



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES Y NO VOLÁTILES DEL HONGO ENDÓFITO *HYPOXYLON ANTHOCHROUM* AISLAMIENTO SMG4 CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA ÚTIL PARA EL DESARROLLO DE BIOPLAGUICIDAS Y AGENTES DE BIOCONTROL

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. F. B. Gonzalo Roque Flores

ASESORA

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad de México

Junio 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Leovigildo Quijano
VOCAL: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
VOCAL: Dr. Ricardo Reyes Chilpa
VOCAL: Dra. María Adelina Jiménez Arellanes
SECRETARIO: Dr. Mario Alberto Figuereo Saldívar

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO.

INSTITUTO DE QUÍMICA

LABORATORIO 1-4, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES.

ESTE TRABAJO SE PRESENTÓ EN EL SIMPOSIUM INTERNO DEL INSTITUTO DE QUÍMICA 2018, UNAM

ASESORA DEL TEMA:

DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

SUSTENTANTE:

GONZALO ROQUE FLORES

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a:

La Universidad Nacional Autónoma de México, el Instituto de Química y al Posgrado en Ciencias Químicas por su contribución en mi formación académica.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo el presente trabajo a través del proyecto IN207117.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría con número de becario 629486.

A la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por su valioso tiempo dedicado al presente proyecto de investigación, por los consejos, enseñanzas y por supuesto, por la amistad que me ha brindado durante todo este tiempo.

A cada uno de los miembros del jurado: Dr. Leovigildo Quijano, Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. María Adelina Jiménez Arellanes y al Dr. Mario Alberto Figuereo Saldívar, por las valiosas aportaciones realizadas durante la revisión de este trabajo.

A la Q. Georgina Duarte Lisci por los análisis realizados en el Laboratorio de espectrometría de masas, USAI, UNAM.

A la Dra. Patricia Lappe Oliveras del Laboratorio de Micromicetes y Levaduras, Instituto de Biología, UNAM, por el apoyo para la identificación taxonómica del hongo en estudio.

I. ANTECEDENTES

La agricultura en México es una actividad económica importante. En la última década, las exportaciones agroalimentarias se han incrementado considerablemente, en el año 2015 las exportaciones superaron a los ingresos petroleros (SAGARPA, 2018). Si bien, estas cifras son prometedoras, los agricultores mexicanos sufren pérdidas millonarias en sus cultivos año con año, debido a factores abióticos (inundaciones, sequías, heladas, etc.) y bióticos (plagas y enfermedades), afectando directamente las ganancias y la disponibilidad de los productos para el consumidor final. De acuerdo a la encuesta nacional agrícola (ENA) en 2017, el 44.2% de las unidades productoras reportaron daños por causas biológicas, lo que causó pérdidas en las cosechas de un 40.3%. Además, la ENA en 2017 señaló que el 60% de los productores utilizaron plaguicidas y un 12% utilizaron organismos de control biológico para contrarrestar las amenazas bióticas (“Encuesta Nacional Agropecuaria,” 2017).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que, en países en desarrollo, los agricultores invierten al menos el 40% de su tiempo en operaciones de deshierbe y, aun así, las malezas generan pérdidas millonarias. Una maleza es una planta que crece dentro de un cultivo sin que esta sea sembrada de manera intencional. Las malezas compiten por espacio, nutrientes, luz y agua con los cultivos de importancia, y algunas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los cultivos al producir metabolitos secundarios bioactivos; además, las malezas pueden ser hospederas de otras plagas que afectan el rendimiento y calidad de los cultivos. De esta manera, las malezas más allá de ser solo una molestia para los agricultores y jardineros, son agentes causales de pérdidas económicas y amenazan la seguridad alimentaria mundial (Bailey, 2014).

Para controlar y aminorar el daño ocasionado por las malezas se han empleado diferentes técnicas: labranza, deshierbe y uso de agentes químicos denominados herbicidas (Griepentrog & Dedousis, 2010; Pohanish, 2015). El ácido 2,4-diclorofenoxiacético y el glifosato son los herbicidas que dominan el mercado en un 80-100% debido a la amplia variedad de cultivos que protegen. Los herbicidas representan el 44% de los plaguicidas usados a nivel mundial, estos números aumentan a un 80% en países como USA y Canadá (Bailey, 2014; Pohanish, 2015).

El control biológico y los bioplaguicidas son una alternativa en el control de plagas que se ha incrementado en las últimas décadas, debido a su menor o nulo impacto sobre el medio ambiente y la salud humana, en comparación con los agroquímicos tradicionales (Carvalho, 2017). El control biológico es un organismo que es introducido en un hábitat con la finalidad de controlar una plaga (De Silva et al., 2019). Dentro de los organismos de control biológico se encuentran a los hongos

endófitos (Srivastava et al., 2014). Los hongos endófitos son microorganismos que pasan parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos internos de las plantas sin causar un daño aparente de enfermedad (Petrini, 1991; Wani et al., 2015). *In planta*, los hongos obtienen hábitat y una fuente de nutrición; sin embargo, se enfrentan a los mecanismos de defensa de las hospederas, y además tienen que interactuar con otros microorganismos endófitos como: algas, insectos, bacterias, virus, y otros hongos, por espacio y nutrientes (Schulz et al., 2015). De esta manera, para prosperar dentro de su hospedera algunos hongos endófitos tienen que producir una amplia gama de metabolitos que le permitan, por una parte inhibir el crecimiento de sus competidores (Herre et al., 2007), y por otro lado beneficiar a su planta huésped al estimular el crecimiento, el desarrollo, la adaptación y/o la tolerancia al estrés (Wani et al., 2015). Cabe señalar que los hongos endófitos y sus hospederas establecen una relación de antagonismo en equilibrio, que depende de los mecanismos de defensa de la hospedera y de los factores de virulencia del hongo (Schulz et al., 2015). La naturaleza química de los metabolitos secundarios producidos por interacción antagonica por hongos endófitos es diversa y con amplia actividad biológica. Los principales grupos químicos corresponden a terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides, compuestos aromáticos, policétidos, quinonas, compuestos alifáticos y péptidos (Guo et al., 2008; Mousa & Raizada, 2013; Strobel et al., 2004), por lo que los metabolitos bioactivos que podrían ser útiles en el desarrollo de medicamentos en medicina, y en el desarrollo de bioplaguicidas en la agricultura (Strobel & Daisy, 2003).

En este contexto, el presente proyecto, pretende identificar los compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito *Hypoxylon anthochroum* aislamiento Smeg4, empleando microextracción en fase sólida y cromatografía de gases-espectrometría de masas; con el fin de poner en evidencia a este hongo endófito, como candidato para el desarrollo de un agente de control biológico, o como fuente de metabolitos secundarios con actividad herbicida que puedan ser usados en el desarrollo de agroquímicos de origen natural cuyo impacto ambiental y toxicológico sea menor.

II. HIPÓTESIS

El estudio químico biodirigido de los metabolitos secundarios volátiles, producidos por el hongo endófito *Hypoxylon anthochroum* aislamiento Smeg4, podría evidenciar compuestos novedosos con actividad fitotóxica contra plantas con importancia negativa en la agricultura.

III. . OBJETIVOS

Establecer el potencial fitotóxico de los metabolitos secundarios volátiles producidos por el hongo *H. anthochroum* aislamiento Smeg4, sobre el crecimiento de malezas con importancia negativa en la agricultura, contribuyendo al conocimiento para el desarrollo de bioplaguicidas—potentes y eficaces, con menor toxicidad e impacto ambiental y/o al desarrollo de agentes de control biológico.

1. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Realizar la identificación taxonómica del aislamiento Smeg4 por medio de la secuenciación de la región ITS1-5.8s-ITS2 del DNA ribosomal.
- ❖ Establecer la actividad fitotóxica de la mezcla de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producida por el hongo *H. anthochroum* Smeg4 en diferentes días de crecimiento, sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de cuatro plantas prueba consideradas malezas: *Amaranthus hypochondriacus*, *Panicum miliaceum*, *Trifolium pratense* y *Medicago sativa*, mediante la técnica de fase gas.
- ❖ Determinar la composición química de la mezcla de VOCs producida por el del hongo endófito *H. anthochroum* Smeg4 al día de mayor actividad fitotóxica, utilizando microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- ❖ Determinar cuantitativamente el efecto fitotóxico de algunos compuestos identificados en la mezcla de VOCs, en forma pura y en mezclas, sobre las cuatro plantas prueba, utilizando el método de fase gas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMO DE ESTUDIO

1.1. Hongo endófito *Hypoxylon anthochroum* aislamiento Smeg4

El hongo endófito *H. anthochroum* Smeg4 fue aislado de la planta *Sapium macrocarpum*, utilizando como criterio ecológico la selección de hojas sanas (Sánchez-Fernández, 2016). El material vegetal empleado fue recolectado en una zona de alta biodiversidad “Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla” (REBIOSH), ubicada en el municipio de Quilamula, estado de Morelos, México.

2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL AISLAMIENTO ENDOFÍTICO SMEG4

Para realizar la identificación taxonómica del hongo endófito Smeg4, se extrajo el DNA genómico total a partir del micelio de un cultivo de 7 días de crecimiento sobre agar papa dextrosa (PDA) al 2%, el cual fue incubado a 28 °C en oscuridad total, usando el kit rápido de aislamiento de DNA genómico de hongos FT71415 (Bio Basic Inc, Markham, ON, Canada); de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante. La región ITS-5.8S se amplificó con los oligonucleótidos ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') y ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La reacción de 'reacción en cadena de la polimerasa' (PCR) se realizó en un termociclador Thermal Gernandt 2720 (Applied Biosystems), en un volumen de reacción de 50 µL que contenía 25 µL GoTaq® Master Mix (Promega), 2.5 µL de cada oligonucleótido (10 pm/µL) y 3 ng de DNA genómico. El programa de PCR consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C por 1 min, seguida por 30 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94 °C, templado por 2 min a 58 °C y extensión por 1 min a 72 °C, y una etapa de extensión final de 5 min a 72 °C. El producto de amplificación se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) (Invitrogen) teñido con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) en buffer 1X TAE, a 90 V, durante 40 min, y se visualizó bajo un transiluminador UVP Dual-Intensity (Upland, CA, EE.UU.). Las secuencias fueron obtenidas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología, UNAM, y posteriormente, se editaron utilizando el programa BioEdit v 7.0.5. Las secuencias editadas se alinearon en la base de datos GenBank usando el programa BLASTN y se realizó una comparación (Macías-Rubalcava et al., 2018; Ulloa-Benítez et al., 2016).

