



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES PRODUCIDOS POR HONGOS ENDÓFITOS CON
USO POTENCIAL EN LA AGRICULTURA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
YOLI MARIANA MEDINA ROMERO

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA
INSTITUTO DE QUÍMICA
COMITÉ TUTOR
DR. RICARDO REYES CHILPA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. OCTUBRE DE 2018



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: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Secretario: Dr. Mariano Martínez Vázquez

Vocal: Dr. José Fausto Rivero Cruz

Vocal: Dra. María Margarita Canales Martínez

Vocal: Dr. Jesús Aguirre Linares

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al Instituto de Química de la UNAM, por orgullosamente pertenecer a estas instituciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el proyecto 179194 y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) mediante el proyecto IN207117 que otorgaron el apoyo financiero para realizar la presente tesis, y al programa de becas del CONACyT por el apoyo económico recibido con número de CVU/Becario: 345794/239871.

A mi Tutora la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava.

A los miembros de mi Comité Tutor: Dr. Ricardo Reyes Chilpa y Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por su asesoría y comentarios durante los tutorales, que contribuyeron en gran medida durante mi formación académica y a mejorar la presente tesis.

A los integrantes del Jurado: Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. Mariano Martínez Vázquez, Dr. José Fausto Rivero Cruz, Dra. María Margarita Canales Martínez y Dr. Jesús Aguirre Linares, por sus valiosos comentarios y acertadas observaciones que permitieron enriquecer esta tesis.

A mis papás Juan José y María Luisa, muchas gracias por la vida y por mis hermanos, por amarme tanto como yo los amo a ustedes, sin toda su paciencia, apoyo y enseñanza no habría podido llegar hasta aquí, también por creer en mí, nunca dejarme caer ante la adversidad, animarme a luchar siempre por lo que quiero y a enfrentar mis miedos y por aguantarme siempre.

A mis hermanos Erandi y Cuauhtli, por todo el amor, apoyo, ayuda, comprensión, ejemplo y enseñanzas que me han dado siempre. A Balam y Gustavo por existir y ser una gran alegría en mi vida. A mis cuñados Christian y Elizabeth, por su apoyo en todo momento. Mi querida familia, soy muy feliz y afortunada por tenerlos a todos ustedes en mi vida, los amo mucho y ¡Por fin lo logramos!

A mi abuelita, tías, tíos, primas y primos que me han apoyado durante los momentos más difíciles.

A la Asistente Alma Lidia Cortés Montes por su apoyo y paciencia durante toda mi estancia en el Instituto de Química.

Al Q.F.B. Gonzalo Roque Flores por ayudarme durante los primeros bioensayos, por hacer divertidos los momentos de trabajo, por escucharme, apoyarme y por su valiosa amistad.

A la M. en C. Marcela Castillo Figa por creer en mi, apoyarme, escucharme y por sus buenos consejos.

A mis amigos: Irma, Mónica, Marbella, Adriana, Carmen, Víctor, Mauricio, Lorenzo, Daniel, Efrén, Edgar, Roger, Rodrigo, Alfredo y Antonio, por compartir momentos felices juntos, apoyarme y escucharme.

A mis alumnos de estancia: Fernando, Aaron, Aranza, Diana, Gerardo y Antonio, por hacer agradables los momentos en que trabajamos juntos, por estar dispuestos a aprender y porque yo también aprendí de ustedes.

Al M. en L. A. Rafael Ibarra por haberme enseñado cómo funciona el mundo de los artículos y las revistas internacionales.

Al Q.F.B. Alejandro Camacho Cruz, encargado del Cepario de la Facultad de Química por recibir en su colección el ejemplar de *Fusarium oxysporum* empleado en los experimentos de esta tesis.

A la Dra. Olga Gómez y la M. en C. Bertha Tlapal Bolaños, del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México, por la donación de los fitopatógenos.

A la Biól. María del Carmen Loyola Blanco por las fotografías de los 16 hongos endófitos del género *Hypoxyton*.

ÍNDICE

Lista de Figuras	iii
Lista de Cuadros.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
Resumen.....	1
Abstract	2
I. Introducción.....	3
II. Antecedentes.....	6
1. Problemática en la agricultura debido a microorganismos fitopatógenos.	7
2. Alternativas al uso de agroquímicos sintéticos.....	9
<i>2.1. Hongos endófitos como agentes de control biológico</i>	<i>9</i>
<i>2.2. VOCs producidos por hongos endófitos del género Hypoxylon como bioplaguicidas</i>	<i>14</i>
III. Hipótesis.....	17
IV. Objetivos	18
1. Objetivos generales	18
2. Objetivos particulares.....	18
V. Materiales y Métodos	20
1. Efecto de los hongos endófitos sobre el crecimiento radial de fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura.....	21
<i>1.1. Bioensayo de antagonismo directo múltiple.....</i>	<i>21</i>
<i>1.2. Potencial antagónico de los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos.....</i>	<i>22</i>
<i>1.3. Bioensayo de antagonismo de los VOCs producidos por los hongos endófitos, en caja de Petri dividida</i>	<i>23</i>

2.	Efecto de los VOCs selectos sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	23
2.1.	<i>Bioensayos in vitro del potencial antifúngico de los VOCs selectos.....</i>	<i>24</i>
2.2.	<i>Bioensayo in vivo del potencial antifúngico de los VOCs selectos.....</i>	<i>25</i>
2.3.	<i>Efecto de los VOCs selectos sobre la respiración.....</i>	<i>26</i>
2.4.	<i>Efecto de los VOCs selectos sobre la conductividad eléctrica.....</i>	<i>27</i>
2.5.	<i>Efecto de los VOCs selectos sobre la morfología de las hifas.....</i>	<i>27</i>
3.	Análisis estadísticos.....	29
VI.	Resultados y Discusión.....	30
1.	Efecto de los hongos endófitos sobre el crecimiento radial de fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura.....	31
1.1.	<i>Bioensayo de antagonismo directo múltiple.....</i>	<i>31</i>
1.2.	<i>Potencial antagónico de los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos.....</i>	<i>38</i>
1.3.	<i>Bioensayo del potencial antagónico de los VOCs producidos por los hongos endófitos, en caja de Petri dividida</i>	<i>44</i>
2.	Efecto de los VOCs selectos sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	49
2.1.	<i>Bioensayos in vitro del potencial antifúngico de los VOCs selectos.....</i>	<i>50</i>
2.2.	<i>Bioensayo in vivo del potencial antifúngico de los VOCs selectos.....</i>	<i>53</i>
2.3.	<i>Efecto de los VOCs selectos sobre la respiración.....</i>	<i>58</i>
2.4.	<i>Efecto de los VOCs selectos sobre la conductividad eléctrica.....</i>	<i>62</i>
2.5.	<i>Efecto de los VOCs selectos sobre la morfología de las hifas.....</i>	<i>65</i>
VII.	Conclusiones.....	70
VIII.	Perspectivas	72
IX.	Referencias bibliográficas.....	73
X.	Anexo.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hongos endófitos del género *Hypoxylon* utilizados en los bioensayos, las claves se componen de las dos primeras letras de la planta hospedera de la que fueron aislados, la e para indicar que son endófitos, la g de generalistas y un número consecutivo de acuerdo al número de endófitos aislados de cada planta hospedera.

Figura 2. Efecto del hongo endófito Haeg2 a los cinco días de cultivo, sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos: *A. alternata* (A), *F. oxysporum* (F), *P. capsici* (C) y *P. ultimum* (U), a los 3, 5 y 10 días de interacción antagónica. Se muestran los controles del crecimiento de los fitopatógenos (arriba), la interacción vista por el anverso (en medio) y la interacción vista por el reverso (abajo).

Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *A. alternata* provocado por los hongos endófitos del género *Hypoxylon* a los cinco días de cultivo, a los 3 (azul), 5 (rojo) y 10 (verde) días de interacción antagónica. Los valores superiores al 12% fueron estadísticamente significativos t-Student ($P<0.05$).

Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* provocado por los hongos endófitos del género *Hypoxylon* a los cinco días de cultivo, a los 3 (azul), 5 (rojo) y 10 (verde) días de interacción antagónica. Los valores superiores al 12% fueron estadísticamente significativos t-Student ($P<0.05$).

Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. capsici* provocado por los hongos endófitos del género *Hypoxylon* a los cinco días de cultivo, a los 3 (azul), 5 (rojo) y 10 (verde) días de interacción antagónica. Los valores superiores al 12% fueron estadísticamente significativos t-Student ($P<0.05$).

Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. ultimum* provocado por los hongos endófitos del género *Hypoxylon* a los cinco días de cultivo, a los 3 (azul), 5 (rojo) y 10 (verde) días de interacción antagónica. Los valores superiores al 12% fueron estadísticamente significativos t-Student ($P<0.05$).

Figura 7. Efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo (Me) y micelio (Mi) del hongo endófito Blaeg1 y del Carbendazim (Car), sobre el crecimiento de *A. alternata*. Control de crecimiento del fitopatógeno (C).

Figura 8. Porcentajes de inhibición producidos por los extractos orgánicos del medio de cultivo (verde oscuro) y micelio (verde claro) de los hongos endófitos del género *Hypoxylon* y del fungicida comercial Carbendazim (Car), sobre el crecimiento de *A. alternata*. Los valores superiores al 13% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P<0.05$).

Figura 9. Porcentajes de inhibición producidos por los extractos orgánicos del medio de cultivo (rosa oscuro) y micelio (rosa claro) de los hongos endófitos del género *Hypoxylon* y del fungicida comercial Carbendazim (Car), sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. Los valores superiores al 13% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P<0.05$).

Figura 10. Porcentajes de inhibición producidos por los extractos orgánicos del medio de cultivo (amarillo oscuro) y micelio (amarillo claro) de los hongos endófitos del género *Hypoxyton* y del fungicida comercial Metalaxil (Met), sobre el crecimiento de *P. capsici*. Los valores superiores al 13% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

Figura 11. Porcentajes de inhibición producidos por los extractos orgánicos del medio de cultivo (morado oscuro) y micelio (morado claro) de los hongos endófitos del género *Hypoxyton* y del fungicida comercial Metalaxil (Met), sobre el crecimiento de *P. ultimum*. Los valores superiores al 13% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

Figura 12. Efecto de los VOCs producidos por los hongos endófitos Maeg1 y Smeg4 a los cinco días de cultivo, sobre el crecimiento de *A. alternata*, a los días 3 y 5 de interacción antagónica. El control de crecimiento del fitopatógeno se muestra en la parte superior.

Figura 13. Porcentajes de inhibición generados por los VOCs producidos por los hongos endófitos del género *Hypoxyton*, a los cinco días de cultivo, sobre el crecimiento de *A. alternata* (verde), *F. oxysporum* (rosa), *P. capsici* (amarillo) y *P. ultimum* (morado) al día tres de interacción antagónica. Los valores superiores al 11% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

Figura 14. Porcentajes de inhibición generados por los VOCs producidos por los hongos endófitos del género *Hypoxyton*, a los cinco días de cultivo, sobre el crecimiento de *A. alternata* (verde), *F. oxysporum* (rosa), *P. capsici* (amarillo) y *P. ultimum* (morado) al día cinco de interacción antagónica. Los valores superiores al 11% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

Figura 15. Estructuras de los VOCs selectos producidos por los hongos endófitos del género *Hypoxyton*, los alcoholes: alcohol feniletílico, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, y los monoterpenos: eucaliptol, ocimeno y terpinoleno.

Figura 16. Inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de la mezcla de los seis VOCs, utilizando el método de dilución en agar.

Figura 17. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos, utilizando el método de dilución en agar. La mezcla de los seis VOCs (MT), la mezcla de los tres alcoholes (MA), los alcoholes feniletílico (A), 2-metil-1-butanol (2-M) y 3-metil-1-butanol (3-M), y los monoterpenos eucaliptol (E), ocimeno (O) y terpinoleno (T), a concentraciones de 125 (azul), 250 (rojo), 500 (verde) y 1000 (morado) $\mu\text{g/mL}$. * valores estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$)

Figura 18. Inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de la mezcla de los seis VOCs, utilizando el método de fase gas.

Figura 19. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos, utilizando el método de fase gas. La mezcla de los seis VOCs (MT), la mezcla de los tres alcoholes (MA), los alcoholes feniletílico (A), 2-metil-1-butanol (2-M) y 3-metil-1-butanol (3-M), y los monoterpenos eucaliptol (E), ocimeno (O) y terpinoleno (T), a

concentraciones de 125 (azul), 250 (rojo), 500 (verde) y 1000 (morado) $\mu\text{g/mL}$. * valores estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

Figura 20. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* creciendo sobre jitomates cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en presencia de los VOCs selectos. La mezcla de los seis VOCs (MT), la mezcla de los tres alcoholes (MA), los alcoholes feniletílico (A), 2-metil-1-butanol (2-M) y 3-metil-1-butanol (3-M), y los monoterpenos eucaliptol (E), ocimeno (O) y terpinoleno (T), a concentraciones de 12.5 (azul oscuro), 25 (rojo), 50 (verde oscuro), 75 (morado), 125 (azul claro), 250 (anaranjado), 500 (lila) y 1000 (rosa) $\mu\text{g/mL}$. Todos los valores fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$) (Figura 20A). Efecto inhibitorio producido por la mezcla de los seis VOCs selectos sobre los jitomates cherry infectados por *F. oxysporum*, en un rango de concentraciones de 12.5 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 20B).

Figura 21. Respiración de las hifas de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos evaluados a las 2 (azul), 5 (anaranjado) y 8 (gris) horas de tratamiento. Mezcla de los seis VOCs (MT), mezcla de los tres alcoholes (MA), alcohol feniletílico (A), 2-metil-1-butanol (2-M), 3-metil-1-butanol (3-M), eucaliptol (E), ocimeno (O) y terpinoleno (T), a concentraciones de 125, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Todos los valores de porcentaje fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

Figura 22. Conductividad eléctrica expresada como conductividad relativa de las hifas de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos evaluados a las 2 (azul), 5 (anaranjado) y 8 (gris) horas de tratamiento. Mezcla de los seis VOCs (MT), mezcla de los tres alcoholes (MA), alcohol feniletílico (A), 2-metil-1-butanol (2-M), 3-metil-1-butanol (3-M), eucaliptol (E), ocimeno (O) y terpinoleno (T), a concentraciones de 125, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Todos los valores de porcentaje fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

Figura 23. Micrografías de las hifas de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos evaluados de manera individual y en mezclas, empleando los métodos de dilución y de fase gas. Hifas de la suspensión de micelio después de 8 h de tratamiento con los VOCs utilizando el método de dilución a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$: C1 hifas control teñidas con azul de lactofenol; A1 alcohol feniletílico; 2-M1 2-metil-1-butanol; 3-M 3-metil-1-butanol; E1 eucaliptol; O1 ocimeno; T1 terpinoleno; AM1 mezcla de los tres alcoholes. Efecto de la concentración de la mezcla de los seis VOCs después de 8 h de tratamiento empleando el método de dilución: TM1 125 $\mu\text{g/mL}$; TM2 250 $\mu\text{g/mL}$; TM3 500 $\mu\text{g/mL}$; TM4 1000 $\mu\text{g/mL}$. Hifas de *F. oxysporum* observadas después de 48 h de tratamiento con los VOCs por el métodos de fase gas a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$: C2 hifas control teñidas con rojo congo; A2 alcohol feniletílico; 2-M2 2-metil-1-butanol; 3-M2 3-metil-1-butanol; E2 eucaliptol; O2 ocimeno; T2 terpinoleno. Efecto de la concentración de la mezcla de los tres alcoholes usando el método de fase gas: AM2 250 $\mu\text{g/mL}$; AM3 500 $\mu\text{g/mL}$; AM4 1000 $\mu\text{g/mL}$. Efecto de la concentración de la mezcla de los seis VOCs utilizando el método de fase gas: C3 hifa control teñida con azul de lactofenol; TM5 50 $\mu\text{g/mL}$; TM6 75 $\mu\text{g/mL}$; TM7 125 $\mu\text{g/mL}$; TM8 250 $\mu\text{g/mL}$; TM9 500 $\mu\text{g/mL}$. Las flechas indican: Mayor penetración del colorante dentro de la hifa (amarilla); proceso de vacuolización (verde); engrosamiento de la parte media de la hifa y adelgazamiento de las orillas (azul); espacios vacíos (roja); proliferación de las vacuolas (morada); hifas rotas (negra).

Figura 24. Micrografías de las alteraciones morfológicas causadas por la mezcla de los seis VOCs selectos, utilizando los métodos de dilución (Figura 24A) y de fase gas (Figura 24B) a 500 µg/mL, después de 8 y 48 h, respectivamente, también se muestran imágenes amplificadas de las alteraciones en las hifas (Figura 24C).

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto inhibitorio de los VOCs selectos producidos por hongos endófitos del género *Hypoxyton*, sobre el crecimiento radial *in vivo* e *in vitro*, y la respiración de las hifas del fitopatógeno *F. oxysporum* expresado como CI₅₀ (µg/mL).

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
cm	Centímetros
CPD	Caldo-papa-dextrosa
°C	Grados Celsius
g	Gramos
h	Horas
H ₂ O	Agua
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
µg	Microgramo
min	Minutos
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mm	Milímetros
PDA	Agar-papa-dextrosa
REBIOSH	Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
sp.	Especie
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles

RESUMEN

Debido a las grandes pérdidas en las cosechas ocasionadas por la presencia de microorganismos nocivos, se emplean agroquímicos sintéticos, mejorando la calidad así como la producción de los cultivos. Sin embargo, su uso extensivo ocasiona efectos adversos en la salud y el ambiente. Para mantener la protección de los cultivos y evitar los efectos adversos, se propone el uso de agentes de control biológico y de bioplaguicidas. Dentro de los agentes de control biológico se encuentran los hongos endófitos mientras que los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por estos microorganismos son un ejemplo de bioplaguicidas.

En la presente tesis se evaluó el potencial antagónico de 16 hongos endófitos del género *Hypoxylon* sobre el crecimiento radial de cuatro fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Pythium ultimum*, mediante bioensayos de antagonismo directo múltiple y simple *in vitro*, así como a través de la evaluación del efecto de los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio. Los bioensayos de antagonismo entre los hongos endófitos y los fitopatógenos demostraron que los endófitos son productores de metabolitos difusibles así como de VOCs, los cuales son bioactivos y su actividad incrementa conforme transcurren los días de interacción antagónica. Por otra parte, los extractos orgánicos del medio de cultivo fueron más activos que los del micelio. También se evaluó el potencial como bioplaguicidas de seis VOCs producidos por endófitos del género *Hypoxylon*, tres alcoholes y tres monoterpenos, estudiando el efecto de cada compuesto, de la mezcla de los seis VOCs, y de la mezcla de los tres alcoholes, sobre el crecimiento radial del hongo fitopatógeno *F. oxysporum*, por medio de bioensayos *in vitro* e *in vivo*. Se determinó el efecto sobre la respiración, la conductividad eléctrica y la morfología de las hifas del fitopatógeno. Se demostró por primera vez, que los VOCs selectos tuvieron potentes efectos antifúngicos contra *F. oxysporum*. Estos efectos dependen de la concentración y del tiempo de exposición, y actúan de manera sinérgica.

Los resultados permitieron demostrar que los endófitos del género *Hypoxylon* en estudio son candidatos para el desarrollo de agentes de control biológico y que los VOCs selectos pueden utilizarse para el desarrollo de bioplaguicidas con uso potencial en el tratamiento de infecciones postcosecha provocadas por el hongo *F. oxysporum* en jitomates.

ABSTRACT

Due to the great losses in the harvests caused by the presence of microorganisms, synthetic agrochemicals are used, improving both the quality and the production of crops. However, its extensive use causes adverse effects on health and the environment. To maintain crop protection and avoid adverse effects, the use of biological control agents and biopesticides is proposed. Among the biological control agents are the endophytic fungi while the volatile organic compounds (VOCs) produced by these microorganisms are an example of biopesticides.

In the present thesis, the antagonistic potential of 16 endophytic fungi of the genus *Hypoxyton* was evaluated on the radial growth of four phytopathogenic microorganisms with negative impact on agriculture: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* and *Pythium ultimum*, by multiple direct antagonism and simple *in vitro* bioassays, as well as with the evaluation of the organic extracts of culture medium and mycelium. The antagonism bioassays between the endophytic fungi and the phytopathogens showed that endophytes produce both diffusible and VOCs metabolites, which are bioactive and their activity increases with the time of antagonistic interaction. On the other hand, the organic extracts of the culture medium were more active than those of the mycelium. The potential of six VOCs produced by endophytes of the genus *Hypoxyton* was evaluated as biopesticides, three alcohols and three monoterpenes. We studied the effects of each compound, the mixture of the six VOCs, and the three alcohols, on the radial growth of the phytopathogenic fungus *F. oxysporum* by *in vitro* and *in vivo* bioassays, and determined the effects on respiration, on electrical conductivity and hyphal morphology of the phytopathogen. It was demonstrated for the first time, that the select VOCs had potent antifungal effects against *F. oxysporum*. These effects depend on the concentration and time of exposure, and act synergistically.

The results allowed to demonstrate that the endophytes of the genus *Hypoxyton* under study, are candidates for the development of biological control agents, and that selected VOCs can be used for biopesticides development, in the treatment of post-harvest infections caused by the fungus *F. oxysporum* in tomatoes.

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos fitopatógenos afectan los sistemas de producción de cultivos, provocando pérdidas tanto en la calidad como en la cantidad de las cosechas producidas (Narayanasamy, 2013). Para evitar estas pérdidas, se han aplicado agroquímicos sintéticos, lo que ha permitido mejorar la calidad y la producción de los cultivos (Raza *et al.*, 2016). Sin embargo, la aplicación intensiva de los agroquímicos sintéticos genera grandes problemas de contaminación ambiental y de aguas subterráneas, efectos adversos en la salud humana, efectos ecológicos, como por ejemplo, al entrar en la cadena alimenticia tienen un impacto en un amplio rango de organismos, así como el incremento notable en la resistencia de los patógenos a los agroquímicos (Butt *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2015; González *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Raza *et al.*, 2016). Debido a las consecuencias negativas del uso intensivo de los agroquímicos sintéticos, es evidente la necesidad de desarrollar estrategias alternativas para el control eficiente de las enfermedades en las plantas de cultivo, maderables y ornamentales (Deng *et al.*, 2015; Mercier y Jiménez, 2004) y que no sean dañinas para especies no blanco, humanos ni el ambiente (Raza *et al.*, 2016). Dos alternativas viables para incrementar la protección de los cultivos de importancia económica contra enfermedades de origen fúngico entre otras, son el uso agentes de control biológico (Raza *et al.*, 2016) y de bioplaguicidas (Dimetry, 2014; Mercier y Jiménez, 2004; Tanwar *et al.*, 2012).

Los agentes de control biológico son organismos vivos no patogénicos que exhiben potencial antagónico contra microorganismos patógenos que causan numerosas enfermedades económicamente importantes, como los hongos y los oomicetos, entre otros. Los agentes de control biológico son capaces de suprimir el desarrollo de los patógenos a través de uno o más mecanismos con el objetivo de reducir la incidencia y severidad de las enfermedades que causan (Narayanasamy, 2013). Una de las principales ventajas del control biológico es que es ambientalmente seguro (Schalchli *et al.*, 2016).

El control biológico es un trabajo sistemático integral, en el cual es necesario tener en cuenta tres aspectos principales para que sea efectivo: los agentes de control biológico, los microorganismos patógenos y las condiciones ambientales en las cuales se utilizará (Raza *et al.*, 2016). Como ejemplo de agentes de control biológico se encuentran los hongos endófitos, estos microorganismos son una alternativa cuando los agroquímicos sintéticos se

han dejado de usar debido a su toxicidad o cuando las plagas han desarrollado resistencia a ellos (Butt *et al.*, 2001). Los hongos endófitos producen metabolitos secundarios (aleloquímicos), químicamente diversos y con amplio efecto biológico sobre diferentes sistemas (Holighaus y Rohlf, 2016; Waller *et al.*, 2005).

El término bioplaguicida se refiere a los principios bioactivos, generalmente metabolitos secundarios producidos por plantas, virus, bacterias y hongos, entre otros organismos, que tienen un uso potencial como agentes de control de plagas (Dimetry, 2014; Tanwar *et al.*, 2012). Dentro de las ventajas del uso de los bioplaguicidas, se encuentra el poder usarlos para inhibir o matar a los microorganismos fitopatógenos en áreas cerradas, sin requerir del contacto directo con los cultivos a proteger (Dimetry, 2014; Mercier y Jiménez, 2004; Schotsmans *et al.*, 2008; Tanwar *et al.*, 2012). Además, de requerir una mínima manipulación por lo que se pueden emplear ampliamente para tratamientos postcosecha (Mercier y Jiménez, 2004). Los bioplaguicidas, son relativamente seguros y compatibles con el ambiente (Dimetry, 2014; Mercier y Jiménez, 2004; Mercier y Smilanick, 2005; Tanwar *et al.*, 2012). Sin embargo, hay pocos bioplaguicidas disponibles actualmente (Dimetry, 2014; Mercier y Jiménez, 2004; Strobel, 2011; Tanwar *et al.*, 2012).

En el caso de los bioplaguicidas, un ejemplo son los compuestos orgánicos volátiles (VOCs por sus siglas en Inglés) producidos entre otros microorganismos por hongos endófitos, los cuales poseen potentes propiedades antimicrobianas actuando principalmente en mezclas (Ezra y Strobel, 2003; Ezra *et al.*, 2004; Mercier y Jiménez, 2004; Mercier y Manker, 2005; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016). Dentro de los VOCs se encuentran principalmente alcoholes, monoterpenos, ácidos, ésteres y cetonas (Ezra y Strobel, 2003; Ezra *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2010). Debido a su bajo peso molecular, los VOCs pueden entrar en fase gaseosa a temperatura ambiente (Vespermann *et al.*, 2007) facilitando su aplicación y evitando su persistencia tanto en los cultivos como en el ambiente. Se ha reportado que algunos hongos endófitos del género *Hypoxyton* producen una gran diversidad de VOCs con actividad biológica (Dai *et al.*, 2006; Hensens *et al.*, 1999; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Suwannarach *et al.*, 2013; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2010), por lo que se propone su uso como agentes de control biológico, y constituyen una fuente viable de bioplaguicidas para el tratamiento de enfermedades postcosecha.

Actualmente, existen escasos estudios sobre el efecto de los VOCs producidos por los hongos endófitos provenientes de especies de plantas mexicanas, evaluados de manera

individual, en mezclas o utilizando los hongos endófitos directamente, en experimentos *in vitro* e *in vivo* que demuestren su aplicación como bioplaguicidas o agentes de control biológico.

La presente tesis aporta conocimientos sobre el uso de hongos endófitos del género *Hypoxyton*, como agentes de control biológico de microorganismos fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura mediante experimentos *in vitro*, y demostró el efecto antifúngico de seis VOCs selectos producidos por este grupo de endófitos, por medio de bioensayos *in vitro* e *in vivo* sobre el crecimiento, la respiración y la conductividad eléctrica del fitopatógeno *F. oxysporum*. Estos hallazgos permiten proponer su aplicación en la agricultura moderna como agentes de control biológico y como bioplaguicidas respectivamente.

II.ANTECEDENTES

La población humana está en constante crecimiento, valores estimados predicen que para 2050 llegará aproximadamente a 10 mil millones. El mayor reto es alimentar y proveer vivienda para la población mundial que incrementa en una tasa exponencial. Sin embargo, también es necesario proteger la salud humana y asegurar las condiciones sociales y económicas. Para lograr uno de estos retos, se emplea la agricultura, debido a que provee alimentos y proporciona productos naturales requeridos en la industria. No obstante, hay factores que limitan la productividad, como pueden ser abióticos (temperatura, disponibilidad de agua, salinidad) y bióticos (plagas, patógenos y malezas) (Edwards y Gatehouse, 2007).

Dentro de los factores bióticos que afectan los sistemas de producción de cultivos, provocando pérdidas significativas tanto en la calidad como en la cantidad de las cosechas producidas, se encuentran los microorganismos fitopatógenos (Narayanasamy, 2013; Singh *et al.*, 2012). Mediante la aplicación de agroquímicos sintéticos para controlar y/o evitar las pérdidas ocasionadas por la presencia de los microorganismos fitopatógenos en los sistemas agroforestales, se ha mejorado notablemente tanto la producción como la calidad de los cultivos (Mercier y Jiménez, 2004; Raza *et al.*, 2016).

Los agroquímicos sintéticos son sustancias o mezcla de sustancias utilizadas para prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo a los vectores de enfermedades humanas o animales, especies de plantas o animales no deseados que causen daños, o que interfieran con la producción, el procesamiento, almacenaje o mercado de los alimentos y productos agrícolas, entre otros. Dentro de la definición se considera que son agentes químicos tóxicos que se liberan desmesuradamente al ambiente para combatir plagas de cultivos (FAO, 2003). El uso excesivo de los plaguicidas ha incrementado sustancialmente la contaminación ambiental, el número de patógenos resistentes y los efectos adversos a la salud (Raza *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2010). Además, se sabe que algunos plaguicidas sintéticos contaminan el agua subterránea y al entrar en la cadena alimenticia tienen un impacto en un amplio rango de organismos que la conforman (Butt *et al.*, 2001).

1. Problemática en la agricultura debido a microorganismos fitopatógenos

Existen dos grupos principales de microorganismos fitopatógenos que tienen un impacto negativo en la agricultura, los hongos verdaderos y los oomicetos. Ambos son microorganismos eucariones, multicelulares con estructuras filamentosas llamadas hifas, que en conjunto forman el micelio, y se reproducen de manera asexual. Los hongos verdaderos presentan en su pared celular quitina como componente principal y esporas no móviles. Los oomicetos, por otra parte, tienen como componente principal de la pared celular la celulosa y producen esporas móviles o zoosporas (Agrios, 2005; Arnold et al 2003; Strobel y Daisy, 2003). Como ejemplo de hongos verdaderos que causan las mayores pérdidas en la agricultura se encuentran especies del género *Alternaria* y *Fusarium*, que producen enfermedades como el tizón temprano de la papa y del jitomate, el marchitamiento vascular de diversas plantas, las manchas de las hojas y las manchas de la fruta en cucurbitáceas, cebollas, manzanas y cítricos, así como la pudrición de la fruta en la cerezas. En particular, *Alternaria alternata*, afecta hojas, tallos, flores y frutas de plantas anuales, también ataca cultivos de hortalizas, plantas ornamentales, cítricos y manzanas, entre otros. La sintomatología que presentan las plantas enfermas va desde manchas foliares y manchas en general, hasta la caída de las plántulas (damping-off), la pudrición de los tallos, tubérculos y frutos. En el caso de *Fusarium oxysporum*, causa el marchitamiento vascular de verduras y flores, de plantas ornamentales perennes herbáceas, cultivos de importancia económica como el jitomate, plátano, cucurbitáceas y algodón, así como árboles. Dentro de los oomicetos los géneros con mayor importancia son *Phytophthora* y *Pythium*, que principalmente pudren raíces, semillas, frutos, entre otras enfermedades. *Phytophthora capsici*, es causante del tizón tardío de la papa, de otras enfermedades que causan la pudrición de las raíces, de los tallos y de los frutos, la pudrición de frutos carnosos, además produce royas en varias plantas anuales y perennes, enfermedades necróticas en las cortezas (cankers) y muerte regresiva en árboles (dieback). Finalmente, *Pythium ultimum*, que es de los microorganismos más comunes y más importantes causantes de la podredumbre de las semillas, la caída de las plántulas (damping-off) y la pudrición de las raíces de todo tipo de plantas, lesiones de los tallos, así como de la pudrición de los frutos y los tubérculos sobre el suelo, y el tizón algodonoso de los pastos (Agrios, 2005; Strobel y Daysi, 2003).

El género *Fusarium* es de gran importancia en la agricultura mundial, debido a que se ha reportado al menos una enfermedad producida por una de las especies pertenecientes a este género, en la mayoría de los cultivos. La severidad de las enfermedades causadas por las especies de *Fusarium* varía dependiendo de la planta hospedera y del organismo blanco enfermo, es decir, si se trata de las hojas, los tallos, las raíces, las semillas o los frutos (Leslie y Summerell, 2006). Debido a la gran variabilidad genética y a su amplia distribución, es difícil encontrar las mejores condiciones para controlar las enfermedades causadas por *Fusarium*, además de requerir de mucho tiempo para su tratamiento (González *et al.*, 2012; Leslie y Summerell, 2006; Mercier y Jiménez, 2004).

A nivel mundial y nacional, el cultivo de jitomate, *Solanum lycopersicum* (Familia: Solanaceae), es considerado el segundo más importante debido al gran número de productos que se obtienen a partir del fruto, y a la superficie de terreno dedicada a su cultivo (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008; González *et al.*, 2012). El hongo *F. oxysporum*, es uno de los principales microorganismos fitopatógenos de jitomate que causa pérdidas de hasta un 60% en los rendimientos del cultivo y también afecta considerablemente la calidad de los frutos postcosecha (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008; Leslie y Summerell, 2006).

El tratamiento para combatir las enfermedades causadas por los hongos del género *Fusarium* en cultivos de importancia económica, así como postcosecha incluyen la aplicación de agroquímicos sintéticos o el uso de cultivos de plantas resistentes (González *et al.*, 2012; Gordon y Martyn, 1997; Leslie y Summerell, 2006). Sin embargo, al utilizar los agroquímicos sintéticos frecuentemente no se considera el número y momento propicio de las aplicaciones, la concentración y el ingrediente activo por lo que esto ocasiona grandes costos de producción (González *et al.*, 2012). Por otra parte, el uso de plantas resistentes requiere encontrar variedades que puedan crecer sin verse afectadas por la enfermedad por lo que también genera altos costos de producción e inversión de tiempo en la investigación y desarrollo de las especies resistentes (Fravel *et al.*, 2003; González *et al.*, 2012; Leslie y Summerell, 2006).

Al aplicar de manera intensiva agroquímicos sintéticos, se contribuye en gran medida a la contaminación ambiental y al deterioro en la salud humana (Deng *et al.*, 2015; González *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). Debido a estos problemas, es necesario realizar un control de las enfermedades en las plantas de cultivo y ornamentales alternativo y eficiente para reducir

los costos tanto ecológicos como económicos de producción (Deng *et al.*, 2015; Mercier y Jiménez, 2004).

2. Alternativas al uso de agroquímicos sintéticos

Actualmente, para obtener una mayor producción de cultivos, se utilizan alternativas efectivas para controlar las plagas y que no sean dañinas para el organismo blanco, el ambiente, los humanos y los animales (Park *et al.*, 2010; Raza *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Dentro de las alternativas para incrementar la protección de los cultivos de importancia económica contra enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos entre otras, se encuentran el uso de agentes de control biológico y de bioplaguicidas (Dimetry, 2014; Mercier y Jiménez, 2004; Raza *et al.*, 2016; Tanwar *et al.*, 2012).

En el caso de los productos postcosecha, que generalmente se entregan en lugares en donde son almacenados por cierto periodo de tiempo mientras llegan a los consumidores finales se necesita el desarrollo de medidas de seguridad para mantener la calidad de los productos y controlar las enfermedades (Huang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016). En este sentido, el control biológico y los bioplaguicidas utilizando microorganismos o compuestos producidos por los microorganismos respectivamente, son una medida de seguridad efectiva para reducir las pérdidas de cosechas de una manera amigable con el ambiente (Huang *et al.*, 2011; Thomscheck *et al.*, 2010; Schalchli *et al.*, 2016).

2.1. Hongos endófitos como agentes de control biológico

Un agente de control biológico es un organismo vivo no patogénico que actúa antagónicamente contra microorganismos patógenos, como los hongos y los oomicetos, entre otros, inhibiendo su crecimiento o llegando a causarle la muerte (Huang *et al.*, 2011; Narayanasamy, 2013; Park *et al.*, 2010). La supresión del desarrollo de los patógenos se realiza a través de uno o más mecanismos de acción, reduciendo tanto la incidencia como la severidad de las enfermedades causadas (Narayanasamy, 2013; Thomscheck *et al.*, 2010). Es importante señalar que para que el control biológico funcione es necesario seleccionar a los agentes de control biológico adecuados para los microorganismos patógenos que se quieren eliminar, y las condiciones ambientales en las cuales se utilizará (Raza *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2010).

Dentro de los agentes potenciales de control biológico, se encuentran los hongos endófitos, utilizados como agentes de micofumigación (Butt *et al.*, 2001; Thomscheck *et al.*, 2010). El término micofumigación, se refiere a la aplicación de la mezcla de VOCs producidos por hongos para el control de otros microorganismos en áreas cerradas (Park *et al.*, 2010; Stinson *et al.*, 2003; Strobel, 2006; 2011; Strobel *et al.*, 2001).

