



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Potencial fitotóxico de metabolitos secundarios volátiles y
no volátiles de hongos endófitos aislados de las plantas
Hippocratea acapulcensis (Celastraceae) y *Hamelia patens*
(Rubiaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ILSE NADIA TORRES OCAMPO



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

CDMX, MÉXICO.

2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

VOCAL: DR. RODOLFO SALAS LIZANA

SECRETARIO: DRA. MARTHA LYDIA MACIAS RUBALCAVA

1er SUPLENTE: DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ

2do SUPLENTE: DRA. MARIANA DEL OLMO RUIZ

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

Laboratorios 1-3 y 1-4

Departamento de Productos Naturales

ASESORA DEL TEMA

DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

SUSTENTANTE

ILSE NADIA TORRES OCAMPO

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo el presente trabajo a través de los proyectos A1-S-20469, 210920 y IN215623, respectivamente.

Agradezco también a mi tutora la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por su inquebrantable paciencia, dedicación constante, invaluable apoyo y el tiempo generosamente invertido en mi desarrollo durante todo el proceso de investigación. Su mentoría fue una pieza fundamental en mi formación académica.

A cada uno de los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones realizadas durante la revisión de este trabajo que permitieron enriquecerlo, así como por el tiempo invertido para dicho proyecto.

A mis compañeros y compañeras del laboratorio, por su apoyo incondicional y por todos los buenos momentos que pasamos acompañados de aprendizajes, consejos y crecimiento académico y personal.

Dedicatoria

A mi abuela, por enseñarme a amar las plantas y la vida.

A mi madre, por siempre alentarme a volar cada vez más alto.

A mi papá, por ser mi guía y ejemplo académico.

A Canela, por acompañarme todas las noches a hacer las tareas.

A mis amigas, Bere, Denisse, Adela, Alma, Rose y Dafne, por escuchar, alentar, aconsejar y acompañar en todo momento.

A mis amigos, Jesús, Ricardo, Jonny, Gonzalo, Vic y Ruy por su apoyo y amistad incondicional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|------------|
| Agradecimientos..... | II |
| Lista de Cuadros | VI |
| Lista de Figuras..... | VII |
| Lista de abreviaturas | X |
| I. Introducción..... | 1 |
| II. Antecedentes..... | 4 |
| 1. Agricultura en México | 4 |
| 1.1 Problemas actuales | 5 |
| 1.2 Control de plagas..... | 6 |
| 1.2.1 Malezas | 7 |
| 2. Productos naturales como fuente de agroquímicos | 8 |
| 2.1 Bioplaguicidas y agentes de biocontrol..... | 9 |
| 3. Hongos. | 10 |
| 3.1 Hongos endófitos | 11 |
| 3.2.1 Metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos | 14 |
| 3.2.2 Metabolitos secundarios volátiles de hongos endófitos | 21 |
| 4. Sitio de colecta | 23 |
| III. Hipótesis | 25 |
| IV. Objetivos..... | 26 |
| 1. Objetivo general..... | 26 |
| 2. Objetivos particulares | 26 |
| V. Desarrollo experimental | 27 |
| 1. Material Vegetal..... | 27 |
| 2. Aislamiento y purificación de hongos endófitos | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos aislados de <i>Hippocratea acapulcensis</i> y <i>Hamelia patens</i> | 28 |
| 4. Cultivos en medio arroz | 29 |
| 4.1 Obtención de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio | 30 |
| 4.2 Análisis del perfil metabólico de los extractos orgánicos | 30 |
| 5. Evaluación de la actividad fitotóxica de extractos orgánicos | 30 |
| 6. Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos orgánicos volátiles | 32 |
| VI. Resultados y discusión | 33 |
| 1. Aislamiento y purificación de hongos endófitos. | 34 |
| 1.2 Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos aislados de <i>Hippocratea acapulcensis</i> y <i>Hamelia patens</i> | 35 |
| 2. Obtención de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio | 45 |
| 2.1 Análisis cromatográfico en capa fina de los extractos orgánicos | 46 |
| 3. Evaluación de la actividad fitotóxica de los extractos orgánicos de AcOEt.... | 48 |
| 4. Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos volátiles orgánicos | 54 |
| VII. Resumen y conclusiones | 60 |
| VIII. Perspectivas | 63 |
| IX. Referencias..... | 64 |

Lista de Cuadros

| | |
|--|-----------|
| Cuadro 1. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos..... | 15 |
| Cuadro 2. Número total de aislamientos y morfotipos obtenidos de <i>Hippocratea acapulcensis</i> y <i>Hamelia patens</i> | 34 |
| Cuadro 3. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos aislamientos de <i>Hippocratea acapulcensis</i> y <i>Hamelia patens</i> | 38 |
| Cuadro 4. Rendimiento y gramos totales de los extractos orgánicos por aislamiento de hongos endófitos. Se muestra el promedio de las cuatro repeticiones y su desviación estándar. | 46 |

Lista de Figuras

- Figura 1.** Representación esquemática químico-ecológica de las interacciones planta-hongo costo-beneficio con énfasis en los hongos endófitos. A) Hipótesis del balance antagónico. B) Enfermedad entre las plantas y los hongos patógenos. C) Reciprocidad entre endófito y patógeno. D) Estrategia de sobrevivencia del endófito. E) Balance sinérgico. Modificada de Kusari *et al.*, 2012. **13**
- Figura 4.** Extractos orgánicos derivados de 3 distintos aislamientos de hongos endófitos. A) Extractos obtenidos con hexano. B) Extractos obtenidos con AcOEt. Los números representan extractos de diferentes aislamientos: 1. HPE1; 2. HPE3; y 3. HAE5. **47**
- Figura 5.** Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos derivados del aislamiento HAE5. Sistema de elución: CH₂Cl₂:CH₃OH (97:3). A. Cromatografía observada con luz UV a 365nm B. Cromatografía revelada con H₂SO₄ al 10% / 80°C. C. Cromatografía observada con luz UV a 254nm. 1. Extracto obtenido con hexano 2. Extracto obtenido con AcOEt. **48**
- Figura 6.** Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos (AcOEt) de los aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* cultivados en medio arroz, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* evaluados a 100 µg/mL. RIVAL: control positivo evaluado a 100, 200 y 300 µg/mL. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA (p< 0.05). Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones. **49**
- Figura 7.** Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos (AcOEt) de los aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* cultivados en medio arroz, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Medicago sativa* evaluados 100 µg/mL. Rival: control positivo evaluado a 100, 200 y 300 µg/mL. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA (p<

0.05). Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones..... **50**

Figura 8. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos (AcOEt) de los aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* cultivados en medio arroz, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Panicum miliaceum* evaluados 100 µg/mL. Rival: control positivo evaluado a 100, 200 y 300 µg/mL. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($p < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones. **51**

Figura 9. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos (AcOEt) de aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* cultivados en medio arroz, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Medicago sativa* evaluados 100 µg/mL. Rival: control positivo evaluado a 100, 200 y 300 µg/mL. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($p < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones. **52**

Figura 10. Efecto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos con mayor inhibición sobre las plantas de prueba. A) Controles negativos a las 48 h de crecimiento. B) Plantas de prueba a las 48 h de exposición a los metabolitos secundarios presentes en los extractos fúngicos. 1. *Amaranthus hypochondriacus*, 2. *Trifolium pratense*, 3. *Panicum miliaceum*, y 4. *Medicago sativa*. **53**

Figura 11. Efecto fitotóxico de los VOCs producidos por los aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* a los 7 días de crecimiento, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Trifolium pratense*. Mezcla de alcoholes 3-metil-1-butanol y alcohol feniletílico evaluados 1.25 µg/mL. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos,..... **55**

Figura 15. Efecto fitotóxico de los compuestos orgánicos volátiles del hongo endófito HAE1 a los 7 días de crecimiento sobre las plantas pruebas. A) Plantas

prueba control negativo a las 48 h de crecimiento. B) Plantas prueba a las 48 h de exposición a los VOCs del endófito HAE1. 1. *Amaranthus hypochondriacus*, 2. *Trifolium pratense*, 3. *Panicum miliaceum*, 4. *Medicago sativa*. **59**

Lista de abreviaturas

| | |
|---------------------------------|--|
| AA | Agar-Agua |
| <i>A. hypochondriacus</i> | <i>Amaranthus hypochondriacus</i> |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| CH ₃ OH | Metanol |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| °C | Grados Celsius |
| g | Gramos |
| <i>H. patens</i> | <i>Hamelia patens</i> |
| h | Horas |
| MA | Medio arroz |
| <i>H. acapulcensis</i> | <i>Hippocratea acapulcensis</i> |
| <i>M. sativa</i> | <i>Medicago sativa</i> |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligramos |
| min | Minutos |
| mm | Milímetros |
| mL | Mililitros |
| µg | Microgramos |
| PDA | Agar-papa-dextrosa |
| <i>P. miliaceum</i> | <i>Panicum miliaceum</i> |
| REBIOSH | Reserva de la Biósfera de la Sierra de Huautla |
| s | Segundos |
| <i>T. patrense</i> | <i>Trifolium patrense</i> |
| VOCs | Compuestos orgánicos volátiles |

I. Introducción

La agricultura ha sido la base del desarrollo y la subsistencia de la sociedad humana, de esta práctica se derivan los alimentos básicos que conforman los pilares de la dieta de la población mundial (Vinchira-Villarraga y Moreno-Sarmiento, 2019). Tan solo en México los registros de la actividad agrícola datan del Posclásico, en donde los mexicas (1200 a 1350 DC) diseñaron un sistema de hidroponía llamado “Chinampas”, en el que se utilizaba el lecho de los fangosos lagos de Xochimilco y Chalco, para establecer sus cultivos (Bastida-Tapia, 2017).

Con la llegada de los europeos a México se añadió a la agricultura novedosos utensilios de labranza y animales de tiro, además de que se establecieron los monocultivos, incorporando nuevos cultivos como el trigo, la caña de azúcar, el tabaco, el algodón y el café, alterando el equilibrio agroecológico que mantenían los pueblos indígenas, iniciando el desgaste de los suelos mexicanos y dando inicio así a un sinnúmero de cambios en la producción agrícola (WRM, 2004).

Posteriormente, en 1940 surge la Revolución Verde en respuesta a crisis alimentarias y con el objetivo de combatir la hambruna, atribuyendo el problema a la escasez de producción de alimentos y ofreciendo como solución el aumento de la productividad mediante el desarrollo tecnológico de la industria agrícola (de la Rosa y Suárez, 2022; Harwood, 2020). Esta revolución adaptó y modernizó la agricultura de todo el mundo por su notable aumento en la producción (Huerta-Sobalvarro y Martínez-Centeno, 2018). Dicho movimiento abarcó tanto la investigación con respecto al aumento de la productividad de las plantas como la puesta en práctica de distintas técnicas de cultivo basadas en el uso indiscriminado de agroquímicos (Gouttefanjat, 2021); por lo que, aunque la Revolución Verde cumplió su objetivo, también provocó daños ambientales, sociales y económicos (de la Rosa y Suárez, 2022).

De acuerdo con la FAO (1995) la Revolución Verde nos planteó una serie de aprendizajes, algunos de los cuales son que dichas tecnologías impulsadas en la década de los 50 revelaron que el extenso uso de agroquímicos usados en contra

de las plagas y malezas debe despertar preocupaciones acerca de sus efectos en el ambiente y la salud humana. Se estableció entonces que la agricultura impulsada por la Revolución Verde es altamente dependiente de insumos químicos que contribuyen al deterioro del suelo, atentan en contra de la biodiversidad e incluso la salud humana (Lechón y Chicaiza, 2019; Sarandón, 2020); por lo que en la actualidad a nivel mundial se incrementó la tendencia a implementar una agricultura sustentable, con el fin de reducir plaguicidas químicos sintéticos y, por otro lado, promover el uso de microorganismos de biocontrol y el manejo integrado de plagas, con el fin de prevenir y suprimir las plagas con un impacto en la salud y el ambiente (Wilches, 2019).