La identificación del hongo endófito Smeg4 se realizó en colaboración con la Dra. Patricia Lappe Oliveras del Laboratorio de Micromicetes y Levaduras, Instituto de Biología-de la UNAM.

3. ESPECIES DE MALEZAS

El potencial fitotóxico de los metabolitos secundarios producidos por *H. anthochroum* Smeg4 se evaluó utilizando semillas de cuatro plantas prueba, las cuales son consideradas malezas ante la CONABIO ("Malezas de México," 2016). Para los bioensayos se utilizó una especie monocotiledónea: *P. miliaceum* (Poaceae) y tres especies dicotiledóneas: *A. hypochondriacus* (Amaranthaceae), *T. pratense* y *M. sativa* (Fabaceae) (Ulloa-Benítez et al., 2016). Las semillas fueron adquiridas en Casa Cobos S.A. de C.V., Central de Abastos, Ciudad de México, México.

4. ACTIVIDAD FITOTÓXICA DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS POR *H ANTHOCHROUM* SMEG4

4.1. Mezcla VOCs producidos por *H. anthochroum* Smeg4

El efecto fitotóxico de mezcla de VOCs producidos por el hongo *H. anthochroum* Smeg4 se estableció a través de bioensayos realizados en contenedores de vidrio de 300 mL, utilizando la técnica de fase gas. Por un lado, se colocó un frasco de vidrio de 30 mL de capacidad con un cultivo del endófito *H. anthochroum* aislamiento Smeg4 a los 0, 3, 5, 7, 10, 20 y 30 días de crecimiento. El endófito se cultivó sobre 5 mL de medio PDA 2%. Los cultivos fueron cubiertos con Magitel®, con la finalidad de disminuir el riesgo de propagación de los conidios por todo el sistema, así como permitir que los VOCs estuvieran en contacto con las semillas de prueba. Por otra parte, las semillas se colocaron en una caja Petri de 3 cm de diámetro sobre 3 mL de agar 1%. Se colocaron 30 semillas por caja, para cada una de las plantas de prueba. Como control negativo, se utilizaron contenedores con PDA 2%, en ausencia del endófito.

4.2. Técnica de fase gas

El efecto fitotóxico de los alcoholes: feniletílico, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol y de los monoterpenos: eucaliptol, ocimeno y terpinoleno, identificados en la mezcla de VOCs producidos por *H. anthochroum* SMeg4 al mayor día de actividad fitotóxica, fueron evaluados mediante la técnica de fase gas modificada de Ulloa-Benítez, 2016. Para la realización de este bioensayo se colocaron pozos de vidrio (9 mm de diámetro y 10 mm de altura) al centro de cajas de Petri de 5 cm de diámetro, y alrededor de los pozos se adicionaron 5 mL de agar 1%. Se colocaron 30 semillas por caja, para cada una de las plantas de prueba. En los pozos se adicionó una alícuota de mezcla o compuesto puro (-0.6-240 µL), según el tratamiento. Como control negativo, se utilizaron cajas en donde los pozos estaban vacíos (Ulloa-Benítez et al., 2016).

4.3. Determinación cuantitativa del efecto fitotóxico

El efecto fitotóxico provocado por los tratamientos, en los dos métodos experimentales (incisos 4.1 y 4.2) las semillas de *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa* fueron incubadas por 48 h a una temperatura de 27 °C en condiciones de completa oscuridad. Trascurrido el periodo de incubación, se contabilizaron las semillas no germinadas y se midió la longitud de la raíz. El efecto sobre la respiración se evaluó colocando las 30 semillas o plántulas en un contenedor de vidrio con 3-5 mL de agua destilada y se monitoreó la cantidad de oxígeno consumido por las plántulas empleando un electrodo de oxígeno tipo Clark conectado a un oxímetro YSI® modelo 5300A, cada 5 s por 3 min (García-Méndez et al., 2016).

La cantidad de oxígeno consumido por las plántulas se determinó mediante un análisis de regresión lineal simple de la curva generada.

Los resultados de germinación, crecimiento de raíz y consumo de oxígeno, se analizaron mediante ANOVA de una vía, modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD, utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.00 (García-Méndez et al., 2016; Macías-Rubalcava et al., 2018).

5. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (VOCs)

Para el análisis cualitativo de los VOCs biosintetizados por del hongo endófito *H. anthochroum* Smeg4, el microorganismo se cultivó por triplicado en viales con septo de 40 mL, conteniendo 15 mL de PDA al 2% como sustrato. En cada vial se colocó un inóculo de 5 mm de diámetro del hongo endófito procedente de un cultivo en PDA de 8 días. Los viales se incubaron durante cinco días a 28 °C bajo la condición de luz-oscuridad artificial 12-12 h. Como controles negativos, se utilizaron tres viales de la misma capacidad con 15 mL de PDA al 2% y se sometieron a las mismas condiciones de incubación que los viales con inóculos.

Los VOCs producidos por el hongo endófito *H. anthochroum* Smeg4 después de cinco días de crecimiento fueron obtenidos por microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) exponiendo una fibra de Divinilbenceno-Polidimetilsiloxano-Carboxen (DVB-PDMS-Carboxen, 2 cm, 50/30 mm) por encima de la muestra durante 60 min. La fibra se preacondicionó por 40 min a 250 °C. Los metabolitos volátiles retenidos en la fibra se inyectaron a 300 °C a un cromatógrafo de gases Agilent 6890 N en modo *splitless*. La separación de compuestos se logró empleando una columna capilar DB-5MS (5% fenil metilpolisiloxano) de 10 m de longitud y 0.18 mm de diámetro y 0.18 μm de espesor de película. Las condiciones de análisis fueron: temperatura del horno inicial de 40 °C y calentamiento de 20 °C/min hasta alcanzar la temperatura de 300 °C, con un tiempo final de 10 min. El gas portador fue helio, a una velocidad de flujo de 1mL/min. El cromatógrafo se acoplo a un espectrómetro de masas marca LECO, modelo Pegasus 4D con detector selectivo de masas LECO TOF. Las condiciones del espectrómetro fueron: energía de ionización electrónica de 70 eV, intervalo de escaneo de 33-500 uma, velocidad de lectura de 20 espectros/s, temperatura de la cámara de ionización de 200 °C y temperatura de la línea de transferencia de 250 °C. Los datos fueron adquiridos y procesados con el software LECO ChromaTOF™.

La composición de los metabolitos secundarios volátiles se determinó mediante la comparación de los patrones de fragmentación de los espectros de masas obtenidos con la base de datos del NIST (National Institute of Standards and Technology). Además, se establecieron los índices de Kovats los cuales fueron calculados con los índices de retención de una serie de alcanos ($\text{C}_8\text{-C}_{20}$) y se

contrastaron con los reportados en la literatura. Algunos compuestos fueron identificados con la comparación de la espectrometría de masas y de estándares puros (alcohol feniletílico, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, eucaliptol, ocimeno, terpinoleno, limoneno y γ -terpineno; Sigma-Aldrich $\geq 90\%$ pureza) con los obtenidos experimentalmente. Las cantidades relativas de los componentes individuales de los tratamientos se expresaron como porcentajes del área de los picos en relación al área total y como un promedio de las tres repeticiones. Asimismo, se realizó el análisis del extracto de PDA para descartar los metabolitos producto de la degradación del medio de cultivo presentes en las muestras (Macías-Rubalcava et al. 2018). Los análisis se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo se desarrolló con la finalidad de establecer el potencial fitotóxico de los VOCs producidos por el hongo endófito *H. anthochroum* aislamiento Smeg4, por lo que contribuirá con información útil para el desarrollo de bioherbicidas con menor impacto en el ambiente. Así como aportar información acerca del metabolismo secundario y bioactividad de hongos endófitos de plantas mexicanas.

Los resultados obtenidos se dividen en cuatro secciones: **1)** identificación taxonómica del aislamiento endofítico Smeg4, **2)** actividad fitotóxica de los VOCs producidos por *H. anthochroum* Smeg4 bajo diferentes días de crecimiento, **3)** identificación de los VOCs producidos por el hongo *H. anthochroum* Smeg4 y **4)** actividad fitotóxica de algunos compuestos puros y en mezcla, identificados en la mezcla de VOCs biosintetizados por el endófito.

1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL AISLAMIENTO ENDOFÍTICO SMEG4

En un trabajo previo, se realizó la descripción de las características macroscópicas y microscópicas presentes en el aislamiento Smeg4, lo que permitió inferir que el hongo pertenece al género *Nodulisporium*, un anamorfo de *Hypoxyton* (Roque-Flores, 2017). Con la finalidad de establecer de manera inequívoca el género y la especie del aislamiento Smeg4, se realizó la secuenciación de la región ITS1-5.8s-ITS2 del DNA ribosomal.