Los hongos endófitos son microorganismos que colonizan los tejidos vegetales de su planta hospedera, sin causar síntomas aparentes de enfermedad (Arnold, 2005; 2007; Azevedo, y Araújo, 2007; Petrini, 1991; Schulz y Boyle, 2005). La estrecha interacción planta-endófito puede desarrollar una relación de antagonismo, comensalismo o mutualismo (Arnold *et al.*, 2003; Gunatilaka, 2006; Kogel *et al.*, 2006; Promputtha *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 1999; Schulz y Boyle, 2005). Las interacciones entre los hongos endófitos y la planta hospedera han sido propuestas como un equilibrio controlado por factores ambientales, químicos, fisiológicos y genéticos (Schulz y Boyle, 2005). En estas relaciones los hongos endófitos pueden tener un efecto en la ecología, en el éxito reproductivo y en la diversidad de las comunidades fúngicas de las plantas hospederas, ya que algunos de ellos, son capaces de producir metabolitos secundarios, que además de presentar gran diversidad química y demostrar efecto biológico en diferentes sistemas, son capaces de actuar por si mismos o de inducir resistencia a factores abióticos como la temperatura, humedad, pH y presión osmótica, y bióticos como bacterias, hongos, nematodos e insectos, dentro de su hospedera (Bourassa *et al.*, 2007; Monnet *et al.*, 2001; Paz *et al.*, 2007; Strobel *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2005; Zaurov *et al.*, 2001; Zhang y Nan, 2007). Dentro de las plantas, la competencia por el tejido de colonización estimula mecanismos de defensa y/o protección por parte de los hongos endófitos; éstos pueden ser indirectos, como la inducción de la resistencia, la estimulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios o la promoción del crecimiento de las plantas hospederas; ecológicos, por ocupación del nicho ecológico o depredación e hiperparasitismo del patógeno; y directos, los cuales implican la secreción de enzimas o metabolitos secundarios volátiles o difusibles (Carroll, 1988; Gao *et al.*, 2010; Istifadah y McGee, 2006; Schulz *et al.*, 1999).

Cabe destacar que cada una de las aproximadamente 300,000 especies de plantas conocidas puede hospedar al menos un endófito (Arnold, 2005; 2007; Rosa *et al.*, 2011; Schulz y Boyle, 2005). La mayoría de los hongos endófitos pertenece al Phylum Ascomycota y sus anamorfos asociados, y en menor proporción se han registrado Basidiomycota y Zygomycota

(Rosa *et al.*, 2011). Por ejemplo, en un estudio realizado en el bosque tropical húmedo de la Isla de Barro Colorado en Panamá, se encontró que todas las hojas estudiadas contenían diversos hongos endófitos, sin importar la especie o familia de hospedero. Sin embargo, algunos endófitos mostraron preferencia por ciertas hospederas (Arnold *et al.*, 2001).

Los hongos endófitos coexisten con una gran diversidad de microorganismos dentro de su planta hospedera. Algunos de estos microorganismos pueden ser bacterias, algas, virus, y principalmente otros hongos endófitos. Se ha observado que la distribución de las diversas especies de hongos se asemeja a un mosaico con diferentes especies que se encuentran en contacto, lo que produce una mezcla extremadamente heterogénea de especies de hongos (Herre *et al.*, 2007). Debido a que se trata de microorganismos que utilizan el mismo tipo de recursos, puede ocurrir una interacción de competencia interespecífica, generando cambios en el uso de algún recurso por parte de cualquiera de los competidores (Oudum y Barrett, 2005; Pianka, 2000). Al haber cambios en el uso de los recursos por parte de uno de los competidores, existen dos tipos de hongos: los especialistas y los generalistas. Los hongos especialistas son aquellos que muestran un rango restringido a los cambios en las condiciones ambientales, son altamente específicos, poco abundantes, y están adaptados a un hospedero particular. Por el contrario, los hongos generalistas tienen una tolerancia más amplia a las condiciones ambientales, son más comunes, muy abundantes, y pueden encontrarse en diversos hospederos (Pianka, 2000; Ricklefs, 1996; Rosa *et al.*, 2011; Schulz y Boyle, 2005; West-Eberhard, 2003).

Los hongos endófitos tanto especialistas como generalistas se relacionan con otros endófitos, con hongos fitopatógenos y con su planta hospedera mediante la producción de metabolitos secundarios. En microorganismos fitopatógenos, se ha observado que los hongos generalistas necrótrofos causan lesiones grandes que proliferan dentro de las primeras 72 horas después de la inoculación, mientras que algunos de los hongos especialistas necrótrofos o biótropos causan lesiones mucho más pequeñas y no son evidentes hasta 96 horas después de la inoculación y otros no producen lesiones (Andrew *et al.*, 2012). La distribución de los hongos endófitos típicamente comprende pocas especies dominantes, y numerosas especies detectadas sólo esporádicamente (Arnold *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2005; Mittermeier *et al.*, 1999; Rosa *et al.*, 2011; Saikkonen, 2007).

Los hongos endófitos en estudio pertenecen al género *Hypoxylon*, que como características macroscópicas presentan micelio polvoso, en el anverso son color café oscuro con halos

blancos y en el reverso color café oscuro. Conforme el micelio envejece se torna totalmente café. Tienen crecimiento radial algunos con bordes irregulares. Producen exudado café y no difunden pigmento. Presentan un olor característico (Figura 1). Dentro de las características microscópicas, se observan hifas septadas, ramificadas. Conidióforos bifurcados. Los conidios son ovalados, sin septos (Barnet y Hunter, 1987). Los hongos endófitos pertenecientes a la especie *Hypoxylon anthochroum* empleados en este trabajo así como otros endófitos pertenecientes al género *Hypoxylon*, producen VOCs con actividad biológica reportada previamente (Hensens *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2010; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Suwannarach *et al.*, 2013; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2010). En algunos de los trabajos antes mencionados, se observó que los hongos endófitos presentaron actividad inhibitoria en experimentos in vitro contra diversos microorganismos fitopatógenos incluyendo a *Fusarium oxysporum* (Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016; Suwannarach *et al.*, 2013). Adicionalmente, se reportó el uso del endófito *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 como agente de control biológico contra *Penicillium digitatum* creciendo en *Citrus limon* (L.) Burm.f. y contra *Penicillium expansum* creciendo en *Citrus reticulata* Blanco y *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (Suwannarach *et al.*, 2013). En el trabajo realizado con el endófito *Hypoxylon* sp. strain CI-4, al evaluar el efecto de los VOCs contra 10 fitopatógenos, se demostró actividad antifúngica y antioomiceto (Thomscheck *et al.*, 2010). Por otro lado, en trabajos previos de dos de los endófitos en estudio, *Hypoxylon anthochroum* strain Blaci (Ulloa-Benítez *et al.*, 2016) y *Nodulisporium* sp. aislamiento GS4d2II1a (Sánchez-Fernández *et al.*, 2016), se demostró la actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica de los VOCs producidos por estos hongos.

En el trabajo realizado con el arbusto *Larrea tridentata* (Sessé & Moc. ex DC.) Coville, se aisló el hongo endófito y patógeno *Phoma* sp., se observó que este microorganismo produce VOCs, principalmente sesquiterpenos, un reducido número de derivados del naftaleno, alcoholes y cetonas capaces de inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Phytophthora palmivora*, *Verticillium dahliae*, *Ceratocystis ulmi* y *Cercospora beticola*. Por otra parte, las evaluaciones realizadas con el extracto orgánico del arbusto, inhibieron de manera similar a los hongos de prueba, encontrándose que el compuesto mayoritario *trans*-cariofileno producido por *Phoma* sp., también es el principal metabolito obtenido del extracto de *L. tridentata* (Strobel *et al.*, 2011). En otro estudio, se encontró que los tallos de la planta *Heterosmilax japónica* Kunth, están colonizados por una amplia variedad de hongos

endófitos de los géneros *Mycosphaerella*, *Phomopsis*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Glomerella*, *Botryosphaeria* y *Guignardia* (Gao *et al.*, 2005).

Debido a los posibles efectos de protección de los hongos endófitos a su hospedera, a su diversidad biológica y a la gran capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos, aunado a que representan una gran proporción de las especies de hongos a nivel mundial, existen varios estudios concernientes a su diversidad, ecología y aplicaciones biotecnológicas (Arnold, 2007; Rosa *et al.*, 2011). Estas investigaciones por un lado, han puesto en evidencia que los endófitos son una fuente potencial de nuevos productos naturales para la explotación en la medicina moderna, la agricultura y la industria. Por otra parte, han contribuido a la sistemática de hongos (Arnold *et al.*, 2001; Arnold, 2007), a las estimaciones de biodiversidad (Arnold *et al.*, 2001), a la ecología de plantas y hongos, a la biología evolutiva, así como a la investigación aplicada que va desde el control biológico hasta la bioprospección (Arnold, 2007; Dreyfuss y Chapela, 1994).

Por ejemplo, en la planta *Artemisia annua* L., el endófito más frecuentemente aislado es *Colletotrichum* sp. Este endófito produce 11 metabolitos secundarios (ergosterol, 3 β ,5 α ,6 β -trihidroxi-ergosta-7,22-dieno, 3 β -hidroxi-ergosta-5-eno, 3-oxo-ergosta-4,6,8(14),22-tetraeno, 3 β -hidroxi-5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,22-dieno, 3 β -hidroxi-5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,9(11),22-trieno y 3-oxo-ergosta-4-eno, ácido indol-3-acético, ácido 6-isoprenilindol-3-carboxílico, 3 β ,5 α -dihidroxi-6 β -acetoxi-ergosta-7,22-dieno y 3 β ,5 α -dihidroxi-6 β -fenilacetiloxi-ergosta-7,22-dieno), de los cuales, cuatro (3 β -hidroxi-ergosta-5-eno, 3 β -hidroxi-5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,22-dieno, 3 β ,5 α -dihidroxi-6 β -acetoxi-ergosta-7,22-dieno y 3 β ,5 α -dihidroxi-6 β -fenilacetiloxi-ergosta-7,22-dieno) presentaron actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* y *Pseudomonas* sp., y de los microorganismos *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Además, todos los compuestos mostraron actividad contra los microorganismos fitopatógenos *P. capsici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* y *Helminthosporium sativum* (Lu *et al.*, 2000). Otro ejemplo, es el estudio en el que se demostró que la presencia de hongos endófitos en las hojas de cacao reduce sustancialmente la caída de las hojas y el daño provocados por el oomiceto fitopatógeno *Phytophthora* sp. (Arnold *et al.*, 2003).

Los metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos son principalmente fitohormonas como el ácido indol-3-acético y otros promotores del crecimiento; alcoholes; terpenos, especialmente mono, sesqui y diterpenos; alcaloides como aminas, amidas, derivados

indólicos y pirrozilidinas; esteroides; derivados isocumarínicos; quinonas; flavonoides; fenilpropanoides y lignanos; péptidos; fenoles y ácidos fenólicos; y compuestos alifáticos (Monnet *et al.*, 2001; Paz *et al.*, 2007; Tan y Zou, 2001; Waller *et al.*, 2005).

2.2. VOCs producidos por hongos endófitos del género *Hypoxyton* como bioplaguicidas

Los bioplaguicidas son metabolitos secundarios producidos por plantas, bacterias y hongos, entre otros organismos, que pueden usarse como agentes de control de plagas alternativos (Dimetry, 2014; Tanwar *et al.*, 2012).

Una de las principales ventajas es su uso en áreas cerradas y sin necesitar estar en contacto con los cultivos a proteger (Dimetry, 2014; Mercier y Jiménez, 2004; Schotsmans *et al.*, 2008; Tanwar *et al.*, 2012), así como una mínima manipulación, por lo que es útil en tratamientos postcosecha (Mercier y Jiménez, 2004). Además, son relativamente seguros y no dañan el ambiente (Dimetry, 2014; Mercier y Jiménez, 2004; Mercier y Smilanick, 2005; Tanwar *et al.*, 2012). Sin embargo, aún no se han desarrollado muchos bioplaguicidas (Dimetry, 2014; Mercier y Jiménez, 2004; Strobel, 2011; Tanwar *et al.*, 2012). Los productos postcosecha generalmente se entregan a los supermercados directamente mientras que llegan a los consumidores después de estar almacenados por cierto periodo de tiempo. El desarrollo de medidas de seguridad para mantener el bienestar humano y controlar las enfermedades postcosecha es muy importante. El uso de bioplaguicidas es una medida de seguridad efectiva para reducir las pérdidas de las cosechas de una manera amigable con el ambiente (Huang *et al.*, 2011).

Como ejemplo de bioplaguicidas se encuentran los VOCs producidos por hongos endófitos, que son químicamente diversos (Ezra y Strobel, 2003; Ezra *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2010; Holighaus y Rohlf, 2016; Mercier y Jiménez, 2004; Mercier y Manker, 2005; Monnet *et al.*, 2001; Paz *et al.*, 2007; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016; Waller *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2016). Las mezclas de VOCs producidos por hongos endófitos se componen principalmente de alcoholes, monoterpenos, aldehídos, ácidos, ésteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, compuestos que contienen nitrógeno, compuestos que contienen sulfuro, entre otros (Ezra y Strobel, 2003; Ezra *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2010; Hung *et al.*, 2015; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016; Wang *et al.*,

2016). Debido a su bajo peso molecular (Vespermann *et al.*, 2007) su aplicación es fácil, ya que a temperatura ambiente entran en fase gaseosa, evitando que permanezcan en los cultivos. En algunos estudios se ha demostrado que los VOCs tienen un gran efecto inhibitorio y la capacidad de matar a los organismos de prueba. Así mismo, se ha observado que la mezcla de los VOCs puede tener actividad sinérgica en la inhibición de los organismos blanco (Ezra y Strobel, 2003; Strobel, 2006; Suwannarach *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016). Además, los VOCs han tenido un papel importante durante la evolución de los microorganismos en el contexto de las interacciones, así como en las dinámicas poblacionales y de comunidades (Campos *et al.*, 2010). Se ha reportado que la mezcla de VOCs producida por hongos endófitos durante su crecimiento también tiene un papel en la formación y regulación de las asociaciones simbióticas y en la distribución de los organismos saprobios, patogénicos y de las micorrizas. Además, están involucrados en el reconocimiento de las hospedadoras, en la defensa y en la competencia (Hung *et al.*, 2015).

Por ejemplo, los VOCs producidos por *Muscodor albus* inhibieron por completo a los fitopatógenos *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Tapesia yallundae* y *Xylaria* sp. (Strobel *et al.*, 2001). En otro estudio realizado con *Muscodor albus* se encontró que este hongo fue efectivo en el control de enfermedades post-cosecha de manzanas y duraznos causadas por *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Monilinia fructicola* (Mercier y Jiménez, 2004).

Un tercer trabajo realizado con un hongo endófito perteneciente al género *Hypoxylon*, *Nodulisporium* sp. CF016, evaluado *in vitro*, inhibe y en algunos casos mata a un amplio rango de fitopatógenos *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum coccodes*, *Magnaporthe oryzae*, *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, demostrando ser un agente de micofumigación efectivo en enfermedades postcosecha causadas por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en manzanas (Park *et al.*, 2010).

Algunos hongos endófitos del género *Hypoxylon* producen una gran diversidad de VOCs con actividad biológica (Dai *et al.*, 2006; Hensens *et al.*, 1999; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Suwannarach *et al.*, 2013; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2010) constituyendo así una fuente viable de bioplaguicidas.

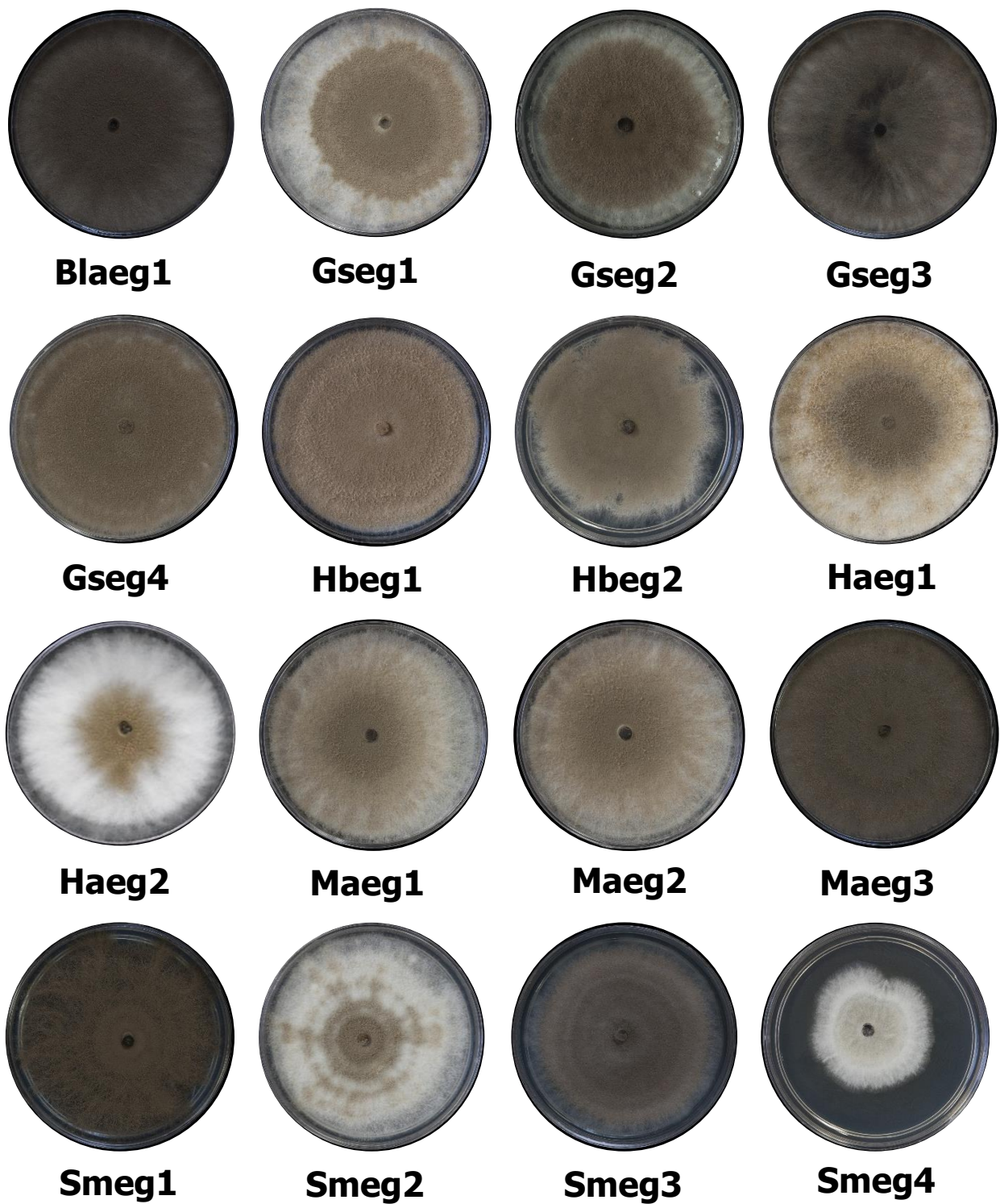


Figura 1. Hongos endófitos del género *Hypoxylon* utilizados en los bioensayos, las claves se componen de las dos primeras letras de la planta hospedera de la que fueron aislados, la e para indicar que son endófitos, la g de generalistas y un número consecutivo de acuerdo al número de endófitos aislados de cada planta hospedera.

III. HIPÓTESIS

Los hongos endófitos del género *Hypoxylon* producen VOCs como un mecanismo de defensa química para poder colonizar y establecerse en plantas que se encuentran en una zona de amplia biodiversidad. Por lo tanto, el estudio del efecto de estos endófitos así como de algunos de los VOCs producidos por ellos, sobre microorganismos fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura, permitirá contribuir al desarrollo de agentes de control biológico y bioplaguicidas alternativos en el tratamiento de enfermedades postcosecha.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivos generales

- 1) Estudiar el potencial antagónico de algunos hongos endófitos del género *Hypoxylon*, obtenidos de las hojas sanas de plantas de la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla, a través de bioensayos de antagonismo directo múltiple y simple *in vitro*, y de la evaluación del efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, con la finalidad de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las complejas interacciones endófito-fitopatógeno y proponer el uso de los hongos endófitos como agentes de control biológico antifúngicos o antioomiceto con impacto negativo en la agricultura.
- 2) Evaluar el potencial como bioplaguicidas de seis VOCs selectos biosintetizados por endófitos del género *Hypoxylon*, tres alcoholes y tres monoterpenos, estudiando el efecto de cada compuesto, de la mezcla de los seis VOCs, y de la mezcla de los tres alcoholes, sobre el crecimiento del fitopatógeno *F. oxysporum*, mediante bioensayos *in vitro* e *in vivo*, así como sobre la respiración, la conductividad eléctrica y la morfología de las hifas de fitopatógeno, con el fin de aportar conocimientos que conduzcan a la aplicación de los VOCs selectos en estudio como bioplaguicidas alternativos, eficaces y biodegradables, en el control de enfermedades postcosecha.

2. Objetivos particulares

- 1) Realizar bioensayos de antagonismo directo múltiple entre los hongos endófitos del género *Hypoxylon* y cuatro microorganismos fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura: *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. ultimum*.
- 2) Determinar la actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, mediante bioensayos de dilución en agar usando como organismos de prueba cuatro microorganismos fitopatógenos.
- 3) Evaluar el potencial aleloquímico de los VOCs producidos por los hongos endófitos, por medio de bioensayos de antagonismo simple en caja de Petri dividida.

- 4) Analizar el efecto de los VOCs selectos de manera individual y en mezclas por medio de bioensayos *in vitro* sobre el crecimiento radial del fitopatógeno *F. oxysporum*, utilizando los métodos de dilución en agar y fase gas.
- 5) Establecer el efecto bioplaguicida *in vivo* de los VOCs selectos de manera individual y en mezclas, sobre *F. oxysporum* creciendo en jitomates cherry.
- 6) Estudiar el efecto de los VOCs selectos de manera individual y en mezclas sobre la respiración de las hifas de *F. oxysporum*.
- 7) Investigar el efecto de los VOCs selectos de manera individual y en mezclas sobre la conductividad eléctrica de *F. oxysporum*.
- 8) Observar el efecto de los VOCs selectos de manera individual y en mezclas, sobre la morfología de las hifas de *F. oxysporum*, mediante preparaciones en fresco a partir de suspensiones de micelio y de microcultivos por los métodos de dilución en agar y de fase gas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente tesis, se utilizaron 16 hongos endófitos a partir de un total de 124 aislamientos endofíticos de las hojas sanas de 11 plantas hospederas: *Bursera lancifolia* (Schltdl.) Engl. (Burseraceae), *Bursera linaloe* (La Llave) Rzed., Calderón & Medina (Burseraceae), *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. (Fabaceae), *Haematoxylon brasiletto* H.Karst. (Fabaceae), *Hippocratea acapulcensis* Kunth (Celastraceae), *Leucaena macrophylla* (Lam.) de Wit (Fabaceae), *Lysiloma acapulcense* (Kunth) Benth. (Fabaceae), *Mimosa affinis* B. L. Rob. (Fabaceae), *Piper leucophyllum* (Miq.) C. DC. (Piperaceae), *Salvia* sp. (Labiatae) y *Sapium macrocarpum* Müll. Arg. (Euphorbiaceae), recolectadas en septiembre de 2010 en la Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla (REBIOSH). La REBIOSH se localiza en el municipio de Quilamula, en el estado de Morelos y cuenta con 59,030 hectáreas. Presenta un clima cálido subhúmedo, con una temperatura media anual de 24.3 °C y una precipitación media anual de 885.3 mm. El principal tipo de vegetación es la selva baja caducifolia y cuenta con un total de 130 familias, 469 géneros y 967 especies de plantas vasculares (SEMARNAT, 2005; Fernández-Saldaña *et al.*, 2007).

Además, se trabajó con seis VOCs selectos producidos por los hongos endófitos *Nodulisporium* sp. aislamiento GS4d2II1 (*Hypoxylon anthochroum*) (Sánchez-Fernández *et al.*, 2016) e *Hypoxylon anthochroum* aislamiento Blaci (Ulloa-Benítez *et al.*, 2016), los alcoholes feniletílico, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, y los monoterpenos eucaliptol, ocimeno y terpinoleno. El 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, eucaliptol, ocimeno y terpinoleno son sintetizados por *Nodulisporium* sp. aislamiento GS4d2II1 (*H. anthochroum*) (Sánchez-Fernández *et al.*, 2016), y el alcohol feniletílico, 2-metil-1-butanol, eucaliptol y terpinoleno por *H. anthochroum* aislamiento Blaci (Ulloa-Benítez *et al.*, 2016). Los estándares de estos compuestos se adquirieron en Sigma-Aldrich con una pureza de ~98%. Los seis VOCs selectos se evaluaron tanto de manera individual, así como en la mezcla de todos ellos y en la mezcla de los tres alcoholes.

1. Efecto de los hongos endófitos sobre el crecimiento radial de fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura

1.1. Bioensayo de antagonismo directo múltiple

Los bioensayos de antagonismo directo múltiple se realizaron en cajas de Petri de 15 cm de diámetro, utilizando como endófitos de prueba a los 16 hongos endófitos del género *Hypoxylon*, y como competidores cuatro microorganismos fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura, dos hongos verdaderos: *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, y dos oomicetos: *Phytophthora capsici* y *Pythium ultimum*. 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.

Los hongos de prueba se sembraron en el centro de las cajas de Petri, que contenían 40 mL de PDA, colocando cuatro inóculos equidistantes de 5 mm diámetro, y se incubaron durante 5 días a 28 °C, con fotoperiodo luz fluorescente/oscuridad 12:12 h, utilizando una incubadora Thermo Scientific Precision (Modelo 3759). Posteriormente, se inocularon los competidores ubicando dos inóculos de 5 mm de diámetro de cada fitopatógeno a cada lado del endófito de prueba. Los inóculos se colocaron pegados a la orilla de las cajas de Petri, para observar la posible inhibición a distancia causada por la presencia de VOCs bioactivos. Adicionalmente, como control de crecimiento se sembraron los competidores fitopatógenos en los mismos lugares sin la presencia del endófito de prueba. Los bioensayos se realizaron al azar, por cuadruplicado.

El bioensayo se monitoreó a los 3, 5 y 10 días de interacción antagónica, midiendo el diámetro de las colonias de cada microorganismo fitopatógeno y se comparó con su respectivo control de crecimiento (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; Roque-Flores, 2017; Sánchez-Ortíz *et al.*, 2016). Para obtener el porcentaje de inhibición que ejerce el hongo endófito de prueba sobre los hongos competidores, se utilizó la siguiente ecuación:

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

Donde a es el crecimiento del microorganismo fitopatógeno en presencia del hongo endófito de prueba y b es el crecimiento del microorganismo fitopatógeno sin la presencia del competidor.

1.2. Potencial antagónico de los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos obtenidos del medio de cultivo y micelio de los 16 hongos endófitos, se realizó mediante la evaluación de su efecto, sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos de prueba: *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. ultimum*, utilizando el método de dilución en agar (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; Meléndez *et al.*, 2015; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016).

Los bioensayos se realizaron en cajas Petri de 5 cm de diámetro. Las muestras se prepararon disolviendo 20 mg de cada uno de los extractos orgánicos en 250 µL de MeOH. En seguida, se adicionaron 40 mL de H₂O destilada estéril y 40 mL de agar-papa-dextrosa (PDA) (2%), para obtener una concentración final de 250 µg/mL. En cada caja de Petri se vertieron 5 mL de la disolución y se dejaron solidificar (~40 °C). A continuación, se colocó un inóculo de 5 mm de diámetro del fitopatógeno de prueba, en el centro de cada caja. Los inóculos se tomaron de colonias en PDA de 8 días de cultivo. Las cajas de Petri se incubaron de dos (oomicetos) a cuatro (hongos verdaderos) días, dependiendo del microorganismo de prueba, a 28 °C, con fotoperiodo luz fluorescente/oscuridad 12:12 h, empleando una incubadora Thermo Scientific Precision (Modelo 3759). Paralelamente, se realizaron controles negativos PDA (1%) y PDA (1%) – MeOH (250 µL). Como control positivo se utilizó el fungicida comercial Prozycar® 50 P.H (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato) a una concentración de 250 µg/mL, para hongos verdaderos, y el Ridomil Gold 4E® (Metalaxil-m) para los oomicetos a una concentración de 250 µg/mL. Los bioensayos se realizaron por cuadruplicado, bajo un diseño completamente al azar (Meléndez *et al.*, 2015; Medina-Romero *et al.*, 2017; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016).

Al finalizar el bioensayo se obtuvieron las mediciones perpendiculares del diámetro del micelio de cada uno de los fitopatógenos de prueba y de sus repeticiones. Los porcentajes de inhibición del crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba provocados por los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los 16 hongos endófitos, se calcularon con respecto al control negativo.

1.3. Bioensayo de antagonismo de los VOCs producidos por los hongos endófitos, en caja de Petri dividida

Para evaluar la actividad antifúngica y antioomiceto de los VOCs producidos por los 16 hongos endófitos del género *Hypoxyton*, se emplearon cajas de Petri de 10 cm, divididas en dos compartimentos, cada uno conteniendo 10 mL de PDA. En uno de los compartimentos se colocaron cuatro inóculos de 5 mm de diámetro del endófito de prueba, tomados de un cultivo en PDA de 8 días, y se incubaron durante 5 días a 28 °C con fotoperiodo luz fluorescente/oscuridad 12:12 h, usando una incubadora Thermo Scientific Precision (Modelo 3759). Transcurrido el periodo de incubación, se colocaron cuatro inóculos de 5 mm de diámetro de cada uno de los microorganismos fitopatógenos de prueba (*A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. ultimum*) en el otro compartimento. Las cajas de Petri se envolvieron con papel Parafilm® y se incubaron bajo las condiciones antes mencionadas. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento, completamente al azar. Asimismo, se obtuvieron cultivos de crecimiento control de los fitopatógenos sin la presencia del endófito. El bioensayo se monitoreó a los 3, 5 y 10 días de interacción antagónica, midiendo el diámetro de las colonias de cada microorganismo fitopatógeno y se comparó con su respectivo control (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Sánchez-Ortíz *et al.*, 2016). Para obtener el porcentaje de inhibición que ejerce el hongo endófito de prueba sobre los hongos competidores, se utilizó la ecuación señalada en el inciso 1.1.

2. Efecto de los VOCs selectos sobre *Fusarium oxysporum*

El efecto de los seis VOCs selectos evaluados de manera individual y en las dos mezclas sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, se realizó mediante bioensayos *in vitro* e *in vivo*. Los bioensayos *in vitro* se llevaron a cabo empleando los métodos de dilución en agar y de fase gas, mientras que el bioensayo *in vivo* se realizó con jitomates cherry infectados con el fitopatógeno. Además, se evaluó el efecto de los VOCs selectos sobre la respiración, la conductividad eléctrica y la morfología de las hifas de *F. oxysporum*.

2.1. Bioensayos *in vitro* del potencial antifúngico de los VOCs selectos

2.1.1. Método de dilución en agar

Los bioensayos del potencial antifúngico de los VOCs selectos por el método de dilución en agar se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Los VOCs de manera individual o en mezclas, se adicionaron a 10 mL de H₂O destilada estéril y 10 mL de agar-papa-dextrosa (PDA) (2%) justo antes de la gelificación. En cada caja de Petri se vertieron 5 mL de la disolución y se dejaron solidificar (~40 °C). A continuación, se colocó un inóculo de 5 mm de diámetro del fitopatógeno de prueba, en el centro de cada caja y se cubrieron con papel parafilm® para evitar la pérdida de los compuestos. Los inóculos se tomaron de colonias de *F. oxysporum* en PDA de 8 días de cultivo. Paralelamente, se realizaron los controles PDA (2%) (negativo) y el fungicida comercial Captan 50 (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida) a una concentración de 200 µg/mL (positivo). Los compuestos se evaluaron utilizando las siguientes concentraciones: 125, 250, 500 y 1000 µg/mL, tanto de manera individual como en las dos mezclas previamente mencionadas. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado, bajo un diseño completamente al azar. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz fluorescente/oscuridad 12:12 h, durante 48 h (Medina-Romero *et al.*, 2017; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Sánchez-Ortíz *et al.*, 2016; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016).

2.1.2. Método de fase gas

Los bioensayos utilizando el método de fase gas se realizaron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro. Las cajas contenían 30 mL de PDA; antes de que el agar gelificara se colocaron pozos de vidrio de 0.5 mL en un extremo de la caja. En el centro de la caja se colocó un inóculo de 5 mm de *F. oxysporum* en PDA de 8 días de cultivo. Posteriormente, se agregaron los VOCs de manera individual o en mezclas, empleando cuatro concentraciones: 125, 250, 500 y 1000 µg/mL, dentro de los pozos y se cubrieron las cajas de Petri con papel parafilm® para evitar que los compuestos se volatizaran. Como control negativo se utilizó un pozo sin compuesto. Los tratamientos se realizaron por cuadruplicado, al azar. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz fluorescente/oscuridad 12:12 h, durante 48 h (Medina-Romero *et al.*, 2017).

2.2. Bioensayo *in vivo* del potencial antifúngico de los VOCs selectos

La determinación *in vivo* del potencial antagónico de los VOCs selectos se realizó mediante la evaluación de su efecto en *F. oxysporum* creciendo sobre *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (jitomates cherry).

Los jitomates se compraron en el mercado sobre ruedas "Piloto", Ciudad de México, México. Se seleccionaron jitomates sin síntomas de enfermedad ni heridas visibles, con un tamaño promedio de 2 a 3 cm de longitud y de 1.0 a 1.5 cm de diámetro, así como un peso promedio de 5 a 6 g por fruto. Los jitomates se esterilizaron superficialmente con etanol al 75% por 30 segundos, posteriormente, se enjuagaron tres veces con H₂O destilada estéril y se secaron en una campana de flujo laminar durante 60 segundos. Los jitomates se clasificaron en tres tratamientos: 1) jitomate solo, 2) jitomate con heridas y 3) jitomate inoculado con el fitopatógeno. Para los tratamientos de los jitomates con heridas e inoculados, una vez esterilizados se les hicieron seis heridas equidistantes de 2 mm de profundidad con una aguja de disección estéril. En los jitomates inoculados se colocaron 20 µL de suspensión de *F. oxysporum* con 1.7×10^7 conidios en cada herida.

Los jitomates con los distintos tratamientos, se colocaron junto con un pozo de vidrio de 0.5 mL dentro de frascos estériles de 30 mL. Los pozos contenían los VOCs de manera individual o en mezclas a diferentes concentraciones (12.5, 25, 50, 75, 125, 250, 500 y 1000 µg/mL). Las mezclas se prepararon con los diferentes compuestos a las mismas concentraciones indicadas previamente, por ejemplo, para la mezcla de alcoholes de 12.5 µg/mL, cada uno de los tres alcoholes se agregó a dicha concentración. Debido a que los compuestos presentan variaciones en el potencial antifúngico, las concentraciones utilizadas no fueron necesariamente las mismas para los diferentes tratamientos, pero se encontraban dentro del rango de 12.5 a 1000 µg/mL. Como controles negativos se utilizaron jitomates con los distintos tratamientos pero sin agregar VOCs de manera individual o en mezcla. Los frascos se taparon y se cubrieron con papel Parafilm® para evitar que los compuestos se volatilizaran. Cada tratamiento se realizó dos veces con cuatro repeticiones por tratamiento, bajo un diseño al azar. Los frascos se mantuvieron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz fluorescente/oscuridad 12:12 h, durante 8 días.

Transcurridos 8 días, se midió el tamaño de cada una de las colonias con un Vernier (Digital Electronic Caliper Vernier Gauge Micrometer Tool; ± 0.02 mm, Mitutoyo, Tokyo, Japan)

(Bajpai y Kang, 2012; Ding *et al.*, 2010; Medina-Romero *et al.*, 2017; Suwannarach *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2008). Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento de las colonias en tratamiento con respecto al control negativo y se realizó el registro fotográfico.

2.3. Efecto de los VOCs selectos sobre la respiración

Para determinar la respiración mediante el consumo de oxígeno del micelio de *F. oxysporum* durante el crecimiento, el fitopatógeno se cultivó en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de caldo papa dextrosa (CPD) bajo condiciones de agitación a 150 rpm, en un agitador orbital New Brunswick Scientific (Modelo Excella E25) a 28 °C y con fotoperiodo luz fluorescente/oscuridad 12:12 h, durante 48 h. En cada matraz se colocaron 5 inóculos de 5 mm de diámetro provenientes de la orilla de cultivos de *F. oxysporum* en PDA de 8 días de incubación. El micelio se filtró al vacío y se lavó con 50 mL de agua bidestilada estéril. Después de la filtración durante 20 min, se pesaron 40 mg de micelio húmedo en tubos de ensaye y se añadieron 4 mL de agua bidestilada estéril junto con los VOCs de manera individual o en mezcla, empleando un rango de concentraciones entre 125 y 1000 µg/mL (125, 250, 500 y 1000 µg/mL). Los tubos se cubrieron con papel Parafilm® para evitar que los compuestos se volatilizaran. Las suspensiones de micelio se agitaron a 150 rpm en un agitador orbital durante 2, 5 y 8 h.