El uso de microorganismos como hongos y bacterias es una herramienta básica para el desarrollo de una agricultura limpia y amigable con el entorno (Viera-Arroyo, 2020), los productos naturales derivados de estos microorganismos poseen una valiosa actividad biológica antibacteriana, antiviral, antiparasítica, antifúngica y herbicida, entre otras, que es importante para el desarrollo de plaguicidas y fármacos (Wang y Wang, 2023).

Los hongos endófitos son un grupo fascinante de microorganismos que colonizan en algún punto de su ciclo de vida los tejidos de las plantas, sin causar daño aparente al hospedero, manteniendo así una relación transitoria con la planta que le permite amortiguar el estrés ambiental externo y la competencia microbiana (Petrini, 1991; Schulz y Boyle, 2005). Esta relación puede producir metabolitos secundarios complejos que son capaces de tener aplicaciones en la agricultura moderna (Alam *et al.*, 2021; Paramanantham *et al.*, 2019). Las recientes tendencias dentro de la agricultura orgánica apuntan a que la biosíntesis de nuevos metabolitos bioactivos producidos por hongos endófitos ayudará a superar los nuevos desafíos que la agricultura sustentable supone (Rodrigo *et al.*, 2021; Tiwari *et al.*, 2021).

Con la finalidad de contribuir en la búsqueda de nuevos compuestos útiles para el desarrollo de novedosos herbicidas con menor toxicidad e impacto ambiental, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el potencial fitotóxico de extractos y compuestos orgánicos volátiles de hongos endófitos aislamientos de las

plantas *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*, sobre los procesos de germinación, respiración y crecimiento de raíz de *Amaranthus hypochondriacus*, *Trifolium pratense*, *Panicum miliaceum* y *Medicago sativa*.

II. Antecedentes

1. Agricultura en México

México cuenta con un sector agrícola líder en América Latina, y se posiciona como el séptimo a nivel mundial (FAO, 2020), aunque las condiciones físicas del suelo, como su relieve y calidad, así como las características climáticas limitan la disponibilidad natural de las zonas aptas para el desarrollo de esta actividad. La superficie agrícola del territorio mexicano es de 198 millones de hectáreas. Se considera que de dichos 198 millones el 14% (27.4 millones) se destina a uso agrícola, mientras que el 58% (115 millones) es para producción ganadera y el 28% (55.5 millones) restante se distribuye en bosques y selvas (Torres y Rojas, 2018).

Desde hace más de 50 años, el desarrollo agrícola mexicano ha estado fuertemente vinculado con el crecimiento económico y social. Este jugó un papel fundamental en el progreso del mercado interno, la producción industrial y el aumento de exportaciones, así como también proporcionó los alimentos necesarios para la creciente población, lo que permitió que México pasara de ser una sociedad rural a una urbana (Amaro-Rosales y Gortari-Rabiela, 2016; Ramírez-Juárez, 2022). En la actualidad la producción agroalimentaria beneficia la economía del país, produce más del 2% del Producto Interno Bruto y un flujo constante de inversión extranjera que en 2020 superó los 80 millones de dólares estadounidenses (Statista, 2020).

Por otro lado, la industria agrícola enfrenta grandes retos, aunado al crecimiento demográfico que obliga a duplicar la producción en los próximos 30 años. Sin embargo, no hay más superficie disponible y constantemente se pierden tierras agrícolas para otros usos; además, el suelo fértil está disminuyendo, los productores agrícolas reportan pérdidas significativas debido al cambio climático, así como el aumento en la incidencia de plagas y enfermedades (INEGI, 2014; Torres y Rojas, 2018).

1.1 Problemas actuales

Los sistemas de producción alimentaria y agrícola de todo el mundo se enfrentan a grandes desafíos a causa de la creciente demanda de alimentos por una población en auge, los efectos adversos del cambio climático y la sobreexplotación de recursos naturales, sumado al desmedido uso de agroquímicos sintéticos para controlar el ataque de organismos no deseados como malezas, insectos, hongos y virus (FAO, 2021; Gan y Wickings, 2017).

El uso de agroquímicos sintéticos representa un riesgo para la salud y el ambiente. Estas prácticas agrícolas contaminan el sistema subterráneo de agua por escurrimiento, infiltración y erosión del suelo. Cuando esta agua contaminada es usada nuevamente en la superficie transmite sus efectos nocivos en el ecosistema (Khanna y Gupta, 2018; Torres y Rojas, 2018). A su vez, los compuestos orgánicos presentes en las formulaciones de los plaguicidas sintéticos han generado preocupación al no existir un mecanismo de control en su uso, debido a que tienen una alta persistencia en el ambiente, con la capacidad de acumularse y aumentar su toxicidad en los distintos niveles de la cadena trófica (CEDRSSA, 2020).

La agricultura tradicional es cada vez más insostenible debido a, entre otros factores: la pérdida en la calidad del producto final; infestación del suelo; la producción de toxinas en la postcosecha por parte de patógenos presentes en productos almacenados; incremento en los costos de producción; y manejo y predisposición de las plantas a enfermedades. Además, existe un creciente problema de plagas resistentes a plaguicidas que están forzando a la industria agrícola a buscar alternativas diferentes de manejo (Mesa, *et al.*, 2019).

1.2 Control de plagas

Hasta antes del siglo XX, el control de plagas y enfermedades agrícolas se hacía con métodos menos agresivos con el ambiente como la rotación de cultivos y el descanso de la tierra. Después de la segunda guerra mundial, la explosión demográfica cambió la forma de producir y de consumir, pues hubo la necesidad de incrementar la producción de alimentos, lo que justificó intensificar el uso de productos sintéticos para controlar plantas, microorganismos y animales indeseables (CEDRSSA, 2020).

En el periodo comprendido de 1990-2018, el consumo mundial de plaguicidas creció un 79%. Particularmente, el grupo de herbicidas mostró el mayor incremento, reportando un 106% de aumento, mientras que el uso de fungicidas creció un 35%. Desde una perspectiva mundial, México concentra el 1.3% de consumo de plaguicidas, posicionándolo en el onceavo lugar con más consumo de plaguicidas (CEDRSSA, 2020).

En México se reporta el uso de 277 plaguicidas formulados con un solo ingrediente activo, de los cuales 137 se encuentran clasificados dentro de la lista de plaguicidas altamente peligrosos del Pesticide Action Network International (INECC, 2018). Dentro de los plaguicidas reportados con mayor frecuencia están el endosulfán, dicloro difenil tricloroetano (DDT), captafol, pentaclorofenol y paratión metilítico; los cuales están prohibidos por lo menos en 31 países debido a su alto grado de toxicidad. Además de las sustancias mencionadas, en el periodo de 2010 a 2019 el glifosato, sustancia catalogada como probable cancerígeno por la Organización Mundial de la Salud, fue uno de los más aplicados en México para el control de malezas en los cultivos (Mendoza e Ize, 2017).

Diversas entidades administrativas trabajan en la resolución para prohibir de manera definitiva estas sustancias, para priorizar el bienestar ambiental y salud de los seres vivos. Se trata de una emergencia medioambiental a nivel mundial para la cual se están impulsando métodos agroecológicos y el manejo integrado de plagas (SEMARNAT, 2019).

1.2.1 Malezas

En términos generales las malezas o malas hierbas se consideran plantas que crecen en lugares donde no son deseadas. Existen numerosas definiciones para las malezas, pero todas se basan en el impacto que causan en las actividades humanas (Oerke *et al.*, 1994).

Las malezas son consideradas plagas debido a que disminuyen la producción y la calidad de los cultivos, tan solo en México existen 2,839 especies de malezas, pertenecientes a 90 familias botánicas. Las malezas compiten con los cultivos por nutrientes, espacio para desarrollarse, agua y luz, entre otros. Son especies que tienen la capacidad de crecer en condiciones adversas, madurar rápidamente y reproducirse en etapas tempranas, logrando una mayor dispersión de semillas (CEDRSSA, 2020). Debido a su gran capacidad competitiva es esencial contar con un manejo adecuado de control de malezas para evadir la disminución en la producción de los cultivos (Zoschke y Quadranti, 2002).

Las malezas pueden ocasionar una pérdida directa del 10% de la producción agrícola; razón por la cual, la identificación y disminución de malezas es necesaria para el éxito de cualquier programa de manejo de malezas (CIMMYT, 2021; López y Ortega, 2017). Un manejo correcto de malezas tiene el potencial no solo de restringir las poblaciones de malezas, sino también de reducir el impacto ambiental de prácticas basadas en el uso exclusivo de agroquímicos sintéticos; así como incrementar la sostenibilidad de los sistemas de cultivos y reducir la resistencia a herbicidas (Harker y O'Donovan, 2013).

2. Productos naturales como fuente de agroquímicos

Los productos naturales se definen como una parte de un organismo (hoja, flor, glándulas aisladas, etc.), un extracto, un exudado, un preparado parcialmente fraccionado o compuestos puros aislamientos (Elufioye y Badal, 2017). Históricamente, los productos naturales han sido fuente inagotable de compuestos útiles por sí mismos o de inspiración para crear compuestos que protejan a los cultivos o con aplicaciones en la industria farmacéutica. En la actualidad, existe una creciente búsqueda de una producción alimentaria más amigable con el ambiente y los seres vivos con el fin de evitar los efectos negativos que tienen los agroquímicos sintéticos. Primordialmente, las investigaciones, se han centrado en el desarrollo e implementación de herramientas alternativas a los agroquímicos, como el uso de compuestos producidos por el metabolismo secundario de microorganismos y plantas (Castillo-Reyes, *et al.*, 2018; Sparks y Duke, 2021).

Los productos naturales a menudo destacan como fuente de metabolitos bioactivos y de estructuras químicas novedosas y complejas que ofrecen una originalidad difícil de igualar en el laboratorio (Bertinetti, 2012; Sparks *et al.*, 2023). Los productos naturales y agentes de biocontrol están volviéndose cada vez más populares y se están considerando como una opción viable para reemplazar los métodos de control de enfermedades usados actualmente y en algunos casos son la única opción en contra de patógenos resistentes (Singh y Yadav, 2020).

Debido a la creciente preocupación por crear una producción agroalimentaria sostenible para controlar plagas y enfermedades en los cultivos, se plantea como una alternativa la implementación el uso de bioplaguicidas y agentes de biocontrol (Zelaya-Molina *et al.*, 2022).

2.1 Bioplaguicidas y agentes de biocontrol

De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental (2010) los bioplaguicidas son productos químicos o sustancias derivadas de organismos vivos como microorganismos, hongos o plantas, altamente específicos contra plagas objetivo y que generalmente representan poco o ningún riesgo para las personas o el ambiente. Además de controlar las plagas en los cultivos, también conservan la calidad e inocuidad del producto (Kumar *et al.*, 2021).

Utilizar los metabolitos producidos por bacterias, hongos y virus como bioplaguicidas ha recibido una atención cada vez mayor en las últimas tres décadas y, de manera particular el mercado global de bioplaguicidas microbianos ubica a los hongos como la segunda potencia en el mercado, después de las bacterias (Bautista y Gómez Álvarez, 2018; Royet-Barroso, 2020).