La identificación taxonómica de la cepa Smeg4 (No. de acceso MF663791 en el GenBank), obtuvo los parentescos más cercanos y con una similitud del 99%, para las cepas de *H. anthochroum* GS4D2II1a (KM516709) y Blaci (KT272400), con una cobertura del 100%, y para las cepas de *H. griseobrunneum* CBS 331.73 (KY610402) y STMA06148 (KC968928) con una cobertura del 98% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de su secuencia ITS1-5.8S-ITS2 en la base de datos de secuencias de nucleótidos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Parentescos cercanos	Número en GenBank	Fuente	Máxima puntuación	% de cobertura	% de identidad
<i>H. anthochroum</i> GS4D2II1a	KM516709	Endófito de hojas sanas de <i>Gliricidia sepium</i>	1027	100	99
<i>H. anthochroum</i> Blaci.	KT272400	Endófito de hojas sanas de <i>Bursera lancifolia</i>	1011	100	99
<i>H. griseobrunneum</i> CBS 331.73	KY610402	Suelo de huerta de <i>Piper betle</i>	985	97	99
<i>H. anthochroum</i> EGJMP20	KF192825	Endófito de <i>Mangifera indica</i>	985	95	99
<i>H. anthochroum</i> 9 (JDR)	JN660819	Espécimen sobre madera	983	95	99
<i>H. griseobrunneum</i> STMA06148	KC968926	Espécimen sobre corteza	979	96	99

Mediante el análisis de las secuencias de las bases de nucleótidos de la región ITS5.8 S no fue posible determinar con precisión la identidad de la cepa Smeg4 como *H. anthochroum* o *H. griseobrunneum*, el complejo patrón de conidióforos en rama (Barnett & Hunter, 1998), similar a *Nodulisporium*, presente en la cepa, confirmó su identificación como *H. anthochroum* (teleomorfo de *Nodulisporium* sp., **Figura 1**) y no como *H. griseobrunneum* que tiene una estructura de rama similar a *Vigariella* (Ju, Y.M.; Rogers, 1996; Kuhnert et al., 2013; Macías-Rubalcava et al., 2018).

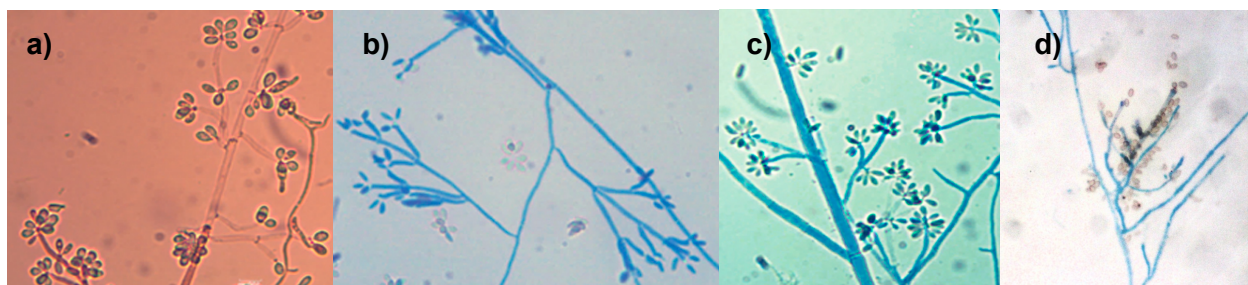


Figura 1. Micrografías del hongo endófito *Hypoxylon anthochroum* Smeg4 teñidas con rojo congo (a) y azul de lactofenol (b, c y d), observadas a 40x y 100x (Roque-Flores, 2017).

El aislamiento endofítico Smeg4 corresponde a la especie *Hypoxylon anthochroum*, el cual es una especie aislada de otras plantas estudiadas de la reserva de la biosfera sierra de Huautla (Macías-Rubalcava et al., 2018; Sánchez-Fernández et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016).

2. ACTIVIDAD FITOTÓXICA DE LA MEZCLA DE VOCs PRODUCIDOS POR *H. ANTHOCHROUM*.

En el presente trabajo se llevó a cabo la determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de la mezclas de VOCs producidos en diferentes días de crecimiento del hongo endófito *H. anthochroum* Smeg4 aislado de hojas de *S. macrocarpum* sobre los procesos de germinación, crecimiento de la raíz y respiración de cuatro plantas modelo consideradas malezas; *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*, utilizando la técnica de fase gas (Ulloa-Benítez et al., 2016). A continuación, se presentan los resultados obtenidos.

En la **Figura 2.a.** se muestra el efecto fitotóxico de la mezcla de VOCs sobre las semillas de *A. hypochondraicus*. Se observa que el endófito *H. anthochroum* Smeg4 produce VOCs con potencial fitotóxico significativo desde el día cero de inoculación, siendo la mezcla de VOCs biosintetizados a los 3 y 5 días de crecimiento en medio PDA, los que poseen la mayor actividad fitotóxica. Al día 3 de crecimiento la mezcla de VOCs provocó inhibición de más del 40% sobre crecimiento de la raíz y la respiración de las plántulas. Al día 5 los VOCs inhibieron los tres procesos fisiológicos evaluados con valores superiores al 75%.

En la **Figura 2.b** se presenta efecto fitotóxico ocasionado por la mezcla de VOCs sobre las semillas de *P. miliaceum*. Se observa que la mezcla de VOCs tiene mayor actividad fitotóxica sobre el crecimiento de raíz, afectando significativamente desde el día cero hasta el día 10, siendo los días 3 y 5 los que más afectaron, mostrando valores superiores al 30% de inhibición. La mezcla de VOCs estimuló significativamente la respiración de las plántulas de *P. miliaceum*, a todos los días de bioensayo, con porcentajes en el intervalo del 10-15%

En la **Figura 2.c.** se aprecia la actividad fitotóxica de la mezcla de VOCs sobre las semillas de *T. pratense*. Se observa que la mezcla de VOCs afectó sólo el crecimiento de raíz y la respiración de las semillas de *T. pratense*. El crecimiento de raíz fue el proceso más afectado con porcentajes de inhibición significativos y superiores al 20%, siendo el día 5 de cultivo previo el de mayor inhibición con un 28%. La mayor actividad fitotóxica sobre la respiración se observó en presencia de los VOCs al día 7 con una inhibición del 35%.

Por último, en la **Figura 2.d.** se muestra la actividad fitotóxica de la mezcla de VOCs empleando semillas de *M. sativa* como planta de prueba. Se aprecia que la mezcla de VOCs tiene efecto significativo sobre el crecimiento de raíz desde el día cero hasta el día 20. La actividad inhibitoria sobre el crecimiento de raíz fue superior al 20% para los días 0, 3 y 5, siendo el día 5 el de mayor inhibición con un 25%. Por otra parte, la mezcla de VOCs estimuló significativamente la respiración de las plántulas de *M. sativa*, provocando porcentajes en el intervalo del 10-30%, a los días 3, 5 y

7 de bioensayo, siendo los VOCs producidos al día 3 los que estimularon en mayor grado causando un 30%.

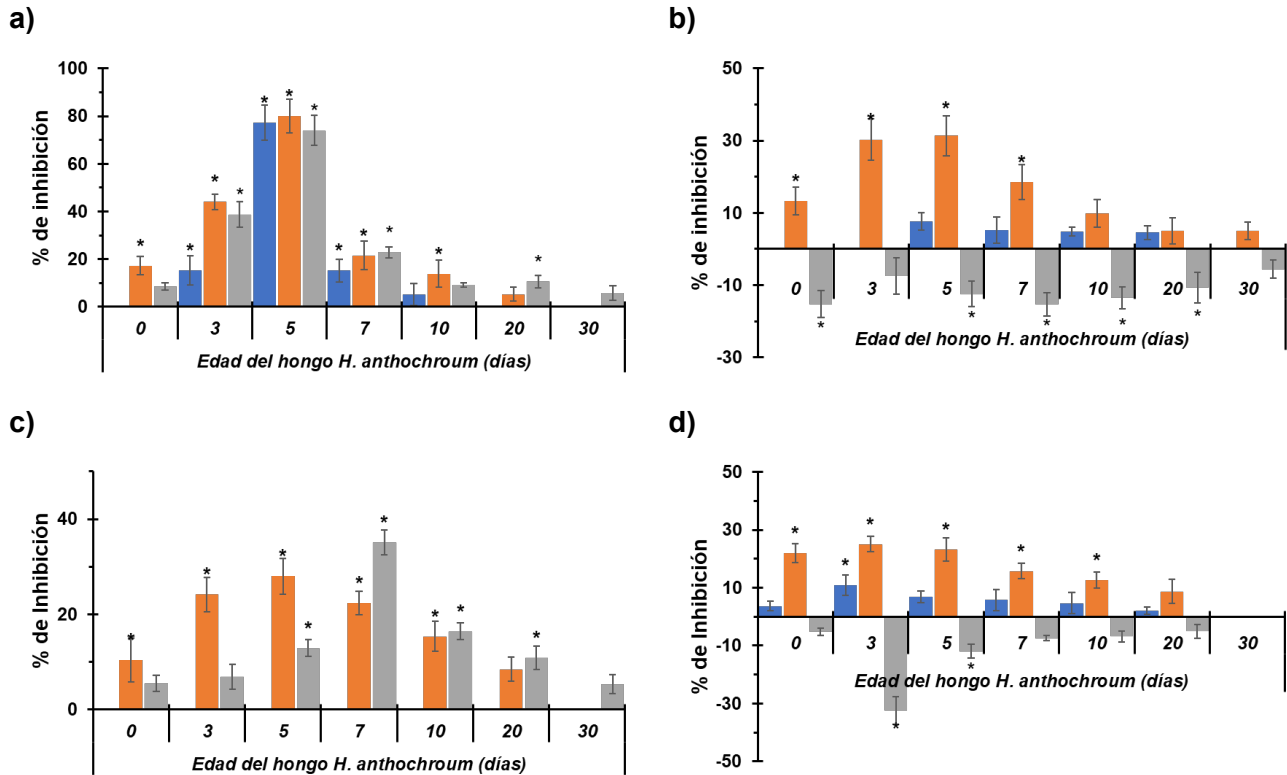


Figura 2. Efecto fitotóxico de la mezcla de compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito *H. anthochroum* aislamiento Smeg4 a los 0, 3, 5, 7, 10, 20 y 30 días de crecimiento, sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las semillas de a) *A. hypochondriacus*, b) *P. miliaceum*, c) *T. pratense* y d) *M. sativa*. Las barras representan el promedio de cuatro repeticiones. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$).

