knowledge to future needs. *Evolutionary Applications*, 6(8), 1218–21. <https://doi.org/10.1111/eva.12098>
- Cantrell, C. L., Dayan, F. E., & Duke, S. O. (2012). Natural Products As Sources for New Pesticides. *Journal of Natural Products*, 75(6), 1231–1242. <https://doi.org/10.1021/np300024u>
- Cao, R., Liu, A. E. X., Gao, A. E. K., Dai, Y., & Wang, A. E. X. (2009). Mycoparasitism of Endophytic Fungi Isolated From Reed on Soilborne Phytopathogenic Fungi and Production of Cell Wall-Degrading Enzymes In Vitro, 584–592.



<https://doi.org/10.1007/s00284-009-9477-9>

Caseley, J. C., Cussans, G. W., Atkin, R. K., & Gressel, J. (1991). Why get resistance? It can be prevented or delayed. In *Herbicide Resistance in Weeds and Crops* (pp. 1–25).

<https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-1101-5.50004-8>

CESAVEG. (2011a). Manual de Plagas y Enfermedades en Chile. Retrieved from http://www.cesaveg.org.mx/html/folleto/folleto_chile_11.pdf

CESAVEG. (2011b). Manual de Plagas y Enfermedades en Jitomate. Retrieved from http://www.cesaveg.org.mx/html/folleto/folleto_jitomate_11.pdf

CESAVEG. (2011c). Manual de Plagas y Enfermedades en Maíz. Retrieved from http://www.cesaveg.org.mx/html/folleto/folleto_maiz_11.pdf

Cutler, H. G., & Cutler, S. J. (1999). *Biologically active natural products: agrochemicals*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Cutler, S. J., & Cutler, H. G. (2000). *Biologically active natural products: pharmaceuticals*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Dadachova, E., & Casadevall, A. (2008). Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6), 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.013>

Dai, J., Krohn, K., Flörke, U., Draeger, S., Schulz, B., Kiss-Szikszai, A., Van Ree, T. (2006). Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. *European Journal of Organic Chemistry*, (15), 3498–3506. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200600261>

Daisy, B. H., Strobel, G. A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D. K., & Runyon, J. B. (2002). Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 148(11), 3737–3741. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3737>

Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(12), 4022–4034.



- <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>
- Demain, A. L. (2014). Valuable Secondary Metabolites from Fungi (pp. 1–15). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1191-2_1
- Deshmukh, S. K., & Misra, J. K. (2016). *Fungi* (1st Ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Dighton, J. (2003). *Fungi in ecosystem processes* (1st Ed.). Boca Raton, Florida: Marcel Dekker Inc.
- Dighton, J. (2016). *Fungi in ecosystem processes* (2nd Ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Dimetry, N. Z. (2014). Different Plant Families as Bioresource for Pesticides. In *Advances in Plant Biopesticides* (pp. 1–20). New Delhi: Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0_1
- Ezra, D., & Strobel, G. A. (2003). Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. *Plant Science*, *165*(6), 1229–1238. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00330-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00330-3)
- Faith, N. G., Garcia, G., Skebba, V. P., Gandhi, N. R., & Czuprynski, C. J. (2015). Use of a commercial mixture of volatile compounds from the fungus *Muscodor* to inhibit *Salmonella* in ground turkey and beef. *Food Control*, *47*, 628–633. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.059>
- FAO. (2003). WORLD AGRICULTURE : TOWARDS 2015/2030 AN FAO PERSPECTIVE. Retrieved July 30, 2016, from <http://www.fao.org/3/a-y4252e.pdf>
- García-Méndez, M. C., Macías-Ruvalcaba, N. A., Lappe-Oliveras, P., Hernández-Ortega, S., & Macías-Ruvalcaba, M. L. (2016). Phytotoxic potential of secondary metabolites and semisynthetic compounds from endophytic fungus *Xylaria feejeensis* strain SM3e-1b isolated from *Sapium macrocarpum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(21), 4255–4263. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01111>
- Gasong, B. T., & Tjandrawinata, R. R. (2016). Production of secondary metabolite E2.2 from *Phaleria macrocarpa* endophytic fungus. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*,



6(10), 881–885. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.01.005>

Gómez Jaimes, R., Hernández Fuentes, L., Cossio Vargas, L. E., López Arriaga, J. G., & Sánchez Lucio, R. (2011). Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. Retrieved from <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3034/ENFERMEDADES FUNGOSAS Y BACTERINAS DEL CULTIVO DEL TOMATE EN EL ESTADO DE NAYARIT 2.pdf?sequence=1>