Por su parte el control biológico aplicado a enfermedades de plantas implica la supresión de los patógenos haciendo uso de los enemigos naturales de las plagas con el fin de reducir o eliminar las poblaciones sin afectar a los cultivos (Carreón y Fentanes, 2007; Heimpel y Mills, 2017). Las estrategias de manejo de fitopatógenos dependen en muchas ocasiones del patógeno, el organismo usado como biocontrolador y el ambiente en el cual se desarrolla la interacción (de León y Mier, 2011; Vinchira-Villarraga y Moreno-Sarmiento, 2019).

Los hongos al ser antagonistas de nemátodos, animales vertebrados, plantas, insectos y otros hongos patógenos destacan como posibles agentes de biocontrol, además tienen una alta capacidad reproductiva, especificidad, producción de esporas resistentes o el desarrollo de fases saprofitas en ausencia de sus huéspedes (Fernández-Jiménez, 2019).

3. Hongos.

Los hongos representan uno de los más grandes acervos de biodiversidad pues dentro de este grupo se estiman un aproximado de 1.5 millones de especies (Hawksworth, 2001). Basándose en como los hongos se comportan en la naturaleza y el laboratorio, estos se pueden definir por las siguientes características: organismos de células eucariotas alargadas, generalmente filamentosos con crecimiento apical, (algunos pueden estar formados por una sola célula como es el caso de las levaduras), de alimentación heterótrofa por absorción, de reproducción asexual y sexual por medio de esporas y con pared celular principalmente constituida por quitina o celulosa (Herrera y Ulloa, 1990; Webster y Weber, 2007). Son de distribución cosmopolita y tienen roles ecológicos importantes como saprófitos, mutualistas y parásitos (Webster y Weber, 2007).

Son organismos que destacan por la producción de una amplia gama de metabolitos secundarios (Calvo *et al.*, 2002) que, a diferencia de los metabolitos primarios, no se requieren directamente para asegurar el crecimiento de los organismos que los producen (Brakhage, 2013). Tanto hongos como bacterias son capaces de producir una extensa variedad de metabolitos secundarios, los cuales se atribuyen a los complejos ecosistemas en los que estos microorganismos compiten e interactúan con otros organismos como bacterias, hongos, algas e incluso animales (Brakhage, *et al.*, 2009; Yim *et al.*, 2007). Por lo tanto, es probable que la evolución de los metabolitos secundarios en microorganismos a lo largo de cientos de millones de años se haya producido porque funcionaron como señales químicas para defender su hábitat o para inhibir el crecimiento de sus competidores (Yim *et al.*, 2007).

Al constituir una fuente promisoría de productos naturales, los hongos sirven como inspiración de empresas y organismos de investigación por su potencial en el control de enfermedades de los cultivos sin perjudicar al ambiente y la salud humana (Bertinetti, 2012; Mesa-Vanegas, *et al.*, 2019). En la actualidad ya existen hongos representantes dentro de la industria agroquímica, como el género *Trichoderma*, el

cual se ha consolidado como el más estudiado para su uso como control de plagas producidas por hongos por sus habilidades micoparásitas (Harman y Kubicek, 2014; Viera-Arroyo, *et al.*, 2020). La capacidad de producir diversos metabolitos y de adaptación a distintas condiciones ambientales y sustratos, confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica (Martínez *et al.*, 2013).

3.1 Hongos endófitos

Se le denomina hongos endófitos a aquellos que colonizan los tejidos de la planta sin causar daño aparente durante la mayor parte o todo su ciclo de vida (Saikkonen *et al.*, 1998; Petrini, 1991). Por lo que dentro de este grupo se incluye una gran variedad de hongos, desde hongos patógenos de plantas y saprófitos que tienen largos períodos de latencia antes de que aparezcan señales de enfermedad en la planta hospedera (Sinclair y Cerkauskas, 1996) hasta hongos mutualistas obligados de pastos (Stone y Petrini, 1997). La evidencia indica que los endófitos se pueden encontrar en todas las plantas y ecosistemas, son abundantes y a menudo son muy diversos (Faeth, 2002).

El registro fósil de microorganismos asociados a plantas que se encuentran en tejidos fosilizados como hojas y tallos ha revelado que las asociaciones planta-endófito pueden haber evolucionado desde el momento en que las plantas colonizaron la tierra (Redecker *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2009). Durante este proceso evolutivo se han formado gradualmente interacciones entre estos microorganismos y las plantas, interacciones que de manera general tienen un impacto beneficioso en la supervivencia de las plantas (Saikkonen *et al.*, 1998). Por ejemplo, muchos hongos endófitos tienen el potencial de sintetizar metabolitos bioactivos que pueden ser usados de manera directa o indirecta como agentes en contra de distintas enfermedades causadas por otros hongos, bacterias y nemátodos, además de que también ayudan a combatir el estrés abiótico (Kusari, *et al.*, 2012; Heredia-Abarca, 2020; Yan *et al.*, 2019).

Esta interacción planta-endófito se ha tratado de explicar a través de la hipótesis del antagonismo balanceado (**Figura 1**). De manera inicial esta hipótesis fue propuesta para abordar como un endófito evita activar las respuestas del huésped y logra crecer dentro sin mostrar manifestaciones de infección o enfermedad. Se propuso que la colonización asintomática es un equilibrio de antagonismos entre el huésped y endófito (Schulz *et al.*, 1999; Schulz y Boyle, 2005). La comunidad de hongos endófitos produce factores de virulencia, como exoenzimas, péptidos y metabolitos fitotóxicos, con una amplia variedad de estructuras químicas. Por su parte, la planta puede responder a los estímulos de hongos endófitos, hongos patógenos y el ambiente activando sus respuestas de defensa. Si los factores de virulencia y las respuestas de defensa de la planta están balanceadas, la asociación permanece aparentemente asintomática (**Figura 1A**). Esta fase es transitoria, ya que los factores ambientales y su interacción con otros microorganismos juegan un rol importante para desestabilizar el balance de antagonismos (Kusari *et al.*, 2012; Wiewiora *et al.*, 2015). Si los mecanismos de defensa contrarrestan por completo los factores de virulencia de hongo, el hongo perecerá. Por el contrario, si la planta sucumbe a los factores de virulencia del hongo, una relación planta-patógeno provocaría una enfermedad en la planta (**Figura 1B**). Ya que muchos endófitos son posiblemente patógenos latentes, pueden ser influenciados por factores intrínsecos o ambientales para expresar patogenicidad (**Figura 1C**).

Recientemente, se ha demostrado que la interacción planta-patógeno puede que no sea solo un equilibrio entre factores de virulencia y respuestas de defensa, sino una interacción mucho más compleja y precisa (**Figura 1D**). Por ejemplo, se han encontrado adaptaciones similares en endófitos que infectan la misma planta, independientemente de su capacidad biosintética (Kusari *et al.*, 2012).

Con el fin de crecer y sobrevivir dentro de la planta, la comunidad de hongos endófitos debe mantener un balance de antagonismo no solo con la planta huésped, sino con los microorganismos competidores, los metabolitos secundarios son

factores importantes para mantener este equilibrio. El resultado es una simbiosis compatible y una planta sana (**Figura 1E**) (Kusari *et al.*,2012; Schulz, 2015).

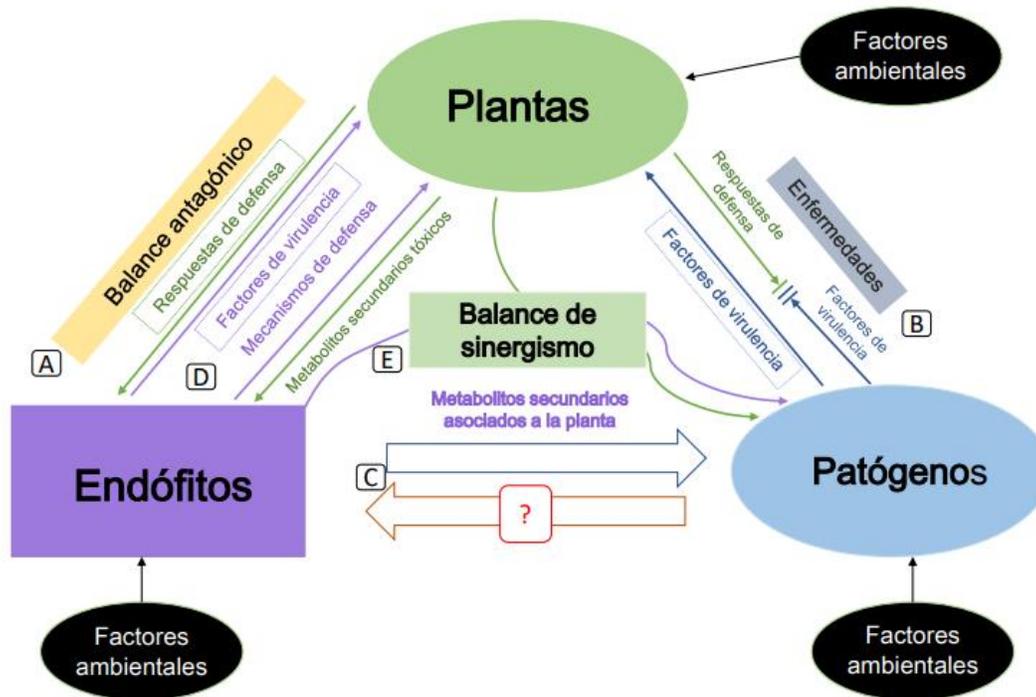


Figura 1. Representación esquemática químico-ecológica de las interacciones planta-hongo costo-beneficio con énfasis en los hongos endófitos. A) Hipótesis del balance antagonístico. B) Enfermedad entre las plantas y los hongos patógenos. C) Reciprocidad entre endófito y patógeno. D) Estrategia de supervivencia del endófito. E) Balance sinérgico. Modificada de Kusari *et al.*, 2012.

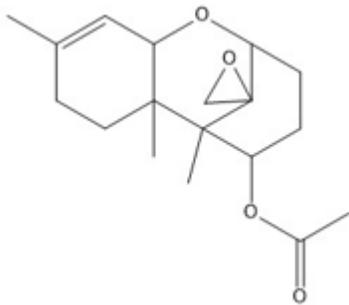
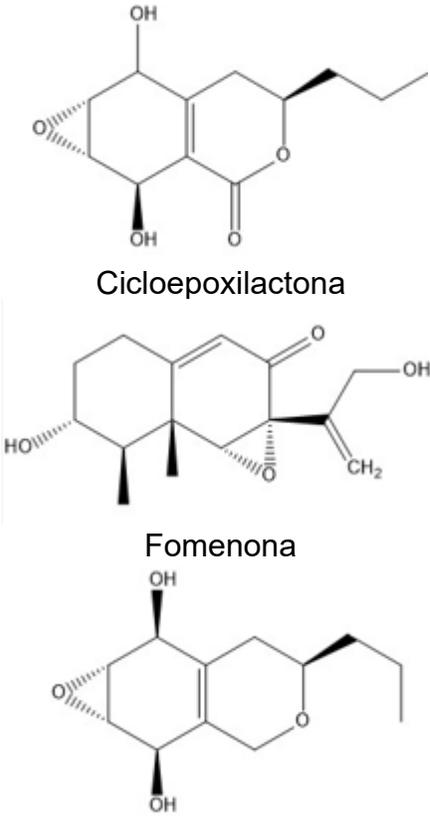
Se ha demostrado que los metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos poseen una gran actividad biológica, lo que los evidencia como agentes fitotóxicos y antimicrobianos, entre otros. En consecuencia, los hongos endófitos son un importante recurso en la industria agroquímica por su capacidad de sintetizar moléculas activas (Strobel *et al.*, 2004).