La respiración se midió transfiriendo el micelio de *F. oxysporum* a una cubeta de vidrio de 10 mL. La tasa de consumo de oxígeno se midió durante tres minutos con ayuda de un electrodo tipo Clark conectado a un monitor de oxígeno biológico (Modelo YSI 5300A) a 28 °C. Las mediciones se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Como control positivo se utilizó Captan 50 en un intervalo de concentraciones de 2.5 a 30 µg/mL y como control negativo el micelio de *F. oxysporum* sin la presencia de los tratamientos. La tasa de respiración de *F. oxysporum* se calculó y se expresó como el porcentaje de oxígeno consumido en presencia de los VOCs, considerando al control negativo como el 100% del consumo.

2.4. Efecto de los VOCs selectos sobre la conductividad eléctrica

El grado de lesión provocado por los VOCs selectos sobre la conductividad eléctrica de *F. oxysporum* se evaluó a través de la medición de la fuga de electrolitos en presencia de los compuestos de manera individual y en mezclas.

Las muestras del micelio se obtuvieron de la manera descrita previamente para el experimento de la respiración, utilizando las mismas concentraciones y horas de prueba. La conductividad eléctrica de las muestras se evaluó utilizando un conductímetro Thermo Scientific (modelo Orion Star A212) a 28 °C. Una vez que se midió la conductividad se calentaron las muestras a ebullición durante 10 min, se enfriaron hasta volver a alcanzar 28 °C y posteriormente se determinó la conductividad final. Las mediciones se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Como control positivo se utilizó Captan 50 en un intervalo de concentraciones de 2.5 a 30 µg/mL y como control negativo el micelio de *F. oxysporum* sin la presencia de los tratamientos. El efecto de los VOCs sobre la conductividad eléctrica de *F. oxysporum*, se expresó como conductividad relativa y se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Conductividad relativa} = \frac{C1-C0}{Ck-C0} \times 100\%$$

Donde C0 es la conductividad eléctrica sin micelio, C1 es la conductividad eléctrica del micelio en presencia de los VOCs y Ck es la conductividad eléctrica final del micelio hervido (Duan *et al.*, 2013; Medina-Romero *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016).

2.5. Efecto de los VOCs selectos sobre la morfología de las hifas

El efecto de los compuestos individuales o las mezclas de VOCs sobre la morfología de las hifas de *F. oxysporum*, se evaluó empleando preparaciones microscópicas en fresco a partir de microcultivos por los métodos de dilución en agar y fase gas, así como suspensiones de micelio. En todos los casos, las preparaciones microscópicas se realizaron dos veces siguiendo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento.

2.5.1. Método de dilución en agar

Los microcultivos por el método de dilución en agar se prepararon en cajas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro que contenían un triángulo de vidrio, 5 mL de agua destilada estéril y un portaobjetos. En los extremos del portaobjetos se colocaron dos cuadros de PDA de 1 x 1 cm, el portaobjetos a su vez se puso sobre el triángulo de vidrio. A continuación, en cada uno de los lados del cuadro de PDA se inocularon por picadura las hifas de *F. oxysporum* y se colocó otro portaobjetos encima de los cuadros de PDA. Los cuadros de PDA contenían a los VOCs selectos de manera individual o en mezclas en una concentración de 1000 µg/mL por el método de dilución en agar mencionado en el inciso 2.1.1. Las cajas de Petri se incubaron a temperatura ambiente por 48 h con fotoperiodo luz fluorescente/oscuridad 12:12 h. Transcurrido este tiempo se retiró uno de los portaobjetos, se colocó una gota de colorante azul de lactofenol o rojo congo en cada uno de los extremos y un cubreobjetos. El efecto sobre la morfología de las hifas de *F. oxysporum* creciendo en presencia de los VOCs se observó en un microscopio óptico Motic (Modelo BA410) a 40x y se comparó con el crecimiento de las hifas sin tratamientos.

2.5.2. Método de fase gas

Para el método de fase gas, los microcultivos se prepararon en cajas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro que contenían un triángulo de vidrio, 5 mL de agua destilada estéril, un portaobjetos y un pozo de vidrio de 0.5 mL. En los extremos del portaobjetos se colocaron dos cuadros de PDA de 1 cm³, el portaobjetos a su vez se puso sobre el triángulo de vidrio. A continuación, en cada uno de los lados del cuadro de PDA se inocularon por picadura las hifas de *F. oxysporum* y se colocó otro portaobjetos encima del cuadro de PDA. Los pozos de vidrio se ubicaron en un extremo del triángulo de vidrio y se les adicionaron los VOCs individuales y en mezclas en un rango de concentraciones entre 12.5 y 1000 µg/mL (12.5, 25, 50, 75, 125, 250, 500 y 1000 µg/mL). Las cajas de Petri se incubaron a temperatura ambiente por 48 h con fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad 12/12 h. Transcurrido este tiempo se retiró uno de los portaobjetos, se colocó una gota de colorante azul de lactofenol o rojo congo en cada uno de los extremos y un cubreobjetos. El efecto sobre la morfología de las hifas de *F. oxysporum* por el método de fase gas, se observó en un microscopio óptico Motic (Modelo BA410) a 40x y se comparó con el crecimiento de las hifas sin la presencia de VOCs.

2.5.3. Método de suspensión

El micelio para las observaciones utilizando el método de suspensión, se preparó de la misma manera que en los bioensayos de respiración y conductividad eléctrica de *F. oxysporum*. Los VOCs individuales y las mezclas de VOCs se evaluaron en las siguientes concentraciones: 125, 250, 500 y 1000 µg/mL. Transcurridas 2, 5 y 8 h de exposición a los VOCs, se tomó una muestra de la suspensión de micelio, se puso en un portaobjetos y se añadió una gota de colorante azul de lactofenol o de rojo congo y se colocó un cubreobjetos. Los cambios morfológicos provocados en las hifas se observaron en un microscopio óptico Motic (Modelo BA410) a 40x y se compararon con la morfología de las hifas del micelio en suspensión con agua sin la presencia de los VOCs.

3. Análisis estadísticos

Con excepción del bioensayo de antagonismo directo múltiple, los resultados de los bioensayos *in vitro* e *in vivo*, se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA $\alpha = 0.05$) para establecer diferencias significativas con respecto a los controles, y una prueba de contrastes de Tukey HSD, para encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, empleando el programa GraphPad Prism versión 6 (Medina-Romero *et al.*, 2017; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Sánchez-Ortíz *et al.*, 2016; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016; Zar, 2010). Para el análisis del bioensayo de antagonismo directo múltiple, se empleó una *t* de Student pareada de dos colas ($\alpha=0.05$), comparando la medida del control con la del tratamiento, utilizando el programa GraphPad Prism versión 6 (Medina-Romero *et al.*, 2017; Roque-Flores, 2017; Zar, 2010).

El valor de la CI₅₀ se determinó a través de un análisis de Probit (Zar 2010), basado en el porcentaje de inhibición promedio obtenido de cada una de las concentraciones de los VOCs de manera individual o en mezclas utilizando el mismo programa estadístico. Los datos están representados por el promedio \pm la desviación estándar (DE), donde la significancia estadística se consideró en un valor de $P < 0.05$.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis detallado de las características macroscópicas (textura, color y tipo de crecimiento del micelio; presencia de pigmentos y de exudado) y de las microscópicas (tipo de hifas, estructuras reproductivas y/o conidios), así como mediante la secuenciación de la región ITS1-5.8s e ITS2 del ADN ribosomal de los 16 hongos endófitos, determinó que estos hongos son similares y pertenecen al género *Hypoxylon* (Flores-Reséndiz, 2014; García-Méndez, no publicado; Morales-Luna, no publicado; Roque-Flores, 2017; Sánchez-Fernández, 2016; Sánchez-Ortíz, 2017; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016). Por otro lado, al compartir el mismo genotipo, pero tener fenotipos diferentes y habitar en distintas plantas hospederas: *Bursera lancifolia* (Burseraceae), *Gliricidia sepium* (Fabaceae), *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae), *Hippocratea acapulcensis* (Celastraceae), *Mimosa affinis* (Fabaceae) y *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae), se designaron como hongos generalistas. Se ha reportado que el género *Hypoxylon* produce VOCs con actividad biológica (Booth *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2006; Hensens *et al.*, 1999; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Strobel, 2015; Suwannarach *et al.*, 2013; Thomscheck *et al.*, 2010; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2010).

Con base en los antecedentes químicos y biológicos derivados de los estudios reportados en la literatura sobre el género *Hypoxylon* (Booth *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2006; Hensens *et al.*, 1999; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Strobel, 2015; Suwannarach *et al.*, 2013; Thomscheck *et al.*, 2010; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2010), se evaluó el efecto de los 16 hongos endófitos, así como de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de los endófitos sobre el crecimiento radial de cuatro fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura, para establecer posibles diferencias en la actividad antagónica presentada por estos microorganismos. Además, se utilizaron seis VOCs selectos, para determinar su efecto en el crecimiento del fitopatógeno *F. oxysporum* en bioensayos *in vitro* e *in vivo*. El posible mecanismo de acción fisiológica de los VOCs selectos se determinó a través del estudio de la respiración y de la conductividad eléctrica del fitopatógeno y se analizó la morfología de las hifas expuestas a los compuestos selectos. A continuación, se describen los resultados obtenidos:

1. Efecto de los hongos endófitos sobre el crecimiento radial de fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura

1.1. Bioensayo de antagonismo directo múltiple

Para establecer el posible efecto sinérgico entre los VOCs y los metabolitos secundarios difundidos en el medio de cultivo, producidos por los hongos endófitos del género *Hypoxyylon*, sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos: *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. ultimum*, se realizaron bioensayos de antagonismo directo múltiple. Es importante señalar que las colonias de los endófitos del género *Hypoxyylon*, no presentan inhibición intraespecífica. A manera de ejemplo, en la Figura 2 se muestra la foto del bioensayo de antagonismo directo múltiple entre el hongo endófito HAeg2 y los cuatro fitopatógenos. En las Figuras 3 – 6 se muestran los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de los fitopatógenos, originados por la presencia de los hongos endófitos con cinco días de cultivo evaluados a los 3, 5 y 10 días de interacción antagónica. En general, los fitopatógenos presentaron la mayor inhibición del crecimiento al día 10 de interacción.

En la Figura 3 se observa la inhibición causada por los endófitos sobre el crecimiento de *A. alternata*, a los 3, 5 y 10 días de interacción antagónica. Los porcentajes de inhibición sobre crecimiento radial del fitopatógeno al día cinco de interacción fueron estadísticamente significativos con valores superiores al 35%, y al día diez, incrementaron a valores superiores al 60%. El endófito Maeg3 fue el que causó el mayor efecto antifúngico sobre el crecimiento de *A. alternata*.

En la Figura 4 se muestra la inhibición provocada por los hongos sobre el crecimiento de *F. oxysporum*, a los 3, 5 y 10 días de interacción antagónica. La inhibición sobre crecimiento al día cinco de interacción fue significativa, mostrando porcentajes superiores al 25%, mientras que al día diez, los porcentajes de inhibición son mayores al 40%. Los hongos Maeg2 y Smeg1, provocaron la mayor inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum*.

En la Figura 5 se observa la inhibición causada por los endófitos sobre el crecimiento del oomiceto *P. capsici*, a los 3, 5 y 10 días de interacción antagónica. Al día cinco de interacción, los porcentajes de inhibición fueron estadísticamente significativos inhibiendo su crecimiento por encima del 30%. Al día diez de interacción antagónica, la inhibición provocada es superior al 40%. El hongo Haeg1 produjo la mayor inhibición sobre el crecimiento de *P. capsici*.

Finalmente, en la Figura 6 se presentan los porcentajes de inhibición provocados por los endófitos sobre el crecimiento de *P. ultimum*, a los 3, 5 y 10 días de interacción antagonica. En general, al día cinco de interacción los porcentajes de inhibición fueron significativos con valores alrededor del 30%. Al día diez de interacción antagonica los valores de la inhibición son superiores al 50%. Los hongos Haeg1 y Maeg2 provocan la mayor inhibición sobre el crecimiento de *P. ultimum*.

La competencia *in vitro* entre los fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura y los hongos endófitos del género *Hypoxylon*, estimula los mecanismos de defensa físicos, como es la formación de barreras miceliarias así como el micoparasitismo, y químicos como la producción de VOCs y de metabolitos difusibles con propiedades antifúngicas (Arnold, 2007; Bourassa *et al.*, 2007; Dreyfuss y Chapela, 1994; Gams *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2010; Istifadah y McGee, 2006; Paz *et al.*, 2007). La producción de metabolitos secundarios probablemente reduce la habilidad competitiva de los competidores, lo que provoca una inhibición de su crecimiento (Ricklefs, 1996).

Algunos de los hongos endófitos actúan como micoparásitos, es decir, utilizan como sustrato a los fitopatógenos competidores para crecer (Gams *et al.*, 2004). Al comportarse como micoparásitos, los hongos endófitos del género *Hypoxylon*, podrían ser utilizados como agentes de control biológico. Además se observó que producen metabolitos secundarios bioactivos, por lo que también podrían ser útil para el desarrollo de bioplaguicidas.

Los resultados derivados de los bioensayos de antagonismo directo múltiple llevados a cabo entre los fitopatógenos *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. ultimum*, y los hongos endófitos, permitieron inferir que se genera una estimulación de la producción de VOCs en condiciones de antagonismo directo múltiple o bien un efecto sinérgico entre los VOCs producidos y los metabolitos secundarios difusibles con propiedades antifúngicas y antioomicetos (Arnold, 2007; Bourassa *et al.*, 2007; Dreyfuss y Chapela, 1994; Paz *et al.*, 2007; Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016), que provocan una inhibición significativa sobre el crecimiento de los fitopatógenos (Ricklefs, 1996). Además, es probable que la concentración y la composición de los VOCs y de los metabolitos secundarios difusibles, cambie en interacción antagonica de forma dependiente del tiempo (Ezra y Strobel, 2003; Strobel, 2006; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016).

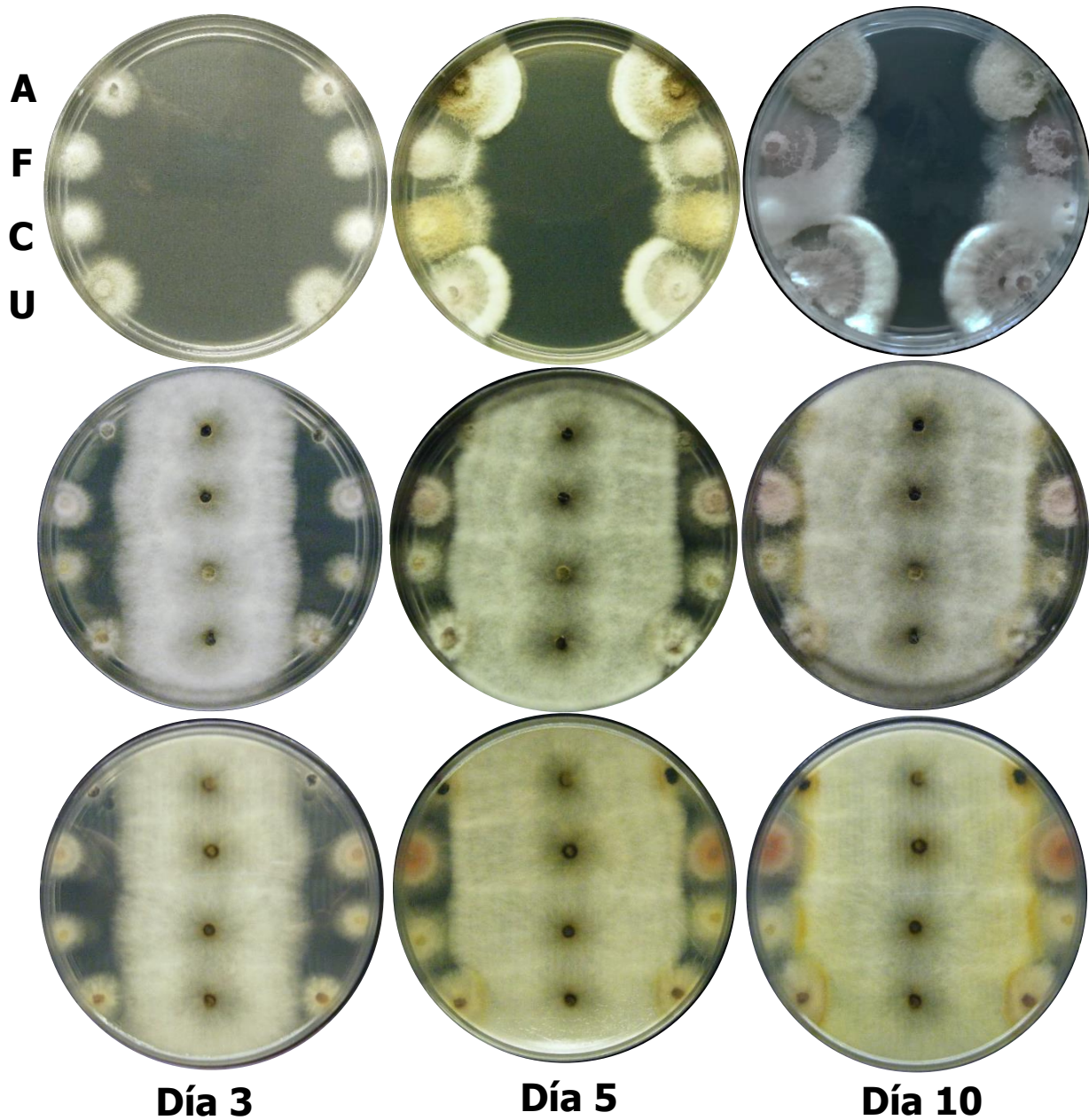


Figura 2. Efecto del hongo endófito Haeg2 a los cinco días de cultivo, sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos: *A. alternata* (A), *F. oxysporum* (F), *P. capsici* (C) y *P. ultimum* (U), a los 3, 5 y 10 días de interacción antagónica. Se muestran los controles del crecimiento de los fitopatógenos (arriba), la interacción vista por el anverso (en medio) y la interacción vista por el reverso (abajo)

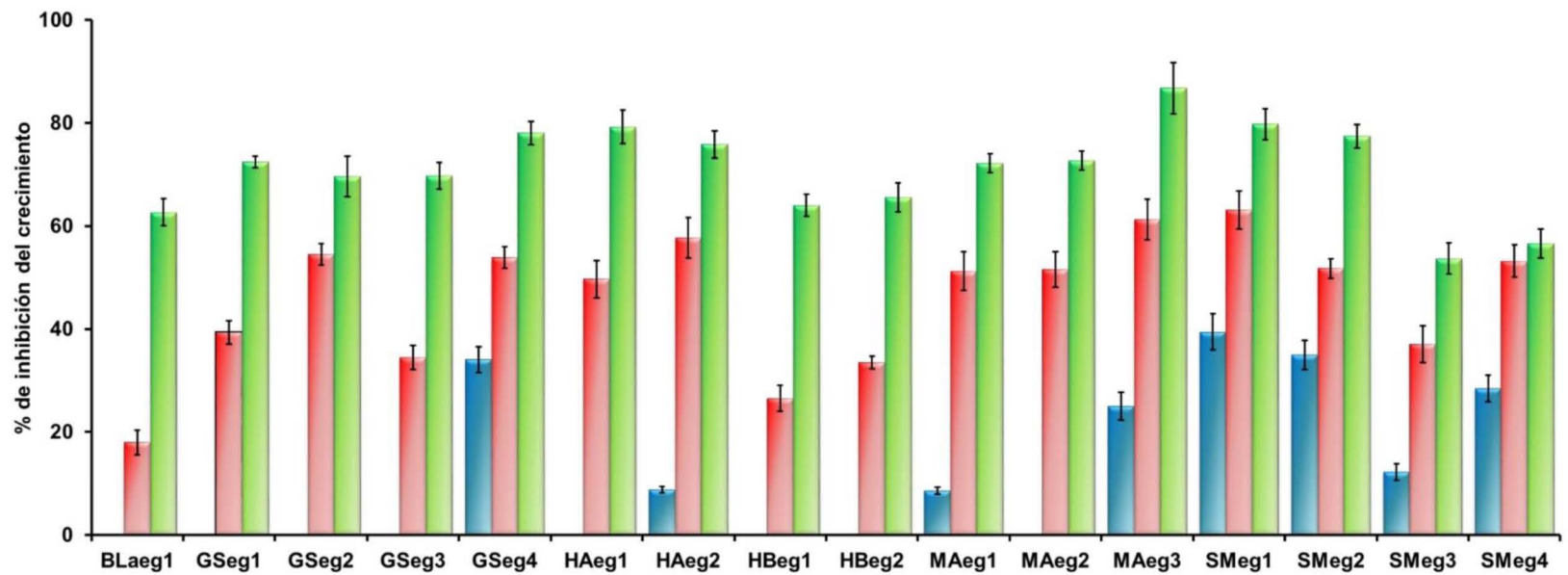


Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *A. alternata* provocado por los hongos endófitos del género *Hypoxylon* a los cinco días de cultivo, a los 3 (azul), 5 (rojo) y 10 (verde) días de interacción antagonística. Los valores superiores al 12% fueron estadísticamente significativos t-Student ($P < 0.05$).

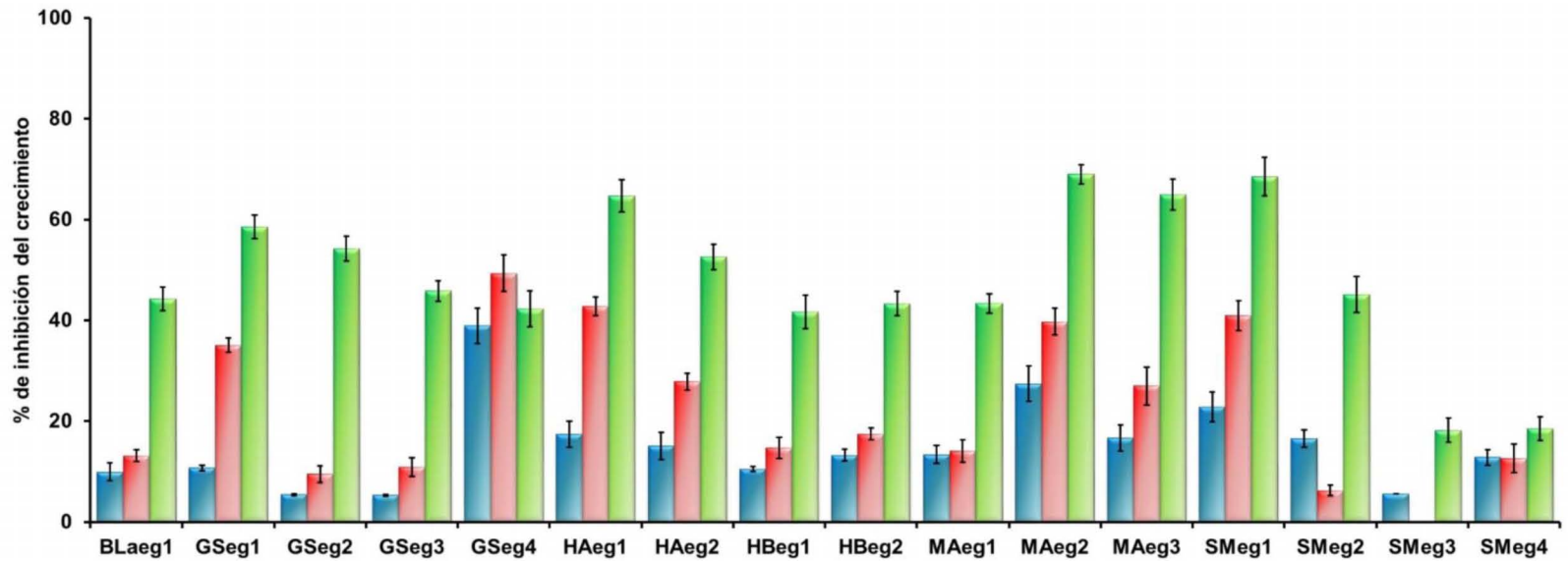


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* provocado por los hongos endófitos del género *Hypoxylon* a los cinco días de cultivo, a los 3 (azul), 5 (rojo) y 10 (verde) días de interacción antagónica. Los valores superiores al 12% fueron estadísticamente significativos t-Student ($P < 0.05$).

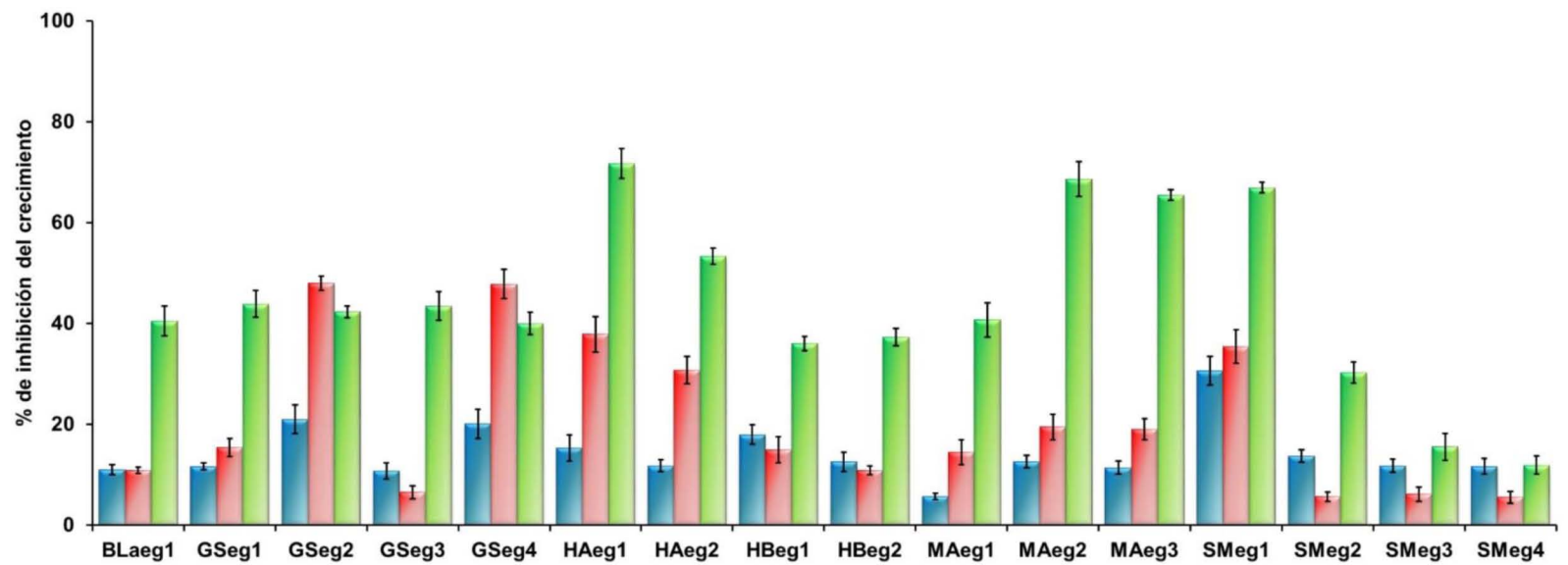


Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. capsici* provocado por los hongos endófitos del género *Hypoxylon* a los cinco días de cultivo, a los 3 (azul), 5 (rojo) y 10 (verde) días de interacción antagónica. Los valores superiores al 12% fueron estadísticamente significativos t-Student ($P < 0.05$).

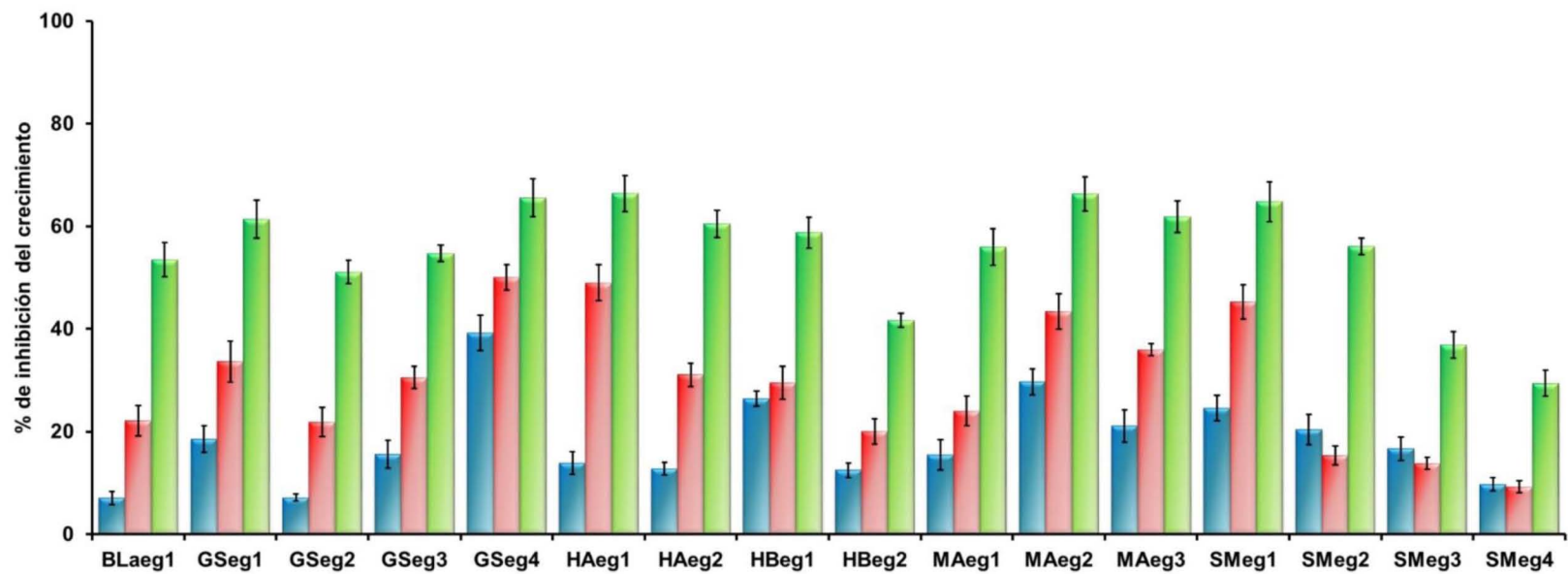


Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. ultimum* provocado por los hongos endófitos del género *Hypoxylon* a los cinco días de cultivo, a los 3 (azul), 5 (rojo) y 10 (verde) días de interacción antagonista. Los valores superiores al 12% fueron estadísticamente significativos t-Student ($P < 0.0$)

1.2. Potencial antagónico de los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos

El potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los hongos del género *Hypoxyton*, se realizó mediante el método de dilución en agar, utilizando como microorganismos de prueba a cuatro fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura: *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. ultimum*.

La Figura 7 muestra un ejemplo del bioensayo por el método de dilución en agar de los extractos del medio de cultivo y micelio del endófito BLaeg1, así como del fungicida comercial Carbendazim, sobre el crecimiento de *A. alternata*. En las Figuras 8 – 11, se muestran los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de los fitopatógenos de prueba en presencia de los extractos orgánicos fúngicos. En general, los extractos orgánicos del medio de cultivo provocaron mayores porcentajes de inhibición que los del micelio.

En la Figura 8 se muestra el efecto inhibitorio causado por los extractos orgánicos, sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *A. alternata*. Los extractos orgánicos del medio de cultivo (32.4%) y del micelio (30.3%) de BLaeg1, fueron los más activos, inhibiendo de manera significativa su crecimiento, con un valor superior al presentado por el fungicida comercial Carbendazim (26.9%).

En la Figura 9 se presenta la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* producida por los extractos orgánicos de los endófitos. Los extractos orgánicos del medio de cultivo (45.7%) y del micelio (31.6%) de Maeg3 y del medio de cultivo de BLaeg1 (30.0%), fueron los más activos inhibiendo de manera significativa su crecimiento. Sin embargo, la inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* es menor a la causada por el fungicida comercial Carbendazim (100%), no obstante es el hongo fitopatógeno más afectado por los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos evaluados.

En la Figura 10 se observa la inhibición del crecimiento de *P. capsici*. La mayor inhibición fue producida por los extractos orgánicos del medio de cultivo (32.7%) y del micelio (32.4%) de BLaeg1, del medio de cultivo de Gseg2 (30.7%), del medio de cultivo de Haeg1 (30.1%), y del medio de cultivo de Smeg3 (32.0%), con porcentajes comparables al provocado por el agroquímico comercial Metalaxil (32.0%).

Finalmente, en la Figura 11 se muestra la inhibición sobre el crecimiento de *P. ultimum*. En este bioensayo todos los extractos orgánicos tanto del medio de cultivo como del micelio

presentaron inhibición significativa sobre el crecimiento de *P. ultimum*. Los extractos orgánicos del medio de cultivo de Blaeg1 (35.1%), presentan valores significativos comparables a los de la inhibición causada por el agroquímico comercial Metalaxil (31.4%). La actividad antifúngica y antioomiceto generada por los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos evaluados permitió establecer que los extractos orgánicos poseen mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento del hongo *F. oxysporum*, mientras que en los otros fitopatógenos de prueba *A. alternata*, *P. capsici* y *P. ultimum*, los valores de inhibición fueron similares. En general, los mayores porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de los fitopatógenos fueron superiores al 30%. Los resultados derivados de este bioensayo pusieron en evidencia que los endófitos del género *Hypoxylon* en estudio, producen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana moderada (Arnold, 2007; Dreyfuss y Chapela, 1994; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

La difusión de pigmentos (metabolitos secundarios, enzimas y/o proteínas) involucra mecanismos químicos de defensa, los cuales son empleados en mayor grado por los hongos durante las interacciones interespecíficas (Bourassa *et al.*, 2007; Paz *et al.*, 2007). Diversos estudios han mostrado que los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos poseen diversa actividad biológica dentro de la que se encuentra la antifúngica (Lu *et al.*, 2000; Strobel *et al.*, 2011). Además, es probable que los metabolitos secundarios producidos en interacción antagónica presenten mayor potencial antifúngico (Ricklefs, 1996).

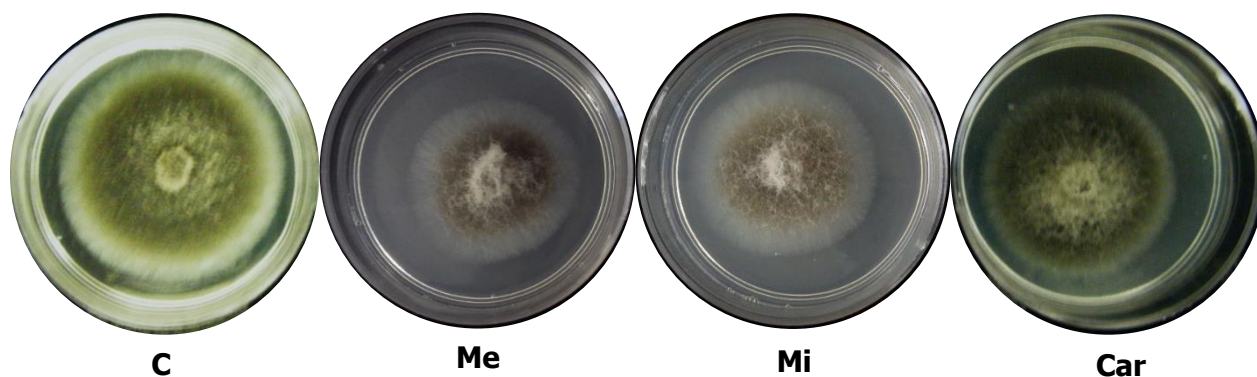


Figura 7. Efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo (Me) y micelio (Mi) del hongo endófito Blaeg1 y del Carbendazim (Car), sobre el crecimiento de *A. alternata*. Control de crecimiento del fitopatógeno (C).