Griepentrog, H. W., & Dedousis, A. P. (2010). Mechanical Weed Control (pp. 171–179). https://doi.org/10.1007/978-3-642-03681-1_11

Guo, B., Wang, Y., Sun, X., & Tang, K. (2008). Bioactive natural products from endophytes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2), 136–142. <https://doi.org/10.1007/s10438-008-2002-2>

Hanlon, K. A. O., Knorr, K., Jørgensen, L. N., Nicolaisen, M., & Boelt, B. (2012). Exploring the potential of symbiotic fungal endophytes in cereal disease suppression. *Biological Control*, 63(2), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.08.007>

Hao, S.-H., Wei, Y., Wang, J., & Zhou, Y.-M. (2015). Allelopathy and the active metabolites of the endophytic fungus, *Alternaria* J46, from *Platyclusus orientalis*. *Weed Biology and Management*, 15(3), 95–101. <https://doi.org/10.1111/wbm.12072>

Harper, J. K., Arif, A. M., Ford, E. J., Strobel, G. A., Porco, J. A., Tomer, D. P., Grant, D. M. (2003). Pestacin: A 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron*, 59(14), 2471–2476. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00255-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00255-2)

Hellwig, V., Grothe, T., Mayer-Bartschmid, A., Endermann, R., Geschke, F.-U., Henkel, T., & Stadler, M. (2002). Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *The Journal of Antibiotics*, 55(10), 881–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12523821>



- Herre, E. A., Mejía, L. C., Kyllö, D. A., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A., & Van Bael, S. A. (2007). Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, *88*(3), 550–558. <https://doi.org/10.1890/05-1606>
- Hewitt, H. G., & Oliver, R. P. (2014). *Fungicides in crop protection*. (R. Oliver & H. G. Hewitt, Eds.) (2nd Editio). Wallingford: CABI. <https://doi.org/10.1079/9781780641669.0000>
- Horst, R. K. (2013). *Westcott's Plant Disease Handbook* (8th Ed.). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2141-8>
- Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W. (2015). Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(8), 3395–3405. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6494-4>
- Ibarra-Martínez, G. (2015). *Hongos endófitos de *H aematoxylon brasiletto* (Fabaceae) productores de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y herbicida*. UNAM.
- Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00151>
- Khan, A., & Lee, I.-J. (2013). Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms Glycine max L. growth during copper stress. *BMC Plant Biology*, *13*(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-86>
- Kharwar, R. N., Verma, V. C., Kumar, A., Gond, S. K., Harper, J. K., Hess, W. M., Strobel, G. A. (2009). Javanicin, an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of neem, chloridium sp. *Current Microbiology*, *58*(3), 233–238. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9313-7>
- Kharwar, & Strobel, G. (2011). Fungal endophytes: an alternative source of bioactive compounds for plant protection. In *Natural products in plant pest management* (pp. 218–241). Wallingford: CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845936716.0218>
- Koshino, H., Togiya, S., Terada, S., Yoshihara, T., Sakamura, S., Shimanuki, T., Tajimi, A. (1989). New Fungitoxic Sesquiterpenoids, Chokols A-G, from Stromata of *Epichloe*



- typhina* and the Absolute Configuration of Chokol E. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(3), 789_796. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869341>
- Koul, O., & Dhaliwal, G. S. (2001). *Phytochemical biopesticides*. Singapore: Harwood Academic Publishers.
- Kramer, R., & Abraham, W. R. (2012). Volatile sesquiterpenes from fungi: What are they good for? *Phytochemistry Reviews*, 11(1), 15–37. <https://doi.org/10.1007/s11101-011-9216-2>
- Krohn, K., Farooq, U., Flörke, U., Schulz, B., Draeger, S., Pescitelli, G., Kurtán, T. (2007). Secondary metabolites isolated from an endophytic *Phoma* sp. - Absolute configuration of tetrahydropyrenophorol using the solid-state TDDFT CD methodology. *European Journal of Organic Chemistry*, (19), 3206–3211. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200601128>
- Kuck, K.-H., Leadbeater, A., & Gisi, U. (2012). FRAC Mode of Action Classification and Resistance Risk of Fungicides. In *Modern Crop Protection Compounds* (pp. 539–557). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527644179.ch14>
- Kumar, S., Kaushik, N., Edrada-Ebel, R., Ebel, R., & Proksch, P. (2008). Endophytic Fungi for Pest and Disease Management. In *Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria* (pp. 365–387). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8571-0_17
- Kurepin, L. V, Zaman, M., & Pharis, R. P. (2014). Phytohormonal basis for the plant growth promoting action of naturally occurring biostimulators. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1715–1722. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6545>
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Perspective Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, 19(7), 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The fusarium laboratory manual* (1st Ed.). Iowa: Blackwell Publishing.