3.2.1 Metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos

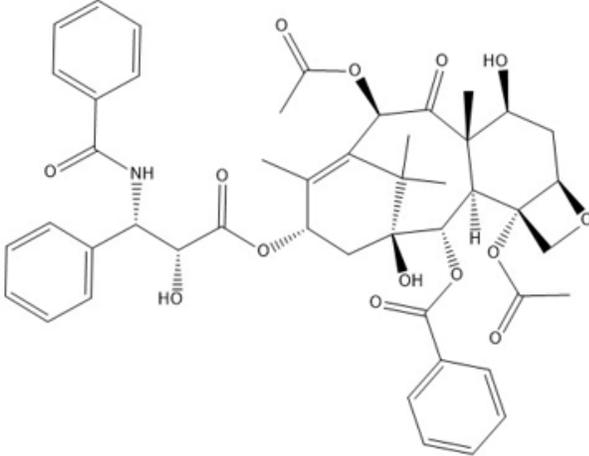
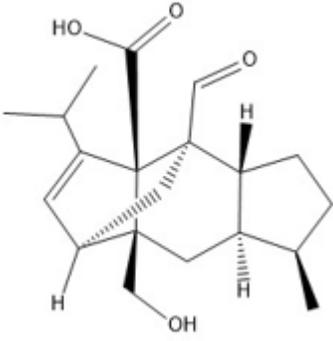
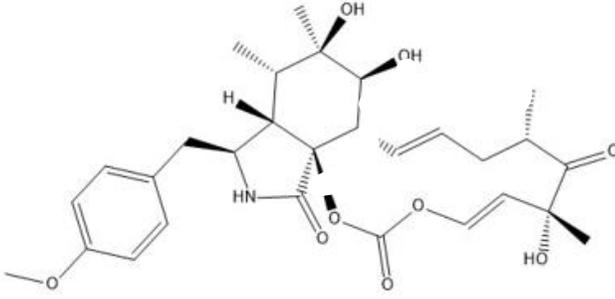
En la constante búsqueda de nuevas moléculas para la industria agroquímica y farmacéutica, los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos representan una fuente importante de compuestos bioactivos. Por un lado, las cepas provenientes de aislamientos de hongos endófitos pueden producir compuestos que no están presentes en los tejidos de sus plantas hospederas y, en algunas ocasiones, sintetizan metabolitos secundarios con mayor actividad o con mayor rendimiento que sus anfitriones (Rustamova *et al.*, 2020). Como es el caso de *Taxus brevifolia* (taxol) en el que se necesita un aproximado de 10 toneladas de corteza para tratar a 500 pacientes con cáncer, elevando su costo y haciéndolo inaccesible para ciertos sectores de la población (Liao *et al.*, 2006). A principios de los años 90 se aisló de *T. brevifolia* el hongo endófito *Taxomyces andrenae* que tiene la capacidad de sintetizar taxol (Strobel *et al.*, 1995; Strobel y Daisy, 2003). Posteriormente, fueron identificados un gran número de hongos productores de taxol con mayor rendimiento *in vitro* tales como como *Pestalotiopsis microscopa* y *T. wallicbiana* (Yuan *et al.*, 2006).

La diversidad de metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos se origina en diferentes rutas biosintéticas tales como la ruta del ácido shikímico, la ruta del acetato mevalonato y ruta de los policétidos (Zeilinger *et al.*, 2015), las estructuras de dichos compuestos naturales incluyen alcaloides, terpenoides, policétidos, isocumarinas, flavonoides, péptidos, esteroides, fenoles, entre otros, algunos de los cuales son únicos (Rustamova *et al.*, 2020; Sánchez-Fernández, *et al.*, 2013). Una gran cantidad de estos compuestos y sus análogos han resultado ser bioactivos (Tiwari y Bae, 2022). En el **Cuadro 1** se describen ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislamientos de hongos endófitos, así como su actividad biológica.

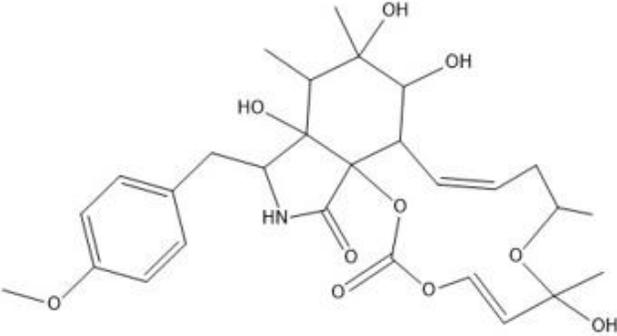
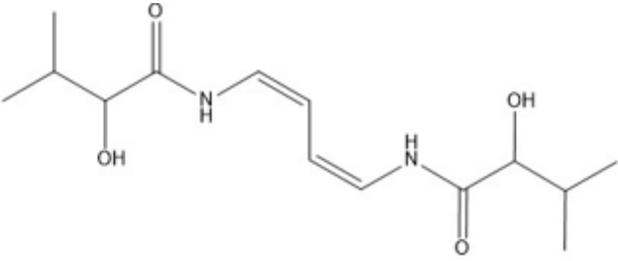
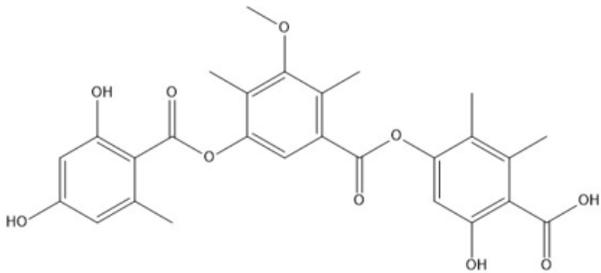
Cuadro 1. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislamientos de hongos endófitos.

| Hongo endófito, planta hospedera y referencia | Metabolitos secundarios / estructura química | Actividad biológica |
|--|--|--|
| <p><i>Trichoderma harzianum</i>, <i>Ilex cornuta</i> (Chen <i>et al.</i>, 2007)</p> |  <p>Tricodermina</p> | <p>Inhibidor de síntesis de proteínas. Antifúngico y fitotóxico.</p> |
| <p><i>Phomopsis</i> sp, <i>Laurus azorica</i> (Hussain <i>et al.</i>, 2009)</p> |  <p>Cicloepoxilactona</p> <p>Fomenona</p> <p>Cicloepoxitrol</p> | <p>Antifúngico y antimicrobiano</p> |

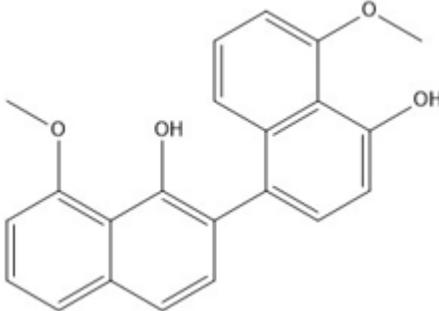
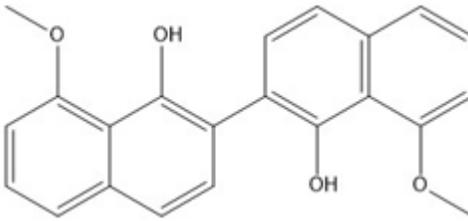
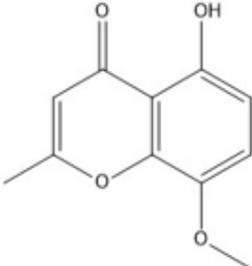
Cuadro 1. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislamientos de hongos endófitos (continuación).

| Hongo endófito, planta hospedera y referencia | Metabolitos secundarios / estructura química | Actividad biológica |
|--|---|---------------------|
| <p><i>Taxomyces andreanae</i>, <i>Taxus brevifolia</i> (Stierle y Strobel, 1995)</p> |  <p style="text-align: center;">Taxol</p> | Anticancerígeno |
| <p><i>Xylaria</i> sp., <i>Garcinia dulcis</i> (Pongcharoen <i>et al.</i>, 2008)</p> |  <p style="text-align: center;">Sordaricina</p> | Antifúngico |
| <p><i>Eutypella scoparia</i> PSU-D44, <i>G. dulcis</i> (Pongcharoen <i>et al.</i>, 2006)</p> |  <p style="text-align: center;">Scoparasina A</p> | Antibacteriano |

Cuadro 1. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislamientos de hongos endófitos (continuación).

| Hongo endófito, planta hospedera y referencia | Metabolitos secundarios / estructura química | Actividad biológica |
|---|--|------------------------------|
| <i>Eutypella scoparia</i> PSU-D44, <i>G. dulcis</i> (Pongcharoen <i>et al.</i> , 2006) |  <p>Scoparasina B</p> | Antibacteriano |
| <i>Cryptosporiopsis quercina</i> , <i>Tripterygium wilfordii</i> (Li <i>et al.</i> , 2000) |  <p>Criptocina</p> | Antifúngico |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Artemisia mongólica</i> (Zou <i>et al.</i> , 2000) |  <p>Ácido colletotritico</p> | Antifúngico y antimicrobiano |

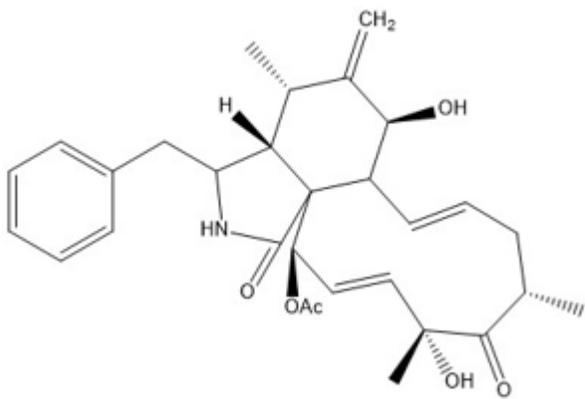
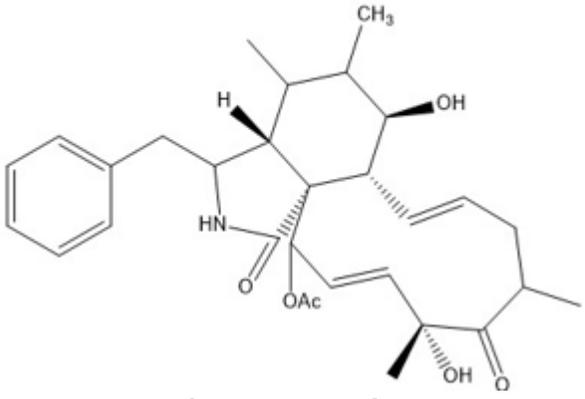
Cuadro 1. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislamientos de hongos endófitos (continuación).

| Hongo endófito, planta hospedera y referencia | Metabolitos secundarios / estructura química | Actividad biológica |
|--|---|---------------------|
| <p><i>Xylaria</i> sp, <i>Juniperus cedrus</i> (Dai <i>et al.</i>, 2006)</p> |  <p>Nodulusporina A</p> | <p>Antifúngico</p> |
| |  <p>Nodulusporina B</p> | |
| |  <p>Nodulusporina C</p> | |
| <p><i>Daldinia</i> <i>eschscholtzii</i> GsE13, <i>Gliricidia sepium</i> (Flores-Reséndiz <i>et al.</i>, 2021).</p> |  <p>5-Hidroxi-8-metoxi-2-metil-4H-cromen-4-ona</p> | <p>Fitotóxico</p> |