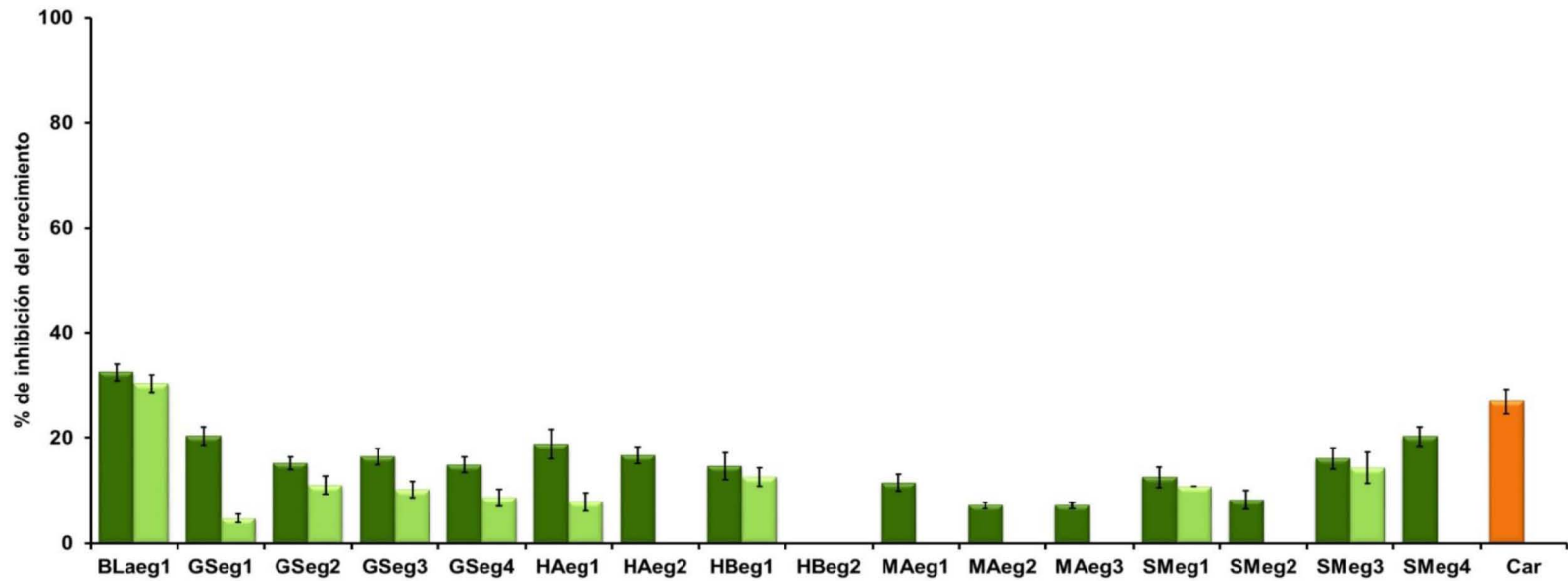


Figura 8. Porcentajes de inhibición producidos por los extractos orgánicos del medio de cultivo (verde oscuro) y micelio (verde claro) de los hongos endófitos del género *Hypoxylon* y del fungicida comercial Carbenazim (Car), sobre el crecimiento de *A. alternata*. Los valores superiores al 13% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

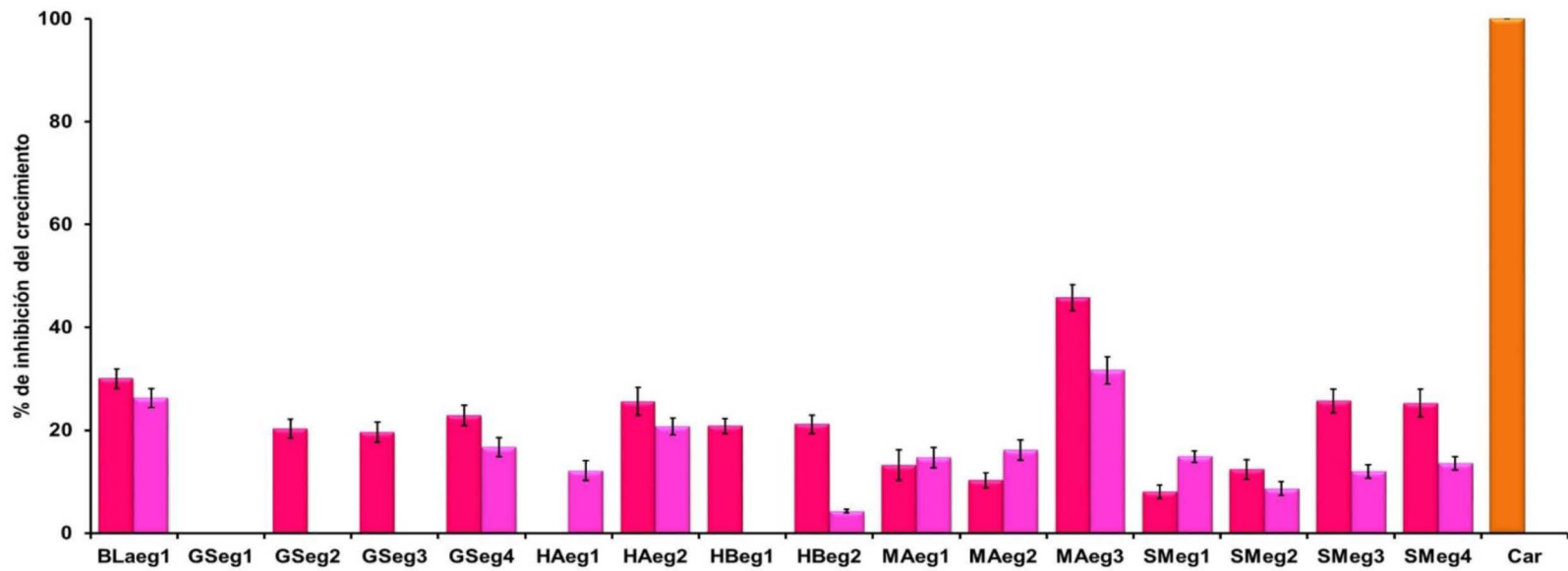


Figura 9. Porcentajes de inhibición producidos por los extractos orgánicos del medio de cultivo (rosa oscuro) y micelio (rosa claro) de los hongos endófitos del género *Hypoxyton* y del fungicida comercial Carbendazim (Car), sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. Los valores superiores al 13% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

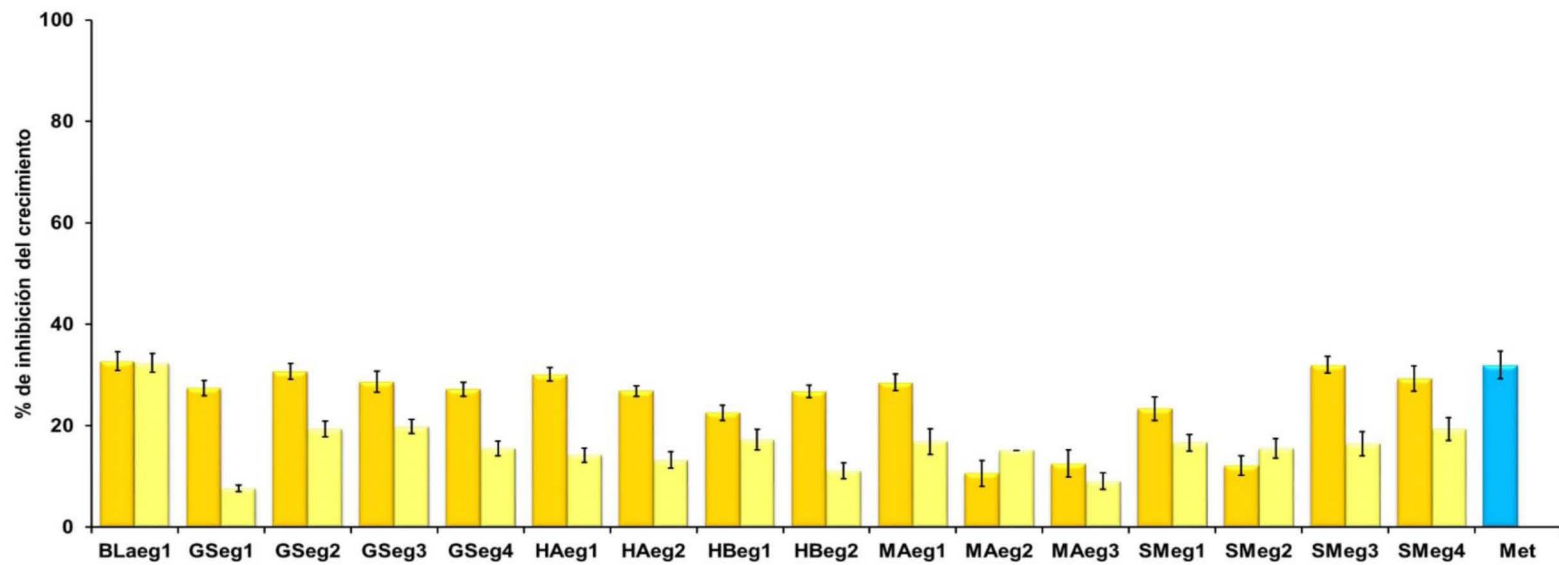


Figura 10. Porcentajes de inhibición producidos por los extractos orgánicos del medio de cultivo (amarillo oscuro) y micelio (amarillo claro) de los hongos endófitos del género *Hypoxyton* y del fungicida comercial Metalaxil (Met), sobre el crecimiento de *P. capsici*. Los valores superiores al 13% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

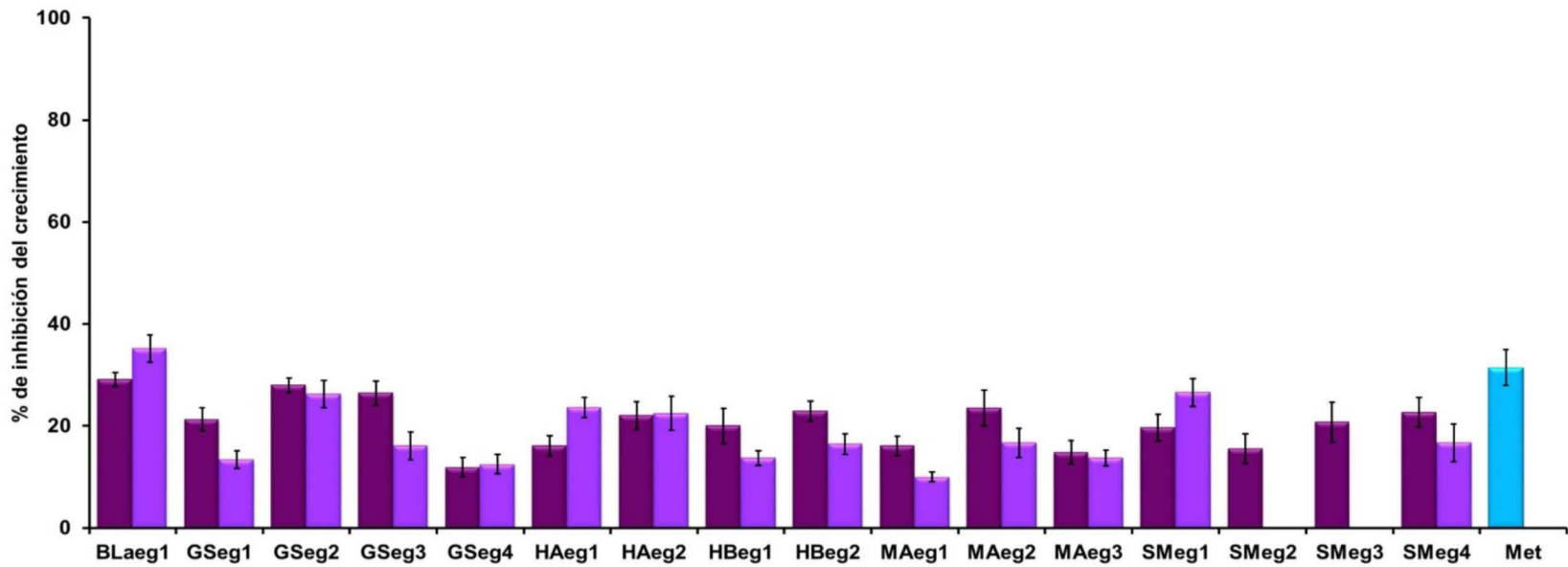


Figura 11. Porcentajes de inhibición producidos por los extractos orgánicos del medio de cultivo (morado oscuro) y micelio (morado claro) de los hongos endófitos del género *Hyphoxylon* y del fungicida comercial Metalaxil (Met), sobre el crecimiento de *P. ultimum*. Los valores superiores al 13% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$)

1.3. Bioensayo del potencial antagonico de los VOCs producidos por los hongos endófitos, en caja de Petri dividida

Para evaluar el potencial antifúngico y antioomiceto de los VOCs producidos por los endófitos sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos, se realizaron bioensayos en cajas de Petri divididas en dos compartimentos (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016). Cabe mencionar que con base en la actividad biológica demostrada por los VOCs producidos por el hongo endófito Gseg1 en el estudio llevado a cabo por Sánchez-Fernández y colaboradores (2016), que mostró el mayor efecto biológico al día cinco de cultivo, el bioensayo con los 16 endófitos del género *Hypoxyton*, se llevó a cabo al mismo día de crecimiento. Los VOCs producidos a los cinco días de cultivo por los diferentes endófitos en estudio se evaluaron a los 3, 5 y 10 días de interacción antagonica. La Figura 12 muestra dos ejemplos del efecto de los Vocs producidos por los hongos endófitos Maeg1 y Smeg4 a los cinco días de cultivo, sobre el crecimiento de *A. alternata*, a los días 3 y 5 de interacción antagonica.

En las Figuras 13 y 14 se muestran los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de los fitopatógenos de prueba en presencia de los VOCs a los tres (Figura 13) y cinco (Figura 14) días de bioensayo. En general, los microorganismos fitopatógenos más afectados por los VOCs al día tres de antagonismo fueron el hongo *A. alternata* y los oomicetos *P. capsici* y *P. ultimum* (Figura 13), mientras que al día cinco de bioensayo fueron *A. alternata* y *P. ultimum* (Figura 14).

En la Figura 13 se observa el efecto inhibitorio causado por los VOCs generados por los endófitos sobre el crecimiento de los cuatro fitopatógenos en estudio al día tres de interacción antagonica. Los VOCs producidos por los hongos Gseg2, Gseg3, Hbeg1, Hbeg2, Maeg2, Smeg1, Smeg2 y Smeg4 inhiben significativamente el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos con valores de alrededor de 24%.

Por otra parte, en la Figura 14 se muestra el efecto inhibitorio causado por los VOCs, sobre el crecimiento de los fitopatógenos al día cinco de interacción antagonica, observándose que la inhibición sobre el crecimiento radial de los cuatro fitopatógenos incrementa con respecto a los días de interacción. Los VOCs producidos por los hongos Gseg2, Gseg3, Gseg4, Haeg2, Hbeg1, Hbeg2, Smeg1 y Smeg2, presentaron porcentajes de inhibición superiores al 35%. Es importante señalar que el único hongo que produce VOCs que inhiben

significativamente el crecimiento de los cuatro fitopatógenos al día cinco de interacción es Haeg2. La inhibición causada por los VOCs producidos por los hongos sobre el crecimiento de los cuatro fitopatógenos evaluados, incrementa del día tres al día cinco de interacción, mientras que al día diez se mantienen los porcentajes de inhibición y los endófitos se pasaban al compartimento de los competidores.

La producción de VOCs por parte de los hongos endófitos puede ser un mecanismo de defensa estimulado por la presencia de los microorganismos fitopatógenos (Campos *et al.*, 2010; Ezra y Strobel, 2003). Al día tres de interacción antagónica la mayoría de los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de los fitopatógenos son de alrededor del 24%, y para el día cinco de interacción son de alrededor del 35%. Es probable que la concentración y la composición de los VOCs cambie conforme transcurre el tiempo de interacción (Strobel, 2006; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016).

Las mezclas de VOCs producidos por los microorganismos y en particular por los hongos endófitos están constituidas esencialmente por hidrocarburos aromáticos y alifáticos, alcoholes, terpenos, aldehídos, ácidos, ésteres, compuestos que contienen nitrógeno o sulfuro, entre otros compuestos (Ezra *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2015; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). En varios estudios se ha demostrado el gran efecto inhibitorio y la capacidad de inhibir por completo a los organismos de prueba de los VOCs. También se confirmó la actividad sinérgica que la mezcla de VOCs tiene en la inhibición de los organismos blanco (Ezra y Strobel, 2003; Strobel, 2006; Thomscheck *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016). En algunos grupos de investigación, se ha reportado actividad biológica debido a las mezclas químicamente diversas de VOCs producidos por otros hongos endófitos del género *Hypoxylon* (Hensens *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 2006; Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Suwannarach *et al.*, 2013; Thomscheck *et al.*, 2010; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2010) por lo que se propone su uso como agentes de control biológico o como fuente de bioplaguicidas en el tratamiento de enfermedades postcosecha.

Es importante destacar que cuando se evaluaron los metabolitos secundarios difusibles y los volátiles producidos por los hongos endófitos del género *Hypoxylon*, de manera independiente, se observó una menor inhibición sobre el crecimiento radial de los fitopatógenos de prueba, por el contrario, cuando se evaluaron en conjunto mediante el bioensayo de antagonismo directo múltiple, la actividad biológica incrementó, por lo que es

probable que exista un efecto sinérgico entre los metabolitos secundarios difusibles y los volátiles (Arnold, 2007; Dreyfuss y Chapela, 1994).

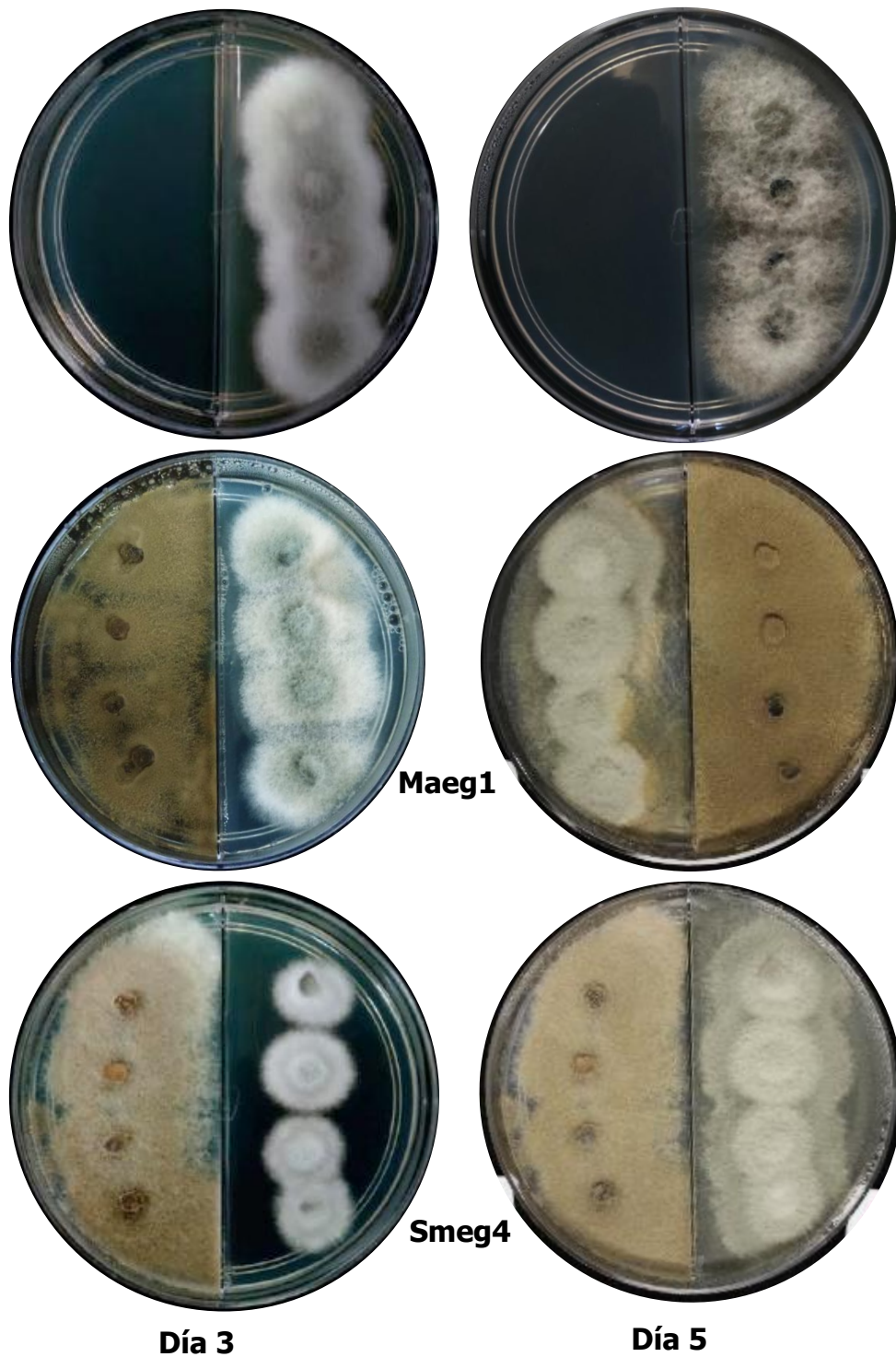


Figura 12. Efecto de los VOCs producidos por los hongos endófitos Maeg1 y Smeg4 a los cinco días de cultivo, sobre el crecimiento de *A. alternata*, a los días 3 y 5 de interacción antagónica. El control de crecimiento del fitopatógeno se muestra en la parte superior.

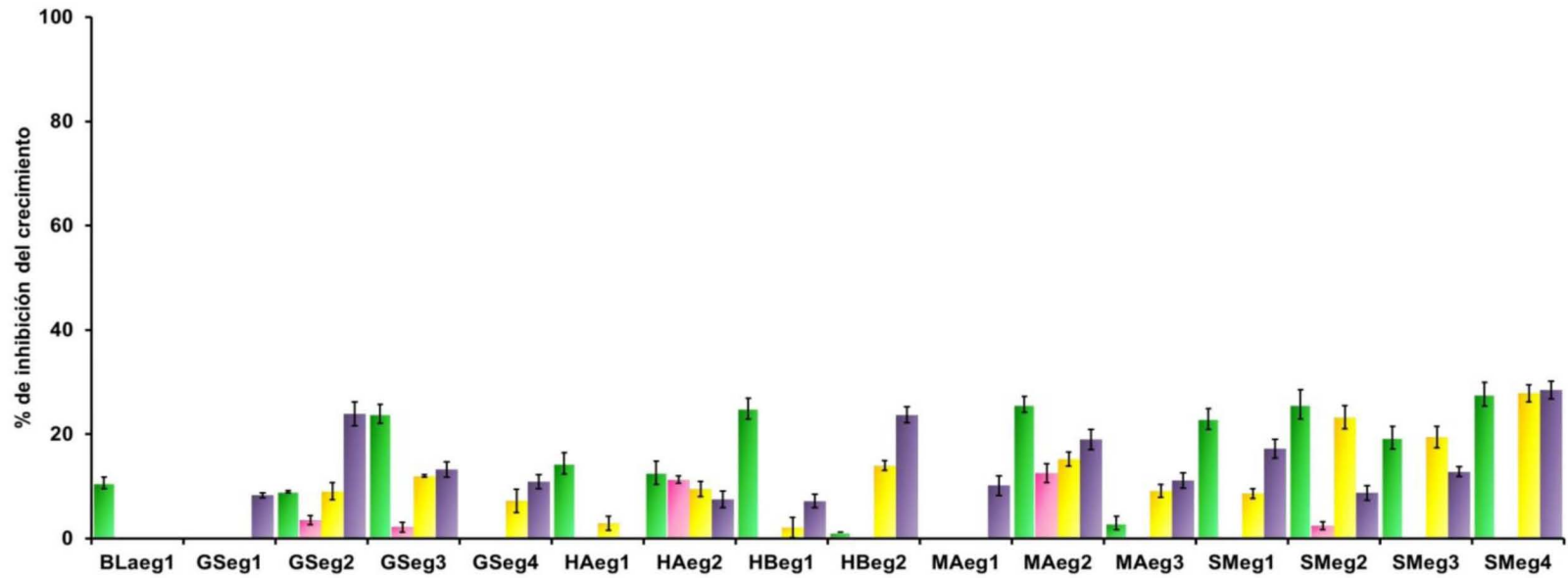


Figura 13. Porcentajes de inhibición generados por los VOCs producidos por los hongos endófitos del género *Hypoxylon*, a los cinco días de cultivo, sobre el crecimiento de *A. alternata* (verde), *F. oxysporum* (rosa), *P. capsici* (amarillo) y *P. ultimum* (morado) al día tres de interacción antagonista. Los valores superiores al 11% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

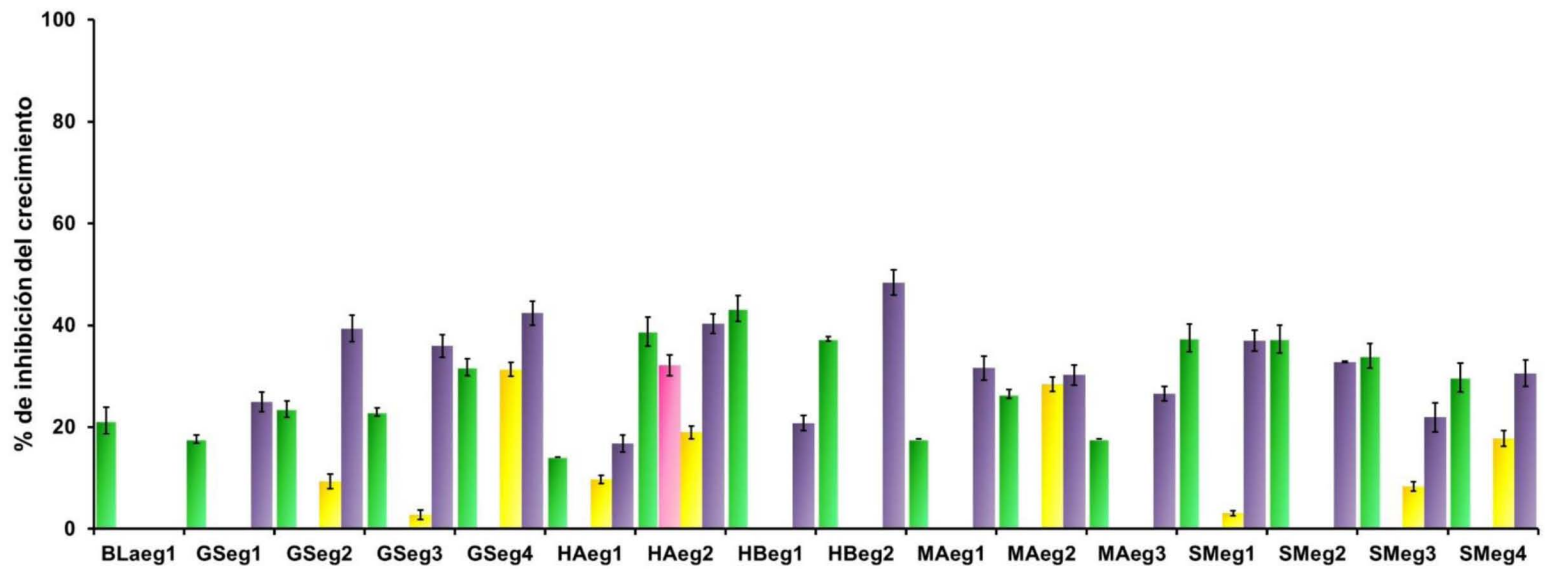


Figura 14. Porcentajes de inhibición generados por los VOCs producidos por los hongos endófitos del género *Hypoxylon*, a los cinco días de cultivo, sobre el crecimiento de *A. alternata* (verde), *F. oxysporum* (rosa), *P. capsici* (amarillo) y *P. ultimum* (morado) al día cinco de interacción antagonista. Los valores superiores al 11% fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$)

2. Efecto de los VOCs selectos sobre *Fusarium oxysporum*

Derivado de los estudios sobre la composición y la actividad biológica de los VOCs producidos por hongos del género *Hypoxylon*, se seleccionaron seis compuestos para evaluar su potencial como bioplaguicidas, los alcoholes: feniletílico, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol; y los monoterpenos: eucaliptol, ocimeno y terpinoleno (Figura 15). El 2-metil-1-butanol, eucaliptol y terpinoleno se identificaron en *Nodulisporium* sp. aislamiento GS4d2III1 (Gseg1) (Sánchez-Fernández *et al.*, 2016), y en *H. anthochroum* aislamiento Blaci (Blaeg1) (Ulloa-Benítez *et al.*, 2016), mientras que el 3-metil-1-butanol y el ocimeno se identificó solamente en Gseg1 (Sánchez-Fernández *et al.*, 2016), y el alcohol feniletílico únicamente en Blaeg1 (Ulloa-Benítez *et al.*, 2016).

Los compuestos evaluados en la presente tesis pertenecen a dos de los grupos químicos más abundantes presentes en las mezclas de VOCs producidas por lo microorganismos, incluyendo a los hongos endófitos del género *Hypoxylon*: los alcoholes y los monoterpenos (Booth *et al.*, 2011; Strobel 2015; Suwannarach *et al.*, 2013). Se evaluó tanto su efecto *in vitro* analizando el crecimiento radial de *F. oxysporum*, como *in vivo* contra el fitopatógeno creciendo sobre jitomates cherry. Además, se determinó el posible mecanismo de acción fisiológica de los VOCs selectos a través del estudio de la respiración y de la conductividad eléctrica de las hifas del fitopatógeno y se analizó el efecto sobre la morfología de las hifas expuestas a los compuestos selectos. Los VOCs se evaluaron de manera individual y en dos diferentes mezclas: de los seis VOCs y de los alcoholes.

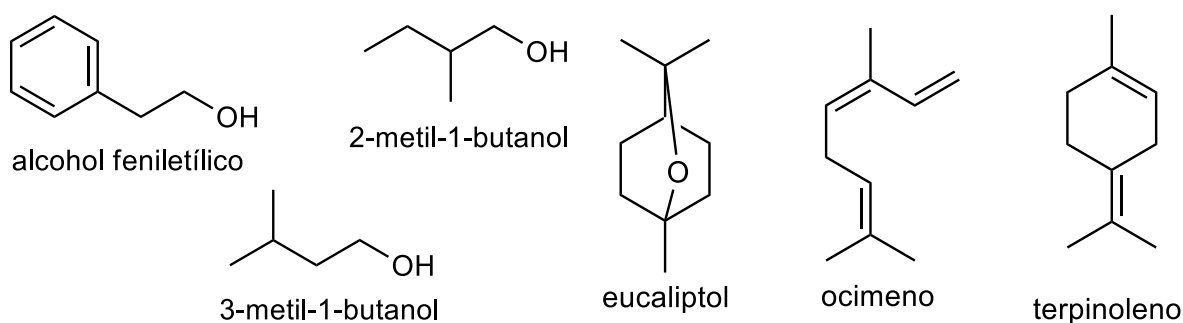


Figura 15. Estructuras de los VOCs selectos producidos por los hongos endófitos del género *Hypoxylon*, los alcoholes: feniletílico, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, y los monoterpenos: eucaliptol, ocimeno y terpinoleno.

2.1. Bioensayos *in vitro* del potencial antifúngico de los VOCs selectos

Con la finalidad de profundizar en el potencial antifúngico que presentan los VOCs selectos, se evaluó el efecto *in vitro* de los compuestos de manera individual y en mezclas, empleando el método de dilución en agar y el método de fase gas sobre el crecimiento radial del hongo fitopatógeno *F. oxysporum*, en un rango de concentraciones de 125 y 1000 µg/mL.

2.1.1. Método de dilución en agar

En la Figura 16 se muestra la inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de la mezcla de los seis VOCs. En la Figura 17 se presentan los porcentajes de inhibición provocados por los alcoholes y los monoterpenos evaluados de manera individual y en mezclas, sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, utilizando el método de dilución en agar. Todos los tratamientos inhiben de forma dependiente de la concentración el crecimiento del fitopatógeno, sin embargo, los porcentajes de inhibición fueron significativos solo a 500 y 1000 µg/mL para las mezclas, y a 1000 µg/mL para los VOCs evaluados de manera individual, excepto el eucaliptol, el cual no tuvo efecto inhibitorio significativo en las concentraciones evaluadas. Las mezclas de los seis VOCs y de los tres alcoholes presentaron el mayor efecto antifúngico, con un 100% de inhibición a 1000 µg/mL y con valores de CI₅₀ de 355.9 y 567.6 µg/mL, respectivamente. Cabe destacar que en su mayoría los compuestos puros evaluados de manera individual, inhiben con porcentajes significativos y superiores al 20% y que el alcohol feniletílico fue el compuesto más activo, inhibiendo en 47.7% el crecimiento del fitopatógeno de prueba a la máxima concentración que fue de 1000 µg/mL.

En este bioensayo empleando el método de dilución en agar, se observó que los VOCs evaluados en las dos mezclas, poseen el mayor efecto antifúngico. Sin embargo, a nivel individual el alcohol feniltetílico fue el que inhibió en mayor grado el crecimiento de *F. oxysporum*. Diversos estudios han demostrado el efecto antagónico del alcohol feniltetílico sobre diversos patógenos (Mercier y Jiménez, 2004; Mo y Sung, 2007; Strobel, 2001; Strobel *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008).

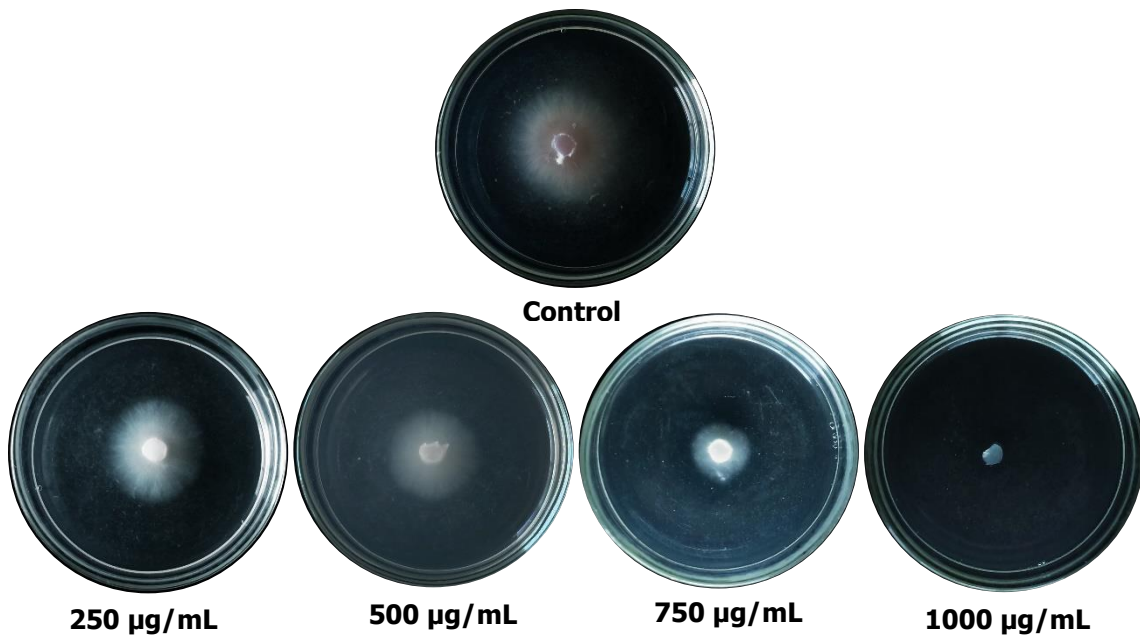


Figura 16. Inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de la mezcla de los seis VOCs, utilizando el método de dilución en agar.