- Li, J. Y., & Strobel, G. A. (2001). Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry*, 57(2), 261–265. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00021-8)
- Li, X.-J., Zhang, Q., Zhang, A.-L., & Gao, J.-M. (2012). Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an Endophytic Fungus Associated with *Melia azedarach*, and Their Antifungal, Antifeedant, and Toxic Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(13), 3424–3431. <https://doi.org/10.1021/jf300146n>
- Macías-Rubalcava, M. L., Hernández-Bautista, B. E., Oropeza, F., Duarte, G., González, M. C., Glenn, A. E., ... Anaya, A. L. (2010). Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodor yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(10), 1122–1131. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9848-5>
- Macías-Rubalcava, M. L., Ruiz-Velasco Sobrino, M. E., Meléndez-González, C., & Hernández-Ortega, S. (2014). Naphthoquinone spiroketals and organic extracts from the endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as potential herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(16), 3553–3562. <https://doi.org/10.1021/jf500965k>
- Malezas de México. (2016). Retrieved January 1, 2017, from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm>
- Mani, V. M., Soundari, A. P. G., Karthiyaini, D., & Preeth, K. (2015). Bioprospecting Endophytic Fungi and Their Metabolites from Medicinal Tree *Aegle marmelos* in Western Ghats, India. *Mycobiology*, 43(3), 303. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.303>
- Mazoyer, M., & Roudart, L. (2006). *A history of world agriculture : from the neolithic age to the current crisis*. Monthly Review Press.
- Menne, H., & Köcher, H. (2007). HRAC Classification of Herbicides and Resistance Development. In *Modern Crop Protection Compounds* (pp. 5–26). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1002/9783527619580.ch1>



- Mercier, J., Lego, S. F., Smilanick, J. L., & Mercier, J. (2017). In-package use of *Muscodor albus* volatile-generating sachets and modified atmosphere liners for decay control in organic table grapes under commercial conditions. *Fruits*, 65(651), 31–38. <https://doi.org/10.1051/fruits/2009039>
- Morath, S. U., Hung, R., & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2–3), 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>
- Morcia, C., Malnati, M., & Terzi, V. (2011). *In vitro* antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.643458>
- Mousa, W. K., & Raizada, M. N. (2013). The Diversity of Anti-Microbial Secondary Metabolites Produced by Fungal Endophytes: An Interdisciplinary Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 4(March), 65. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00065>
- Müller, A., Faubert, P., Hagen, M., zu Castell, W., Polle, A., Schnitzler, J. P., & Rosenkranz, M. (2013). Volatile profiles of fungi - Chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genetics and Biology*, 54, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.02.005>
- Nandula, V. K. (2010). Herbicide Resistance: Definitions and Concepts. In *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds* (pp. 35–43). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470634394.ch2>
- Nollet, L. M. L., & Rathore, H. S. (2015). *Biopesticides handbook*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Pingali, P. L. (1995). Impact of Pesticides on Farmer Health and the Rice Environment: An Overview of Results from a Multidisciplinary Study in the Philippines. In *Impact of Pesticides on Farmer Health and the Rice Environment* (pp. 3–21). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0647-4_1
- Qasem, J. R., & Foy, C. L. (2001). Weed Allelopathy, Its Ecological Impacts and Future



- Prospects. *Journal of Crop Production*, 4(2), 43–119.
https://doi.org/10.1300/J144v04n02_02
- Rosales Robles, E., & Medina Cazares, T. (2000). *Manejo de malezas en Cultivos básicos*. SAGARPA. (2016). Atlas agroalimentario. Retrieved July 30, 2016, from http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016
- Sánchez-Fernández, R. E. (2016). *Actividad antagónica, antifúngica y fitotóxica de hongos endófitos de gliricidia sepium (fabaceae): identificación de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles de nodulisporium sp. GS4d2II1a*. UNAM.
- Sánchez-Fernández, R. E., Diaz, D., Duarte, G., Lappe-Oliveras, P., Sánchez, S., & Macías-Rubalcava, M. L. (2016). Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2II1a: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microbial Ecology*, 71(2), 347–364. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0679-3>
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, M. Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, C. M., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP*, 16(2), 132–146. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
- Sánchez-Ortiz, B. L. (2016). *Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de hongos endófitos de Haematoxylon brasiletto (Fabaceae) útiles en agricultura*. UNAM.
- Sánchez-Ortiz, B. L., Sánchez-Fernández, R. E., Duarte Lisci, G., Lappe-Oliveras, P., & Macías-Rubalcava, M. L. (2016). Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1313–1325. <https://doi.org/10.1111/jam.13101>
- Sandoval-Espinosa, Y. K. M. (2014). *Aislamiento y purificación de hongos endófitos con*