Cuadro 1. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislamientos de hongos endófitos (continuación).

| Hongo endófito, planta hospedera y referencia | Metabolitos secundarios / estructura química | Actividad biológica | |
|---|--|----------------------------------|--|
| <p><i>Daldinia eschscholtzii</i> GsE13, <i>Gliricidia sepium</i> (Flores-Reséndiz <i>et al.</i>, 2021).</p> | | <p>Fitotóxico</p> | |
| | <p>5-Metoxi-2-metil-croman-4-ona</p> | | |
| | <p>5-Metoxi-2-metil-croman-4-ol</p> | | |
| | | <p>4,8-Dihidroxi-1-tetralona</p> | |
| | | <p>1,8-Dimetoxynaftaleno</p> | |

Cuadro 1. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislamientos de hongos endófitos (continuación).

| Hongo endófito, planta hospedera y referencia | Metabolitos secundarios / estructura química | Actividad biológica |
|---|---|---------------------|
| <p><i>Xylaria cubensis</i> Aislada de <i>Eugenia brasiliensis</i> (Biasetto <i>et al.</i>, 2019).</p> |  <p>Citocalasina D</p> | Fitotóxico |
| |  <p>Citocalasina C</p> | |

3.2.2 Metabolitos secundarios volátiles de hongos endófitos

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, organic volatile compounds por sus siglas en inglés) son compuestos de bajo peso molecular que contienen carbono, se evaporan fácilmente a temperatura y presión ambientales normales, son hidrofóbicos (Inamdar *et al.*, 2020; Kaddes *et al.*, 2019) y pueden atravesar las membranas celulares, por lo que juegan un papel importante en el funcionamiento del ecosistema (Dudareva *et al.*, 2013).

La biosíntesis de los VOCs depende de la disponibilidad de carbono, nitrógeno y sulfuro, así como de la energía proporcionada por el metabolismo primario. Los hongos endófitos son capaces de interactuar con sus hospederos y producir una mezcla de moléculas VOCs, permitiendo a las plantas transmitir señales complejas y comunicarse con su ambiente pues están involucrados en innumerables interacciones entre plantas, simbioses mutualistas y antagonistas (Dudareva *et al.*, 2013; Kaddes *et al.*, 2019). La suma de todos los volátiles producidos por los organismos es conocida como volatiloema o “huella química” (Bruissson *et al.*, 2023). Algunas de las principales funciones que pueden ser mediadas por los VOCs son: defensa en contra de herbívoros y patógenos, comunicación entre diferentes órganos de las plantas y con otras plantas, así como la atracción de organismos benéficos para la planta, como polinizadores y dispersores de semillas (Farré-Armengol *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha comprobado hay una fuerte relación entre la producción de VOCs y la fitotoxicidad debido a efectos alelopáticos en plantas vecinas (Arimura *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2021). La emisión de VOCs es un mecanismo antifúngico predominante en los microorganismos antagonistas (Zhao *et al.*, 2022). Desempeñan un papel importante en la formación y regulación de asociaciones simbióticas ya que están involucrados en el reconocimiento, la defensa y competencia entre comunidades de microbios (Effmert *et al.*, 2012).

Se ha puesto especial atención en el uso y aplicación de VOCs dentro de la industria agroquímica en el control post cosecha evitando la producción de micotoxinas (Inamdar *et al.*, 2020). Por ejemplo, el hongo *Muscodor yucateensis* aislado del árbol *Bursera simaruba* produce una mezcla de 38 VOCs (identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas), entre los que destaca la presencia de octano, 2-pentilfurano, cariofileno, aromadendreno y derivados del naftaleno. Esta mezcla de VOCs es efectiva contra hongos fitopatógenos, como *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*. Además, inhibe el crecimiento de la raíz de algunas especies vegetales como *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Solanum lycopersicon* (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010).

Los hongos endófitos producen una amplia gama de compuestos volátiles y no volátiles que pueden ser utilizados para el control biológico (Mousa y Raizada, 2013). Su actividad antagónica ha sido evidenciada, por ejemplo, en el desarrollo de nematocidas alternativos (Anke y Sterner 1997), fungicidas e insecticidas (Andrés *et al.*, 2017), bactericidas y estimuladores de crecimiento. Por ejemplo, los metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp. han probado su actividad al suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos y favorecer el crecimiento de las plantas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2015).

Los hongos endófitos han sido usados en el control de enfermedades post cosecha, por ser antagonistas que inhiben el crecimiento del micelio de fitopatógenos. Por ejemplo, los hongos endófitos *Cylindrocarpon* sp., *Stachybotrys elegans*, y *Choiromyces aboriginum*, aislamientos de la caña, penetran y causan la lisis enzimática de las hifas de los hongos patógenos *Phytophthora aphanidermatum* y *R. solani* (Cao *et al.*, 2009). Por su parte, *Muscodor albus*, aislado de *Cinnamomum zeylanicum*, ha sido usado como biofumigante en control post cosecha para controlar el crecimiento del moho gris (*Botrytis cinerea*) en manzana y la podredumbre (*Monilinia fructicola*) del durazno (Mercier *et al.*, 2007; Strobel *et al.*, 2011).

Dado que los criterios de selección de plantas hospederas que incluyen entre otros aspectos, a las plantas que crecen en zonas de alta biodiversidad, sin aparente enfermedad o daños por herbívoros (criterio ecológico), así como aquellas con antecedentes etnomédicos (Strobel *et al.*, 2004; Strobel y Daisy, 2003), la REBIOSH se considera una zona de interés para el estudio de hongos endófitos. Esto se debe a que en esta reserva existe una mayor posibilidad de aislar una amplia variedad de hongos endófitos de plantas hospederas, los cuales podrían potencialmente producir metabolitos secundarios con una elevada actividad biológica (Strobel *et al.*, 2004).

Bajo este contexto se seleccionaron de acuerdo con el criterio ecológico, las especies *Hippocratea acapulcensis* (Celastraceae) y *Hamelia patens* (Rubiaceae), llamadas comúnmente mata piojo y coralillo, respectivamente para el estudio de sus hongos endófitos. Es importante destacar que *H. patens* se utiliza como hierba medicinal contra picaduras de insecto, reumatismo, asma y desórdenes menstruales y ha mostrado actividad analgésica y antiséptica (Scofield, 1998). En el área agroquímica, se ha estudiado su actividad antifúngica contra hongos de importancia agrícola como *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Abubacker *et al.*, 2013). No obstante, no se dispone de información sobre su actividad fitotóxica.

Por otro lado, *H. acapulcensis* también posee usos medicinales documentados, incluyendo su aplicación para disminuir la acidez estomacal y como remedio contra plagas del cuero cabelludo (García-Loza, 2016; Mena-Jiménez, 2018). Además, se ha registrado que esta planta actúa como hospedera de hongos endófitos con actividad antifúngica (Macías-Rubalcava *et al.*, 2018).

III. Hipótesis

Dada la gran diversidad de hongos endófitos que comúnmente colonizan las plantas, al realizar el aislamiento de hongos endófitos a partir de hojas sanas de las plantas *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*, se espera evidenciar la producción *in vitro* de metabolitos secundarios bioactivos volátiles y no volátiles con potencial fitotóxico y con ello contribuir al conocimiento de nuevos agentes de biocontrol o bioplaguicidas.

IV. Objetivos

1. Objetivo general

Evaluar el potencial fitotóxico de los metabolitos secundarios volátiles y no volátiles sintetizados por hongos endófitos aislados de las plantas *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*, recolectadas en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, para contribuir al posible desarrollo de nuevos agentes herbicidas de origen natural con menor toxicidad e impacto ambiental.

2. Objetivos particulares

- Aislar y purificar hongos endófitos de hojas sanas de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*.
- Documentar las características macro y microscópicas de las cepas puras de hongos endófitos para su posterior identificación taxonómica.
- Cultivar a los hongos endófitos puros utilizando medio arroz y condiciones estáticas de incubación.
- Obtener los extractos orgánicos a partir del medio de cultivo, mediante un proceso de maceración exhaustivo, empleando disolventes orgánicos.
- Realizar el análisis del perfil metabolómico de los extractos orgánicos obtenidos, utilizando cromatografía en capa fina.
- Evaluar el potencial fitotóxico de los extractos fúngicos sobre la germinación, crecimiento de raíz y respiración de las plántulas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Panicum miliaceum*, *Trifolium pratense* y *Medicago sativa*.
- Evidenciar la producción de compuestos orgánicos volátiles y determinar su efecto fitotóxico sobre la germinación, crecimiento de raíz y respiración de las especies de plantas en estudio.

V. Desarrollo experimental

1. Material Vegetal

La recolecta del material vegetal utilizado para este estudio se llevó a cabo en la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH), en la estación biológica de la localidad de Quilamula en el municipio de Tlaquilténango, (8°30'4.1"N - 98° 51'52"O' y 18°32'12.2"N - 99° 02'05"O 1080-1230 msnm), Morelos, en mayo de 2019. Bajo el criterio de selección de plantas que crecen en zonas de alta biodiversidad aunado al criterio ecológico (Yu *et al.*, 2010) se recolectaron hojas sanas de la parte media de tres plantas para cada especie y fueron almacenadas dentro de bolsas con cierre hermético a temperatura controlada, las cuales fueron procesadas dentro de las primeras 24 h después del muestreo.

2. Aislamiento y purificación de hongos endófitos

El material vegetal se lavó con agua purificada y agua destilada estéril. A continuación, dentro de una campana de extracción se esterilizó de manera superficial empleando la siguiente secuencia de soluciones: etanol al 75%, agua destilada estéril, NaClO al 3.4%, agua destilada estéril, etanol al 75% y agua destilada estéril, todas ellas durante 1 min. Una vez esterilizadas, las hojas se secaron con papel absorbente estéril. Con ayuda de un bisturí esterilizado a la flama se obtuvieron cortes de aproximadamente 2× 2 mm de la parte central de las hojas, sin tomar nervaduras (Schulz *et al.*, 1993). Al azar, se seleccionaron 4 segmentos por hoja y se colocaron en cajas Petri con agar-papa-dextrosa (PDA) + cloranfenicol (500 mg/L) y otros 4 segmentos en medio agar-agua destilada al 2% (AA) + cloranfenicol (500 mg/L; Flores-Reséndiz *et al.*, 2021; Sánchez-Fernández, 2010; 2016).

Las cajas se incubaron a temperatura ambiente con ciclos de luz artificial-oscuridad (12:12 h) y se revisaron periódicamente durante seis semanas. De cada segmento de hoja emergieron colonias distintas de hongos endófitos que fueron transferidos a cajas de Petri con PDA. Para obtener cultivos puros se realizaron las resiembras necesarias utilizando distintos medios de cultivo selectivos, como AA, rosa de bengala y PDA con y sin cloranfenicol (500 mg/L; Sánchez-Fernández, 2010; 2016; Sánchez-Ortiz, 2016).

3. Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*

Las características macroscópicas se obtuvieron sembrando por cuadruplicado en el centro de una caja Petri con PDA un inóculo de 5 mm de diámetro obtenido a partir del micelio de un cultivo puro de 8 días de crecimiento. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente con fotoperiodos de 12:12 h luz artificial-oscuridad. Cuando los hongos crecieron hasta el límite de las cajas Petri se registraron las características del micelio en el anverso y reverso: color, textura, consistencia, producción de pigmento, tipo de crecimiento, así como la presencia de exudados (Sánchez-Fernández, 2010; 2016; Sánchez-Ortiz, 2016).