En resumen, los VOCs biosintetizados por el hongo endófito *H. anthochroum* Smeg4 poseen potencial fitotóxico y se producen principalmente a los días 3-7 de crecimiento. La mezcla de VOCs afectó principalmente el crecimiento de raíz de las cuatro semillas de prueba, siendo las semillas de *A. hypochodriacus*, *P. miliaceum* y *T. pratense* las más afectas con valores significativos superiores al 28% de inhibición. En general, la germinación fue el proceso fisiológico menos afectado. La mezcla de VOCs inhibió la respiración de las plantas *A. hypochodriacus* y *T. pratense* con valores de 73% y 35% de inhibición, respectivamente. Asimismo, estimuló la respiración de las plántulas de *P. miliaceum* y *M. sativa*, con porcentajes en el intervalo del 10-30%, esta observación permite inferir la presencia de VOCs con efecto sobre la respiración actuando como desacoplantes. Los agentes desacoplantes, a diferencia de los inhibidores de la

cadena respiratoria, provocan una disminución del gradiente electroquímico de protones, ocasionando un aumento, es decir, los desacoplantes alteran el potencial de membrana, lo que conlleva a la aceleración de la cadena respiratoria hasta su máxima capacidad (Jacoby et al., 2015).

Las semillas de *A. hypochondriacus* fueron las más afectadas por la presencia de la mezcla de VOCs, generando valores superiores al 75% inhibición sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración al día 5 de crecimiento.

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS VOCs PRODUCIDOS POR EL HONGO *H. ANTHOCHROUM* SMEG4

Una vez establecido el potencial fitotóxico de la mezcla de VOCs producidos en diferentes días de crecimiento del endófito *H. anthochroum* Smeg4 sobre malezas, se identificaron los compuestos responsables de la actividad biológica, al día 5 de crecimiento debido a que los VOCs biosintetizados en este tiempo presentaron la mayor actividad fitotóxica. La determinación cualitativa y cuantitativa se llevó a cabo utilizando microextracción en fase sólida (SPME) seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

En las **Figura 3** se muestra la diversidad química de compuestos identificados en la mezcla de VOCs al día 5 de crecimiento sobre PDA 2%. Se identificaron 26 compuestos: un alcano, cuatro alcoholes, un éster, dos furanos y 18 terpenos (12 monoterpenos y seis sesquiterpenos). Los compuestos más afines a la fibra fueron los monoterpenos eucaliptol y *d*-limoneno con áreas relativas de 19.7% del área total. El tercer compuesto más afín a la fibra fue un derivado de azuleno (tiempo de retención 10.65 min; **Cuadro 2**), con un área del 10.2%. El alcohol más abundante fue el 3-metil-1-butanol con 4.94%.

En la **Figura 4** se muestra a manera de ejemplo, un cromatograma de gases obtenido a partir de la inyección de la mezcla de VOCs producidos por el hongo *H. anthochroum* SMeg4 analizada por cromatografía. Los compuestos fueron identificados por espectrometría de masas, mediante la comparación de los patrones de fragmentación de los espectros de masas comparados con los de la base de datos del NIST. En la **Figura 5** se muestra, el patrón de fragmentación del alcohol feniletílico, el porcentaje de similitud fue del 97.4%. Asimismo, los componentes de la mezcla fueron identificados por la comparación de los índices de Kovats experimentales con los reportados en la literatura. Además, algunos compuestos fueron identificados por la comparación de los espectros de masas de estándares puros.

La abundancia relativa de los componentes individuales de la mezcla de VOCs se expresó como porcentajes del área de los picos en relación al área total y como un promedio de tres repeticiones. En el **Cuadro 2** se resume la composición de la mezcla de VOCs identificados.

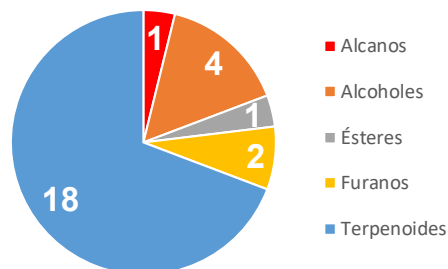


Figura 3. Composición de la mezcla de VOCs producidos por el hongo *H. anthochroum* Smeg4 a los 5 días de crecimiento en agar papa dextrosa al 2%.

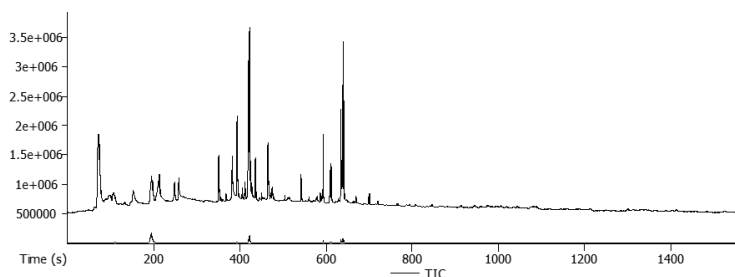


Figura 4. Cromatograma de la mezcla de compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito *H. anthochroum* aislamiento Smeg4 a los 5 días de crecimiento en medio PDA al 2%.

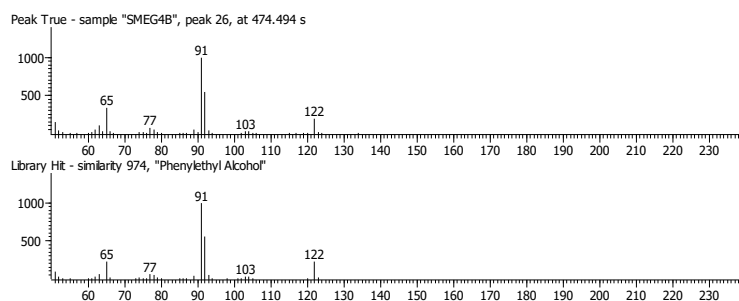


Figura 5. Comparación de los espectros de masas del alcohol fenilético: En la parte superior se observa el espectro experimental y en la parte inferior el registrado en la base de datos del NIST.

Cuadro 2. Compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito *H. anthochroum* aislamiento Smeg4 a los 5 días de crecimiento en medio PDA, colectados de la fase de vapor por SPME e identificados por cromatografías de gases-espectrometría de masas.

# ¹	T.R. (min)	Nombre	Área%	IR _{Exp}	IR _{Lit}	P.M.	Fórmula Molecular	CAS	Id.
1	2.55	2,5-dimetilfurano	2.61	692	693	96	C ₆ H ₈ O	625-86-5	I.K., E.M.
2	2.62	Propanoato de etilo	0.82	697	705	102	C ₅ H ₁₀ O ₂	105-37-3	I.K., E.M.
3	3.26	3-metil-1-butanol	4.94	742	741	88	C ₅ H ₁₀	123-51-3	I.K., E.M., S.
4	3.31	2-metil-1-butanol	1.51	745	743	88	C ₅ H ₁₀	137-32-6	I.K., E.M., S.
5	5.85	α-tujeno	2.48	929	930	136	C ₁₀ H ₁₆	2867-05-2	I.K., E.M.
6	6.39	4-metilen-1-(1-metiletil)-biciclo[3.1.0]-hexano	3.47	977	977	136	C ₁₀ H ₁₆	3387-41-5	I.K., E.M.
7	6.56	β-mirceno	4.74	992	992	136	C ₁₀ H ₁₆	123-35-3	I.K., E.M.
8	6.57	2-pentilfurano	4.68	994	996	138	C ₉ H ₁₄ O	3777-69-3	E.M.
9	6.75	α-felandreno	0.80	1012	1010	136	C ₁₀ H ₁₆	99-83-2	I.K., E.M.
10	6.86	α-terpineno	0.92	1024	1017	136	C ₁₀ H ₁₆	99-86-5	I.K., E.M.
11	6.98	p-cimeno	7.66	1038	1030	134	C ₁₀ H ₁₄	99-87-6	I.K., E.M.
12	7	d-limoneno	19.72	1041	1032	136	C ₁₀ H ₁₆	5989-27-5	I.K., E.M., S.
13	7.03	Eucaliptol	19.73	1044	1046	154	C ₁₀ H ₁₈ O	470-82-6	I.K., E.M., S.
14	7.12	β-ocimeno	1.70	1055	1052	136	C ₁₀ H ₁₆	3779-61-1	I.K., E.M., S.
15	7.26	γ-terpineno	1.98	1070	1060	136	C ₁₀ H ₁₆	99-85-4	I.K., E.M., S.
16	7.42	1-octanol	0.30	1089	1078	130	C ₈ H ₁₈ O	111-87-5	I.K., E.M.
17	7.51	α-terpinoleno	0.36	1099	1089	136	C ₁₀ H ₁₆	586-62-9	I.K., E.M., S.

#: Número del compuesto identificado; T.R.: Tiempo de retención; IR_{exp}: Índices de Kovats calculados a partir de los datos de tiempos de retención en una columna capilar DB-5MS; IR_{Lit}: Índices de Kovats reportados en la literatura (Adams, 2007; NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>); Chemspider (<http://www.chemspider.com/>); PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); mVOCs Database (<http://bioinformatics.charite.de/mvoc/index.php?site=mvocsearch>)); P.M.: Peso molecular; CAS: número de registro CAS; Id.: Identificación del posible compuesto por espectrometría de masas (E.M.), Índice de Kovats (I.K.) y/o muestra auténtica (S). Los compuestos con una similitud menor al 80% en los patrones de fragmentación de la espectrometría de masas fueron eliminados.



Cuadro 2. Compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito *H. anthochroum* aislamiento Smeg4 a los 5 días de crecimiento en medio PDA, colectados de la fase de vapor por SPME e identificados por cromatografías de gases-espectrometría de masas (**Continuación**).