- potencial antifúngico y fitotóxico de Ly siloma acapulcense*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schulz, B., Haas, S., Junker, C., Andréé, N., & Schobert, M. (2015). Fungal endophytes – biology and bioprospecting Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science*, 109(1).
- Schulz, B., Römmert, A.-K., Dammann, U., Aust, H.-Jür., & Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*, 103(10), 1275–1283. <https://doi.org/10.1017/S0953756299008540>
- SENASICA. (2014). Malezas Reglamentadas. Retrieved from <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/malezas-reglamentadas>
- Shentu, X., Zhan, X., Ma, Z., Yu, X., & Zhang, C. (2014). Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 248–254. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000036>
- Shymanovich, T., Saari, S., Lovin, M. E., Jarmusch, A. K., Jarmusch, S. A., Musso, A. M., Faeth, S. H. (2015). Alkaloid Variation Among *Epichloid* Endophytes of Sleepygrass (*Achnatherum robustum*) and Consequences for Resistance to Insect Herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 41(1), 93–104. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0534-x>
- Sieber, T. N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21(2–3), 75–89. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.004>
- Spadoni, A., Neri, F., & Mari, M. (2015). Physical and Chemical Control of Postharvest Diseases. In R. Wills & J. Golding (Eds.) (pp. 89–116). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18489-6>
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms , 257–268.
- Tomscheck, A. R., Strobel, G. A., Booth, E., Geary, B., Spakowicz, D., Knighton, B., Ezra, D. (2010). *Hypoxylon* sp., an Endophyte of *Persea indica*, Producing 1,8-Cineole and Other



- Bioactive Volatiles with Fuel Potential. *Microbial Ecology*, 60(4), 903–914.
<https://doi.org/10.1007/s00248-010-9759-6>
- Tuininga, A. R. (2005). Interspecific Interaction Terminology: From Mycology to General Ecology. In J. Dighton, J. F. White, & P. Oudemans (Eds.), *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem* (Third Edit, pp. 265–283). CRC Press Taylor & Francis Group.
- Ulloa-Benítez, Á., Medina-Romero, Y. M., Sánchez-Fernández, R. E., Lappe-Oliveras, P., Roque-Flores, G., Duarte Lisci, G., ... Macías-Rubalcava, M. L. (2016). Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile and semi-volatile organic compounds from the endophyte *Hypoxyton anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia* (Burseraceae). *Journal of Applied Microbiology*, 121(2), 380–400.
<https://doi.org/10.1111/jam.13174>
- Villanueva Silva, R. (2014). *Potencial antagónico de hongos endófitos de Mimosa affinis y Sapium macrocarpum*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Villaseñor Mir, H. E., & Espitia Rangel, E. (2000). El trigo de Temporal en México. Retrieved from
<http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/406/711.pdf?sequence=1>
- Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., & Lee, I. J. (2012). Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules*, 17(9), 10754–10773.
<https://doi.org/10.3390/molecules170910754>
- Worapong, Jeerapun, Gary, S., Eugene J., F., J. Y., L., Gary, B., & W. M., H. (2001). *Muscodor albus* anam. gen. et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. *Mycotaxon*, 79, 67–79. Retrieved from
<http://www.mycotaxon.com/vol/abstracts/79/79.67.html>
- Worapong, Jeerapun, Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. F., Baird, G., & Hess, W. M. (2002). *Muscodor roseus* anna. nov. an endophyte from *Grevillea pteridifolia*. *Mycotaxon*, 81,



463–475.

Zar, J. H. (2010). *Biostatistical analysis : books a la carte edition*. (5th Ed.). Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall.

Zhao, J., Mou, Y., Shan, T., Li, Y., Zhou, L., Wang, M., & Wang, J. (2010). Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* Isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Molecules*, 15(11), 7961–7970. <https://doi.org/10.3390/molecules15117961>