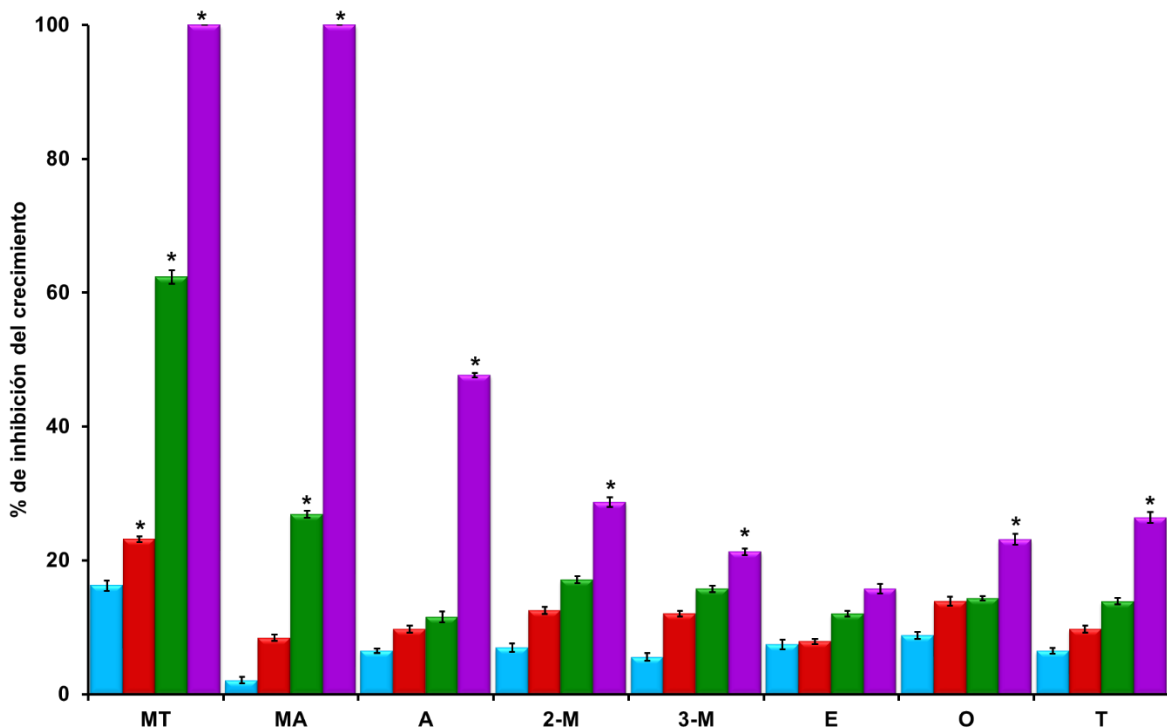


Figura 17. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos, utilizando el método de dilución en agar. La mezcla de los seis VOCs (MT), la mezcla de los tres alcoholes (MA), los alcoholes feniletílico (A), 2-metil-1-butanol (2-M) y 3-metil-1-butanol (3-M), y los monoterpenos eucaliptol (E), ocimeno (O) y terpinoleno (T), a concentraciones de 125 (azul), 250 (rojo), 500 (verde) y 1000 (morado) µg/mL. * valores estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

2.1.2. Método de fase gas

En la Figura 18 se presenta la inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de la mezcla de los seis VOCs. En la Figura 19 se observa el efecto inhibitorio de los VOCs evaluados de manera individual y en mezclas sobre el crecimiento de *F. oxysporum* empleando el método de fase gas. De manera similar al efecto observado en el bioensayo de dilución en agar, todos los tratamientos inhiben de forma dependiente de la concentración el crecimiento del fitopatógeno, sin embargo, la inhibición fue estadísticamente significativa a las concentraciones más altas, es decir, para las dos mezclas a partir de la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$, y para los compuestos 2-metil-1-butanol (29.0%), 3-metil-1-butanol (26.9%) y eucaliptol (30.8%), a la máxima concentración de prueba que fue de 1000 $\mu\text{g/mL}$, el resto de los valores de inhibición no fueron significativos. Los compuestos alcohol fenilético, ocimeno y terpinoleno no mostraron efecto significativo en ninguna concentración. Las mezclas de los seis VOCs y de los alcoholes presentaron el mayor efecto antifúngico, con valores de CI_{50} de 516.4 y 634.6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

De nueva cuenta, las mezclas de los seis VOCs y de los tres alcoholes presentaron la mayor inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno. Es importante señalar que en el bioensayo realizado por el método de fase gas los valores de las CI_{50} son más altos que los obtenidos por el método de dilución en agar, lo que indica que la inhibición es más efectiva si se realiza difundiendo en el agar los volátiles, esto puede deberse a que el ambiente dentro de la caja de Petri está más saturado de VOCs, y éstos permanecen más tiempo al encontrarse disueltos en agar.

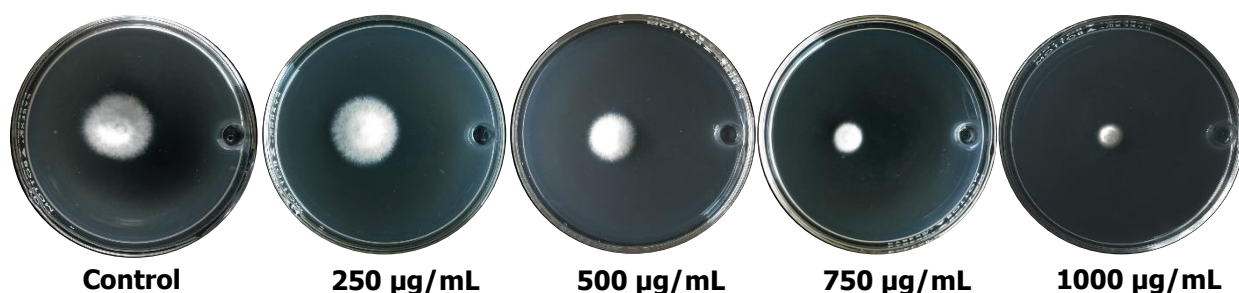


Figura 18. Inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de la mezcla de los seis VOCs, utilizando el método de fase gas.

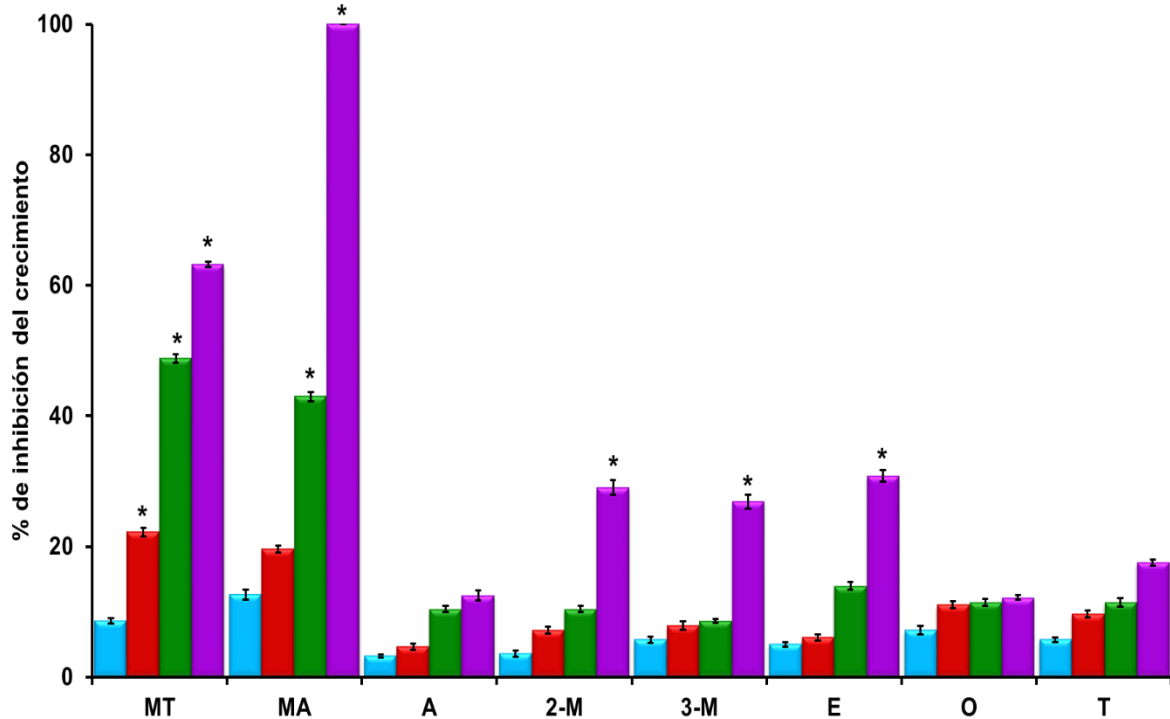


Figura 19. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos, utilizando el método de fase gas. La mezcla de los seis VOCs (MT), la mezcla de los tres alcoholes (MA), los alcoholes fenilético (A), 2-metil-1-butanol (2-M) y 3-metil-1-butanol (3-M), y los monoterpenos eucaliptol (E), ocimeno (O) y terpinoleno (T), a concentraciones de 125 (azul), 250 (rojo), 500 (verde) y 1000 (morado) µg/mL. * valores estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

2.2. Bioensayo *in vivo* del potencial antifúngico de los VOCs selectos

Para demostrar el efecto antifúngico, así como la posible aplicación de los VOCs selectos como bioplaguicidas, se realizó una prueba *in vivo*, empleando jitomates cherry infectados con *F. oxysporum*.

En la Figura 20A se observan los porcentajes de inhibición provocados por los VOCs selectos sobre jitomates cherry infectados con el fitopatógeno *F. oxysporum*, empleando un rango de concentraciones de 12.5 a 1000 µg/mL. Todos los tratamientos inhiben significativamente y de forma dependiente de la concentración el crecimiento del fitopatógeno. Con excepción del ocimeno todos los VOCs evaluados provocaron un efecto inhibitorio superior al 40%, a partir de la concentración de 125 µg/mL. No obstante, el ocimeno fue el único terpeno que inhibió en un 100% el crecimiento a la máxima concentración evaluada que fue de 1000 µg/mL. Las mezclas de los seis VOCs y de los tres

alcoholes, así como los alcoholes feniletílico, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol evaluados de manera individual mostraron el mayor efecto antifúngico, inhibiendo significativamente el crecimiento del fitopatógeno de prueba en 30.5%, 17.1%, 40.7%, 44.5% y 47.5%, respectivamente, a la mínima concentración de prueba que fue de 12.5 µg/mL. En la Figura 20B se muestra a manera de ejemplo, el registro fotográfico del efecto inhibitorio producido por la mezcla de los seis VOCs selectos sobre los jitomates cherry infectados por *F. oxysporum*, en un rango de concentraciones de 12.5 a 1000 µg/mL.

En el Cuadro 1, se resume el efecto antifúngico mostrado por los VOCs selectos evaluados de manera individual y en mezclas, expresado como valores de concentración inhibitoria media (CI₅₀, µg/mL). Los valores de CI₅₀ confirman que las mezclas de los seis VOCs y de los tres alcoholes, así como el alcohol feniletílico, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol de evaluados de manera individual, poseen el mayor potencial antifúngico en el crecimiento de *F. oxysporum* sobre jitomates cherry, con valores de 25.8, 88.3, 22.3, 18.6 y 19.7 µg/mL, respectivamente. Cabe destacar que a pesar de que la CI₅₀ de la mezcla de los seis VOCs es mayor a la provocada por los alcoholes evaluados de manera individual, y junto con la mezcla de los tres alcoholes, son los únicos tratamientos que inhiben en un 100% el crecimiento del fitopatógeno sobre jitomates cherry, a partir de la concentración de 250 µg/mL, mientras que el 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol inhibieron por completo el crecimiento a partir de 500 µg/mL.

De manera similar a los experimentos *in vitro*, la mezcla de los seis VOCs posee el mayor potencial antifúngico. La mayor inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en los experimentos *in vivo* puede deberse a que el fitopatógeno debe producir metabolitos específicos para asegurar una colonización exitosa cuando infectan a los jitomates por lo que parte de los recursos del patógeno se utilizan para este propósito, limitando su propio desarrollo (Gordon y Martyn, 1997; Leslie y Summerell, 2006; Strobel *et al.*, 2007). Además, los jitomates cherry contienen diferentes nutrientes a los encontrados en el medio PDA, y tienen un sistema de defensa que produce metabolitos, que lo ayudan a protegerse del ataque de herbívoros y microorganismos patógenos (González *et al.*, 2012). Como consecuencia, la exposición a los VOCs selectos tiene mayor efecto negativo sobre el crecimiento de *F. oxysporum*, favoreciendo su uso como bioplaguicidas.

Es interesante señalar que el alcohol feniletílico también es producido por los hongos endófitos *Muscodor albus* E6 y *M. albus* aislamiento 620, utilizados como agentes de control

biológico en manzanas infectadas con los hongos *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* y en duraznos infectados con *Monilinia fructicola* (Mercier y Jiménez, 2004; Strobel, 2001; Strobel *et al.*, 2007). Este compuesto también se reportó como constituyente de los VOCs producidos la actinobacteria *Streptomyces platensis* F-1 (Wan *et al.*, 2008). En el estudio llevado a cabo por Wan y colaboradores (2008), se encontró que los VOCs producidos por *S. platensis* F-1 pueden ser los responsables de los efectos tóxicos observados sobre los patógenos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *B. cinerea*. Por otra parte, Mo y Sung (2007) proponen al alcohol feniletílico extraído de la levadura *Pichia anomala* SKM-T como un agente de control biológico en el almacenamiento postcosecha de fresas, debido a que mostró actividad antifúngica en fresas infectadas con *B. cinerea*.

El 3-metil-1-butanol también es un compuesto volátil presente en la mezcla de VOCs de *M. albus* aislamiento 620 y *M. suthepensis* aislamiento CMU-Cib462, utilizados como agentes de micofumigación (Strobel *et al.*, 2007; Suwannarach *et al.*, 2016), así como en el hongo endófito *Phaeosphaeria nodorum* (Pimienta *et al.*, 2012). Suwannarach y colaboradores (2016) emplearon a *M. suthepensis* aislamiento CMU-Cib462 como biofungicida postcosecha para proteger frutos de *Citrus tangerina* contra *Penicillium digitatum*, reduciendo de manera significativa el diámetro de las lesiones. Pimienta y colaboradores (2012) evaluaron el efecto *in vitro* de los VOCs del hongo endófito *P. nodorum* como agente antifúngico sobre *M. fructicola*, observando una inhibición significativa sobre el crecimiento del fitopatógeno.

El 3-metil-1-butanol y el eucaliptol se reportaron como parte de los constituyentes de la mezcla de VOCs producidos por los hongos endófitos *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 y *Nodulisporium* sp. aislamiento GS4d2II1a, los cuales presentan actividad antifúngica (Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Suwannarach *et al.*, 2013). Suwannarach y colaboradores (2013) demostraron en bioensayos *in vitro* que los VOCs del hongo *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 inhibe significativamente el crecimiento de los fitopatógenos *Alternaria porri*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *F. oxysporium*, *Fusarium solani*, *Nigrospora oryzae*, *P. digitatum*, *Penicillium expansum*, *R. solani* y *Sclerotium rolfsii*. Los estudios *in vivo* mostraron que los VOCs inhibieron el desarrollo de las lesiones causadas por *P. expansum* en los frutos *Citrus aurantifolia* y *Citrus reticulata*, y por *P. digitatum* en el fruto *Citrus limon*. Sánchez-Fernández y colaboradores (2016) probaron que la mezcla de VOCs producida por el endófito *Nodulisporium* sp. aislamiento GS4d2II1a inhibió de manera significativa el crecimiento de

los fitopatógenos *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum*, *Pythium polytylum*, *P. capsici*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora parasitica*, *F. oxysporum* y *A. solani*.

El 2-metil-1-butanol también se ha descrito como uno de los compuestos en la mezcla de VOCs producida por *M. albus* aislamiento 620, utilizado como agente de control biológico (Ramin *et al.*, 2005) y de *Muscodor yucatanensis*, que tuvo propiedades antifúngicas y fitotóxicas (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010). Los experimentos *in vitro* realizados por Ramin y colaboradores (2005) confirman que los VOCs de *M. albus* aislamiento 620 actúan sobre los hongos *B. cinerea*, *P. expansum* y *S. sclerotiorum*, y contra las bacterias *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli*, inhibiendo la germinación de las esporas de *B. cinerea* y *P. expansum*, y el crecimiento de *S. sclerotiorum*, *E. carotovora* pv. *carotovora*, *P. fluorescens* y *E. coli*. Es importante señalar que los VOCs selectos empleados en este trabajo, no se evaluaron como mezclas de bioplaguicidas para probar su eficacia en enfermedades postcosecha en ninguno de los trabajos previamente mencionados.

Los experimentos *in vivo* realizados con *F. oxysporum* creciendo sobre jitomates cherry, muestran que los VOCs evaluados de manera individual y en mezclas, particularmente la mezcla de los seis VOCs, inhiben significativamente y de manera dependiente de la concentración el crecimiento del micelio sobre las heridas infectadas de los jitomates. Cabe mencionar que los valores de la CI_{50} obtenidos en los bioensayos con los jitomates cherry infectados son menores a los encontrados en los bioensayos *in vitro*, tanto para los VOCs evaluados de manera individual como en mezclas (Cuadro 1).

Una vez que se demostró por medio de bioensayos *in vitro* e *in vivo* que los VOCs evaluados de manera individual y en mezclas inhiben el crecimiento de *F. oxysporum*, para elucidar el posible mecanismo de acción de los compuestos de prueba, se estudiaron sus efectos en la respiración, la conductividad eléctrica y la morfología de las hifas del fitopatógeno.

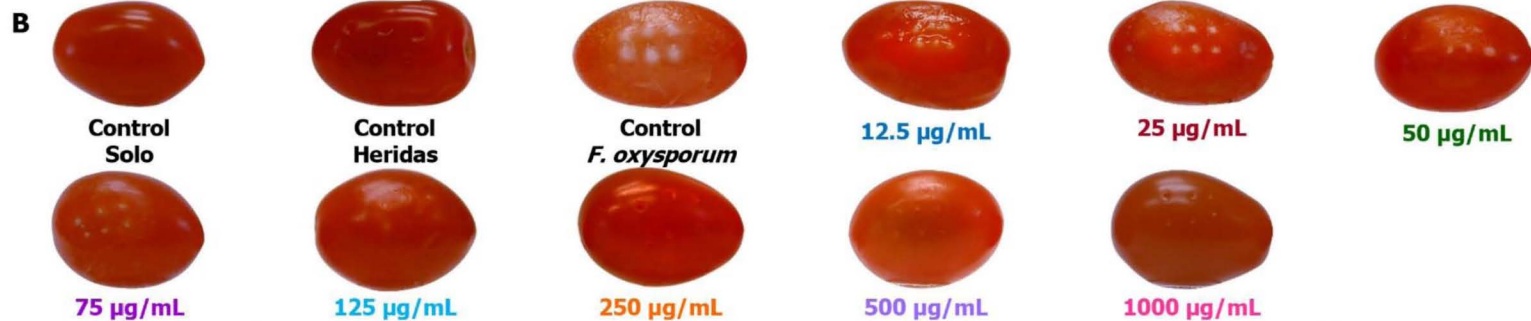
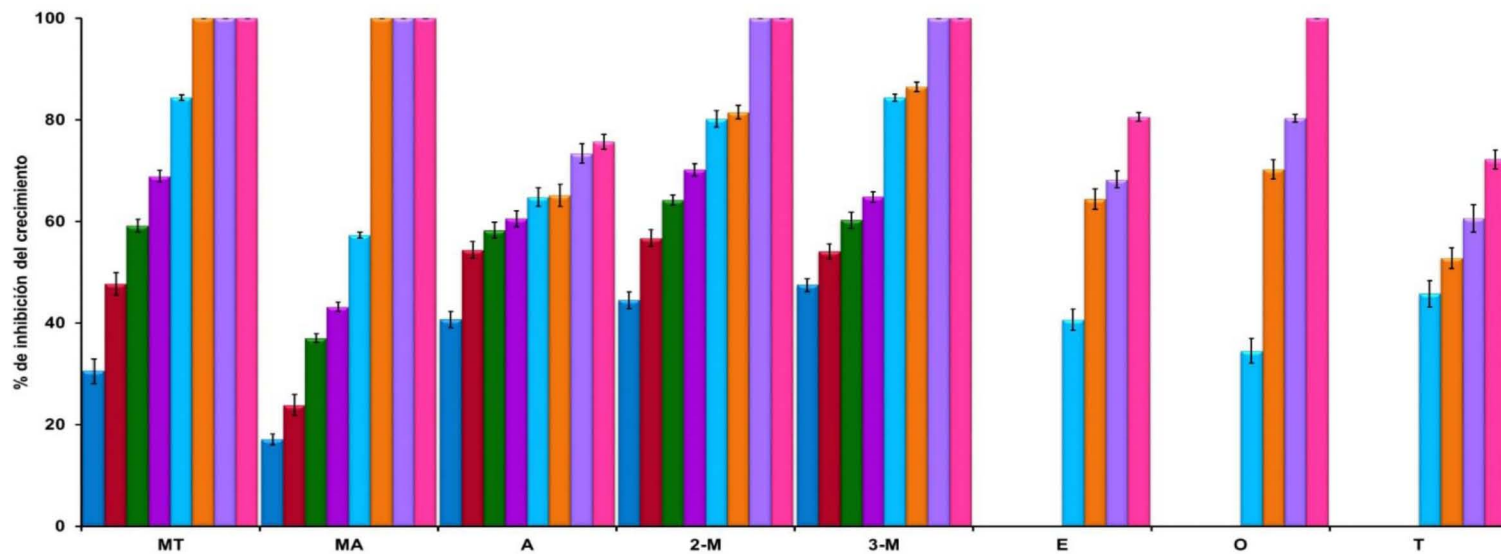


Figura 20. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* creciendo sobre jitomates cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en presencia de los VOCs selectos. La mezcla de los seis VOCs (MT), la mezcla de los tres alcoholes (MA), los alcoholes fenilético (A), 2-metil-1-butanol (2-M) y 3-metil-1-butanol (3-M), y los monoterpenos eucaliptol (E), ocimeno (O) y terpinoleno (T), a concentraciones de 12.5 (azul oscuro), 25 (rojo), 50 (verde oscuro), 75 (morado), 125 (azul claro), 250 (anaranjado), 500 (lila) y 1000 (rosa) µg/mL. Todos los valores fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$) (Figura 20A). Efecto inhibitorio producido por la mezcla de los seis VOCs selectos sobre los jitomates cherry infectados por *F. oxysporum*, en un rango de concentraciones de 12.5 a 1000 µg/mL (Figura 20B)

2.3. Efecto de los VOCs selectos sobre la respiración

En primer lugar, para correlacionar la inhibición causada por los VOCs sobre el crecimiento radial del fitopatógeno *F. oxysporum* con posibles alteraciones en la respiración del microorganismo, se evaluó el efecto de los VOCs de manera individual o en mezclas sobre la tasa de consumo de oxígeno durante el crecimiento del micelio. En la Figura 21 se presenta el efecto inhibitorio producido por los VOCs sobre la respiración del fitopatógeno. El micelio de 48 h de crecimiento del fitopatógeno se incubó en presencia de cuatro diferentes concentraciones de los VOCs de manera individual y en mezclas. La tasa de consumo de oxígeno se midió a las 2, 5, y 8 h de incubación. Todos los tratamientos mostraron valores estadísticamente significativos, y se encontró una inhibición de forma dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. El mayor porcentaje de inhibición se observó a las 8 h de incubación. A la máxima concentración de prueba que fue de 1000 µg/mL, con excepción del 3-metil-1-butanol y del terpinoleno, todos los tratamientos mostraron diferencias significativas a los tres tiempos.

La mayor inhibición del consumo de oxígeno fue provocada por la mezcla de los seis VOCs en un 97.1% a la concentración de 1000 µg/mL, después de 8 h de incubación, con un valor de CI_{50} de 183.9 µg/mL. A la misma concentración, la mezcla de los seis VOCs mostró valores de CI_{50} de 315.1 y 248.1 µg/mL a las 2 y 5 h de incubación, respectivamente. Para la mezcla de alcoholes a la misma concentración, provocó una inhibición de 68.0% y un valor de CI_{50} de 244.4 µg/mL, después de 8 h de incubación. Con respecto a los compuestos evaluados individualmente, los monoterpenos terpinoleno y eucaliptol, provocaron la mayor inhibición con porcentajes superiores al 80% y valores de CI_{50} de 200.7 y 395.9 µg/mL, respectivamente. El ocimeno inhibió en un 65.1% y mostró un valor de CI_{50} de 573.3 µg/mL. Los alcoholes 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol inhibieron el consumo de oxígeno en un 70.6% y 61.2%, presentando valores de CI_{50} de 247.9 y 480.5 µg/mL, respectivamente. El alcohol feniletílico mostró un valor de $CI_{50} > 1000$ µg/mL, inhibiendo la respiración en un 42.1% a la máxima concentración evaluada.

En el Cuadro 1 se resume el efecto inhibitorio sobre la respiración de *F. oxysporum* provocado por los VOCs selectos evaluados de manera individual y en mezclas a 125, 250, 500 y 1000 µg/mL después de 2, 5 y 8 h de incubación, expresados como valores de CI_{50} , (µg/mL). A partir de los resultados obtenidos fue evidente el efecto sinérgico de los VOCs. La mezcla de los seis VOCs inhibe en mayor grado que los alcoholes y los monoterpenos

evaluados de manera individual, con valores de CI_{50} inferiores a 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de las 2 h de incubación.

Los resultados sobre la inhibición de la respiración del fitopatógeno indican que los compuestos evaluados de manera individual y en mezclas poseen un efecto antifúngico estadísticamente significativo dependiente tanto del tiempo de incubación como de la concentración de compuestos. Para todos los tratamietos la mayor inhibición ocurre después de ocho horas y a la máxima concentración de prueba. Además, las mezclas de los seis VOCs y de los tres alcoholes actúan de manera sinérgica. Estos resultados concuerdan con lo descrito previamente para los VOCs biosintetizados por diferentes microorganismos (Ezra y Strobel, 2003; Strobel, 2006; Thomscheck *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016).

Cuadro 1. Efecto inhibitorio de los VOCs selectos sobre el crecimiento *in vivo* e *in vitro*, y la respiración de las hifas de *F. oxysporum* expresado como CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Compuesto	CI_{50} $\mu\text{g}/\text{mL}$					
	Crecimiento radial			Respiración		
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>		Horas		
	Jitomates cherry	Dilución en agar	Fase gas	2	5	8
Mezcla de seis VOCs	25.8	355.9	516.4	315.1	248.1	183.9
Mezcla de alcoholes	88.3	567.6	634.6	> 1000	418.4	244.4
Alcohol feniletílico	22.3	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
2-Metil-1-butanol	18.6	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	480.5
3-Metil-1-butanol	19.7	> 1000	> 1000	822.5	357.8	247.9
Eucaliptol	167.7	> 1000	> 1000	659.7	591.1	395.9
Ocimeno	172.1	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	573.3
Terpinoleno	189.3	> 1000	> 1000	420.6	299.1	200.7
Captan 50	-	5.1	-	8.4	6.0	4.0

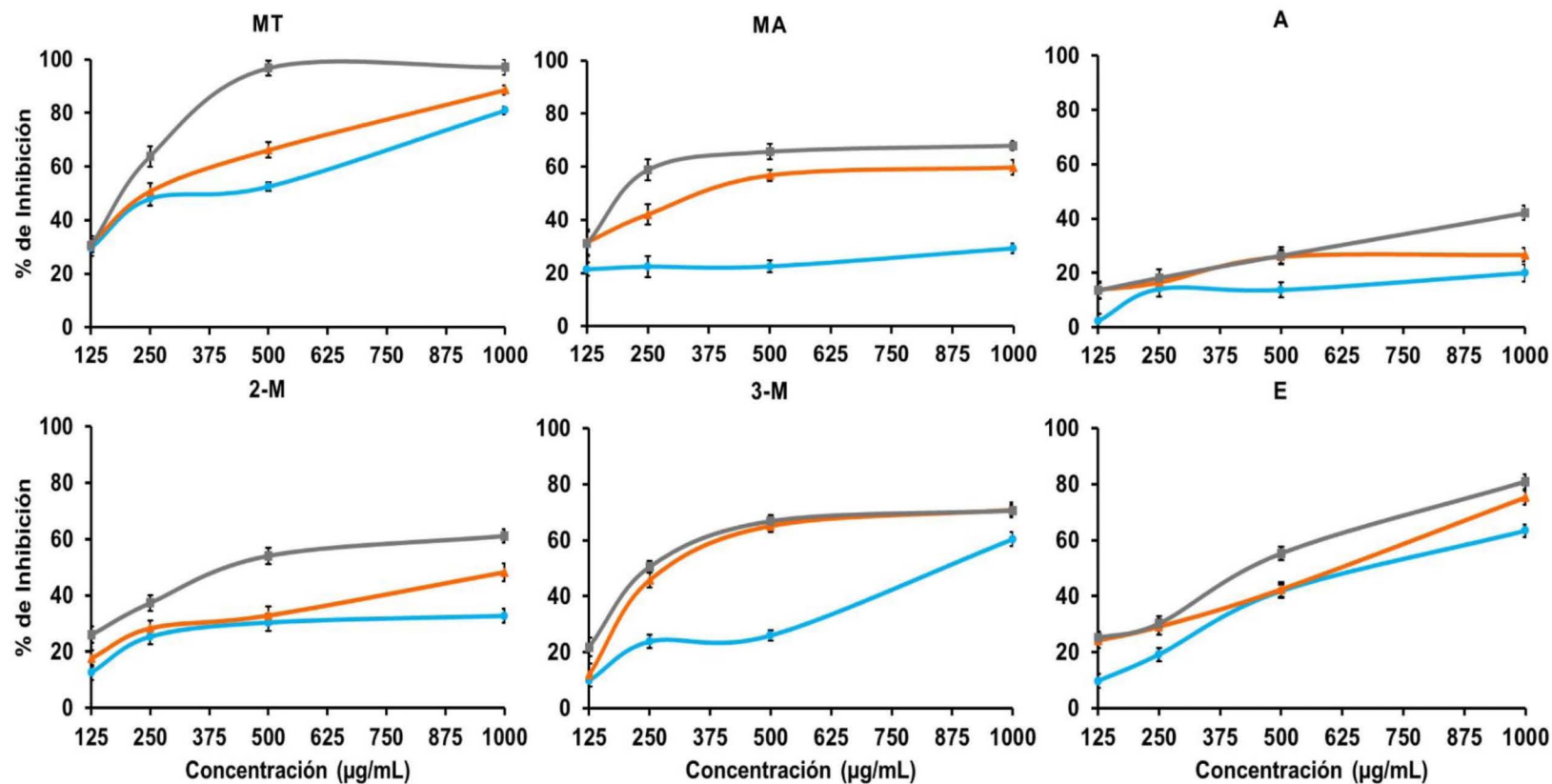


Figura 21. Respiración de las hifas de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos evaluados a las 2 (azul), 5 (anaranjado) y 8 (gris) horas de tratamiento. Mezcla de los seis VOCs (MT), mezcla de los tres alcoholes (MA), alcohol feniletílico (A), 2-metil-1-butanol (2-M), 3-metil-1-butanol (3-M) y eucalipto (E), a concentraciones de 125, 250, 500 y 1000 µg/mL. Todos los valores de porcentaje fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

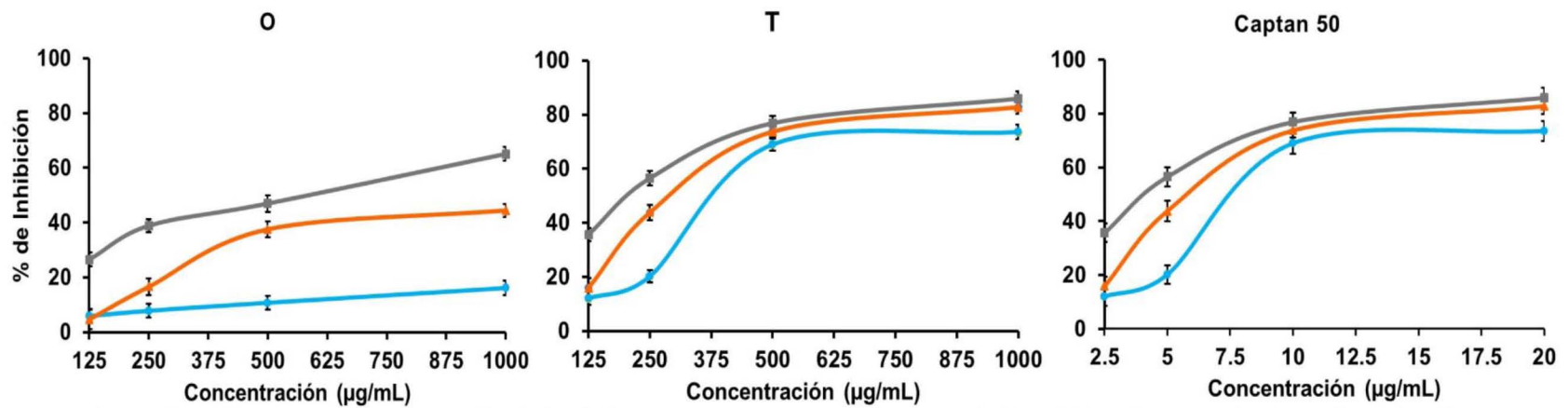


Figura 21. (Continuación). Respiración de las hifas de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos evaluados a las 2 (azul), 5 (anaranjado) y 8 (gris) horas de tratamiento. Ocimeno (O), terpinoleno (T) y Captan 50, a concentraciones de 125, 250, 500 y 1000 µg/mL. Todos los valores de porcentaje fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$)

2.4. Efecto de los VOCs selectos sobre la conductividad eléctrica

Para confirmar si el efecto provocado por los VOCs sobre el crecimiento y respiración de *F. oxysporum* conlleva a la disrupción la membrana celular, se analizó la conductividad eléctrica en presencia de los VOCs. En la Figura 22 se presenta el efecto producido por los VOCs sobre la conductividad eléctrica expresada como conductividad relativa. En todos los casos la conductividad aumentó con respecto a la concentración y al tiempo de incubación. Sin embargo, únicamente la mezcla de los seis VOCs muestra diferencias significativas con respecto a la concentración y al tiempo incubación. Asimismo, todos los tratamientos muestran valores estadísticamente significativos a la máxima concentración de prueba que fue de 1000 µg/mL, a partir de las 2 y hasta las 8 h.

Los mayores porcentajes de conductividad relativa se observaron a la máxima concentración después de 8 h de incubación el micelio en presencia de los VOCs. Con excepción del terpinoleno que muestra una tasa de fuga de electrolitos del 37.0% con respecto al control, todos los tratamientos provocaron un incremento de la conductividad relativa entre 40% y 50% en el orden que se indica a continuación: ocimeno (48.8%) >2-metil-1-butanol (45.4%) >alcohol feniletílico (43.1%) >mezcla de alcoholes (42.9%) >mezcla de los seis VOCs (42.8%) >3-metil-1-butanol (42.4%) >eucaliptol (40.6%). El incremento en la conductividad relativa a las 2 h de tratamiento es alrededor de 30% y a las 5 horas de tratamiento del 30% a 40%. Estos resultados indicaron que los VOCs alteraron la conductividad eléctrica del fitopatógeno ocasionando la salida de iones.

De manera similar al efecto observado en la respiración del fitopatógeno, los VOCs tuvieron un efecto dependiente de la concentración y del tiempo de incubación, actuando también de manera sinérgica cuando se evalúan en mezclas sobre la conductividad eléctrica del fitopatógeno, ocasionando un cambio en el flujo de electrolitos haciendo que incremente la tasa de fuga de electrolitos con respecto a las hifas que no se encuentran expuestas a los VOCs (Duan *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016).