#1	T.R. (min)	Nombre	Área%	IR _{Exp}	IR _{Lit}	P.M.	Fórmula Molecular	CAS	Id.
18 ²	7.86	2,6-dimetil-2E,4Z,6-octatrieno	0.43	1139	1131	136	C ₁₀ H ₁₆	7216-56-0	I.K., E.M.
19	7.91	Alcohol feniletílico	1.02	1145	1121	122	C ₈ H ₁₀ O	60-12-8	E.M., S.
20	8.39	2,6,10,14-tetrametil- heptadecano	0.17	1200	1221	296	C ₂₁ H ₄₄	18344-37-1	E.M.
21	9.66	Cariofileno-(I1)	0.78	1376	---	204	C ₁₅ H ₂₄	---	E.M.
22	9.76	β-elemeno	0.70	1390	1392	204	C ₁₅ H ₂₄	515-13-9	I.K., E.M.
23	9.88	Elemeno	2.74	1408	1392	204	C ₁₅ H ₂₄	515-13-9	E.M.
24	10.19	α-guaieno	1.66	1456	1457	204	C ₁₅ H ₂₄	3691-12-1	I.K., E.M.
25	10.56	3,7,7-trimetil-11-metilen-spiro[5.5]undec-2-eno	3.85	1515	1499	204	C ₁₅ H ₂₄	18431-82-8	E.M.
26	10.65	[1S-(1α,7α,8αβ)]- 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-dimetil-7-(1-metileténil)-, azuleno. (bulneseno)	10.20	1529	1526	204	C ₁₅ H ₂₄	3691-11-0	I.K., E.M.

#: Número del compuesto identificado; T.R.: Tiempo de retención; IR_{exp}: Índices de Kovats calculados a partir de los datos de tiempos de retención en una columna capilar DB-5MS; IR_{Lit}: Índices de Kovats reportados en la literatura (Adams, 2007; NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>); Chemspider (<http://www.chemspider.com/>); PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); mVOCs Database (<http://bioinformatics.charite.de/mvoc/index.php?site=mvocsearch>)); P.M.: Peso molecular; CAS: número de registro CAS; Id.: Identificación del posible compuesto por espectrometría de masas (E.M.), Índice de Kovats (K) y/o muestra auténtica. Los compuestos con una similitud menor al 80% en los patrones de fragmentación de la espectrometría de masas fueron eliminados.



Algunos de los compuestos identificados en la mezcla de VOCs producidos por *H. anthochroum* aislamineto Smeg4, han sido reportados en otras mezclas bioactivas de VOCs producidas por aislamientos endofíticos, lo que justifica la actividad biológica observada.

El alcohol 3-metil-1-butanol se ha identificado en la mezcla de VOCs producidos por el hongo endófito *Muscodor albus*, este compuesto es el segundo metabolito más abundante en la mezcla, la cual ha evidenciado actividad antibacteriana y antifúngica contra: *Pythium ultimum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Ustilago hordei*, *Stagnospora nodorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Verticillium dahliae*, *Cercospora beticola*, *Tapesia yallundae*, *Xylaria* sp., *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* (Sears et al., 2001). Además, ha sido reportado en la mezcla de VOCs producido por el endófito *Gliocladium* sp., en donde mostró actividad antimicrobiana contra el hongo *V. dahliae* y el oomiceto *P. ultimum* (Stinson et al., 2003). El 3-metil-1-butanol también, ha sido identificado en la mezcla bioactiva de VOCs producidos por el hongo *M. fengyangensis* sp. nov., y la mezcla fue inhibió el crecimiento de hongos y oomicetos: *Botrytis cinerea*, *Aspergillus clavatus*, *Colletotrichum fragariae*, *Didymella bryoniae*, *Magnaporthe oryzae*, *P. ultimum*, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* y *V. dahliae* (Lin et al., 2010). También se ha identificado como el compuesto mayoritario en la mezcla de VOCs producidos por el endofito *Phomopsis* sp.; los VOCs producidos por este microorganismo mostraron actividad antifúngica contra *S. sclerotiorum* (Geary et al., 2011). El 3-metil-1-butanol, también fue identificado como un componente mayoritario en la mezcla de VOCs producidos por el hongo *Xylaria* sp. PB3f3, el cual evidenció efecto fitotóxico sobre el crecimiento de la raíz y la germinación de *A. hypochondriacus* y de *Solanum lycopersicum* (Sánchez-Ortiz et al., 2016).

El alcohol 2-metil-1-butanol se ha identificado como el compuesto mayoritario contenido en la mezcla bioactiva de VOCs producidos por *Xylaria* sp. PB3f3 a los 20 días de crecimiento; la mezcla evidenció actividad fitotóxica sobre la germinación, crecimiento de raíz y respiración de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*. En este mismo trabajo, se demostró que el alcohol 2-metil-1-butanol tiene actividad fitotóxica, inhibiendo el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* con una IC₅₀ de 4.59 µg/mL (Sánchez-Ortiz et al., 2016). Por otra parte, el 2-metil-1-butanol ha sido identificado en la mezcla de VOCs producidos por *Daldinia* cf. *concentrica*, esta mezcla evitó el desarrollo de *Alternaria alternata* y *B. cinerea* en frutas secas y eliminó la infección por *A. niger* en el maní. El compuesto puro inhibió el crecimiento de *A. alternata* y *B. cinerea* (Liarzi et al., 2016).

El alcohol feniletílico ha sido identificado como uno de los constituyentes químicos volátiles producidos por *Camellia sinensis*, por lo que se estudió de manera independiente sobre el hongo *Colletotrichum camelliae* Masee, agente causal de antracnosis de las hojas de té (*C. sinensis*). El

alcohol inhibió el crecimiento fúngico en más del 70% a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Zhang et al., 2006). En otro estudio se exploró el potencial antifúngico del alcohol feniletílico sobre *C. gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis o chancro en *Persea americana* Mill (aguacate), café (*Coffea arabica*) y cítricos (*Citrus* sp), inhibiendo el crecimiento del hongo en más del 50% a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Nidiry, 2003). El alcohol feniletílico se ha identificado en varias mezclas bioactivas de VOCs producidos por los hongos endófitos; *M. albus* (Sears et al., 2001), *Gliocladium* sp. (Lin et al., 2010), y *M. fengyangensis* sp. Nov. (Stinson et al., 2003) cuyas mezclas de VOCs inhibieron el crecimiento de hongos, oomicetos y/o bacterias. También, el alcohol feniletílico se ha identificado en la mezcla de VOCs producidos por el hongo endófito *H. anthochroum* aislamiento Blaeg1, Gseg1 (Medina-Romero et al., 2017) y Haeg2 (Macías-Rubalcava et al., 2018); la mezcla de VOCs producidos por el endófito evidenció actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, por lo que se estudió el efecto inhibitorio de diferentes compuestos puros presentes en la mezcla de VOCs, uno de ellos el alcohol feniletílico sobre daños morfológicos (Macías-Rubalcava et al., 2018) y sobre la membrana del hongo fitopatógeno, mostrando en ambos casos efectos negativos importantes (Medina-Romero et al., 2017). Además, el alcohol feniletílico ha sido sugerido como un conservador de cosméticos por su actividad antimicrobiana (Sirilun et al., 2017).

El eucaliptol (1-8-cineol) es el compuesto mayoritario de la mezcla de VOCs producidos por el aislamiento endofítico *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34. Esta mezcla de VOCs inhibe y/o mata a los fitopatógenos: *Penicillium digitatum* y *P. expansum* (Suwannarach et al., 2013). La mezcla de VOCs producida por el hongo endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a también estaba constituida principalmente por eucaliptol (33%) al día 3 de crecimiento del endófito creciendo en PDA, y evidenció actividad antifúngica sobre *F. oxysporum* y antioomiceto contra *P. parasitica*, *P. cinnamomi* y *P. capsici* (Sánchez-Fernández et al., 2016). De igual forma, la mezcla de VOCs producidos por el endófito *H. anthochroum* Blaci estaba conformada principalmente por eucaliptol, y demostró actividad antifúngica sobre *A. alternata* a los 10 días de crecimiento en medio PDA. Además, produjo inhibición sobre los procesos de germinación, crecimiento de raíz y respiración de las malezas *A. hypochondriacus*, *P. miliaceum*, *T. pratense* y *M. sativa*. En este trabajo se comprobó la actividad fitotóxica del eucaliptol, afectando los tres procesos evaluados sobre las semillas de *A. hypochondriacus* en más del 40% a la concentración de 75 $\mu\text{g/mL}$ (Ulloa-Benítez et al., 2016). En un estudio *In vivo*, se cuantificó la actividad antifúngica del eucaliptol sobre *F. oxysporum* creciendo sobre jitomate cherry, el cual mostró una IC_{50} de 167.7 $\mu\text{g/mL}$ (Medina-Romero et al., 2017). El eucaliptol ha sido identificado como componente principal de los VOCs producidos por los endófitos *H. anthochroum* aislamientos: Blaeg1, Gseg1 y Haeg2 crecidos sobre

medio arroz al día 5 de crecimiento. La mezcla de VOCs producidos por los endófitos inhibieron el crecimiento, la respiración y causaron daños morfológicos sobre el hongo *F. oxysporum* (Macías-Rubalcava et al., 2018). En un estudio realizado por Morcia et al. (2011), se determinó la actividad antifúngica del eucaliptol contra: *F. subglutinans*, *F. cerealis*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius*, *A. alternata* y *Penicillium* sp. Además, el eucaliptol es un componente principal de diferentes aceites esenciales de plantas, los cuales han demostrado tener actividad antifúngica (Cárdenas-Ortega et al., 2005; Pitarokili et al., 2003).

El compuesto 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-dimetil-7-(1-metiletenil)-,[1S-(1 α ,7 α ,8 α β)]- azuleno, comúnmente llamado bulneseno, fue uno de los compuestos más afines a la fibra. El bulneseno se ha identificado en mezclas de VOCs producidos por *M. albus* crecido sobre diferentes sustratos (Atmosukarto et al., 2005; Ezra & Strobel, 2003; Sears et al., 2001), así como en las mezclas de VOCs de diferentes aislamientos endófitos; *M. brasiliensis* sp. (Savi et al., 2019), *M. fengyangensis* sp. (Lin et al., 2010), *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 (Suwannarach et al., 2013) y *Xylaria* sp. PB3f3 (Sánchez-Ortiz et al., 2016).