Para observaciones preliminares, se utilizó el método de la cinta adhesiva transparente. Se colocó un pedazo de cinta de aproximadamente 4 cm, sostenido con la ayuda de pinzas estériles, en contacto con la superficie del cultivo a analizar. Posteriormente, se presionó suavemente el lado adhesivo sobre la superficie del micelio aéreo para adherir sus estructuras. Luego, se colocó la cinta sobre un portaobjetos con gotas de azul de lactofenol y/o rojo Congo y se observaron a través de objetivos de 10x y 40X las características morfológicas del micelio y órganos reproductivos (Sánchez-Fernández, 2016; Sánchez-Ortiz, 2016; Pacasa-Quisbert, 2017; Villanueva-Silva, 2017).

Las características microscópicas se establecieron mediante la observación microscópica de microcultivos, siguiendo la técnica descrita por Prats (2006) que consistió en preparar una cámara húmeda estéril, utilizando una caja de Petri, en cuyo fondo se colocó agua estéril, papel filtro y un triángulo de vidrio, encima del mismo se colocó un portaobjetos y sobre éste un cuadrado de 2 cm x 2 cm de PDA al 2%, cortado con ayuda de bisturí. El cuadro de PDA se inoculó en las cuatro aristas con micelio de un cultivo puro, mediante picadura con asa micológica, sobre el bloque del medio ya inoculado se colocó otro portaobjetos y se incubó durante 7 días a temperatura ambiente con fotoperiodos de 12:12 h luz artificial-oscuridad. Una vez terminado el periodo de incubación, se retiró uno de los dos cubreobjetos y se colocó en el cubreobjetos sin PDA de una a dos gotas de azul lactofenol y/o de rojo Congo para después ser observar al microscopio el micelio y órganos reproductivos *in situ* con objetivos de 10x y 40X (Arenas, 1993).

Las características microscópicas observadas fueron comparadas con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter 1998; Berlanger y Powelson, 2000; Dugan *et al.*, 2006, Ellis *et al.*, 2007; Pitt y Hocking, 2009; Sciortino, 2017.

4. Cultivos en medio arroz

Los aislamientos de hongos endófitos se cultivaron en medio arroz (MA), el cual beneficia el crecimiento de los hongos filamentosos y permite la optimización en la producción de metabolitos secundarios (Sandoval-Espinosa, 2014; Aly *et al.*, 2008). Se preparó con 30 g de arroz lavado y remojado durante 1 h en agua destilada. Posteriormente, se filtró a través de malla de plástico y se colocó en un frasco de vidrio de 300 mL, por último, se agregaron 40 mL de agua destilada. Se prepararon 4 frascos con medio para cada aislado de hongo endófito en cultivo. El medio se esterilizó en autoclave a 121° C durante 15 min. En cada frasco se introdujeron 5 inóculos de agar de 1 cm de diámetro, provenientes del cultivo sólido del microorganismo previamente incubado en PDA por 15 días. El MA se incubó en

condiciones estáticas por 30 días a temperatura ambiente con un fotoperiodo de 12:12 h luz artificial-oscuridad (Sánchez-Fernández, 2016; Sánchez-Ortiz, 2016).

4.1 Obtención de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio

Una vez finalizado el periodo de incubación, se obtuvieron los extractos orgánicos de cada uno de los hongos endófitos puros mediante maceración exhaustiva con hexano. El proceso de extracción se realizó durante cinco días consecutivos con 250 mL hexano y posteriormente se repitió el mismo procedimiento con AcOEt. Los extractos se concentraron al vacío con rotavapor y se registró su rendimiento de extracción (Flores-Reséndiz, *et al.*, 2021).

4.2 Análisis del perfil metabolómico de los extractos orgánicos

Los extractos secos se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF) con un sistema de elución: CH₂Cl₂:CH₃OH (97:3) y fueron observadas con luz UV a 365nm y 254nm, y fueron reveladas con H₂SO₄ al 10% a 80°C. Se compararon los perfiles metabolómicos obtenidos con hexano y AcOEt y se unificaron aquellos que presentaron mayor similitud (Villanueva-Silva, 2017).

5. Evaluación de la actividad fitotóxica de extractos orgánicos

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos se llevó a cabo mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación, longitud de raíz y respiración de plántulas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Panicum miliaceum*, *Trifolium pratense* y *Medicago sativa*, obtenidas de Casa Cobo,

S.A. de C.V. (Central de Abastos, Ciudad de México) utilizando el método de dilución en agar en caja Petri (Flores-Reséndiz, *et al.*, 2021).

Los bioensayos de fitotoxicidad se realizaron en condiciones estériles en cajas Petri de 5 cm de diámetro. Se pesaron 8 mg de extracto y se disolvieron en 0.1-0.3 mL de metanol, a continuación, se agregaron 40 mL de agua destilada y 40 mL de AA al 2%, para obtener una concentración final de 100 µg/mL. Posteriormente, se vertieron 5 mL de las disoluciones en cajas Petri y se dejaron solidificar por completo, para finalizar se colocaron 30 semillas por caja de cada una de las especies.

Las cajas Petri se incubaron durante 48 h en la oscuridad a 28°C y la actividad fitotóxica se registró contando el número de semillas germinadas y midiendo la longitud de las raíces con el procesador de imágenes ImageJ. De manera paralela se evaluaron los controles negativos siguientes: AA al 1%, AA 1%/metanol (0.3 mL) y el herbicida comercial RIVAL (Glifosato: sal monoamónica de *N*-(fosfometil) glicina) como control positivo, a una concentración de 100 µg/mL, 200 µg/mL y 300 µg/mL.

El efecto de los extractos orgánicos sobre la respiración de las plántulas se obtuvo mediante el registro del consumo de oxígeno, utilizando un electrodo de oxígeno tipo Clark, conectado a un oxímetro YSI. Una vez transcurrido el periodo de incubación (48 h), las 30 plántulas de cada una de las cajas de Petri se transfirieron a una celda de vidrio y se adicionaron 5 mL de agua desionizada. El consumo de O₂ de las plántulas se registró cada 5 s durante 4 min. El análisis de la regresión lineal simple de cada una de las curvas permitió determinar cuantitativamente el O₂ consumido por las plántulas de cada una de las semillas de prueba (Flores-Reséndiz, *et al.*, 2021).

Los promedios de porcentajes de inhibición se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una $\alpha = 0.05$ y una prueba de contrastes de Tukey HDS, utilizando el programa GraphPad Prism versión 9 (Macías-Rubalcava *et al.* 2014; Meléndez-González *et al.*, 2015).

6. Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos orgánicos volátiles

La determinación cuantitativa de la actividad fitotóxica de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por los hongos endófitos aislados se realizó en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con dos compartimentos, uno con 10 mL de PDA al 2% y el otro con 10 mL de AA. La división entre compartimentos impide el paso de los compuestos solubles producidos por el hongo endófito de prueba y permite el libre movimiento de VOCs (Ulloa-Benítez *et al.*, 2016).

En el compartimento de la caja con PDA se colocó una fila de tres inóculos de 5 mm de diámetro equidistantes de 10 aislamientos de hongos endófitos debido a su capacidad de desprender olores particulares y/o a que producen exudado aromático (Kanchiswamy *et al.*, 2015; Netzker *et al.*, 2020; Schulz, *et al.*, 2015). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente en fotoperiodos de 12:12 h luz artificial-oscuridad durante 7 días. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se colocaron 30 semillas de cada una de las plantas de prueba en el compartimento con AA al 2%, las cajas se sellaron con Parafilm y se incubaron a 28° C en la oscuridad. De manera paralela se evaluaron los controles siguientes: el medio de cultivo sin inocular como control negativo y la mezcla de los alcoholes 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol y alcohol feniletílico a una concentración de 1.25 µg/mL como control positivo, dentro de un vial colocado en el centro de la caja Petri (Roque-Flores, 2019).

La actividad fitotóxica se registró contando el número de semillas germinadas, midiendo la longitud de las radículas y determinando el consumo de O₂ de las plántulas después de 48 h como se describió en el Inciso 5. Evaluación de la actividad fitotóxica de extractos orgánicos.

VI. Resultados y discusión

La presente investigación se desarrolló con el propósito de aislar y purificar hongos endófitos con potencial antagónico de las plantas *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*, las cuales fueron recolectadas en una zona de alta biodiversidad. Además, se buscó determinar la actividad fitotóxica de los extractos orgánicos obtenidos a partir del cultivo de los hongos endófitos en MA, así como evaluar el potencial fitotóxico de los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) producidos por los hongos endófitos aislados.

Los resultados obtenidos se dividen en cuatro partes:

La primera comprende el aislamiento y purificación de los hongos endófitos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*, así como la determinación de las características macro y microscópicas de los hongos aislados. La segunda se enfoca en la obtención de extractos orgánicos a partir de cultivos de los hongos endófitos puros en medio arroz, así como en la determinación de los perfiles cromatográficos por cromatografía en capa fina. La tercera engloba la evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos obtenidos (compuestos no volátiles) sobre la germinación, crecimiento de raíz y respiración de cuatro plantas prueba. Finalmente, la cuarta establece cuantitativamente el potencial fitotóxico de los VOCs producidos por los hongos endófitos sobre las plantas prueba en los procesos fisiológicos en estudio.

1. Aislamiento y purificación de hongos endófitos.

El aislamiento realizado a partir de las hojas sanas de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* dio como resultado 27 aislamientos de hongos endófitos, de los cuales se determinaron los morfotipos, basándose en la morfología macroscópica, agrupándolos como miembros similares (macroscópicamente) para su clasificación temporal y análisis (Allaby, 2010). Se determinó un total de 9 morfotipos para *H. acapulcensis* y 5 para *H. patens* (**Cuadro 2**), confirmando así que los criterios utilizados para la selección de plantas hospederas garantizan diversos morfotipos de hongos endófitos (Sánchez-Fernández, *et al.*, 2013; Strobel *et al.*, 2003; Strobel *et al.*, 2004).

Cuadro 2. Número total de aislamientos y morfotipos obtenidos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*.

| Planta | Clave | Aislamientos puros totales | Número total de morfotipos |
|---------------------------------|-------|----------------------------|----------------------------|
| <i>Hippocratea acapulcensis</i> | HAE | 14 | 9 |
| <i>Hamelia patens</i> | HPE | 13 | 5 |

A cada aislamiento se le asignó una clave que constó de: la primera letra del género y especie de la planta hospedera, más la letra E identificándolo como endófito, por último, se adicionó un número consecutivo para diferenciar los morfotipos.

1.2 Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*

Las características macroscópicas de los 14 morfotipos de hongos endófitos aislados obtenidos se determinaron mediante la observación detallada de los cultivos en medio PDA con ayuda un microscopio estereoscópico. Para cada aislamiento se registró el color, textura, tipo de crecimiento de la colonia, borde, presencia de pigmentos, anillos de crecimiento o exudados, así como también el tiempo que les tomó crecer al límite de la caja Petri. Para el análisis de las estructuras microscópicas se utilizó la técnica de microcultivos y tinción con azul de lactofenol y/o rojo Congo. Con esta técnica se registró la presencia de estructuras reproductivas, como conidios y conidióforos, así como el tipo de hifas que conforman el micelio.

El estudio detallado de las características macro y microscópicas de los aislamientos de hongos endófitos (**Cuadro 3**) permitió la identificación tentativa de los morfotipos HPE1, HPE3, HPE4, HPE5, HAE5, HAE6 y HAE7 como pertenecientes al género *Verticillium*, a los aislamientos HPE2, HAE3, HAE8 y HAE9 como potenciales integrantes del género *Acremonium*, a los aislamientos HAE2 y HAE4 como posibles pertenecientes al género *Paecilomyces* y por último el aislamiento HAE1 permanece sin identificar.