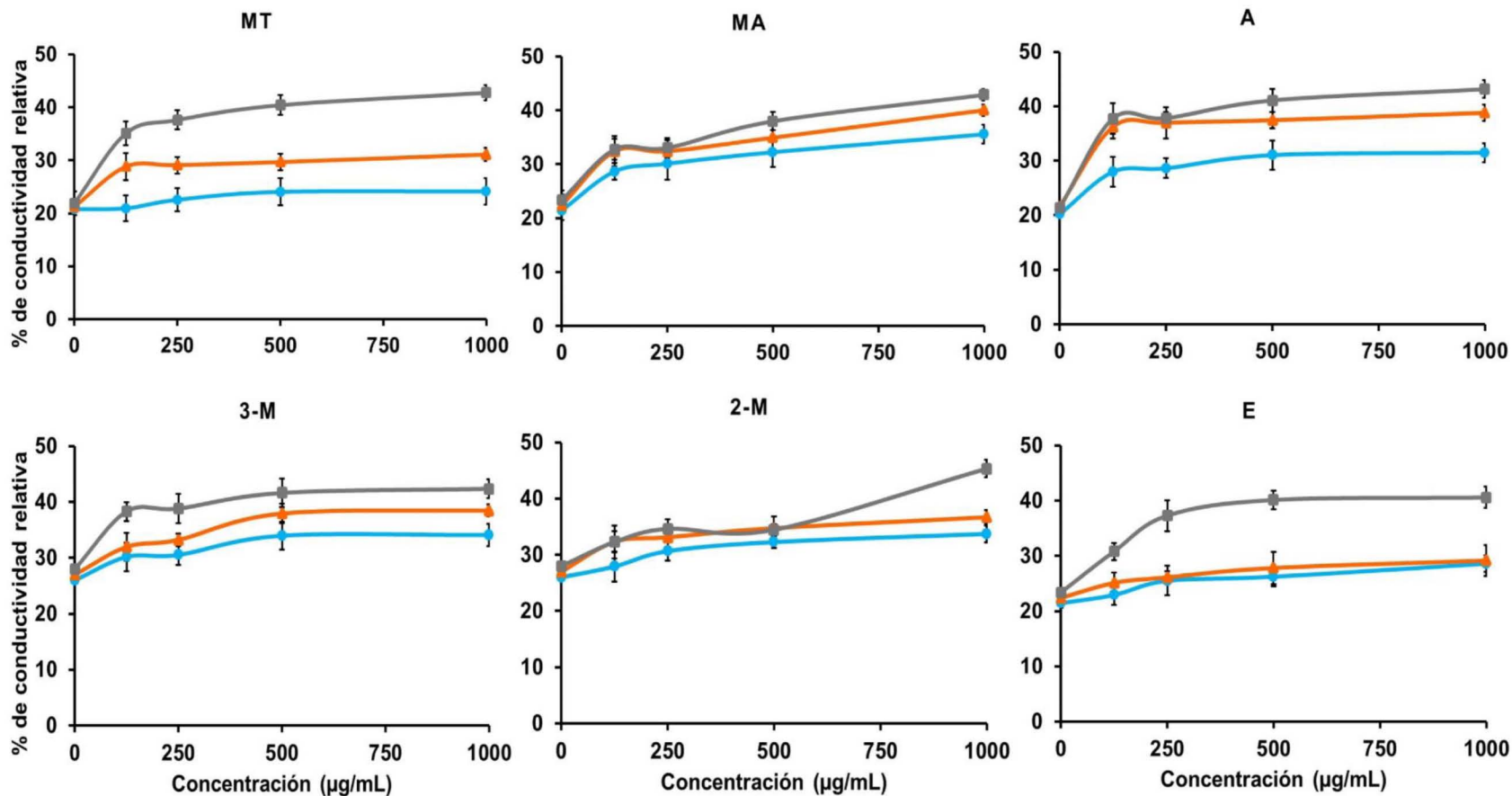


Figura 22. Conductividad eléctrica expresada como conductividad relativa de las hifas de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos evaluados a las 2 (azul), 5 (anaranjado) y 8 (gris) horas de tratamiento. Mezcla de los seis VOCs (MT), mezcla de los tres alcoholes (MA), alcohol feniletílico (A), 2-metil-1-butanol (2-M), 3-metil-1-butanol (3-M) y eucaliptol (E), a concentraciones de 125, 250, 500 y 1000 µg/mL. Todos los valores de porcentaje fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

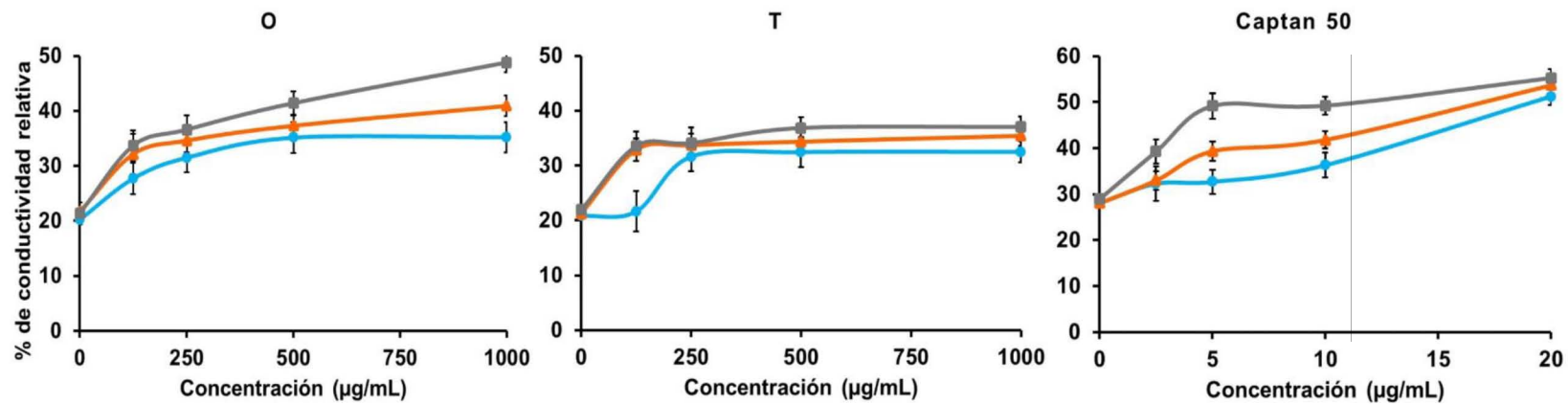


Figura 22. (Continuación). Conductividad eléctrica expresada como conductividad relativa de las hifas de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos evaluados a las 2 (azul), 5 (anaranjado) y 8 (gris) horas de tratamiento. Ocimeno (O), terpinoleno (T) y Captan 50, a concentraciones de 125, 250, 500 y 1000 µg/mL. Todos los valores de porcentaje fueron estadísticamente significativos ANOVA ($P < 0.05$).

2.5. Efecto de los VOCs selectos sobre la morfología de las hifas

Finalmente, con el objeto de investigar el efecto de los VOCs de manera individual y en mezclas sobre el fitopatógeno *F. oxysporum*, se estudió la morfología de las hifas a través de preparaciones en fresco hechas a partir de microcultivos empleando el método de dilución en agar y de fase gas, así como por suspensiones de micelio. La descripción y la discusión sobre la morfología de las hifas obtenidas por las diferentes metodologías se realizaron de manera conjunta para facilitar la comparación la comparación de los efectos de los VOCs sobre la ultraestructura del fitopatógeno.

Las micrografías obtenidas a partir de microcultivos de 48 h de crecimiento del fitopatógeno en presencia de los VOCs empleando el método en fase gas muestran mayores efectos tóxicos sobre la morfología de las hifas que las micrografías obtenidas por el método de dilución en agar. En contraste con el método de dilución en agar, los VOCs evaluados de manera individual inducen la proliferación de las vacuolas a la concentración de 1000 µg/mL. Además, el 2-metil-1-butanol y el 3-metil-1-butanol inducen un proceso de vacuolización, donde algunas vacuolas se abultan y eso hace que haya regiones hinchadas en la hifa. El 2-metil-1-butanol también provoca engrosamiento de las hifas en la parte media y adelgazamiento en las orillas por lo que la hifa presenta grosor diferencial. El ocimeno ocasiona espacios vacíos que indican la pérdida de contenido hifal, observándose hifas transparentes y vacías (Figuras 23 y 24C). De nueva cuenta, el mayor efecto tóxico sobre la morfología de las hifas se observó en las micrografías obtenidas de los tratamientos con la mezcla de los seis VOCs y de los tres alcoholes. Como consecuencia del estrés producido por la presencia de estas mezclas, hay proliferación de las vacuolas y procesos de vacuolización, lo que resultó en hifas rotas. La mezcla de los seis VOCs mostró el mayor efecto tóxico a partir de la concentración de 75 µg/mL e inhibió completamente el crecimiento del patógeno a la concentración 1000 µg/mL. Por otra parte, la mezcla de alcoholes presentó el mayor daño sobre las hifas a partir de 250 µg/mL. Se observaron hifas con engrosamiento en la parte media y adelgazamiento en las orillas (Figuras 23 y 24C). Los análisis de los microcultivos confirmaron que los VOCs selectos perturbaron la conductividad eléctrica e inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum*. Esto puede deberse a la proliferación de las vacuolas y a un drástico proceso de vacuolización, que origino la ruptura de la hifas, alterando en consecuencia la respiración del microorganismo (Figura

24C). En la Figura 23 se muestra el efecto de los VOCs evaluados de manera individual y en mezclas, usando el método de fase gas.

Las micrografías de las suspensiones del micelio observadas después de 2, 5 y 8 h de tratamiento con los VOCs selectos muestran que el mayor efecto tóxico sobre la morfología de las hifas es a partir de las 5 h a la concentración de 1000 µg/mL. El alcohol feniletílico y el 3-metil-1-butanol provocaron una mayor penetración del colorante en las hifas, por lo que el color en algunas regiones de las hifas es más intenso que en otras regiones. En presencia del 2-metil-1-butanol, del eucaliptol y de la mezcla de alcoholes se observó, además de una mayor penetración del colorante, procesos de vacuolización, y engrosamiento en la parte media y adelgazamiento en las orillas. El ocimeno y la mezcla de los seis VOCs también indujeron procesos de vacuolización y engrosamiento de las hifas en la parte media de las hifas, además se encontraron espacios vacíos que indican la pérdida del contenido hifal. El terpinoleno, también ocasionó una mayor penetración del colorante y la generación de espacios vacíos debido a la pérdida del contenido hifal. Después de 8 h de tratamiento con el 3-metil-1-butanol, además de los efectos observados a las 5 h, también provoca procesos de vacuolización y el engrosamiento de la parte media de las hifas y adelgazamiento de las orillas. En presencia del eucaliptol, ocimeno, terpinoleno, y de ambas mezclas, fue más evidente el proceso de vacuolización, de engrosamiento y adelgazamiento de las hifas, así como de la pérdida del contenido hifal desde las 5 h (Figuras 23 y 24C).

Cabe destacar que la mezcla de los seis VOCs es el único tratamiento que induce cambios morfológicos a partir de la concentración más baja de prueba que fue de 125 µg/mL (Figura 23). Los daños en la morfología de las hifas se relacionan con los resultados obtenidos previamente en los experimentos de la respiración y la conductividad eléctrica. Las alteraciones causadas por los VOCs en la respiración y en la conductividad eléctrica del microorganismo pueden deberse a la proliferación de las vacuolas y a un severo proceso de vacuolización que resulta en la ruptura de las hifas. Los efectos de los VOCs evaluados de forma individual y en mezclas sobre las hifas de *F. oxysporum* después de 8 h de exposición empleando el método de dilución se muestran en la Figura 23.

Para un mejor entendimiento de las alteraciones en la morfología de las hifas de *F. oxysporum* causadas por los VOCs de manera individual y en mezclas, se muestra una breve explicación de cada término utilizado: mayor penetración del colorante dentro de la hifa: el color en algunas regiones de la hifa es más intenso que en otras regiones. Proceso de

vacuolización: la vacuola se abulta y eso hace que haya regiones hinchadas en la hifa. Engrosamiento de la parte media de la hifa y adelgazamiento de las orillas: la hifa presenta grosor diferencial. Espacios vacíos que indican pérdida de contenido hifal: la hifa parece transparente y vacía. Proliferación de las vacuolas: es un incremento sustancial en el número de vacuolas. Hifas rotas: la hifa está separada en dos o más pedazos (Figuras 23 y 24C). A manera de ejemplo, en la Figura 18 se observan las alteraciones morfológicas causadas por la mezcla de los seis VOCs utilizando los métodos de dilución (Figura 24A) y de fase gas (Figura 24B) a 500 µg/mL, después de 8 y 48 h de exposición, respectivamente. También se muestran imágenes amplificadas de las alteraciones en las hifas (Figura 24C).

En el trabajo realizado con los VOCs de *P. nodorum* sobre el crecimiento de *M. fructicola*, se encontró que después de la exposición de *M. fructicola* a los VOCs del endófito, se produjo una alteración morfológica sobre las hifas del fitopatógeno, observándose adelgazamiento de las hifas, algunas hifas rizadas, y otras con espacios vacíos que indicaron la pérdida del contenido hifal (Pimienta *et al.*, 2012).

Una de las desventajas del uso de los VOCs evaluados es el costo elevado de los compuestos puros, en particular de los monoterpenos, por lo que su uso en los cultivos estaría limitado. Para evitar los altos costos, se podría utilizar la mezcla de alcoholes que si bien no es igual de efectiva que la mezcla de todos los compuestos puros, tiene actividad similar. Además en las observaciones de los efectos de los compuestos sobre las hifas del fitopatógeno, los alcoholes causaron los mayores cambios morfológicos.

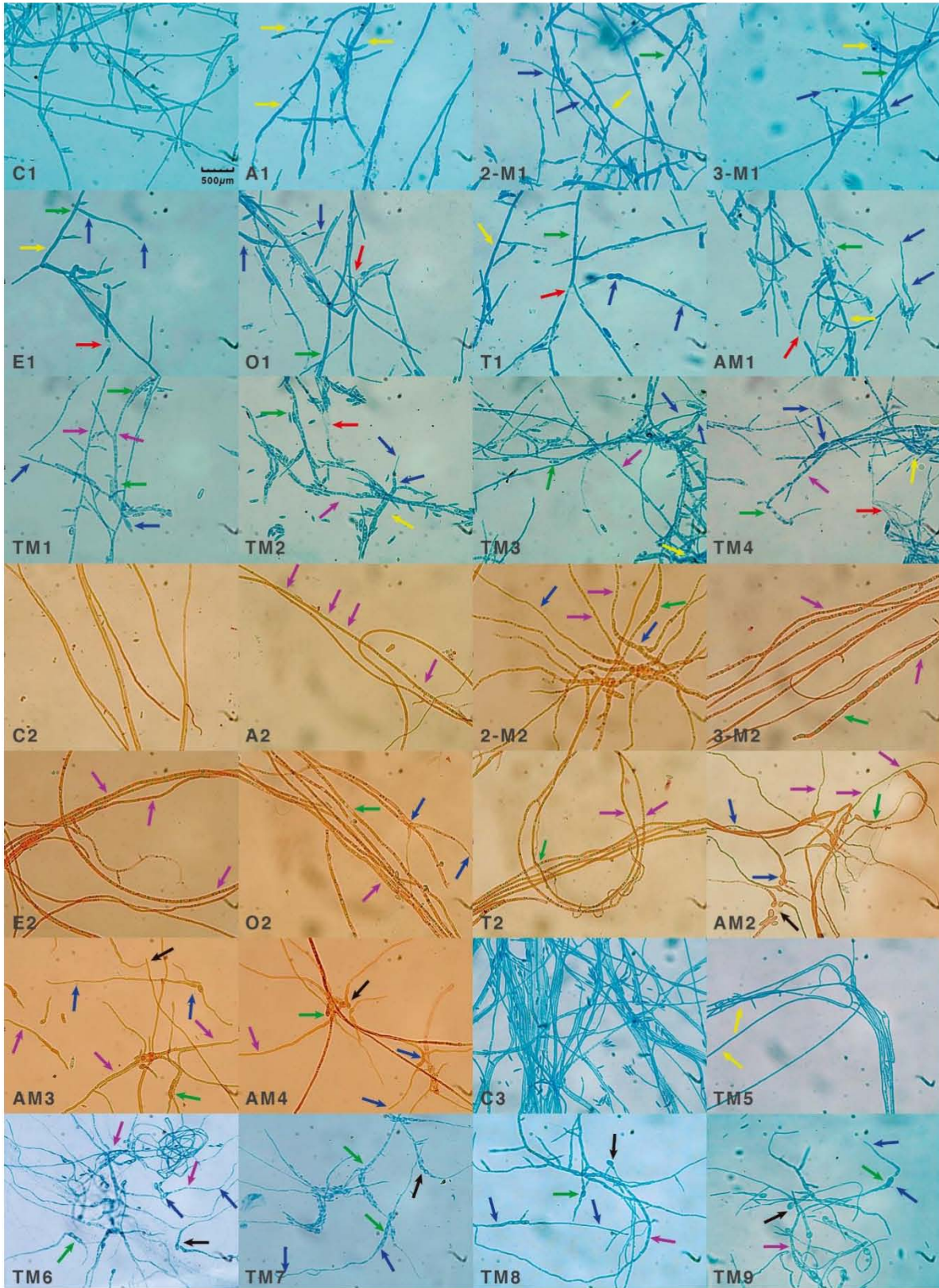


Figura 23.

Figura 23. Micrografías de las hifas de *F. oxysporum* en presencia de los VOCs selectos evaluados de manera individual y en mezclas, empleando los métodos de dilución y de fase gas. Hifas de la suspensión de micelio después de 8 h de tratamiento con los VOCs utilizando el método de dilución a la concentración de 1000 µg/mL: C1 hifas control teñidas con azul de lactofenol; A1 alcohol feniletílico; 2-M1 2-metil-1-butanol; 3-M 3-metil-1-butanol; E1 eucaliptol; O1 ocimeno; T1 terpinoleno; AM1 mezcla de los tres alcoholes. Efecto de la concentración de la mezcla de los seis VOCs después de 8 h de tratamiento empleando el método de dilución: TM1 125 µg/mL; TM2 250 µg/mL; TM3 500 µg/mL; TM4 1000 µg/mL. Hifas de *F. oxysporum* observadas después de 48 h de tratamiento con los VOCs por el métodos de fase gas a la concentración de 1000 µg/mL: C2 hifas control teñidas con rojo congo; A2 alcohol feniletílico; 2-M2 2-metil-1-butanol; 3-M2 3-metil-1-butanol; E2 eucaliptol; O2 ocimeno; T2 terpinoleno. Efecto de la concentración de la mezcla de los tres alcoholes usando el método de fase gas: AM2 250 µg/mL; AM3 500 µg/mL; AM4 1000 µg/mL. Efecto de la concentración de la mezcla de los seis VOCs utilizando el método de fase gas: C3 hifa control teñida con azul de lactofenol; TM5 50 µg/mL; TM6 75 µg/mL; TM7 125 µg/mL; TM8 250 µg/mL; TM9 500 µg/mL. Las flechas indican: Mayor penetración del colorante dentro de la hifa (amarilla); proceso de vacuolización (verde); engrosamiento de la parte media de la hifa y adelgazamiento de las orillas (azul); espacios vacíos (roja); proliferación de las vacuolas (morada); hifas rotas (negra).

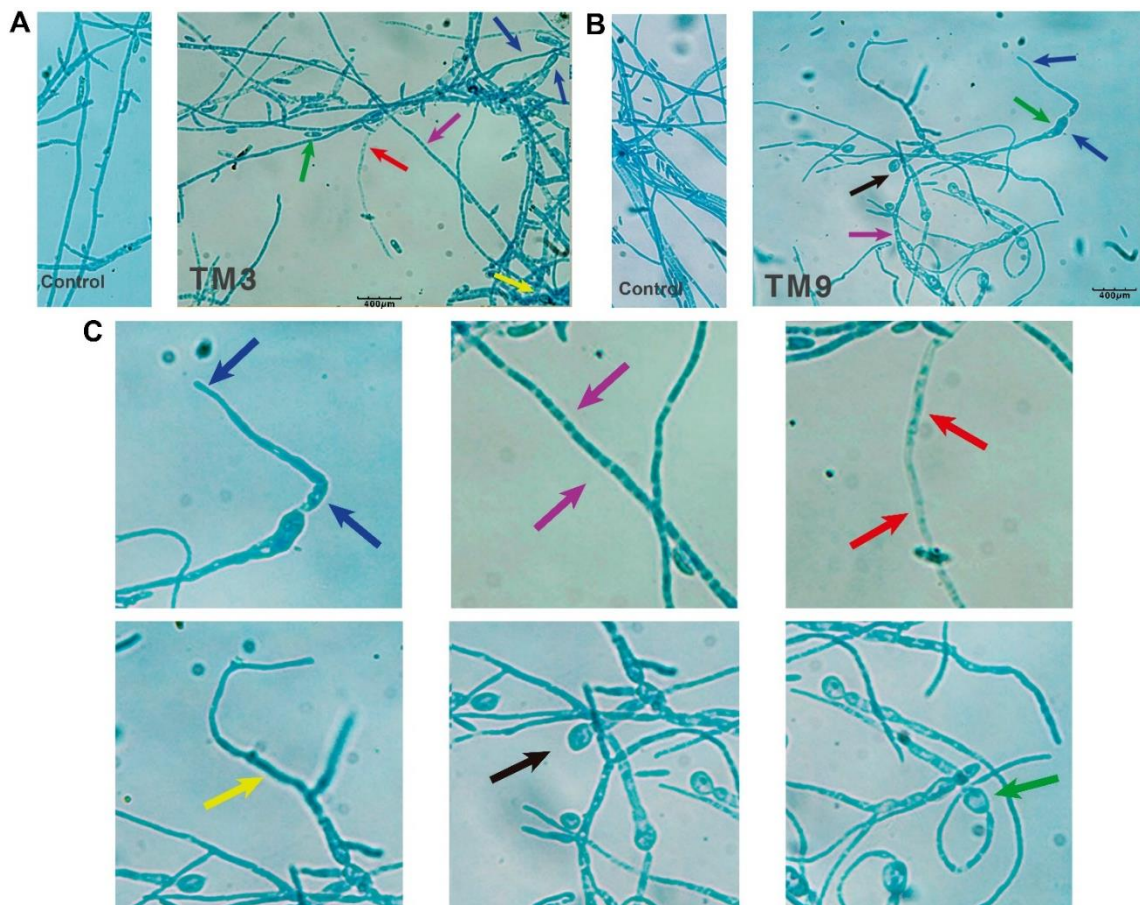


Figura 24. Micrografías de las alteraciones morfológicas causadas por la mezcla de los seis VOCs selectos, utilizando los métodos de dilución (Figura 24A) y de fase gas (Figura 24B) a 500 µg/mL, después de 8 y 48 h, respectivamente, también se muestran imágenes amplificadas de las alteraciones en las hifas (Figura 24C).

VII. CONCLUSIONES

Los bioensayos de antagonismo directo múltiple entre los hongos endófitos del género *Hypoxylon* y los microorganismos fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura: *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. ultimum*, permitieron establecer que los endófitos son productores de metabolitos secundarios tanto difusibles como volátiles bioactivos, cuya actividad incrementa conforme transcurren los días de interacción antagonista. La competencia múltiple *in vitro* entre los endófitos y los fitopatógenos también estimula mecanismos de defensa físicos, como es la formación de barreras miceliales y el micoparasitismo.

Los bioensayos utilizando los extractos orgánicos, mostraron que los extractos del medio de cultivo fueron más activos que los del micelio sobre el crecimiento radial de los fitopatógenos. La inhibición del crecimiento radial de hongos y de oomicetos fitopatógenos fue diferencial. Sin embargo, en *A. alternata*, *P. capsici* y *P. ultimum*, algunos extractos mostraron inhibición similar a la del fungicida comercial.

Los bioensayos de antagonismo en caja dividida permitieron corroborar que los hongos endófitos producen VOCs bioactivos capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba.

Los bioensayos de antagonismo directo múltiple y en caja dividida, así como los de potencial antagonista a nivel de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, llevados a cabo con los hongos endófitos del género *Hypoxylon*, permitieron demostrar que estos microorganismos son candidatos para el desarrollo de agentes de control biológico, así como, una fuente para la obtención de bioplaguicidas útiles en la agricultura. Además demostraron que a pesar de pertenecer al mismo género y posiblemente a la misma especie, presentaron diferente actividad biológica. En todos los bioensayos se observó que la mayor inhibición ocurre al inicio de la interacción antagonista.

En la presente tesis, se demostró por primera vez, que los VOCs selectos, los alcoholes fenilético, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, así como los monoterpenos eucaliptol, ocimeno y terpinoleno, presentes en las mezclas producidas por los hongos endófitos del género *Hypoxylon*, poseen potentes efectos antifúngicos contra el fitopatógeno *F.*

oxysporum, en bioensayos *in vitro* e *in vivo*, actuando tanto de manera individual como de manera sinérgica en mezclas.

En los experimentos *in vivo*, empleando a *F. oxysporum* creciendo sobre jitomates cherry, se mostró que los VOCs selectos evaluados de manera individual y en mezclas, inhiben de manera significativa y dependiente de la concentración, el crecimiento del micelio sobre las heridas infectadas de los jitomates, la inhibición fue mayor cuando los seis VOCs se encontraban en mezcla.

Los bioensayos *in vitro* demostraron que los VOCs selectos, particularmente la mezcla de los seis VOCs, inhibieron significativamente y de forma dependiente de la concentración el crecimiento de *F. oxysporum*, afectando la respiración, y la conductividad eléctrica del fitopatógeno. Estos resultados aunados a las alteraciones en la morfología de las hifas, pusieron en evidencia que los VOCs constituyen candidatos prometedores para el desarrollo de bioplaguicidas. Estos compuestos tienen un gran potencial para el tratamiento de las infecciones postcosecha provocadas por el hongo *F. oxysporum*.

Actualmente, no hay estudios relacionados con el efecto de los VOCs sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *F. oxysporum*, ni de su posible mecanismo de acción fisiológico, actuando de manera individual o en mezclas. Asimismo, no hay reportes en la literatura de estudios *in vivo* sobre VOCs producidos por hongos endófitos actuando de manera individual o en mezclas como bioplaguicidas, que demuestren su eficiencia en el control postcosecha de microorganismos fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura. Por lo que este trabajo constituye una contribución importante al estudio de los VOCs biosintetizados por hongos endófitos potencialmente útiles en la agricultura.

VIII. PERSPECTIVAS

Identificar la composición química de la mezcla de VOCs producidos por los hongos endófitos del género *Hypoxyton*.

Determinar el mecanismo de acción de cada uno de los VOCs.

Establecer relaciones de estructura – actividad de los VOCs para su posible aplicación en la agricultura y en la industria farmacéutica.

Realizar modificaciones estructurales a los VOCs para potenciar o mejorar la actividad presentada.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. 2005. *Plant pathology*. Elsevier Academic Press. EE. UU. 922 pp.
- Andrew, M., R. Barua, S. M. Short y L. M. Kohn. 2012. Evidence for a common toolbox based on necrotrophy in a fungal lineage spanning necrotrophs, biotrophs, endophytes, host generalists and specialists. *Plos one*, **7**(1): 1-14.
- Arnold, A. E. 2005. Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. Pp. 49-68. En: Deshmukh, S. K. y M. K. Rai (eds.). *Biodiversity of fungi: their role in human life*. Science Publisher. EE. UU.
- Arnold, A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, **21**: 51-66.
- Arnold, A. E., Z. Maynard y G. S. Gilbert. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous Neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycol. Res.*, **105**(12): 1502-1507.
- Arnold, A. E., L. C. Mejía, D. Kylló, E. I. Rojas, Z. Maynard, N. Robbins y E. A. Herre. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, **100**(26): 15649-15654.
- Ascencio-Álvarez A., A. López-Benítez, F. Borrego-Escalante, S. A. Rodríguez-Herrera, A. Flores-Olivas, F. Jiménez-Díaz y A. J. Gámez-Vázquez. 2008. Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **26**: 114-120.
- Azevedo, J. L. y W. L. Araújo. 2007. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. Pp. 189-207. En: Ganguli, B. N. y S. K. Deshmukh (eds.). *Fungi: Multifaceted Microbes*. CRC Press. EE. UU.
- Bajpai V. K. y S. C. Kang. 2012. *In vitro* and *in vivo* inhibition of plant pathogenic fungi by essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *J Agr Sci Tech*, **14**: 845-856.
- Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1987. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Macmillan Publishing Company. EE. UU. 228 pp.
- Booth, E., G. Strobel, B. Knighton, J. Sears, B. Geary y R. Avci. 2011. A rapid column technique for trapping and collecting of volatile fungal hydrocarbons and hydrocarbon derivatives. *Biotechnology Letters*, **33**: 1963-1972.

- Bourassa, S., J. Brodeur y Y. Carrière. 2007. Endophyte-grass complexes and the relationship between feeding preference and performance in a grass herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **124**(2): 221-228.
- Butt, T. M., C. Jackson y N. Magan. 2001. Introduction - Fungal biological control agents: progress, problems and potential. Pp. 1-9. En: Butt, T. M., C. Jackson y N. Magan (eds.). *Fungi as biocontrol agents*. CAB International. Inglaterra.
- Campos, V. P., R. S. Canuto de Pinho y E. S. Freire. 2010. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. *Cienc agrotec*, **34**: 525-535.
- Carroll, G. C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, **69**: 2-9.
- Dai, J. Q., K. Krohn, U. Flörke, S. Draeger, B. Schulz, A. Kiss-Szikszai, S. Antus, T. Kurtan y T. van Ree. 2006. Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. *European Journal of Organic Chemistry*, **15**: 3498-3506.
- Deng, L., Y. Zhou y K. Zeng. 2015. Pre-harvest spray of oligochitosan induced the resistance of harvested navel oranges to anthracnose during ambient temperature storage. *Crop Prot*, **70**: 70-76.
- Dimetry, N. Z. 2014. Different plant families as bioresource for pesticides. Pp. 1-20. En: Singh, D. (ed.). *Advances in plant biopesticides*. Springer India. India.
- Ding, T., T. Jiang, J. Zhou, L. Xu y Z. M. Gao. 2010. Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). *Genet Mol Res*, **9**: 2104-2112.
- Dreyfuss, M. M. y I. H. Chapela. 1994. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. *Biotechnology*, **26**(5): 49-80.
- Duan, Y., C. Ge, S. Liu, C. Chen y M. Zhou. 2013. Effect of phenylpyrrole fungicide fludioxonil on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pestic Biochem Phys*, **106**: 61-67.
- Edwards, M. G. y A. M. R. Gatehouse. 2007. Biotechnology in crop protection: towards sustainable insect control. Pp. 1-23. En: Vurro, M. y J. Gressel (eds.). *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management*. Springer. Holanda.

- Ezra, D. y G. Strobel. 2003. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. *Plant Science*, **165**: 1229-1238.
- Ezra, D., W. M. Hess y G. A. Strobel. 2004. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*, **150**: 4023-4031.
- FAO. 2003. World agriculture: towards 2015/2030 an FAO perspective. Revisado el 17 de mayo, 2017, de <http://www.fao.org/3/a-y4252e.pdf>
- Fernández-Saldaña, C. M., D. I. Munévar, A. Ortiz, E. E. Moreno y A. N. Aragón. 2007. Una visita a la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (Morelos, México). *Revista estudios sociales*, Universidad de Guadalajara, México. 189-219.
- Flores-Reséndiz, M. 2014. Hongos endófitos de *Gliricidia sepium* con potencial antagónico. Tesis de Licenciatura. UNAM. Ciudad de México.
- Fravel, D., C. Olivain y C. Alabouvette. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol*, **157**: 493-502.
- Gams, W., P. Diederich y K. Poldmaa. 2004. Fungicolous fungi. Pp. 343-392. En: Mueller, G. M., G. F. Bills y M. S. Foster (eds.). *Biodiversity of fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier. EE. UU.
- Gao, F. K., C. C. Dai y X. Z. Liu. 2010. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **4**(13): 1346-1351.
- Gao, X. X., H. Zhou, D. Y. Xu, C. H. Yu, Y. Q. Chen y L. H. Qu. 2005. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiology Letters*, **249**: 255-266.
- González, I., Y. Arias y B. Peteira. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* – tomate. *Rev Protección Veg*, **27**: 1-7.
- Gordon T. R. y R. D. Martyn. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu Rev Phytopathol*, **35**: 111-128.
- Gunatilaka, L. A. 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J Nat Prod.*, **69**: 509-526.
- Hensens, O.D., J.G. Ondeyka, A.W. Dombrowski, D.A. Ostlind y D.L. Zink. 1999. Isolation and structure of nodulisporic acid A1 and A2, novel insecticides from *Nodulisporium* sp. *Tetrahedron Letters*, **40**: 5455-5458.

- Herre, E. A., L. C. Mejía, D. A. Kylo, E. Rojas, Z. Maynard, A. Butler y S. A. Van Bael. 2007. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, **88**(3): 550-558.
- Holighaus, G. y M. Rohlf. 2016. Fungal allelochemicals in insect pest management. *Applied Microbiology Biotechnology*, 100: 5681-5689.
- Huang, R., G. Q. Li, J. Zhang, L. Yang, H. J. Che, D. H. Jiang, y H. C. Huang. 2011. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Disease Control and Pest Management*, **101**(7): 859-869.
- Hung, R., S. Lee y J. W. Bennett. 2015. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Appl Microbiol Biotechnol*, **99**: 3395-3405.
- Istifadah, N. y P. A. McGee. 2006. Endophytic *Chaetomium globosum* reduces development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australas Plant Path*, **35**(4): 411-418.
- Kogel, K. H., P. Franken y R. Hüchelhoven. 2006. Endophyte or parasite-what decides? *Curr Opin Plant Biol*, **9**(4): 358-363.
- Leslie, J. F. y B. A. Summerell. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. EE. UU. 388 pp.
- Li, Q., P. Ning, L. Zheng, J. Huang, G. Li y T. Hsiang. 2012. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biol Control*, **61**:113-120.
- Macías-Rubalcava, M. L., B. E. Hernández-Bautista, F. Oropeza, G. Duarte, M. C. González, A. E. Glenn, R. T. Hanlin y A. L. Anaya. 2010. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *J Chem Ecol*, **36**: 1122-1131.
- Medina-Romero, Y. M., G. Roque-Flores y M. L. Macías-Rubalcava. 2017. Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**: 8209-8222.

- Meléndez-González, C., M. J. Muriá-Gonzalez, A. L. Anaya, B. E. Hernández-Bautista, S. Hernández-Ortega, M. C. González, A. E. Glenn, R. T. Hanlin y M. L. Macías-Rubalcava. 2015. Acremoxanthone E, a novel member of heterodimeric polyketides with a bicyclo [3.2.2] nonene ring, produced by *Acremonium camptosporum* W. Gams (Clavicipitaceae) endophytic fungus. *Chemistry & Biodiversity*, **12**: 133-147.
- Mercier, J. y J. I. Jiménez. 2004. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biology and Technology*, **31**: 1–8.
- Mercier, J. y D. C. Manker. 2005. Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodor albus*. *Crop Prot*, **24**: 355-362.
- Mercier, J. y J. L. Smilanick. 2005. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *Biol Control*, **32**: 401-407.
- Mittermeier, R. A., C. G. Mittermeier, N. Myers y P. Robles-Gil. 1999. *Hotspots: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. CEMEX. S.A. de C.V. Ed. Ilustrada. España. 430 pp.
- Mo, E. K. y C. K. Sung. 2007. Phenylethyl alcohol (PEA) application slows fungal growth and maintains aroma in strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, **45**: 234-239.
- Monnet, F., N. Vaillant, A. Hitmi, A. Coudret y H. Sallanon. 2001. Endophytic *Neotyphodium lolii* induced tolerance to Zn stress in *Lolium perenne*. *Physiologia Plantarum*, **113**: 557-563.
- Narayanasamy, P. 2013. Mechanisms of action of fungal biological control agents. Pp. 99-200. En: Narayanasamy, P. (ed.). *Biological management of diseases of crops. Volume 1: characteristics of biological control agents*. Dordrecht Springer. India.
- Oudum, E. P. y G. W. Barrett. 2005. *Fundamentals of Ecology*. Thomson Brooks Cole. EE. UU. 598 pp.
- Park, M. S., J. Ahn, G. J. Choi, Y. H. Choi, K. S. Jang y J. C. Kim. 2010. Potential of the volatile – producing fungus *Nodulisporium* sp. CF016 for the control of postharvest diseases of apple. *The Plant Pathology Journal*, **26**: 253-259.
- Paz, Z., S. Burdman, U. Gerson y A. Szejnberg. 2007. Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. *Journal of Applied Microbiology*, **103**(6): 2570-2579.

- Peng, L., S. Yang, Y. J. Cheng, F. Chen, S. Pan y G. Fan. 2012. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Sci Biotechnol*, **21**: 1533-1539.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. Pp. 179-197. En: Andrews, N. J. y S. S. Hirano (eds.). *Microbial Ecology of Leaves*. Springer. EE. UU.
- Pianka, E. R. 2000. *Evolutionary Ecology*. Addison Wesley Longman. EE. UU. 512 pp.
- Pimenta, R. S., J. F. M. Silva, J. S. Buyer y W. J. Janisiewicz. 2012. Endophytic fungi from plums (*Prunus domestica*) and their antifungal activity against *Monilinia fructicola*. *J Food Protect*, **75**:1883-1889.
- Prompttha, I., S. Lumyong, V. Dhanasekaran, E. Hüge, C. Mackenzie, K. Hyde y R. Jeewon. 2007. Phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microb Ecol*, **53**(4): 579-590.
- Ramin, A. A., P. G. Braun, R. K. Prange y J. M. DeLong. 2005. *In vitro* effects of *Muscodor albus* and three volatile components on growth of selected postharvest microorganisms. *HortScience*, **40**:2109-2114.
- Raza, W., J. Wang, Y. Wu, N. Ling, Z. Wei, Q. Huang y Q. Shen. 2016. Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Applied Microbiology Biotechnology*, **100**: 7639-7650.
- Ricklefs, R. E. 1996. *Ecology*. W. H. Freeman and Company. EE. UU. 896 pp.
- Roque-Flores, G. 2017. Efecto fitotóxico, antifúngico y antioomiceto de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles del aislamiento endofítico Smeg4 de *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae). Tesis de Licenciatura. UNAM. Ciudad de México.
- Rosa, L. H., M. L. A. Vieira, B. B. Cota, S. Johann, T. M. A. Alves, C. L. Zani y C. A. Rosa. 2011. Endophytic fungi of tropical forests: a promising source of bioactive prototype molecules for the treatment of neglected diseases. Pp. 469-483. En: Rundfeldt, C. (ed.). *Drug Development – A Case Study Based Insight into Modern Strategies*. InTech. EE. UU.
- Saikkonen, K. 2007. Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews*, **21**: 67-74.