Con base en la capacidad de producir una gran diversidad de VOCs con actividad antimicrobiana, el género de *Muscodor* se ha utilizado como agente de biocontrol en el desarrollo de enfermedades postcosecha de uvas durante su transporte (Gabler et al., 2010) y almacenaje de duraznos (Schnabel & Mercier, 2006). También se ha utilizado para prevenir el daño provocado por hongos en cereales (Lin et al., 2010). De igual forma, la especie *H. anthochroum* ha sido reportada como productora de VOCs que muestran diferencias cualitativas y cuantitativas en los metabolitos que biosintetiza y en su actividad biológica, dependiente de la planta hospedera de la que se aisló y del medio cultivo del microorganismo. La mezcla de VOCs posee actividad antimicrobiana sobre hongos y oomicetos fitopatógenos, poniendo en evidencia su potencial para el desarrollo de un agente de control biológico postcosecha o como una fuente de bioplaguicidas para el control de *F. oxysporum* (Macías-Rubalcava et al., 2018; Medina-Romero et al., 2017; Sánchez-Fernández et al., 2016; Ulloa-Benítez et al., 2016).

4. ACTIVIDAD FITOTÓXICA DE VOCs SELECTOS PRODUCIDOS POR *H. ANTHOCHROUM*

La mezcla de compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito *H. anthochroum* Smeg4 tiene actividad fitotóxica significativa sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las cuatro malezas de prueba (**Sección 2 y 3**). Con la finalidad de evidenciar algunos de los compuestos responsables de la actividad fitotóxica, se exploró el potencial fitotóxico

de seis VOCs puros (3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, alcohol feniletílico, eucaliptol, ocimeno y terpinoleno).

En la mezcla de VOCs producidos por *H. anthochroum* Smeg4 al día 5 de crecimiento, y que corresponde al día de mayor actividad fitotóxica, se identificaron cuatro alcoholes y 12 monoterpenos como los dos grupos químicos de mayor presencia en la mezcla de VOCs (**Figura 3** y **Cuadro 2**). El alcohol feniletílico, el 2-metil-1-butanol y el 3-metil-1-butanol se seleccionaron como parte de los alcoholes más afines a la fibra. Por otra parte, también se eligieron a los monoterpenos: eucaliptol, ocimeno y terpinoleno, los dos primeros también forman parte de los constituyentes más afines a la fibra y por lo tanto de los más abundantes. Cabe señalar que los compuestos seleccionados pertenecen a dos de los grupos químicos más abundantes en las mezclas de VOCs biosintetizados por microorganismos, incluyendo a los hongos endófitos del género *Hypoxylon*. Además, como se mencionó en la sección anterior los seis compuestos seleccionados han mostrado diversas actividades biológicas, actuando como antifúngicos, antioomicetos, antibacterianos y herbicidas, entre otros (Alpha et al., 2015; Booth et al., 2011; Kanchiswamy et al., 2015; Macías-Rubalcava et al., 2018; Sánchez-Fernández et al., 2016; Spakowicz & Strobel, 2015; Suwannarach et al., 2013; Ulloa-Benítez et al., 2016).

Con el fin de evidenciar si los alcoholes o los terpenos tienen mayor contribución en el potencial fitotóxico ocasionado por la mezcla de VOCs producidos por *H. anthochroum* Smeg4 creciendo en PDA, se evaluó la mezcla los seis VOCs selectos (5 µg/mL), de los tres monoterpenos (5 y 500 µg/mL) y de los tres alcoholes (5 µg/mL) en mezcla, empleando el método de fase gas.

4.1. Mezcla de monoterpenos y alcoholes

La mezcla de alcoholes (MA) y la mezcla total (*Mtot*) afectaron significativamente los tres procesos fisiológicos estudiados a la concentración de 5 µg/mL (**Figura 6**). En general, provocaron valores de inhibición significativos y superiores al 50%. La mezcla de monoterpenos no mostró actividad fitotóxica sobre los procesos evaluados a la misma concentración de prueba.

En la **Figura 6**, se observa que las mezclas de alcoholes (MA) y total (*Mtot*) a la concentración de 5 µg/mL afectaron significativamente los tres procesos fisiológicos estudiados. En general, causaron valores de inhibición significativos y superiores al 50%. Por otra parte, a la misma concentración, la mezcla de terpenos no mostró actividad fitotóxica sobre los procesos evaluados a la concentración de prueba.

En la **Figura 6.a** se muestra efecto fitotóxico causado por las diferentes mezclas de compuestos sobre la germinación de las plantas prueba. De las cuatro semillas blanco, tres de ellas

(*A. hypochondriacus*, *T. pratense* y *M. sativa*) fueron inhibidas en un 100% por la presencia de la *MA* y *Mtot*. El efecto inhibitorio sobre la germinación de *P. miliaceum* causado por la *Mtot* fue del 53%, valor superior al efecto fitotóxico producido por la *MA* (36%), lo que sugiere que los monoterpenos generan un efecto sinérgico en mezcla con los alcoholes.

En la **Figura 6.b** se observa que el crecimiento de la raíz de las semillas *A. hypochondriacus*, *T. pratense* y *M. sativa* se inhibió en un 100% por la presencia de la *MA* y la *Mtot*. Las semillas de *P. miliaceum* se inhibieron significativamente y en más del 57% por la presencia de la *MA* y en más del 61% por la *Mtot*. Cabe señalar que entre ambos tratamientos no hubo diferencia significativa, lo que permite inferir que el efecto inhibitorio producido por las mezclas depende sólo de la presencia de los alcoholes.

En la **Figura 6.c** se resume el efecto fitotóxico sobre la respiración de las plantas prueba. En general, los tratamientos con la *MA* y la *Mtot* inhibieron significativamente y en más del 45% el proceso de respiración. La respiración de las semillas de *A. hypochondriacus* fue la más afectada con valores de inhibición del 85% en presencia de la *MA* y la *Mtot*. La respiración de las semillas de *T. pratense* y *M. sativa* se inhibió significativamente en un 65% por la *MA* y la *Mtot*. Para las semillas de *A. hypochondriacus*, *T. pratense* y *M. sativa*, el efecto fitotóxico observado no fue estadísticamente significativo entre tratamientos, lo que permite inferir de nueva cuenta que la presencia de los alcoholes en la mezcla son los responsables de la inhibición sobre la respiración.

La *MA* y la *Mtot* provocaron mayor efecto fitotóxico sobre las semillas de malezas dicotiledóneas.

Con base en el efecto fitotóxico de las mezclas *MA* y *Mtot* a la concentración de 5 µg/mL, la actividad biológica causada por la mezcla de VOCs biosintetizados por el hongo endófito *H. anthochroum* Smeg4 (**Sección 2**) puede ser atribuida en gran medida a la presencia de los alcoholes feniletílico, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol.

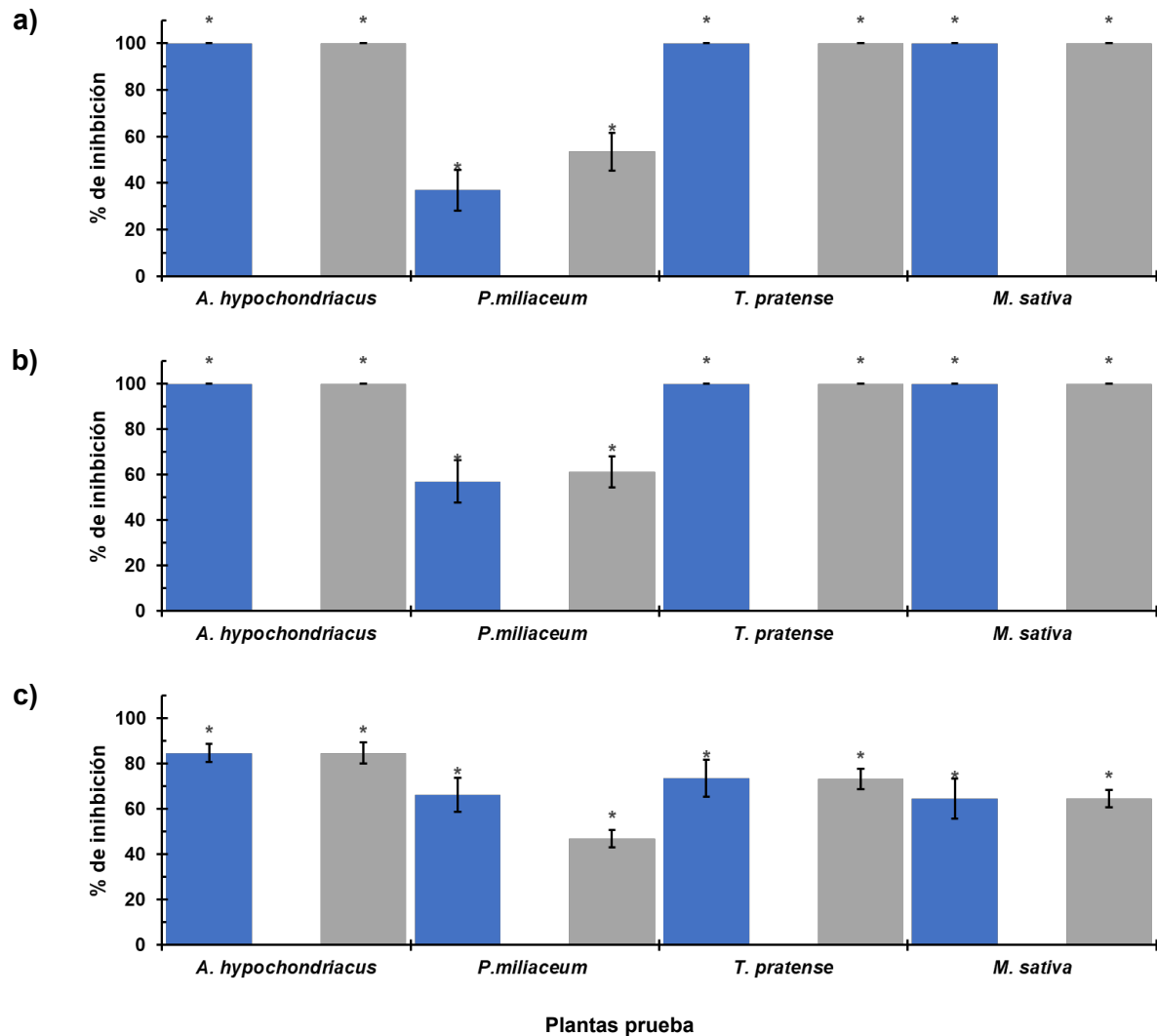


Figura 6. Efecto fitotóxico de la ■ mezcla de alcoholes (alcohol feniletílico, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol), ■ mezcla de terpenos (eucaliptol, ocimeno y terpinoleno) y ■ mezcla total (alcoholes y terpenos) identificados en la mezcla de VOCs producidos por *H. anthochroum* Smeg4 a la concentración de 5 µg/mL, sobre: **a)** germinación, **b)** crecimiento de raíz y **c)** respiración de cuatro malezas con impacto negativo en la agricultura. Las barras representan el promedio de cuatro repeticiones. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$).