El género *Verticillium* (**Figura 3A**) suele incluir colonias de rápido crecimiento con coloración blanca a amarilla que se tornan color marrón, rojo o verde, presentan texturas aterciopeladas, vellosas o algodonosas. El reverso se caracteriza por presentar coloración marrón, rojizo o amarillo (Ellis *et al.*, 2007). Microscópicamente el micelio vegetativo es hialino, septado y multinucleado (Berlanger y Powelson, 2000). Tienen conidióforos delgados, ramificados y verticilados, conidios de formas ovoides a elipsoides, hialinos, unicelulares, nacidos en la parte apical de la fiálide de manera individual o en grupos, las fiálides son divergentes, largas y delgadas

(Barnett y Hunter, 1998; Dugan *et al.*, 2006; Ellis *et al.*, 2007; Inderbitzin *et al.*, 2011). *Verticillium* ha sido encontrado como endófito en diversas plantas de importancia médica, además se sabe que algunos metabolitos secundarios sintetizados por este género poseen actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos, como *Pyricularia oryzae* (patógeno del arroz; You, *et al.*, 2009; Wheeler, 2018).

El género *Acremonium* (**Figura 3B**) generalmente incluye colonias de crecimiento lento, pueden ser blancas, grises, rosadas, crema o anaranjadas, húmedas al principio y con la edad se vuelven polvorientas parecidas a la gamuza (Ellis *et al.*, 2007). El reverso a menudo intensifica su color con respecto al anverso de la colonia (Sciortino, 2017). Microscópicamente el micelio vegetativo está formado por hifas delgadas, septadas y hialinas (Perdomo *et al.*, 2011; Pitt y Hocking, 2009). Presenta fiálides largas, delgadas con punta fina que forman grupos o cadenas de conidios en el ápice. Algunas fiálides pueden tener un solo conidio en la punta, especialmente los cultivos jóvenes, los conidios se agrupan en forma de cabeza, tienen forma ovalada o circular y generalmente son unicelulares (Sciortino, 2017; Barnett y Hunter, 1998). *Acremonium* es reconocido como endófito en distintos pastos perennes, confiriendo resistencia a los insectos herbívoros y al estrés ambiental (Khan *et al.*, 2021). También ha sido aislado como hongo endófito de plantas leñosas de clima tropical y algunos metabolitos secundarios producidos por éste demostraron actividad contra oomicetos fitopatógenos, como *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora capsici* (Meléndez-González *et al.*, 2015). Además, estudios previos lo han evidenciado como endófito presente en *H. patens* (Gómez-Rivera *et al.*, 2016).

El género *Paecilomyces* (**Figura 3C**), es generalmente descrito por tener colonias de rápido crecimiento, con colores amarillos, óxido, dorados, lila, rosa, marrón o blanco. Las colonias nunca son de color verde brillante o azul verdoso, diferenciándose así de *Penicillium*, la textura de la colonia es polvorienta, lanuda, algodonosa o aterciopelada. El reverso es crema, rosa, amarillo o marrón claro (Ellis *et al.*, 2007; Sciortino, 2017). Microscópicamente el micelio está formado por hifas hialinas y septadas. Las fiálides están hinchadas de la base y disminuye

gradualmente en un cuello largo y delgado, están espaciadas y distantes en forma de V o W. Los conidios se presentan en cadenas largas y delgadas, de colores hialinos a oscuros, de formas alargadas y ovoides (Barnett y Hunter, 1998; Ellis *et al.*, 2007; Sciortino, 2017). Algunos endófitos de este género son productores de fitohormonas, como las auxinas y giberelinas (Khan *et al.*, 2012), compuestos antifúngicos (Wang *et al.*, 2002) y algunas especies son antagonistas de hongos fitopatógenos, como *Biscogniauxia mediterranea*, *Fusarium moniliforme* y oomicetos como *Phytophthora cinnamomi* (Rodrigo *et al.*, 2017). Es importante mencionar que no hay reportes previos en la literatura de que los metabolitos secundarios sintetizados por hongos endófitos de estos tres géneros sean productores de compuestos fitotóxicos.

Por otra parte, es importante señalar que todos los hongos aislados en la presente investigación presentaron un crecimiento lento y micelio de color blanco. Algunos morfotipos, como el HAE1, no presentaron estructuras de reproducción, las cuales son características pertenecientes a los hongos endófitos, además de que todos presentaron distintas tasas de crecimiento indicando la presencia de diferentes morfotipos (Selim *et al.*, 2012).

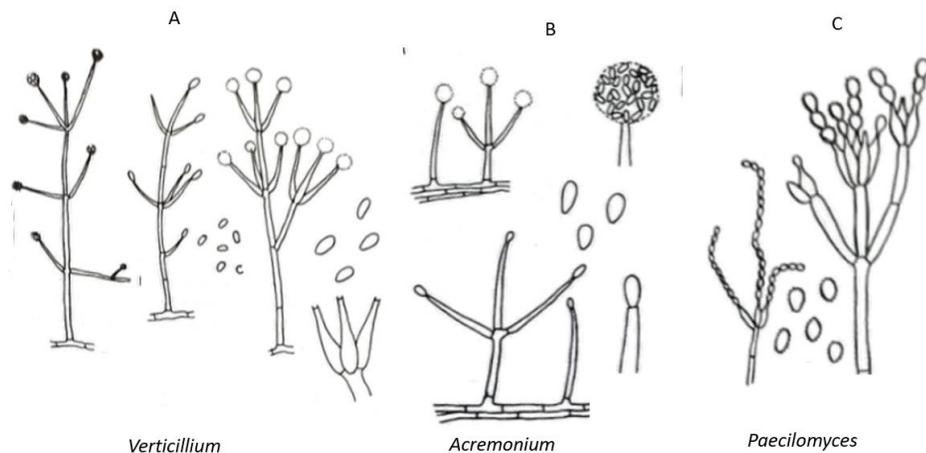
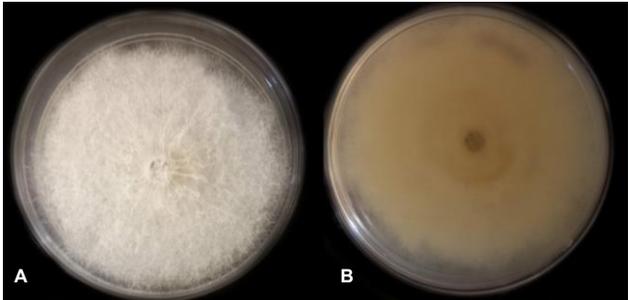
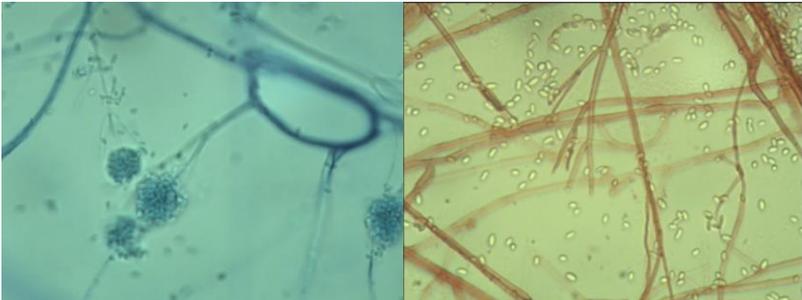
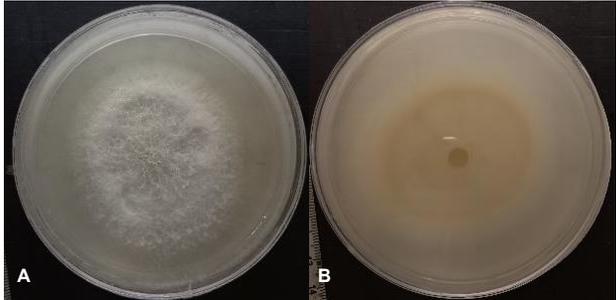
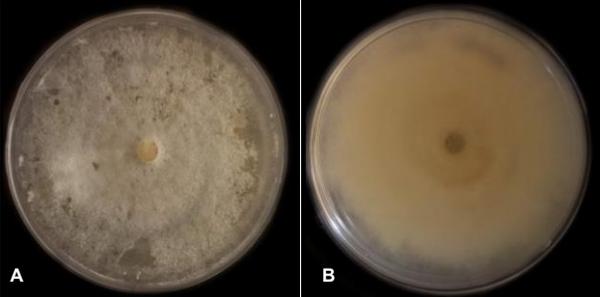
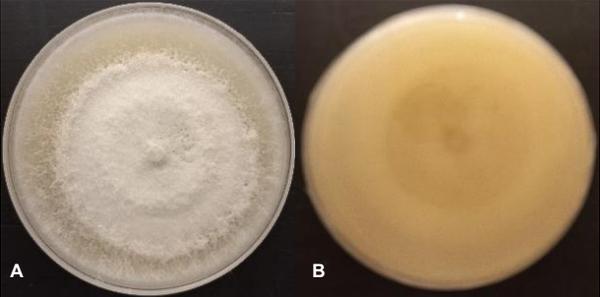
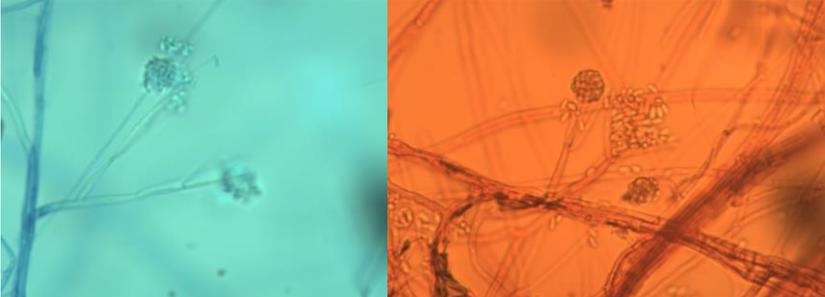


Figura 3. Esquemas representativos de los géneros propuestos, modificada de Barnett y Hunter, 1998.