- Sánchez-Fernández, R. E., B. L. Sánchez-Ortíz, Y. K. M. Sandoval-Espinosa, Á. Ulloa-Benítez, Armendáriz-Guillén, B., M. C. García-Méndez y M. L. Macías-Rubalcava. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP*, **16**(2): 132-146.
- Sánchez-Fernández, R. E. 2016. Actividad antagonista, antifúngica y fitotóxica de hongos endófitos de *Gliricidia sepium* (Fabaceae): Identificación de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. Tesis de Doctorado. UNAM. Ciudad de México.
- Sánchez-Fernández, R. E., D. Díaz, G. Duarte, P. Lappe-Oliveras, S. Sánchez, y M. L. Macías-Rubalcava. 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.
- Sánchez-Ortíz, B. L., R. E. Sánchez-Fernández, G. Duarte, P. Lappe-Oliveras y M. L. Macías-Rubalcava. 2016. Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *J Appl Microbiol*, **120**:1313-1325
- Sánchez-Ortíz, B. L. 2017. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae) útiles en agricultura. Tesis de Doctorado. UNAM. Ciudad de México.
- Schalchli, H., G. R. Tortella, O. Rubilar, L. Parra, E. Hormazabal y A. Quiroz. 2016. Fungal volatiles: an environmentally friendly tool to control pathogenic microorganisms in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, **36**: 144-152.
- Schotsmans, W. C., G. Braun, J. M. DeLong y R. K. Prange. 2008. Temperature and controlled atmosphere effects on efficacy of *Muscodor albus* as a biofumigant. *Biol Control*, **44**: 101-110.
- Schulz, B. y C. Boyle. 2005. The endophytic continuum. *Mycol Res*, **109**(6): 661-686.
- Schulz, B., A. K., Römmert, U. Dammann, H. J. Aust y D. Strack. 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycol Res*, **103**(10): 1275-1283.
- SEMARNAT. 2005. Revisado el 30 de Marzo, 2015, de http://www.inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=551.


- Singh, H., G. Al-samarai y M. Syarhabil. 2012. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of citrus. *International Journal of Scientific and Research Publications*, **2**: 2250-3153.
- Stinson, A. M., N. K. Zidack, G. A. Strobel y B. J. Jacobsen. 2003. Effect of mycofumigation with *Muscodor albus* and *Muscodor roseus* on seedling diseases of sugar beet and *Verticillium* wilt of eggplant. *Plant Disease*, **87**: 1349-1354.
- Strobel, G. A. 2006. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, **9**: 240-244.
- Strobel, G. A. 2011. *Muscodor* species- endophytes with biological promise. *Phytochemistry Reviews*, **10**: 165-172.
- Strobel, G. A. 2015. Bioprospecting – fuels from fungi. *Biotechnology Letters*, **37**: 973-982.
- Srobel, G. y B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**(4): 491-502.
- Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo y J. Harper. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod*, **67**: 257-268.
- Strobel, G.A., E. Dirkse, J. Sears y C. Markworth. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, **147**: 2943–2950.
- Strobel, G. A., K. Kluck, W. M. Hess, J. Sears, D. Ezra y P. N. Vargas. 2007. *Muscodor albus* E-6, an endophyte of *Guazuma ulmifolia* making volatile antibiotics: isolation, characterization and experimental establishment in the host plant. *Microbiology*, **153**: 2613–2620.
- Strobel, G., S. K. Singh, S. Riyaz-Ul-Hassan, A. M. Mitchell, B. Geary y J. Sears. 2011. An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. *FEMS Microbiol Lett*, **320**: 87-94.
- Suwanarach, N., J. Kumla, B. Bussaban, W. Nuangmek, K. Matsui y S. Lumyong. 2013. Biofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit. *Crop protection*, **45**: 63-70.
- Suwanarach, N., B. Bussaban, W. Nuangmek, W. Pithakpol, B. Jirawattanakul, K. Matsui y S. Lumyong. 2016. Evaluation of *Muscodor suthepensis* strain CMU-Cib462 as a postharvest biofumigant for tangerine fruit rot caused by *Penicillium digitatum*. *J Sci Food Agr*, **96**: 339-345.

- Tan, R. X. y W. X. Zou. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*, **18**(4): 448-459.
- Tanwar, R. S., P. Dureja, H. S. Rathore. 2012. Biopesticides. Pp. 587-603. En: Rathore, H. S. y L. M. Nollet (eds.). *Pesticides: Evaluation of environmental pollution*. CRC Press. EE. UU.
- Thomscheck, A. R., G. A. Strobel, E. Booth, B. Geary, D. Spakowicz, B. Knighton, C. Floerchinger, J. Sears, O. Liarzi y D. Ezra. 2010. *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1, 8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. *Microbiology Ecology*, **60**: 903-914.
- Tian, P., Z. Nan, C. Li y G. Spangenberg. 2008. Effect of the endophyte *Neotyphodium lolii* on susceptibility and host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens. *Eur J Plant Pathol*, **122**:593-602.
- Ulloa-Benítez, Á., Y. M. Medina-Romero, R. E. Sánchez-Fernández, P. Lappe-Oliveras, G. Roque-Flores, G. Duarte Lisci, T. Herrera Suárez y M. L. Macías-Rubalcava. 2016. Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile and semi-volatile organic compounds from the endophyte *Hypoxylon anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia* (Burseraceae). *Journal of Applied Microbiology*, **121**: 380-400.
- Vespermann, A., M. Kai y B. Piechulla. 2007. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology*, **17**: 5639-5641.
- Waller, F., B. Achatz, H. Baltruschat, J. Fodor, K. Becker, M. Fischer, T. Heier, R. Hückelhoven, C. Neumann, D. Wettstein, P. Franken y K. Kogel. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS*, **102**(38): 13386-13391.
- Wan, M., G. Li, J. Zhang, D. Jiang, H.C. Huang. 2008. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biol Control*, **46**: 552-559.
- Wang, Y., Li, Y., Yang, J., Ruan, J., & Sun, C. 2016. Microbial volatile organic compounds and their application in microorganism identification in foodstuff. *Trends in Analytical Chemistry*, **78**: 1-16.
- West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press. EE. UU. 794 pp.

- Wu, Z. C., D. L. Li, Y. C. Chen y W. M. Zhang. 2010. A new isofuranonaphthalenone and benzopyrans from endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Aquilaria sinensis*. *Helv Chim Acta*, **93**: 920-924.
- Yang, S., L. Liu, D. Li, H. Xia, X. Su, L. Peng, S. Pan. 2016. Use of active extracts of poplar buds against *Penicillium italicum* and possible modes of action. *Food Chemistry*, **196**: 610-618.
- Yang, S., L. Peng, Y. Cheng, F. Chen y S. Pan. 2010. Control of citrus green and blue molds by Chinese propolis. *Food Science and Biotechnology*, **19**: 1303-1308.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall. EE. UU. 947 pp.
- Zaurov, D., S. Bonos, J. Murphy, M. Richardson y F. Belanger. 2001. Endophyte infection can contribute to aluminum tolerance in fine fescues. *Crop Science*, **41**:1981–1984.
- Zhang, Y. P. y Z. B. Nan. 2007. Growth and anti-oxidative systems changes in *Elymus dahuricus* is affected by *Neotyphodium* endophyte under contrasting water availability. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **193**(6): 377-386.

X. Anexo

Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits

Yoli Mariana Medina-Romero¹ · Gonzalo Roque-Flores¹ ·
Martha Lydia Macías-Rubalcava¹ 

Received: 19 April 2017 / Revised: 31 July 2017 / Accepted: 11 September 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract To assess their potential as biopesticides, the effect on the growth of phytopathogen *Fusarium oxysporum* of six volatile organic compounds from endophytic fungi was studied in vivo and in vitro; compounds were used both as a mixture and individually. In vivo studies were performed inoculating the pathogen into cherry tomatoes, while the in vitro antifungal effect was studied using agar dilution and gas phase methods. Also, the morphology of the hyphae exposed to these compounds was analyzed. Moreover, the possible mechanism of action of these compounds was determined by studying the respiration and cell membrane permeability. Results show that the compounds have a significant concentration-dependent antifungal effect individually and act in a synergic manner. Additionally, changes in cell membrane permeability, damage to the hyphal morphology, and an inhibitory effect on the respiration were observed. The mixture of the six compounds may be used for postharvest control of *F. oxysporum* in tomatoes.

Keywords Volatile organic compounds · Endophytic fungi · Antifungal activity · *Fusarium oxysporum* · Biopesticides · Postharvest control

Taken in part from the PhD thesis of Y. M. Medina-Romero

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8542-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Martha Lydia Macías-Rubalcava
mmacias@iqiunam.mx; mamacias@gmail.com

¹ Instituto de Química, Departamento de Productos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, Ciudad de México 04510, México

Introduction

Due to the great number of products obtained from the fruit and to the vast surface dedicated to its culture, tomato, *Solanum lycopersicum* (Family: *Solanaceae*), is considered the second most important crop worldwide and in Mexico (Ascencio-Álvarez et al. 2008; González et al. 2012). The phytopathogen *Fusarium oxysporum* is responsible for nearly 60% of production losses; this fungus also affects considerably the postharvest fruit quality (Ascencio-Álvarez et al. 2008; Leslie and Summerell 2006).

Fusarium genus is of great importance in agriculture: most crops worldwide present at least one disease produced by one *Fusarium* species. Severity of such diseases varies depending on the host plant, and the target organ, whether it attacks the leaves, stem, roots, seeds or fruits (Leslie and Summerell 2006). *Fusarium* species are widely spread and genetically diverse; this makes finding the best conditions to control these infections a challenging task and treatment long and difficult (González et al. 2012; Leslie and Summerell 2006; Mercier and Jiménez 2004).

Treatment of *Fusarium* caused diseases in economically important crops, both in culture and postharvest, includes the use of synthetic agrochemicals; also, resistant crops have been developed (González et al. 2012; Gordon and Martyn 1997; Leslie and Summerell 2006). However, when using agrochemicals, the proper time and number of applications, the concentration and the active ingredient are often disregarded, resulting in increased production costs (González et al. 2012). On the other hand, finding resistant crops requires a costly research, development and production process (Fravel et al. 2003; González et al. 2012; Leslie and Summerell 2006).

Also, it is well known that intensive use of synthetic agrochemicals generates environmental pollution issues, adverse

human health effects and a remarkable increase on agrochemical resistance of pathogens (Deng et al. 2015; González et al. 2012; Li et al. 2012). There is a dire need to develop different strategies for the efficient control of diseases on edible and ornamental plants (Deng et al. 2015; Mercier and Jiménez 2004). A viable alternative to protect economically important crops from fungal diseases is the use of biopesticides (Dimetry 2014; Mercier and Jiménez 2004; Tanwar et al. 2012). Biopesticides are bioactive principles, usually secondary metabolites from plants, virus, bacteria and fungi; that can be used as plague-control agents (Dimetry 2014; Tanwar et al. 2012).

One of the main advantages of biopesticides is that they can be used in closed areas and kill or inhibit the pathogenic microorganisms not requiring direct contact with the crops (Dimetry 2014; Mercier and Jiménez 2004; Schotsmans et al. 2008; Tanwar et al. 2012). Additionally, they can be easily employed as postharvest treatments as they need little manipulation (Mercier and Jiménez 2004). Biopesticides are relatively safe and environmentally friendly (Dimetry 2014; Mercier and Jiménez 2004; Mercier and Smilanick 2005; Tanwar et al. 2012). Nonetheless, to date there are very few bioplaguicides available (Dimetry 2014; Mercier and Jiménez 2004; Strobel 2011; Tanwar et al. 2012).

Volatile organic compounds (VOCs) produced by endophytic fungi are a known class of biopesticides; these compounds, particularly as mixtures, possess potent antimicrobial properties (Effinert et al. 2012; Ezra and Strobel 2003; Ezra et al. 2004; Kai et al. 2009; Mercier and Jiménez 2004; Mercier and Manker 2005; Sánchez-Fernández et al. 2016; Ulloa-Benítez et al. 2016; Vespermann et al. 2007; Wenke et al. 2010). Some common VOCs are alcohols, monoterpenes, organic carboxylic acids, esters and ketones (Ezra and Strobel 2003; Ezra et al. 2004; Gao et al. 2005; Lemfack et al. 2014). The VOCs most often reported in living environments had vapor pressures ranging from 3.03 to 7.46 mg/m³ (Korpi et al. 2009), due to these low vapor pressures, VOCs are readily converted to gaseous phase at room temperature enabling their easy application on plants.

To identify the mixtures of VOCs produced by the microorganisms, headspace solid phase microextraction (HSSPME) is used. With this technique, it is possible to obtain small sampling amounts of VOCs that will not affect the release equilibrium (Zhang and Li 2010); therefore, the composition of the VOCs produced by microorganisms can be known but the concentrations released to the environment cannot be accurately determined; HSSPME allows to obtain relative abundances. In addition, the production rates of VOCs depend on various factors such as time, temperature, substrate, interactions with other species, and other environmental variables specific to each microorganism (Hung et al., 2015; Sánchez-Fernández et al. 2016; Sánchez-Ortiz et al. 2016).

It has been reported that some endophytic fungi from the *Hypoxyton* genus produce a great variety of biologically active

VOCs (Dai et al. 2006; Hensens et al. 1999; Sánchez-Fernández et al. 2016; Suwannarach et al. 2013; Ulloa-Benítez et al. 2016; Wu et al. 2010) they constitute therefore a possible source of biopesticides.

The aim of this work is to evaluate the biopesticide potential of six VOCs, three alcohols and three monoterpenes, produced by endophytes from the *Hypoxyton* genus, describing the effects of each compound, the mixture of all the six VOCs, and the mixture of the three alcohols; on the phytopathogen *F. oxysporum*, in both in vitro and in vivo bioassays. For the in vivo assays, the pathogen was inoculated in cherry tomatoes. The in vitro tests consisted of analyzing the radial growth of the fungus using the agar dilution and gas phase methodology. The possible mechanism of action by which they affect the respiration and cell membrane permeability was assessed.

Materials and methods

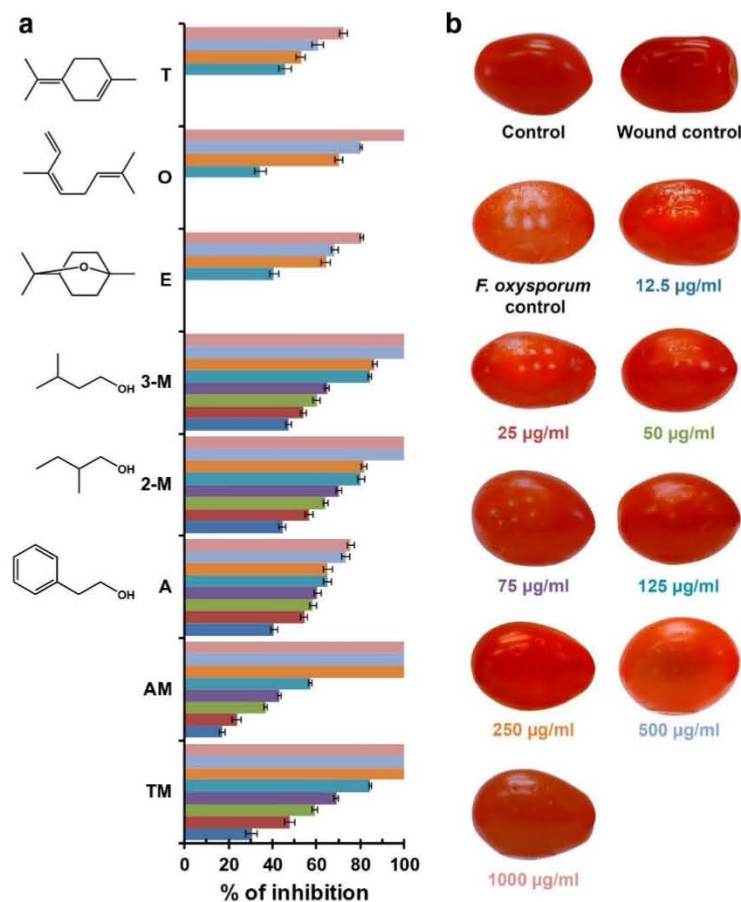
Six VOCs, produced by endophytic fungi *Nodulisporium* sp. strain GS4d2III1 (*Hypoxyton anthochroum*) (Sánchez-Fernández et al. 2016) and *Hypoxyton anthochroum* strain Blaci (Ulloa-Benítez et al. 2016), were selected: phenylethyl alcohol, 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol, and monoterpenes eucalyptol, ocimene and terpinolene (Fig. 1). 2-Methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, eucalyptol, ocimene and terpinolene are biosynthesized by *Nodulisporium* sp. strain GS4d2III1 (*H. anthochroum*) (Sánchez-Fernández et al. 2016), and the phenylethyl alcohol, 2-methyl-1-butanol, eucalyptol and terpinolene by *H. anthochroum* strain Blaci (Ulloa-Benítez et al. 2016). Standards for these compounds were purchased from Sigma-Aldrich (purity ~ 98%), (St. Louis, Missouri, USA).

The phytopathogenic strain of *F. oxysporum* used for the bioassays was deposited in the Fungal Collection of the Herbario Nacional de México (MEXU), UNAM, under acquisition number MEXU 28340; and in the Cepario de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (CFQ) under acquisition number CFQ-H-134. For the working stock, *F. oxysporum* strain was routinely grown on potato-dextrose-agar medium at 25 °C in 12:12 h light-dark photoperiod using a fluorescent light (T12 30 W, Phillips, Chihuahua, Mexico).

In vivo effect of selected VOCs on cherry tomatoes infected with *F. oxysporum*

S. lycopersicum var. *cerasiforme* (cherry tomatoes) were used in order to evaluate the in vivo effect of the VOCs. Tomatoes with no apparent diseases or visible wounds were bought at a local market, average sizes were around 2–3 cm long and 1.0–1.5 cm diameter, weight ranged from 5 to 6 g per tomato.

Fig. 1 In vivo effect of selected VOCs on the growth of *F. oxysporum* colonizing cherry tomatoes (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*). **a** Percent inhibition on *F. oxysporum* growth: six VOCs' mixture (TM), alcohols' mixture (AM), phenylethyl alcohol (A), 2-methyl-1-butanol (2-M), 3-methyl-1-butanol (3-M), eucalyptol (E), ocimene (O) and terpinolene (T); at 12.5 (navy blue); 25 (red); 50 (green); 75 (purple); 125 (light green); 250 (orange); 500 (light blue) and 1000 (pink) $\mu\text{g}/\text{mL}$. All percent values are statistically significant, ANOVA ($P < 0.05$). **b** In vivo antifungal effect of six VOCs' mixture evaluated from 12.5 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$



Tomatoes were surfaced-sterilized with 75% ethanol during 30 s and rinsed three times with sterile distilled water for 60 s then air-dried on a laminar flow hood. Six equidistant, 2 mm deep, wounds were inflicted with a sterile dissection needle and 20 μl of a *F. oxysporum* suspension with 1.7×10^7 conidia was added to each wound. Each tomato, treated or untreated, was placed in 30 mL sterile flasks along with a 0.5-mL glass vial. These vials contained either one of the mixtures or one of the six VOCs at different concentrations (12.5, 25, 50, 75, 125, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The mixtures were prepared with each of the compounds at the same concentration with the previously indicated values, i.e., for the alcohols' mixture at 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each of the three alcohols was added at 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In order to obtain the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}), at least four data points were used for each treatment; due to their varying antifungal potential, the concentrations used are not necessarily the same for the different treatments but are all in the indicated range of 12.5 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Flasks were tightly closed and sealed with Parafilm® to avoid compound loss. Tomatoes with no treatment and with and without wounds were used as negative

controls. Each bioassay was performed twice with four repetitions per treatment under a random design. Flasks were kept at room temperature under a 12/12 h fluorescent light/dark photoperiod. After 8 days, two perpendicular measurements of the diameter of each *F. oxysporum* colony were taken with a Vernier caliper (Digital Electronic Caliper Vernier Gauge Micrometer Tool; ± 0.02 mm, Mitutoyo, Tokyo, Japan) (Suwannarach et al. 2016; Bajpai and Kang 2012; Ding et al. 2010; Tian et al. 2008). Growth inhibition percentage was determined by comparing to the negative control. Photographic records of the growing colonies were kept.

In vitro effect of selected VOCs on the radial growth of *F. oxysporum*

The in vitro effect of the individual VOCs and the two mixtures on the radial growth of *F. oxysporum* was evaluated on Petri dishes using agar dilution and gas phase bioassays (Macías-Rubalcava et al. 2010; Meléndez-González et al. 2015; Sánchez-Fernández et al. 2016; Ulloa-Benítez et al.

2016). Determinations were carried out using four different concentrations (125, 250, 500 and 1000 µg/mL) to obtain the IC₅₀ values. Five cm diameter Petri dishes were used for the agar dilution bioassays; 5 mL of the VOCs and mixtures solutions were added to 20 mL of potato-dextrose-agar medium (PDA, 2%) right before gelification, then kept at ~ 35 °C until solidified. A 5-mm diameter inoculum was placed inside each Petri dish which were then sealed with Parafilm® to avoid compound loss; inocula were obtained from the borders of *F. oxysporum* cultures (PDA, 8 days). PDA 2% and 2.5–30 µg/mL of commercial fungicide Captan 50 (*N*-trichloromethyltio-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide, BRAVOAG, Estado de Mexico, Mexico) were used as negative and positive controls (Sánchez-Fernández et al. 2016; Sánchez-Ortiz et al. 2016; Ulloa-Benítez et al. 2016). Similarly, gas phase bioassays were performed on 10 cm diameter Petri dishes with 30 mL of 1% PDA; right before agar solidification, a 0.5-mL vial was placed near the edge of each dish. Then, a 5-mm diameter inoculum, obtained from the borders of *F. oxysporum* cultures (PDA, 8 days), was placed on the agar surface. Either one of the six VOCs or VOCs' mixtures were added to the vials, the negative control had an empty vial. The dishes were sealed with Parafilm® to avoid compound loss. For both assays, Petri dishes were incubated at room temperature during 48 h under a 12/12 h fluorescent light/dark photoperiod. Two perpendicular measurements of the mycelia diameter of *F. oxysporum* were taken and compared to the diameter of the negative control. Experiments were performed twice under a random design with four repetitions per treatment.

Effect of selected VOCs on *F. oxysporum* respiration

To determine the respiration rate during *F. oxysporum* mycelium growth, the fungus was cultured in 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of potato dextrose broth (CPD) at 28 °C under a 12/12 h fluorescent light/dark photoperiod and agitation at 150 rpm (orbital shaker, New Brunswick Scientific, Excella E25, Enfield, Connecticut, USA). Five 5 mm diameter inocula, obtained from the borders of *F. oxysporum* cultures (PDA, 8 days), were placed in each flask. After 48 h, mycelium was vacuum-filtered and rinsed with 50 mL of double-distilled sterile water. After 20 min of filtration, 40 mg of moist mycelium was weighed on each assay tube and 4 mL of double-distilled sterile water and the individual VOCs or the mixtures were added. Concentrations of the compounds or mixtures ranged from 125 to 1000 µg/mL (125, 250, 500 and 1000 µg/mL), to determine IC₅₀ values. Tubes were sealed with Parafilm® to avoid compound loss. Mycelium suspensions were kept under agitation at 150 rpm in an orbital shaker during 2, 5 and 8 h. After the agitation period, suspensions were transferred to a 10-mL glass cuvette and oxygen

consumption rate was measured at 28 °C during 3 min with a Clark electrode connected to a biological oxygen monitor (YSI 5300A, YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, USA). Bioassays were performed twice under a random design with four repetitions per treatment. 2.5–30 µg/mL of Captan 50 was used as positive control, untreated aqueous suspension of the mycelium was used as the negative control. Respiration rate of *F. oxysporum* was calculated as percentage of oxygen consumed in presence of VOCs considering the negative control as 100% of consumption.

Effect of selected VOCs on *F. oxysporum* cell membrane permeability

Damage rate caused by VOCs and VOCs' mixtures on cell membrane of *F. oxysporum* was evaluated through measurement of electrolyte leak. Mycelium samples were prepared in the same manner than in the oxygen consumption experiments; also, the same VOCs' concentrations were used. Electrical conductivity of samples was measured after 2, 5 and 8 h of treatment with the compounds, using a conductivity meter (Thermo Scientific Orion Star A212, Massachusetts, USA) at 28 °C. Samples were then heated to boiling point during 10 min and final conductivity was determined. The assay was performed twice under a random design with four repetitions per treatment. 2.5–30 µg/mL of Captan 50 and aqueous solution of mycelium with no VOCs were used as positive and negative control. Effect of the VOCs in cell membrane permeability was expressed as relative conductivity and calculated according to the following equation:

$$\text{Relative conductivity} = \frac{C1 - C0}{Ck - C0} \times 100\%.$$

Where *C0* is the electrical conductivity without mycelium, *C1* is the conductivity of the mycelium in presence of VOCs, and *Ck* is the final electrical conductivity of the boiled mycelium (Duan et al. 2013; Peng et al. 2012; Yang et al. 2016).

Effect of selected VOCs on *F. oxysporum* hyphal morphology

Effect of the VOCs or VOCs' mixtures on *F. oxysporum* hyphal morphology was evaluated using fresh microscopic preparations from mycelium suspensions and microcultures, using the dilution and gas phase methodologies. Both microscopic preparations were carried out twice under a random design with four repetitions per treatment. Mycelium samples were prepared in the same manner than in the oxygen consumption and cell membrane damage experiments. Individual VOCs and VOCs' mixtures concentrations were 125, 250, 500 and

1000 µg/mL. After 2, 5 and 8 h of being exposed to the compounds, a small volume was removed from the suspension, it was placed on a microscope slide and a drop of lactophenol blue or Congo red was added and a coverslip was positioned on top. Morphological changes of the hyphae were observed at 40× under an optical microscope (Motic, BA410, Hong Kong, China); they were compared to the hyphae from the suspension with no VOCs.

For the gas phase method, microcultures were prepared as follows: a 10-cm diameter Petri dishes with a triangle-shaped glass, a microscope slide, 5 mL of distilled sterile water and a 0.5 mL glass vial were used; two 1 × 1 cm PDA squares were placed near the edges of the slide and hyphae were puncture-inoculated on each side of the squares and a coverslip was placed on top of each square. Glass vials were positioned on the vertex of the glass triangle; VOCs and VOCs' mixtures were added to the vials at different concentrations (12.5, 25, 50, 75, 125, 250, 500 and 1000 µg/mL). Petri dishes were incubated at room temperature during 48 h under a 12/12 h fluorescent light/dark photoperiod. After incubation, the microscope slide was removed from the dish and a drop of lactophenol blue or Congo red was added. Effects on the hyphal morphology were observed at 40× under the microscope; they were compared to the hyphae growth with no VOCs.

Statistical analysis

Results from the in vivo and in vitro assays were analyzed by ANOVA ($\alpha = 0.05$) test to establish significant differences respect to control samples, and Tukey HSD tests to find significant differences between treatments. GraphPad Prism software (ver. 6) was used for said tests (Sánchez-Fernández et al. 2016; Sánchez-Ortiz et al. 2016; Ulloa-Benítez et al. 2016; Zar 2010). IC₅₀ values were determined through a Probit analysis (Zar 2010), based on the average percentage of inhibition obtained for each VOCs or mixture concentration using the same statistical software. Data are represented as mean ± standard deviation (SD); statistical significance was considered for a *P* value < 0.05.

Results

Recently, we reported the antimicrobial and phytotoxic effect of VOCs' mixtures produced by the endophytic fungi *Nodulisporium* sp. strain GS4d2II1 (*H. anthochroum*) (Sánchez-Fernández et al. 2016) and *H. anthochroum* strain Blaci (Ulloa-Benítez et al. 2016). In this work, six of the bioactive VOCs synthesized by these fungi were selected to evaluate them as biopesticides: phenylethyl alcohol, 2-methyl-1-butanol, and 3-methyl-1-butanol; and monoterpenes eucalyptol, ocimene and terpinolene (Fig. 1). 2-Methyl-1-

butanol, eucalyptol and terpinolene were found in *Nodulisporium* sp. strain GS4d2II1 (*H. anthochroum*) (Sánchez-Fernández et al. 2016), and in *H. anthochroum* strain Blaci (Ulloa-Benítez et al. 2016), while 3-methyl-1-butanol and ocimene were found only in *Nodulisporium* sp. strain GS4d2II1 (*H. anthochroum*) (Sánchez-Fernández et al. 2016), and phenylethyl alcohol was found in *H. anthochroum* strain Blaci (Ulloa-Benítez et al. 2016). The VOCs investigated belong to two of the most abundant chemical groups found in VOCs' mixtures produced by microorganisms, including endophytic fungi of the genus *Hypoxyton*: the alcohols and the monoterpenes (Booth et al. 2011; Strobel 2015; Suwannarach et al. 2013).

Although the exact concentrations of selected VOCs released by the microorganism to the environment are not known, the abundance determined by HSSPME is in accordance with their area percentage; therefore, that the concentrations used in this investigation are most likely in the range of the microorganisms' emission into their environment (Sánchez-Fernández et al. 2016; Ulloa-Benítez et al. 2016).

Their effect was evaluated in vivo against *F. oxysporum* growing on cherry tomatoes, and in vitro by analyzing the radial growth of the phytopathogen. Effects on the respiration and cell membrane permeability were carried out in order to elucidate the possible physiological mechanism of action. VOCs were evaluated individually and in two different mixtures: the six VOCs' and the alcohols' mixtures.

In vivo effect of selected VOCs on cherry tomatoes infected with *F. oxysporum*

Figure 1a shows the percent inhibition of selected VOCs on cherry tomatoes infected with the phytopathogen *F. oxysporum*. Concentration of the VOCs ranged from 12.5 to 1000 µg/mL; all treatments resulted in significant inhibition of *F. oxysporum* growth in a concentration-dependent manner. For concentrations greater than 125 µg/mL, the inhibitory effect was over 40% for all the VOCs except ocimene. This monoterpene was, however, the only terpene with a 100% growth inhibition at the largest evaluated concentration (1000 µg/mL). The six VOCs' mixture, the alcohols' mixture and the three individual alcohols showed the greatest antifungal effect with significant percent inhibition of 30.5, 17.1, 40.7, 44.5 and 47.5% for the minimal concentration, 12.5 µg/mL (Table S1 in the supplementary material).

Table 1 presents the antifungal effect of the selected VOCs evaluated both individually and as mixtures, expressed as IC₅₀ (µg/mL). The IC₅₀ values obtained confirm that the six VOCs' mixture, the alcohols' mixture, phenylethyl alcohol, 2-methyl-1-butanol, and 3-methyl-1-butanol possess the largest effect on *F. oxysporum* growth with values of 25.8, 88.3, 22.3, 18.6 and 19.7 µg/mL respectively. Despite the fact that

Table 1 Inhibitory effect (IC₅₀, µg/mL) of selected VOCs from endophytic fungi on phytopathogen *F. oxysporum*

Compound	IC ₅₀ µg/mL					
	Radial growth			Respiration		
	In vivo		In vitro	Hours		
	On cherry tomatoes	Agar dilution method		Gas phase method	2	5
Six VOCs' mixture	25.8	355.9	516.4	315.1	248.1	183.9
Alcohols' mixture	88.3	567.6	634.6	> 1000	418.4	244.4
Phenylethyl alcohol	22.3	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
2-Methyl-1-butanol	18.6	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	480.5
3-Methyl-1-butanol	19.7	> 1000	> 1000	822.5	357.8	247.9
Eucalyptol	167.7	> 1000	> 1000	659.7	591.1	395.9
Ocimene	172.1	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	573.3
Terpinolene	189.3	> 1000	> 1000	420.6	299.1	200.7
Captan 50	–	5.1	–	8.4	6.0	4.0

the six VOCs' mixture has a higher IC₅₀ value than the individual alcohols, both mixtures inhibit 100% of growth from 250 µg/mL onward while 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol have a 100% inhibition starting from 500 µg/mL. The inhibitory effect of the whole concentration range of the six VOCs' mixture (12.5–1000 µg/mL) is shown in Fig. 1b.

In vitro effect of selected VOCs on the radial growth of *F. oxysporum*

In vitro effect on the radial growth of *F. oxysporum* was evaluated for the mixtures and the individual VOCs using the agar dilution and gas phase bioassays.

Agar dilution method

Figure 2a displays the percent inhibition of four different concentrations of the two mixtures and the individual monoterpenes and alcohols, on the radial growth of *F. oxysporum* using the agar dilution bioassay. All treatments show a concentration-dependent effect; however, percent inhibition is significant only at 500 and 1000 µg/mL for the mixtures, and at 1000 µg/mL for the individual VOCs excluding eucalyptol, which showed no significant effect. The six VOCs' and the alcohols' mixtures present the greatest antifungal effect, with 100% inhibition at 1000 µg/mL and IC₅₀ values of 355.9 and 567.6 µg/mL. Phenylethyl alcohol is the most active individual VOC: 47.7% at 1000 µg/mL; the rest of the VOCs show percent inhibition of over 20% at the same concentration.

Gas phase method

Figure 2b shows the inhibitory effect on *F. oxysporum* growth of the individual VOCs and the mixtures at four different concentrations employing the gas method phase. Similarly to the effects observed in the agar bioassay, all treatments inhibit growth on a concentration-dependent manner yet percent inhibition is significant only at certain concentrations: for the mixtures, only at concentrations larger than 250 µg/mL, and for 2-methyl-1-butanol (29.0%), 3-methyl-1-butanol (26.9%) and eucalyptol (30.8%), only at 1000 µg/mL, which was the maximum concentration tested. Phenylethyl alcohol, ocimene and terpinolene showed no significant effect at any of the concentrations. The six VOCs' and the alcohols' mixtures present the highest antifungal effect, with IC₅₀ values of 516.4 and 634.6 µg/mL.

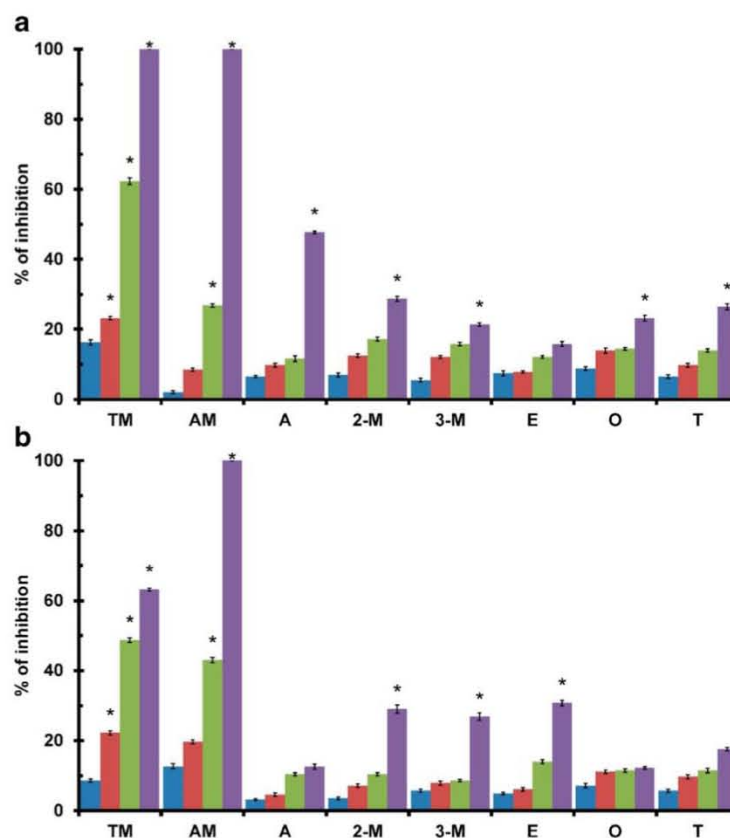
It is worth noting that the IC₅₀ values from the infected cherry tomatoes assay are lower than the values from the two in vitro bioassays, both for the mixtures and for the individual VOCs (Table 1).

Once the in vitro and in vivo bioassays demonstrated that the six individual VOCs and the mixtures inhibited the growth of *F. oxysporum*, the phytopathogen respiration, cell membrane permeability and hyphal morphology were evaluated in order to elucidate the physiological mechanism of action of the tested compounds.