Tomando en cuenta que la mezcla de monoterpenos no evidenció efecto inhibitorio sobre los procesos fisiológicos evaluados sobre las plantas prueba a la concentración de 5 µg/mL, se realizó una determinación a mayor concentración (500 µg/mL), los resultados se discuten en la siguiente sección.

4.2. Evaluación de alcohol feniletílico, eucaliptol y mezcla de terpenos

Como se señaló en la sección 3 el alcohol feniletílico (AFE) y eucaliptol (E), han sido identificados en mezcla de VOCs bioactivos producidos por diversos microorganismos, ambos compuestos

tienen actividad antimicrobiana (Nidiry, 2003; Sánchez-Fernández et al., 2016; Zhang et al., 2006), en consecuencia es posible que también posean actividad fitotóxica. En este sentido, se evaluó el potencial fitotóxico causado por el *AFE*, el *E* y la mezcla de terpenos (*MT*) a la concentración de 500 µg/mL, en donde se observa un efecto fitotóxico significativo sobre alguno de los tres procesos fisiológicos estudiados en presencia del *AFE*, el *E* o *MT* en al menos una de las plantas prueba.

En la **Figura 7.a.** se muestra el efecto sobre la germinación de las plantas prueba. Se observa que en presencia de los tres tratamientos las semillas más afectadas fueron las de *A. hypochondriacus*. Los compuestos puros *AFE* y el *E* inhibieron significativamente y en más del 90% la germinación de *A. hypochondriacus*, mientras que la *MT* inhibió en más del 50%. La germinación de *P. miliaceum* se inhibió en 21% y 40% por el *E* y la *MT*, respectivamente, lo que permite sugerir un efecto fitotóxico sinérgico ocasionado por la presencia de los terpenos contenidos en la *MT*.

En la **Figura 7.b.** se resume la inhibición sobre el crecimiento de raíz de las plantas prueba. En general los tres tratamientos evaluados inhibieron en al menos el 60% el crecimiento de la raíz de las cuatro malezas, siendo este proceso fisiológico el más afectado bajo estas condiciones. El tratamiento con *E* afectó significativamente el crecimiento de las cuatro semillas en más del 90%. Las semillas de *A. hypochondriacus* fueron las más sensibles con valores de inhibición superiores al 85% bajo los tres tratamientos utilizados.

En la **Figura 7.c.** se aprecia el efecto fitotóxico causado por el *E*, *AFE* y la *MT* sobre la respiración de las semillas de prueba. Las semillas de *A. hypochondriacus* y *P. miliaceum* fueron las semillas más afectadas en presencia de los tres tratamientos inhibiendo en más del 50% su respiración.

Cabe señalar que en general la actividad fitotóxica ejercida por todos los tratamientos (*MT*, *E* y *AFE*) es igual o superior al 50%, sin embargo, la concentración de la *MA* y la *Mtot* fue 100 veces menor (5 µg/mL). Estos resultados permiten inferir que la actividad observada en la sección 2 fue causada esencialmente por la presencia de los alcoholes 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol. Por otra parte, corroboran que las mezclas de VOCs biosintetizados por microorganismos actúan de manera sinérgica (Medina-Romero et al., 2017).

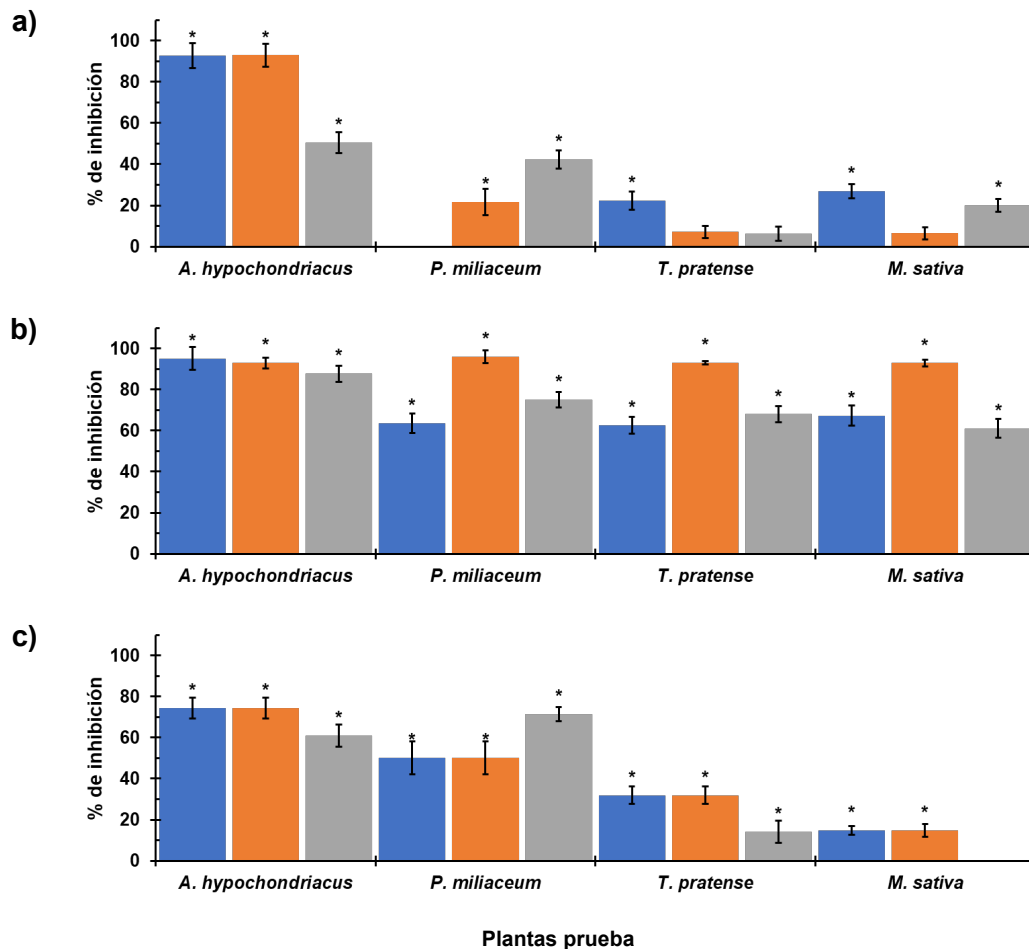


Figura 7. Efecto fitotóxico de la ■ alcohol fenilético, ■ eucaliptol y ■ mezcla de terpenos (eucaliptol, ocimeno, terpinoleno) identificados en la mezcla de VOCs producidos por *H. anthochroum* Smeg4 a la concentración de 500 µg/mL, sobre: **a)** germinación, **b)** crecimiento de raíz y **c)** respiración de cuatro malezas con impacto negativo en la agricultura. Las barras representan el promedio de cuatro repeticiones. *Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$).

VI. CONCLUSIONES

La identificación taxonómica del aislamiento endofítico Smeg4 mediante métodos moleculares permitió establecer su identidad como *Hypoxylon anthochroum*. El complejo patrón de conidióforos en rama corroboró la especie como *H. anthochroum*.

El hongo endófito *H. anthochroum* Smeg4 produce compuestos orgánicos volátiles con actividad fitotóxica sobre la germinación, crecimiento de la raíz y la respiración de cuatro malezas con impacto negativo en la agricultura: *A. hypochondriacus*, *T. pratense*, *M. sativa* y *P. miliaceum*.

Los VOCs producidos al día 5 de crecimiento del endófito poseen el mayor potencial fitotóxico, al inhibir significativamente el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba. Las semillas de *A. hypochondriacus* fueron las más afectadas con valores superiores al 75% inhibición.

Se identificaron 26 compuestos en la mezcla de VOCs producidos por *H. anthochroum* Smeg4 al día 5 de crecimiento: un alcano, cuatro alcoholes, un éster, dos furanos, 12 monoterpenos y seis sesquiterpenos. Los tres compuestos más afines a la fibra fueron los monoterpenos eucaliptol (19.73%) y *d*-limoneno (19.72%), bulneseno (10.20%) y el 3-metil-1-butanol (4.94%).

El efecto fitotóxico causado por la presencia de la mezcla de alcohol feniletílico, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol, fue más activa que la mezcla de los monoterpenos; eucaliptol, ocimeno, terpinoleno a la concentración de 5 µg/mL. La actividad fitotóxica provocada por la mezcla total depende principalmente de la presencia de los alcoholes.

El efecto fitotóxico generado en presencia de la mezcla de los tres alcoholes a la concentración de 5 µg/mL fue mayor que el ocasionado por el alcohol feniletílico a 500 µg/mL; en consecuencia, es posible que los alcoholes 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol sean más fitotóxicos que el alcohol feniletílico o exista un efecto sinérgico entre los tres alcoholes.

VII. PERSPECTIVAS

- ❖ Establecer la actividad fitotóxica de la mezcla de VOCs producida por el hongo *H. anthochroum* aislamiento Smeg4 a los días 3, 4, 5, 6 y 7 de crecimiento, sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las cuatro plantas prueba, mediante la técnica de fase gas, con la finalidad de corroborar si la mezcla de VOCs al día 5 de crecimiento del endófito es la más activa.
- ❖ Determinar las concentraciones inhibitorias medias (IC₅₀), del efecto fitotóxico de los seis VOCs selectos (tres alcoholes y tres terpenos) puros y en mezclas (*MA*, *MT* y *Mtot*), sobre la germinación, el crecimiento de raíz y la respiración de las cuatro malezas con impacto negativo en la agricultura, utilizando el método de fase gas.
- ❖ Establecer el modo de acción de los seis VOCs selectos puros y en mezclas sobre la cadena respiratoria mitocondrial, empleando mitocondrias aisladas de *M. sativa*, y sobre la integridad de la membrana mitocondrial empleando fluoróforos.