Effect of VOCs on *F. oxysporum* respiration

First, in order to correlate the inhibition caused by VOCs on the radial growth of the phytopathogen with modifications on

Fig. 2 In vitro effect of selected VOCs on the growth of *F. oxysporum*. **a** Percent inhibition using the agar dilution bioassay. **b** Percent inhibition using the gas phase methodology. Six VOCs' mixture (TM), alcohols' mixture (AM), phenylethyl alcohol (A), 2-methyl-1-butanol (2-M), 3-methyl-1-butanol (3-M), eucalyptol (E), ocimene (O) and terpinolene (T); at 125 (blue), 250 (red), 500 (green) and 1000 (purple) $\mu\text{g}/\text{mL}$. *Statistically significant percent values, ANOVA ($P < 0.05$)



the respiration of the microorganism, the effect of the individual VOCs and the mixtures on the respiration rate of the *F. oxysporum* during the mycelium growth was evaluated. Figure 3 presents the inhibitory effect of the VOCs on *F. oxysporum* respiration. Mycelium from the fungus was incubated in presence of four different concentrations of the individual VOCs and the mixtures the oxygen consumption rate was measured at 2, 5 and 8 h of incubation and was found inhibited in a concentration-dependent manner. All treatments showed statistically significant results. Inhibition increased with time. The greatest percent inhibition was observed at 8 h of incubation. At 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which was the maximum concentration tested, there were significant differences between incubation times for all the treatments except terpinolene and 3-methyl-1-butanol.

VOCs' mixture had the greatest oxygen consumption inhibition, 97.1% at 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 8 h incubation ($\text{IC}_{50} = 183.9 \mu\text{g}/\text{mL}$). At that same concentration, IC_{50} values were 315.1 and 248.1 for the VOCs' mixture at 2 and 5 h incubation periods. For the alcohols' mixture at 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inhibition was of 68.0% with an IC_{50} value of 244.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Concerning the individual VOCs, monoterpenes terpinolene and eucalyptol induced the greater inhibition (> 80%) with

IC_{50} values of 200.7 and 395.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Ocimene percent inhibition was of 65.1% and its IC_{50} values of 573.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The alcohols 3-methyl-1-butanol and 2-methyl-1-butanol inhibited oxygen consumption by 70.6 and 61.2% with IC_{50} values of 247.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 480.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Phenylethyl alcohol had an $\text{IC}_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$, inhibiting respiration by 42.1% at the largest tested concentration (Table S2 in the supplementary material).

Table 1 summarizes the inhibitory effect on *F. oxysporum* respiration of VOCs evaluated at 125, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 2, 5 and 8 h of incubation, expressed as IC_{50} values ($\mu\text{g}/\text{mL}$). From these results, the synergic effect of the VOCs becomes evident: the six VOCs' mixture inhibits more effectively than the individual alcohols and monoterpenes, with IC_{50} values of less than 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after only 2 h of incubation.

Effect of selected VOCs on *F. oxysporum* cell membrane permeability

To assess if the effect of the selected VOCs on *F. oxysporum* growth and respiration leads to cell membrane disruption, cell

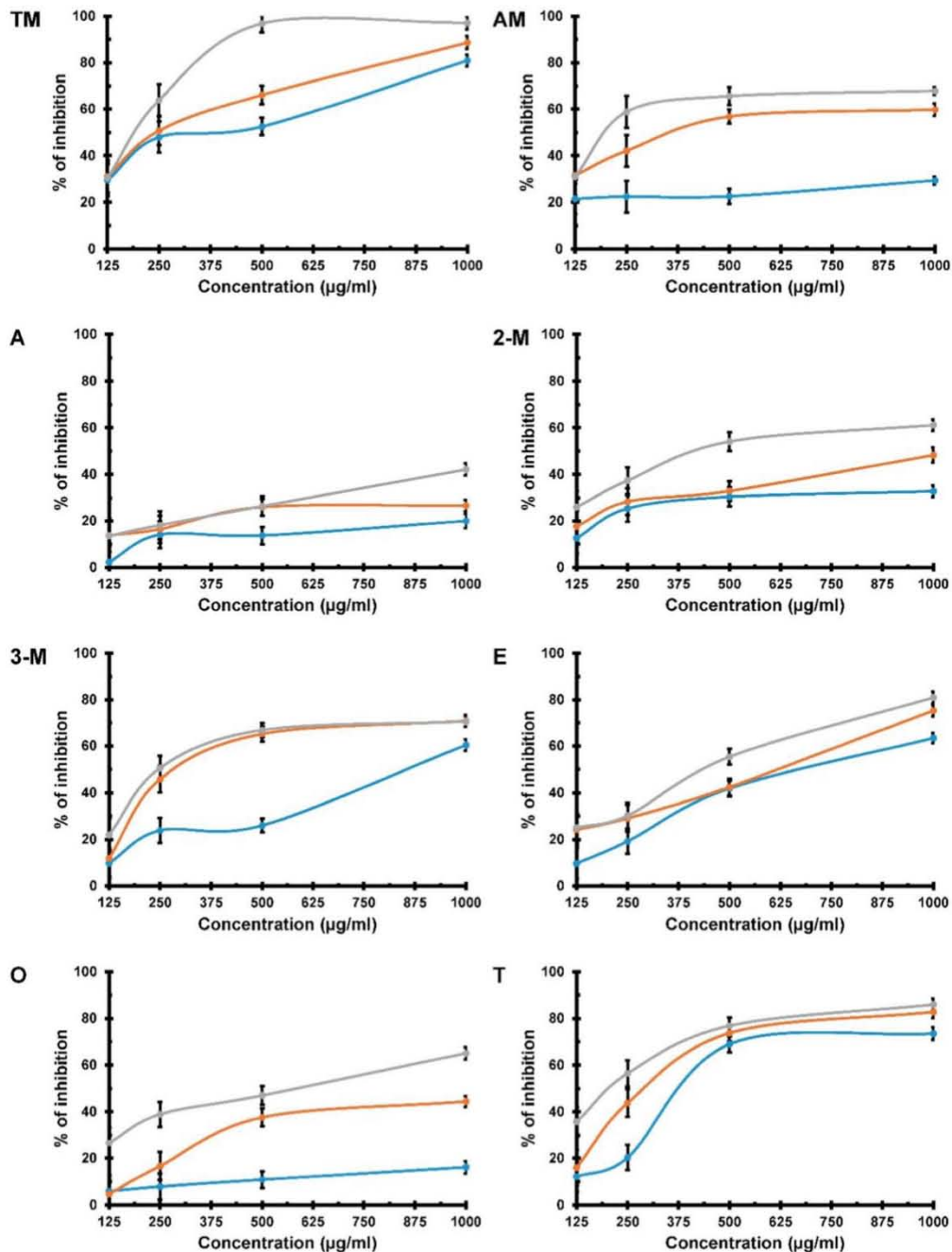


Fig. 3 Effect of selected VOCs on the respiration of *F. oxysporum* evaluated at 2 (blue), 5 (orange), and 8 (gray) hours of treatment. Six VOCs' mixture (TM), alcohols' mixture (AM), phenylethyl alcohol (A), 2-methyl-1-butanol (2-M), 3-methyl-1-butanol (3-M), eucalyptol (E), ocimene (O), and terpinolene (T), at 125, 250, 500, and 1000 µg/mL.

In general, at 2 h of treatment for concentrations ranging from 250 to 1000 µg/mL, all percent values were statistically significant, ANOVA ($P < 0.05$). For 5 and 8 h of treatment, results were statistically significant in the 125–1000 µg/mL range

membrane permeability was analyzed in presence of the VOCs. Figure 4 shows the effect of treatments on the relative

conductivity of *F. oxysporum* membrane; conductivity increases as concentration and incubation time do. However,

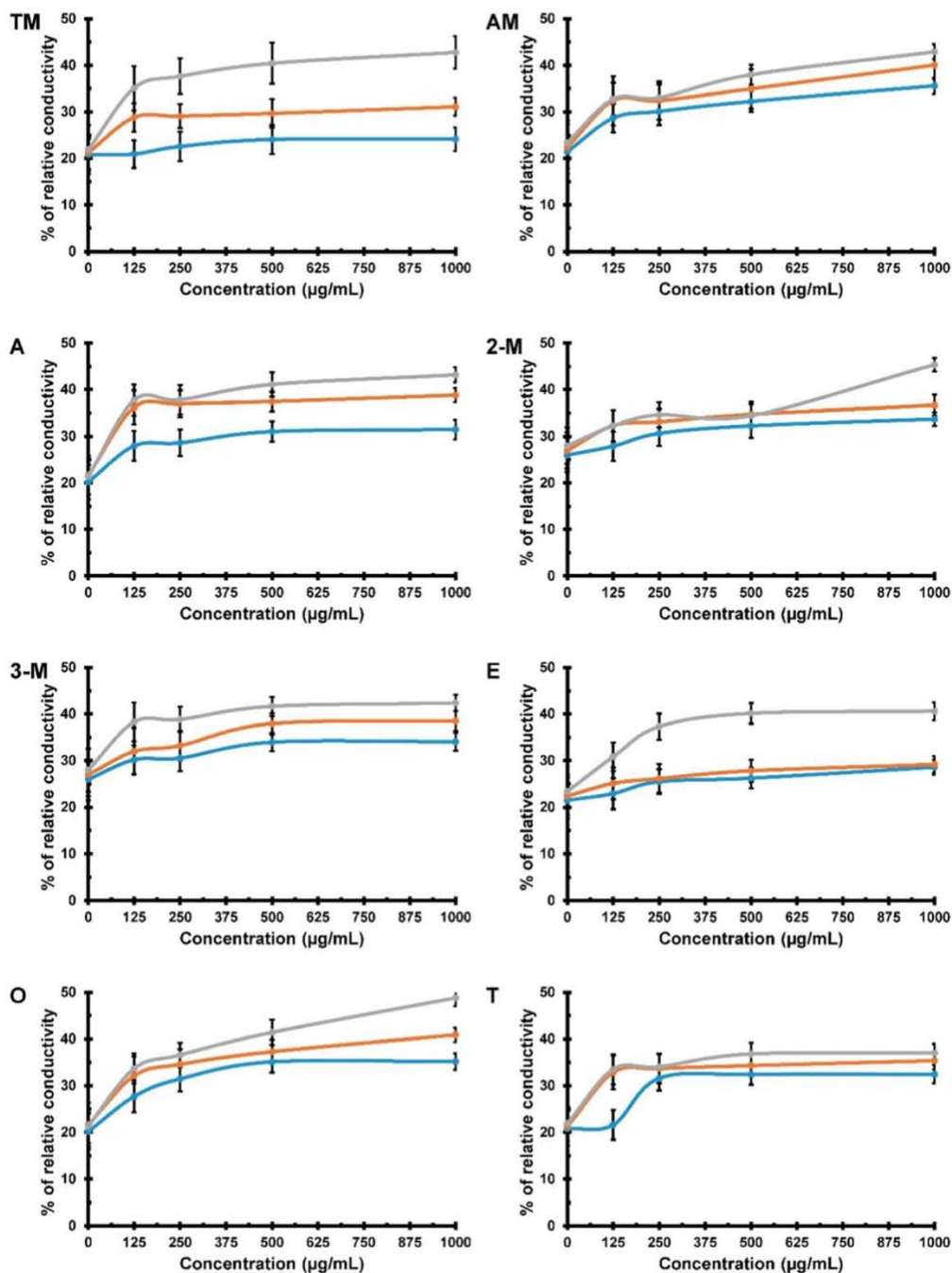


Fig. 4 Effect of selected VOCs on the relative conductivity of phytopathogen *F. oxysporum* evaluated at 2 (blue), 5 (orange), and 8 (gray) hours of treatment. Six VOCs' mixture (TM), alcohols' mixture (AM), phenylethyl alcohol (A), 2-methyl-1-butanol (2-M), 3-methyl-1-butanol (3-M), eucalyptol (E), ocimene (O), and terpinolene (T), at 125,

250, 500, and 1000 µg/mL. At 2 h of treatment for concentrations 500 and 1000 µg/mL, all percent values were statistically significant, ANOVA ($P < 0.05$). For 5 and 8 h of treatment, results were statistically significant in the 125–1000 µg/mL range

only the six VOCs' mixture shows significant differences with concentration and incubation time. Significant results were

obtained at 1000 µg/mL, the maximum concentration, for all the treatments from 2 to 8 h.

Greatest increases of relative conductivity were observed at the maximum concentration after 8 h of incubation of the mycelium in presence of the VOCs. Terpinolene leads to an electrolyte leak rate of 37%, comparing to the control experiment; for all the other treatments, increase on relative conductivity was between 40 and 50%: ocimene (48.8%) >2-methyl-1-butanol (45.4%) >phenylethyl alcohol (43.1%) >alcohols' mixture (42.9%) > VOCs' mixture (42.8%) >3-methyl-1-butanol (42.4%) >eucalyptol (40.6%). Increases on relative conductivity are ~30% after 2 h of treatment and from 30 to 40% for 5 h (Table S3 in the supplementary material).

Effect of VOCs on hyphal morphological characters of *F. oxysporum*

To further investigate the effect of the individual VOCs and the mixtures on the ultrastructure of the phytopathogen *F. oxysporum*, the morphology of the hyphae was studied in fresh preparations from mycelium suspensions and from microcultures, using the agar dilution and gas phase methodologies.

Micrographs of the mycelium suspensions after 2, 5 and 8 h of treatment with the selected VOCs show that the greatest toxic effect on hyphal morphology started after 5 h at 1000 µg/mL. Phenylethyl alcohol and 3-methyl-1-butanol induced a deeper penetration of the colorant into the hyphae when compared to the control experiments. Likewise, 2-methyl-1-butanol, eucalyptol and the alcohols' mixture induced deeper penetration of the colorant but also resulted in vacuolization and a thickening of the middle part of the hyphae and a thinning of the tips. Ocimene and the six VOCs' mixture also induced the vacuolization process and thickening and thinning on the middle and the tips respectively; additionally, there were void spaces that indicate the loss of hyphal content. Terpinolene caused a deeper penetration of the colorant and the generation of void spaces (images not shown).

After 8 h of treatment with 3-methyl-1-butanol, aside from the effects observed at 5 h, vacuolization and a thickening of the middle part of the hyphae and a thinning of the tips were observed. For the hyphae treated with eucalyptol, ocimene, terpinolene and both mixtures, the vacuolization process, the thickening and thinning effects and the loss of hyphal content became more evident than at 5 h (Fig. S1).

It is worth noting that the VOCs' mixture was the only treatment that induced morphological changes at the lowest tested concentration (125 µg/mL). Damages to the hyphal morphology were in agreement with the results obtained from the cell membrane permeability and respiration experiments. The effects of individual VOCs and mixtures on the *F. oxysporum* hyphae after 8 h of agar dilution treatment are shown in Fig. S1 (C1-TM1) in the supplementary material.

Micrographs from 48 h microcultures of the pathogen in presence of the VOCs using the gas phase method show a greater toxic effect on the hyphal morphology than the micrographs obtained from the agar dilution methodology. In contrast to what was observed from the microcultures using the dilution method, there were plenty vacuoles at 1000 µg/mL of all the individual VOCs. 2-Methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol induced a vacuolization process. Also, 2-methyl-1-butanol caused thickening and thinning on the middle and the tips thickening and thinning on the middle and the tips, respectively. Ocimene lead to hyphal content loss. Again, the greatest toxic effect on hyphal morphology was observed in the micrographs obtained from treatments with the six VOCs' and alcohols' mixtures. As consequences of the stress led by the presence of these mixtures, there was a substantial increment in the number of vacuoles, and an increase in the vacuolization process, resulting in hyphal rupture. The six VOCs' mixture presented the largest toxic effect at the concentration of 75 µg/mL and above. It also completely inhibited the phytopathogen growth at 1000 µg/mL. On the other hand, the alcohols' mixture displayed the greatest effect on the hyphae at the concentration of 250 µg/mL. Hyphae with a thicker middle and thinner tips were also observed. The effects of individual VOCs and mixtures on the *F. oxysporum* hyphae after 48 h of gas phase method treatment are shown in Fig. S1 (C2-AM2) in the supplementary material.

Analysis of the microcultures confirms that the selected VOCs alter cell membrane permeability of *F. oxysporum*. VOCs also inhibited the growth of the phytopathogen. This appears to be due to a proliferation of vacuoles and a severe vacuolization process that results in the rupture of hyphae, which results in turn in the alteration of the respiration of the microorganism. The effect of individual VOCs and mixtures on the *F. oxysporum* hyphae after 48 h, using the gas phase methodology, is shown in Fig. S1 (C3-TM2) in the supplementary material.

As an example, Fig. 5 shows the morphological alterations caused after 8 h by the six VOCs' mixture using the agar dilution method on *F. oxysporum* at 500 µg/mL, (Fig. 5a), and using the gas phase method at 48 h of treatment (Fig. 5b), amplified images are also shown (Fig. 5c).

The terms used to describe the alterations on the hyphal morphology of *F. oxysporum* are explained below. Dye penetration into hyphae: color in some regions of the hyphae is more intense than in other regions. Vacuolization process: the vacuole is swollen and that leads to bloated regions in the hyphae. Thickening of the middle part of the hyphae and thinning of the tips: the hyphae present differential thickness. Void spaces indicating loss of hyphal content: the hyphae seem to be clear and empty. Proliferation of vacuoles: there is a substantial increment in the number of vacuoles. Broken hyphae: the hyphae is separated in two or more pieces.

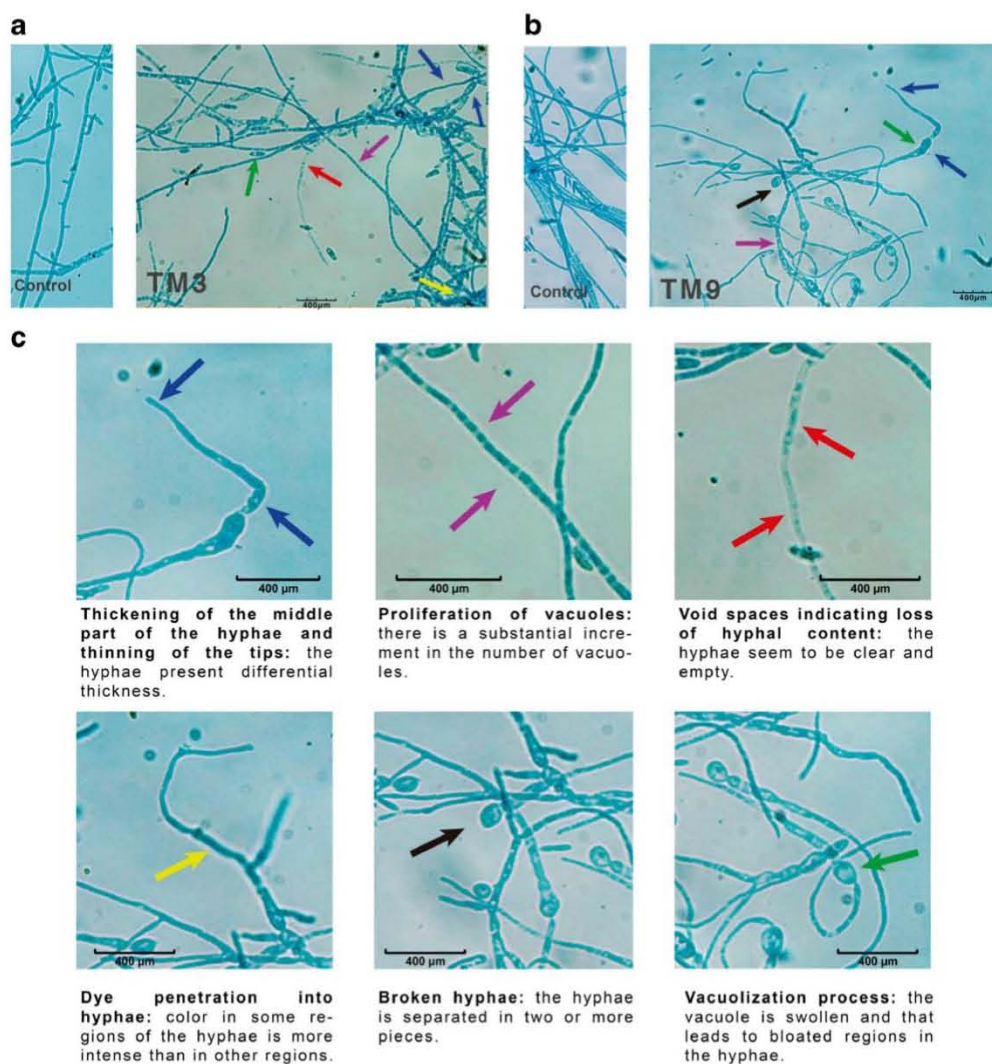


Fig. 5 Micrographs of *F. oxysporum* hyphae dyed with lactophenol blue in presence of the six VOCs' mixture using the dilution and gas phase methodologies. **a** Hyphae from mycelium suspension after 8 h of dilution treatment with selected VOCs at 500 µg/mL. **b** Hyphae from *F. oxysporum* microcultures after 48 h of gas phase treatment with the six VOCs' mixture at 500 µg/mL. **c** Amplified images of the morphological alterations caused by the six VOCs' mixture. Dye penetration into hyphae: color in some regions of the hyphae is more

intense than in other regions (yellow). Vacuolization process: the vacuole is swollen and that leads to bloated regions in the hyphae (green). Thickening of the middle part of the hyphae and thinning of the tips: the hyphae present differential thickness (blue). Void spaces indicating loss of hyphal content: the hyphae seem to be clear and empty (red). Proliferation of vacuoles: there is a substantial increment in the number of vacuoles (purple). Broken hyphae: the hyphae is separated in two or more pieces (black)

Discussion

The VOCs phenylethyl alcohol, 2-methyl-1-butanol, and 3-methyl-1-butanol; and monoterpenes eucalyptol, ocimene and terpinolene, synthesized by the endophytic fungi *Nodulisporium* sp. strain GS4d2II1 (*H. anthochroum*) (Sánchez-Fernández et al. 2016) and *H. anthochroum* strain Blaci (Ulloa-Benítez et al. 2016), were evaluated as biopesticides in vivo against *F. oxysporum* growing on cherry

tomatoes, and in vitro by analyzing the radial growth of the phytopathogen. The individual compounds have a significant concentration-dependent antifungal effect and also act in a synergic manner when evaluated as mixtures. Additionally, the six VOCs' mixture, the alcohols' mixture and the three individual alcohols produced changes in cell membrane permeability, resulting in leakage of ions. Damage to the hyphal morphology and an inhibitory effect on the respiration were also observed. This alteration on the respiration of the

microorganism is due to a proliferation of vacuoles and a severe vacuolization process that results in the rupture of hyphae. The in vivo experiments showed greater inhibition on the growth of *F. oxysporum* than the in vitro evaluations.

The greatest inhibition on the growth of *F. oxysporum* in the in vivo experiments might be due to the following: when infecting the tomatoes, the phytopathogen needs to produce specific metabolites for a successful colonization; part of the pathogen supplies are used for this purpose thus limiting its own development (Gordon and Martyn 1997; Leslie and Summerell 2006; Strobel et al. 2007). Also, cherry tomatoes produce different nutrients from what is found on PDA media and tomatoes themselves have a defense system that produces metabolites, which help protect the plant from plagues and phytopathogenic microorganisms (González et al. 2012). Consequently, exposure to VOCs results in a greater effect on *F. oxysporum* growth and their use as bioplaguicides is favored.

It is important to point out that the phenylethyl alcohol is also produced by the endophytic fungi *Muscodor albus* E6 and *M. albus* strain 620, which are used as biological control agents against fungi *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apples, and *Monilinia fruticola* in peaches (Mercier and Jiménez 2004; Strobel et al. 2001, 2007). This alcohol has also been reported as a constituent of the VOCs produced by actinobacteria *Streptomyces platensis* F-1 (Wan et al. 2008). The study by Wan et al. (2008) suggests that the VOCs produced by *S. platensis* F-1 may be responsible for the toxic effects on pathogens *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *B. cinerea*. Additionally, Mo and Sung (2007) propose that phenylethyl alcohol extracted from *Pichia anomala* SKM-T yeast can be used as a biological control agent in postharvest storage of strawberries since it showed antifungal properties against *B. cinerea* in strawberries inoculated with this phytopathogen.

3-Methyl-1-butanol is also present in the VOCs from *M. albus* strain 620 and *Muscodor suthepensis* strain CMU-Cib462, used as mycofumigation agents (Strobel et al. 2007; Suwannarach et al. 2016), and from the endophytic fungus *Phaeosphaeria nodorum* (Pimenta et al. 2012). Suwannarach et al. (2016) used *M. suthepensis* strain CMU-Cib462 as postharvest biofungicide to protect *Citrus tangerina* fruit against *Penicillium digitatum*, reducing significantly the diameter of the wounds. Pimenta et al. (2012) evaluated the in vitro effect of VOCs from the endophytic fungus *P. nodorum* as an antifungal agent against *M. fruticola*, observing a significant inhibition on the growth and a morphological modification on the hyphae of the phytopathogen; some hyphae were thinner, others were curled and some showed void spaces indicating loss of the hyphal content.

3-Methyl-1-butanol and eucalyptol are also reported as constituents on the VOCs' mixture produced by the endophytic fungi *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 and

Nodulisporium sp. strain GS4d2II1a, which present antifungal activity (Sánchez-Fernández et al. 2016; Suwannarach et al. 2013). Suwannarach et al. (2013) demonstrated in vitro that VOCs from *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 significantly inhibit the growth of phytopathogens *Alternaria porri*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Fusarium solani*, *Nigrospora oryzae*, *P. digitatum*, *Penicillium expansum*, *R. solani* and *Sclerotium rolfii*. Their in vivo studies show that the VOCs inhibit the development of lesions caused by *P. expansum* on *Citrus aurantifolia* and *Citrus reticulata* fruits, and by *P. digitatum* on *Citrus limon*. Sánchez-Fernández et al. (2016) proved that the VOCs' mixture from *Nodulisporium* sp. strain GS4d2II1a significantly inhibits the growth of phytopathogens *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium polytulum*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora parasitica*, *F. oxysporum* and *A. solani*.

2-Methyl-1-butanol has also been described as a compound on the VOCs' mixture produced by *M. albus* strain 620, used as a biological control agent (Ramin et al. 2005) and by *Muscodor yucatanensis*, which has antifungal and phytotoxic properties (Macías-Rubalcava et al. 2010). In vitro experiments by Ramin et al. (2005) confirm that VOCs from *M. albus* strain 620 act against fungi *B. cinerea*, *P. expansum* and *S. sclerotiorum* and against bacteria *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* by inhibiting spore germination of *B. cinerea* and *P. expansum*, and growth of *S. sclerotiorum*, *E. carotovora* pv. *carotovora*, *P. fluorescens* and *E. coli*. Selected VOCs have not been evaluated as biopesticides mixtures to test their efficacy on postharvest diseases in any of the works mentioned.

In conclusion, we demonstrated, for the first time, that the selected VOCs from endophytic fungi from the *Hypoxyylon* genus exhibit potent antifungal effects against the phytopathogen *F. oxysporum*, as shown by the in vivo and in vitro studies. The effects are observed for the individual VOCs (alcohols phenylethyl alcohol, 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol, and monoterpenes eucalyptol, ocimene and terpinolene), and there is a synergic effect observed both in the alcohols' mixture and the six VOCs' mixture.

In vivo experiments, performed on *F. oxysporum* growing on cherry tomatoes, show that the individual VOCs and the mixtures, particularly the six VOCs' mixture, significantly inhibit in a concentration-dependent manner the growth of the mycelium on wounds from the infected tomatoes. The in vitro studies demonstrate that the selected VOCs, particularly the six VOCs' mixture, inhibit the growth of *F. oxysporum*, significantly and in a concentration-dependent manner, by affecting the respiration and cell membrane permeability of the phytopathogen. These results, along with the

hyphal morphology alteration, indicate that the VOCs are promising candidates for the development of biopesticides, having great potential for tomatoes postharvest treatment against diseases caused by *F. oxysporum*.

To the best of our knowledge, there are currently no studies related to the effect of these VOCs on the growth of phytopathogenic fungus *F. oxysporum*, nor from their physiological action mechanism, individually or as mixture. Likewise, we found no in vivo studies of VOCs from endophytic fungi acting, individually or as mixtures, as postharvest biopesticides against phytopathogenic microorganisms of agricultural importance.

Acknowledgements This work was supported by grants CONACyT 179194 and DGAPA-UNAM IN207117. Yoli Mariana Medina-Romero is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 239871 from CONACyT. We wish to thank Dra. Bertha Tlapal Bolaños from Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, for the donation of the plant pathogenic microorganism used in the bioassays and to Dra. Elizabeth K. Galván Miranda from Facultad de Química, UNAM, for language revision.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Ascencio-Álvarez A, López-Benítez A, Borrego-Escalante F, Rodríguez-Herrera SA, Flores-Olivas A, Jiménez-Díaz F, Gámez-Vázquez AJ (2008) Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 114–120
- Bajpai VK, Kang SC (2012) In vitro and in vivo inhibition of plant pathogenic fungi by essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *J Agric Sci Technol* 14:845–856
- Booth E, Strobel G, Knighton B, Sears J, Geary B, Avcı R (2011) A rapid column technique for trapping and collecting of volatile fungal hydrocarbons and hydrocarbon derivatives. *Biotechnol Lett* 33:1963–1972
- Dai JQ, Krohn K, Flörke U, Draeger S, Schulz B, Kiss-Szikszai A, Antus S, Kurtan T, van Ree T (2006) Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. *Eur J Org Chem* 15:3498–3506
- Deng L, Zhou Y, Zeng K (2015) Pre-harvest spray of oligochitosan induced the resistance of harvested navel oranges to anthracnose during ambient temperature storage. *Crop Prot* 70:70–76
- Dimetry NZ (2014) Different plant families as bioresource for pesticides. In: Singh D (ed) *Advances in plant biopesticides*, 1st edn. Springer India, New Delhi, pp 1–20
- Ding T, Jiang T, Zhou J, Xu L, Gao ZM (2010) Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Campylopus acuminata* (Nyssaceae). *Genet Mol Res* 9:2104–2112
- Duan Y, Ge C, Liu S, Chen C, Zhou M (2013) Effect of phenylpyrrole fungicide fludioxonil on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pestic Biochem Physiol* 106:61–67
- Effmert U, Kalderás J, Warnke R, Piechulla B (2012) Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J Chem Ecol* 38: 665–703
- Ezra D, Strobel G (2003) Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodora albus*. *Plant Sci* 165:1229–1238
- Ezra D, Hess WM, Strobel GA (2004) New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology* 150:4023–4031
- Fravel D, Olivain C, Alabouvette C (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol* 157:493–502
- Gao XX, Zhou H, Xu DY, Yu CH, Chen YQ, Qu LH (2005) High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiol Lett* 249:255–266
- González I, Arias Y, Peteira B (2012) Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. *Rev Protección Veg* 27:1–7
- Gordon TR, Martyn RD (1997) The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu Rev Phytopathol* 35:111–128
- Hensens OD, Ondeyka JG, Dombrowski AW, Ostlind DA, Zink DL (1999) Isolation and structure of nodulisporic acid A1 and A2, novel insecticides from *Nodulisporium* sp. *Tetrahedron Lett* 40:5455–5458
- Hung R, Lee S, Bennett JW (2015) Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:3395–3405
- Kai M, Hausteiner M, Molina F, Petri A, Scholz B, Piechulla B (2009) Bacterial volatiles and their action potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:1001–1012
- Korpi A, Järnberg J, Pasanen AL (2009) Microbial volatile organic compounds. *Crit Rev Toxicol* 39:139–193
- Lemfack MC, Nickel J, Dunkel M, Preissner R, Piechulla B (2014) mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res* 42: D744–D748
- Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing, Iowa
- Li Q, Ning P, Zheng L, Huang J, Li G, Hsiang T (2012) Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biol Control* 61:113–120
- Macías-Rubalcava ML, Hernández-Bautista BE, Oropeza F, Duarte G, González MC, Glenn AE, Hanlin RT, Anaya AL (2010) Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodora yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *J Chem Ecol* 36:1122–1131
- Meléndez-González C, Muriá-González MJ, Anaya AL, Hernández-Bautista BE, Hernández-Ortega S, González MC, Glenn AE, Hanlin RT, Macías-Rubalcava ML (2015) Acremoxanthone E, a novel member of heterodimeric polyketides with a bicyclo[3.2.2]nonene ring, produced by *Acremonium camptosporum* W. Gams (Clavicipitaceae) endophytic fungus. *Chem Biodivers* 12:133–147
- Mercier J, Jiménez JI (2004) Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodora albus*. *Postharvest Biol Technol* 31:1–8
- Mercier J, Manker DC (2005) Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodora albus*. *Crop Prot* 24:355–362
- Mercier J, Smilanick JL (2005) Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodora albus*. *Biol Control* 32:401–407

- Mo EK, Sung CK (2007) Phenylethyl alcohol (PEA) application slows fungal growth and maintains aroma in strawberry. *Postharvest Biol Technol* 45:234–239
- Peng L, Yang S, Cheng YJ, Chen F, Pan S, Fan G (2012) Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Sci Biotechnol* 21:1533–1539
- Pimenta RS, Silva JFM, Buyer JS, Janisiewicz WJ (2012) Endophytic fungi from plums (*Prunus domestica*) and their antifungal activity against *Monilinia fructicola*. *J Food Prot* 75:1883–1889
- Ramin AA, Braun PG, Prange RK, DeLong JM (2005) In vitro effects of *Muscodora albus* and three volatile components on growth of selected postharvest microorganisms. *Hortscience* 40:2109–2114
- Sánchez-Fernández RE, Díaz D, Duarte G, Lappe-Oliveras P, Sánchez S, Macías-Rubalcava ML (2016) Antifungal volatile organic compounds from the endophyte *Nodulisporium* sp. strain GS4d2IIIa: a qualitative change in the intraspecific and interspecific interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microb Ecol* 71:347–364
- Sánchez-Ortiz BL, Sánchez-Fernández RE, Duarte G, Lappe-Oliveras P, Macías-Rubalcava ML (2016) Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematostyloxyton brasiletto*. *J Appl Microbiol* 120:1313–1325
- Schotsmans WC, Braun G, DeLong JM, Prange RK (2008) Temperature and controlled atmosphere effects on efficacy of *Muscodora albus* as a biofumigant. *Biol Control* 44:101–110
- Strobel G (2011) *Muscodora* species-endophytes with biological promise. *Phytochem Rev* 10:165–172
- Strobel GA (2015) Bioprospecting-fuels from fungi. *Biotechnol Lett* 37: 973–982
- Strobel GA, Dirkse E, Sears J, Markworth C (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 147:2943–2950
- Strobel GA, Kluck K, Hess WM, Sears J, Ezra D, Vargas PN (2007) *Muscodora albus* E-6, an endophyte of *Guazuma ulmifolia* making volatile antibiotics: isolation, characterization and experimental establishment in the host plant. *Microbiology* 153:2613–2620
- Suwannarach N, Kumla J, Bussaban B, Nuangmek W, Matsui K, Lumyong S (2013) Biofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit. *Crop Prot* 45:63–70
- Suwannarach N, Bussaban B, Nuangmek W, Pithakpol W, Jirawattanakul B, Matsui K, Lumyong S (2016) Evaluation of *Muscodora suthepensis* strain CMU-Cib462 as a postharvest biofumigant for tangerine fruit rot caused by *Penicillium digitatum*. *J Sci Food Agric* 96:339–345
- Tanwar RS, Dureja P, Rathore HS (2012) Biopesticides. In: Rathore HS, Nollet LM (eds) *Pesticides: evaluation of environmental pollution*, 1st edn. CRC Press, Boca Raton, pp 587–603
- Tian P, Nan Z, Li C, Spangenberg G (2008) Effect of the endophyte *Neotyphodium lolii* on susceptibility and host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens. *Eur J Plant Pathol* 122:593–602
- Ulloa-Benítez Á, Medina-Romero YM, Sánchez-Fernández RE, Lappe-Oliveras P, Roque-Flores G, Duarte Lisci G, Herrera Suárez T, Macías-Rubalcava ML (2016) Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile and semi-volatile organic compounds from the endophyte *Hypoxyton anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia* (Burseraceae). *J Appl Microbiol* 121:380–400
- Vespermann A, Kai M, Piechulla B (2007) Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl Environ Microbiol* 17:5639–5641
- Wan M, Li G, Zhang J, Jiang D, Huang HC (2008) Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biol Control* 46:552–559
- Wenke K, Kai M, Piechulla B (2010) Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta* 231: 499–506
- Wu ZC, Li DL, Chen YC, Zhang WM (2010) A new isofuranonaphthalenone and benzopyrans from endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Aquilaria sinensis*. *Helv Chim Acta* 93: 920–924
- Yang S, Liu L, Li D, Xia H, Su X, Peng L, Pan S (2016) Use of active extracts of poplar buds against *Penicillium italicum* and possible modes of action. *Food Chem* 196:610–618
- Zar JH (2010) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Upper Saddle River
- Zhang Z, Li G (2010) A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchem J* 95: 127–139