VIII. REFERENCIAS

- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (4th ed.). Allured Pub Corp.
- Alpha, C. J., Campos, M., Jacobs-Wagner, C., & Strobel, S. A. (2015). Mycofumigation by the Volatile Organic Compound-Producing Fungus *Muscodora*

- albus Induces Bacterial Cell Death through DNA Damage. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3), 1147–1156. <https://doi.org/10.1128/AEM.03294-14>
- Atmosukarto, I., Castillo, U., Hess, W. M., Sears, J., & Strobel, G. (2005). Isolation and characterization of *Muscodora albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. *Plant Science*, 169(5), 854–861. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.06.002>
- Bailey, K. L. (2014). The Bioherbicide Approach to Weed Control Using Plant Pathogens. In *Integrated Pest Management* (pp. 245–266). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00014-2>
- Barnett, H. L. (Horace L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th Ed.). Minnesota: APS Press.
- Booth, E., Strobel, G., Knighton, B., Sears, J., Geary, B., & Avci, R. (2011). A rapid column technique for trapping and collecting of volatile fungal hydrocarbons and hydrocarbon derivatives, 1963–1972. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0660-2>
- Cárdenas-Ortega, N. C., Zavala-Sánchez, M. A., Aguirre-Rivera, J. R., Pérez-González, C., & Pérez-Gutiérrez, S. (2005). Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* gray. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4347–4349. <https://doi.org/10.1021/jf040372h>
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48–60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>
- De Silva, N. I., Brooks, S., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), 133–148. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001>
- Encuesta Nacional Agropecuaria. (2017). Retrieved January 15, 2019, from <http://www.beta.inegi.org.mx/programas/enal/2017/>
- Ezra, D., & Strobel, G. A. (2003). Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodora albus*. *Plant Science*, 165(6), 1229–1238. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00330-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00330-3)
- Gabler, F. M., Mercier, J., Jiménez, J. I., & Smilanick, J. L. (2010). Integration of continuous biofumigation with *Muscodora albus* with pre-cooling fumigation with ozone or sulfur dioxide to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 55(2), 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.07.012>
- García-Méndez, M. C., Macías-Rubalcava, N. A., Lappe-Oliveras, P., Hernández-Ortega, S., & Macías-Rubalcava, M. L. (2016). Phytotoxic potential of secondary metabolites and semisynthetic compounds from endophytic fungus *Xylaria feejeensis* strain SM3e-1b isolated from *Sapium macrocarpum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(21), 4255–4263. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01111>
- Geary, B., Singh, S. K., Strobel, G. A., Ezra, D., Sears, J., & Knighton, B. (2011). An Endophytic *Phomopsis* sp. Possessing Bioactivity and Fuel Potential with its Volatile Organic Compounds. *Microbial Ecology*, 61(4), 729–739. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9818-7>
- Griepentrog, H. W., & Dedousis, A. P. (2010). Mechanical Weed Control (pp. 171–179). https://doi.org/10.1007/978-3-642-03681-1_11
- Guo, B., Wang, Y., Sun, X., & Tang, K. (2008). Bioactive natural products from endophytes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2), 136–142. <https://doi.org/10.1007/s10438-008-2002-2>
- Herre, E. A., Mejía, L. C., Kylo, D. A., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A., & Van Bael, S. A. (2007). Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 88(3), 550–558. <https://doi.org/10.1890/05-1606>
- Jacoby, R. P., Millar, A. H., & Taylor, N. L. (2015). Assessment of Respiration in Isolated Plant Mitochondria Using Clark-Type Electrodes (pp. 165–185). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2639-8_12
- Ju, Y.M.; Rogers, J. D. (1996). A revision of the genus *Hypoxyton*. *Mycologia Memoirs*, 20, 1–365.
- Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, 6, 151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00151>
- Kuhnert, E., Jacques, F., Derek, P., Janet, J., Divinagracia, L., & Marc, S. (2013). New *Hypoxyton* species from Martinique and new evidence on the molecular phylogeny of *Hypoxyton* based on ITS rDNA and β -tubulin data. *Fungal Diversity*, 64(1), 181–203. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0264-3>
- Liarzi, O., Bar, E., Lewinsohn, E., & Ezra, D. (2016). Use of the endophytic fungus *Daldinia* cf. *concentrica* and its volatiles as bio-control agents. *PLoS ONE*, 11(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168242>
- Lin, F.-C., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Yuan, Z.-L., Zhang, C.-L., Mao, L.-J., ... Wang, G.-P. (2010). *Muscodora fengyangensis* sp. nov. from southeast China: morphology, physiology and production of volatile compounds. *Fungal Biology*, 114(10), 797–808. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.07.006>
- Macías-Rubalcava, M.L., Sánchez-Fernández, R. E., Roque-Flores, G., Lappe-Oliveras, P., & Medina-Romero, Y. M. (2018). Volatile organic compounds from *Hypoxyton* anthochroum endophytic strains as postharvest mycofumigation alternative for cherry tomatoes. *Food Microbiology*, 76. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.014>
- Macías-Rubalcava, Martha Lydia, Sánchez-Fernández, R. E., Roque-Flores, G., Lappe-Oliveras, P., & Medina-Romero, Y. M. (2018). Volatile organic compounds from *Hypoxyton* anthochroum endophytic strains as postharvest mycofumigation alternative for cherry tomatoes. *Food Microbiology*, 76(February), 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.014>
- Malezas de México. (2016). Retrieved January 1, 2017, from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm>
- Medina-Romero, Y. M., Roque-Flores, G., & Macías-Rubalcava, M. L. (2017). Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(22), 8209–8222. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8542-8>
- Morcia, C., Malnati, M., & Terzi, V. (2011). *In vitro* antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.643458>
- Mousa, W. K., & Raizada, M. N. (2013). The Diversity of Anti-Microbial Secondary Metabolites Produced by Fungal Endophytes: An Interdisciplinary Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 4(March), 65. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00065>
- Nidiry, E. S. J. (2003). Quantitative Structure–Fungitoxicity Relationships of Some Monohydric Alcohols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5337–5343. <https://doi.org/10.1021/jf0301448>
- Petrini, O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves (pp. 179–197). https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9
- Pitarokili, D., Tzakou, O., Loukis, A., & Harvala, C. (2003). Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3294–3301. <https://doi.org/10.1021/jf0211534>
- Pohanish, R. P. (2015). *Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural*. William Andrew. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-02568-9>
- Roque-Flores, G. (2017). *Efecto fitotóxico, antifúngico y antioomiceto de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles del aislamiento endofítico Smeg4 de Sapium macrocarpum (euphorbiaceae)*. UNAM. Tesis de Licenciatura.

- 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*. UNAM. Tesis de Doctorado.
- Sánchez-Fernández, R. E., Díaz, D., Duarte, G., Lappe-Oliveras, P., Sánchez, S., & Macías-Rubalcava, M. L. (2016). Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2II1a: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microbial Ecology*, 71(2), 347–364. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0679-3>
- Sánchez-Ortiz, B. L., Sánchez-Fernández, R. E., Duarte Lisci, G., Lappe-Oliveras, P., & Macías-Rubalcava, M. L. (2016). Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1313–1325. <https://doi.org/10.1111/jam.13101>
- Savi, D. C., Kava, V., Maia, B. H. L. N. S., Serviensi, A., Galli-Terasawa, L. V., Pena, L. C., ... Annes, V. (2019). *Muscodor brasiliensis* sp. nov. produces volatile organic compounds with activity against *Penicillium digitatum*. *Microbiological Research*, 221(December 2018), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.01.002>
- Schnabel, G., & Mercier, J. (2006). Use of a *Muscodor albus* pad delivery system for the management of brown rot of peach in shipping cartons. *Postharvest Biology and Technology*, 42(1), 121–123. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.05.006>
- Schulz, B., Haas, S., Junker, C., André, N., & Schobert, M. (2015). Fungal endophytes – biology and bioprospecting Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science*, 109(1).
- Sears, J., Dirkse, E., Markworth, C., & Strobel, G. A. (2001). Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 147(11), 2943–2950. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-11-2943>
- Sirilun, S., Chaiyasut, C., Sivamaruthi, B. S., Peerajan, S., Kumar, N., & Periyana, K. (2017). Phenethyl Alcohol Is an Effective Non-Traditional Preservative Agent for Cosmetic Preparations. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(8), 129. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i8.18572>
- Spakowicz, D. J., & Strobel, S. a. (2015). Biosynthesis of hydrocarbons and volatile organic compounds by fungi: bioengineering potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12), 4943–4951. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6641-y>
- Srivastava, S., Tripathi, A., & Pandey, R. (2014). Entophytic Microbes and Biocontrol of Plant Diseases. In *Biological Controls for Preventing Food Deterioration* (pp. 117–137). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118533024.ch6>
- Stinson, M., Ezra, D., Hess, W. M., Sears, J., & Strobel, G. (2003). An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*, 165(4), 913–922. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00299-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00299-1)
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 67(4), 491–502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms 1. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257–268. <https://doi.org/10.1021/np030397v>
- 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 Protection*, 45, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.11.015>
- Ulloa-Benítez, Á., Medina-Romero, Y. M., Sánchez-Fernández, R. E., Lappe-Oliveras, P., Roque-Flores, G., Duarte Lisci, G., ... Macías-Rubalcava, M. L. (2016). Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile and semi-volatile organic compounds from the endophyte *Hypoxyton anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia* (Burseraceae). *Journal of Applied Microbiology*, 121(2). <https://doi.org/10.1111/jam.13174>
- Wani, Z. A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2015). Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 2955–2965. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6487-3>
- Zhang, Z. Z., Li, Y. B., Qi, L., & Wan, X. C. (2006). Antifungal activities of major tea leaf volatile constituents toward *Colletorichum camelliae* Masea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3936–3940. <https://doi.org/10.1021/jf060017m>