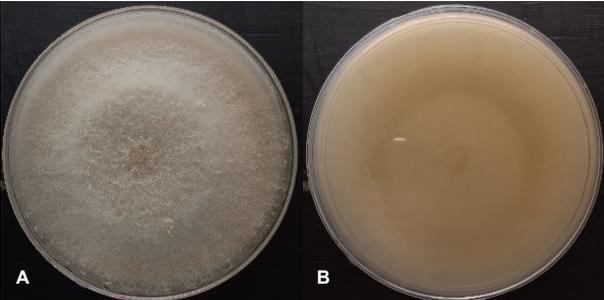
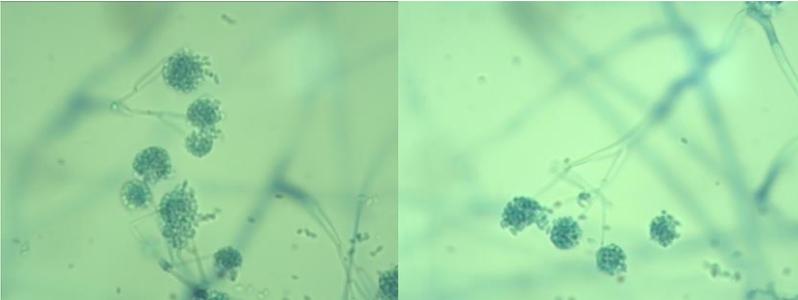
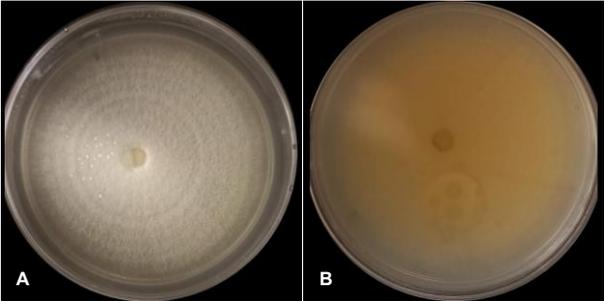
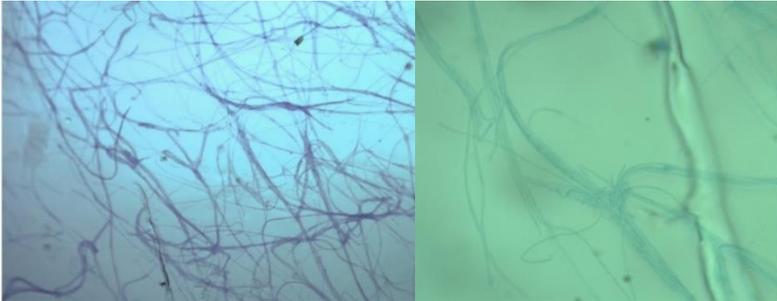
Cuadro 3. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*.

| Hongo y género propuesto | Características macroscópicas | Características Microscópicas |
|-----------------------------|---|--|
| HPE1 <i>Verticillium</i> |  <p>A. Micelio color blanco, algodonoso, con crecimiento radial y borde filamentosos. Produce un exudado incoloro. B. Reverso presenta un anillo en el centro con pigmentación marrón claro. 12 días de crecimiento.</p> |  <p>Micrografías (400X) teñidas con azul de lactofenol (izq.) y rojo Congo (der.). Hifas septadas y hialinas. Hay presencia de conidios ovalados, alargados de forma libre y agrupados en conidióforos dispuestos en largas fiálides divergentes con disposición opuesta.</p> |
| HPE2 <i>Acremonium</i> |  <p>A. Micelio color blanco, algodonoso en el centro de la colonia y aterciopelado hacia los extremos, de crecimiento radial y borde uniforme. No produce exudado. B. Reverso con coloración blanca y manchas concéntricas color marrón claro. 20 días de crecimiento</p> |  <p>Micrografías (400X) teñidas con azul de lactofenol. Hifas septadas, hialinas, con presencia de conidios hialinos, ovalados, alargados y agrupados en conidióforos en la parte apical de las fiálides simulando una cabeza.</p> |

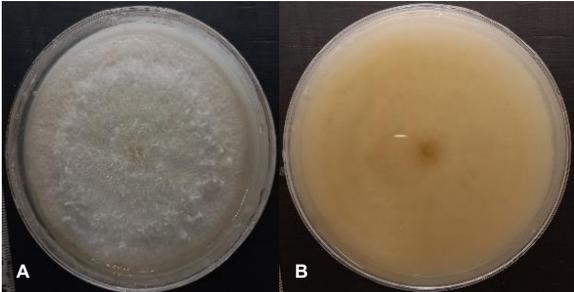
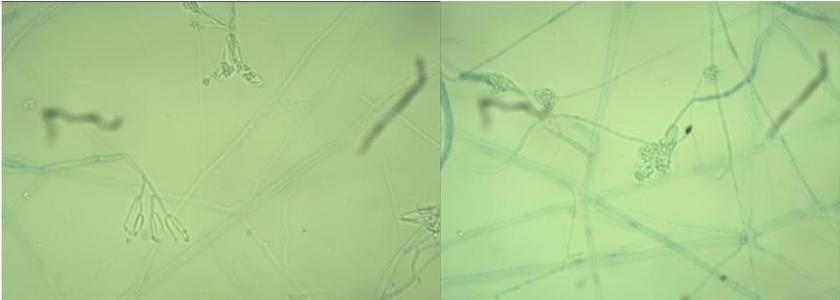
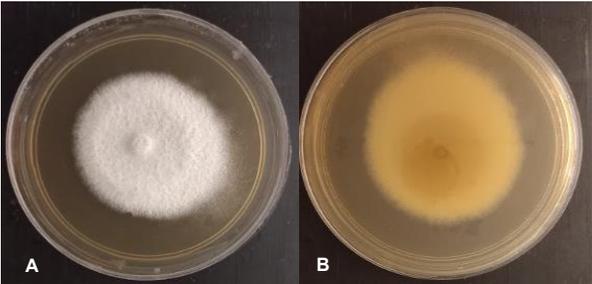
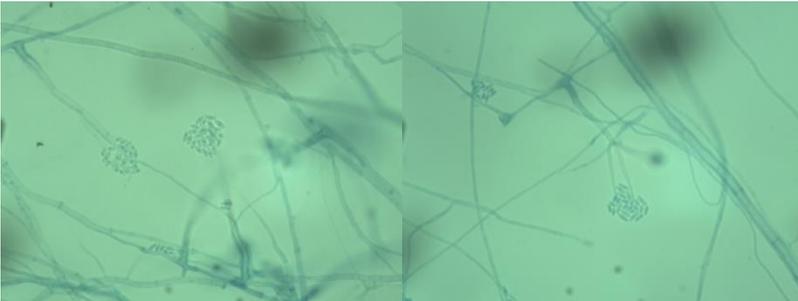
Cuadro 4. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* (continuación).

| Hongo y género propuesto | Características macroscópicas | Características Microscópicas |
|--|---|---|
| <p>HPE3</p> <p><i>Verticillium</i></p> |  |  |
| <p>HPE4</p> <p><i>Verticillium</i></p> |  |  |
| | <p>A. Micelio color crema, de textura algodonosa con poca densidad, con crecimiento radial de borde irregular y produce un exudado incoloro. B. Reverso con coloración blanca y color marrón claro al centro. 10 días de crecimiento.</p> | <p>Micrografías (400X) teñidas con azul de lactofenol (A) y rojo Congo (der.). Hay presencia de conidios ovalados y hialinos, agrupados en conidióforos dispuestos en largas fiálides que divergen.</p> |
| | | <p>Micrografías (400X) teñidas con azul de lactofenol (izq.) y rojo Congo (der.). Hifas septadas y hialinas. Hay presencia de conidios ovalados de forma libre y agrupados en conidióforos dispuestos en fiálides largas y delgadas que divergen.</p> |

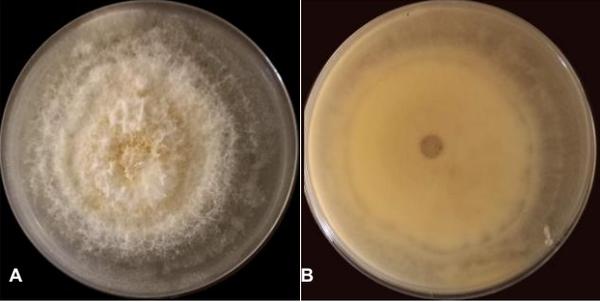
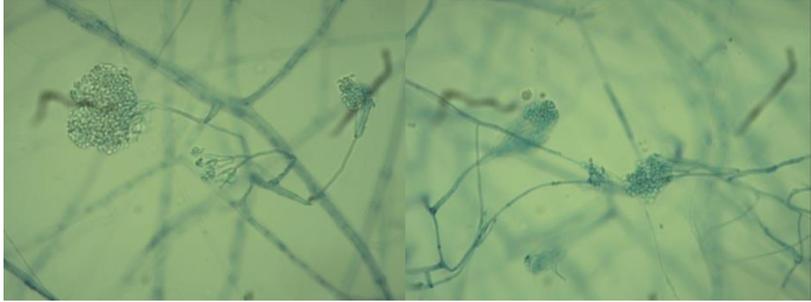
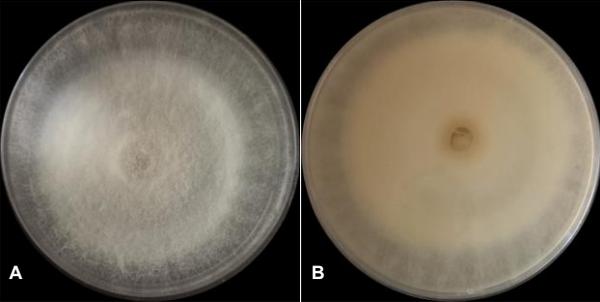
Cuadro 4. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* (continuación).

| Hongo y género propuesto | Características macroscópicas | Características Microscópicas |
|--|---|---|
| <p>HPE5</p> <p><i>Verticillium</i></p> |  <p>A. Micelio color blanco de textura algodonosa, elevado al centro de la colonia y plano hacia los extremos. Presenta crecimiento radial y borde uniforme. B. Reverso color blanco, con anillos de crecimiento color marrón claro. 15 días de crecimiento.</p> |  <p>Micrografías (400X) teñidas con azul de lactofenol. Hay presencia de conidios ovalados de forma libre y agrupados en conidióforos dispuestos en fiálides delgadas y divergentes con disposición opuesta.</p> |
| <p>HAE1</p> |  <p>A. Micelio blanco, de textura polvosa, con crecimiento radial y borde uniforme, no presenta producción de exudado. B. Reverso color marrón claro y con anillos de crecimiento. 17 días de crecimiento.</p> |  <p>Micrografías teñidas con azul de lactofenol observadas a 400X. Hifas delgadas, hialinas y septadas.</p> |

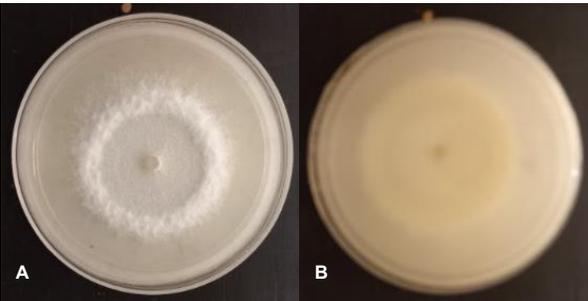
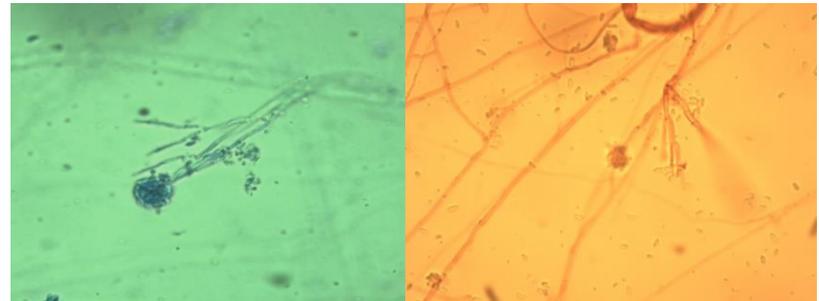
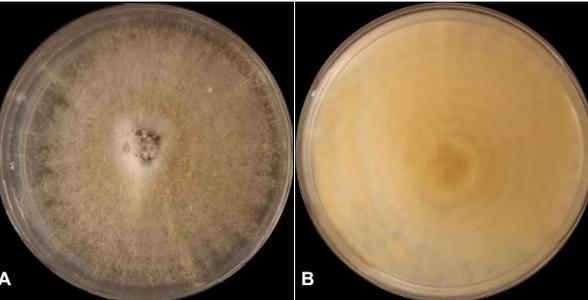
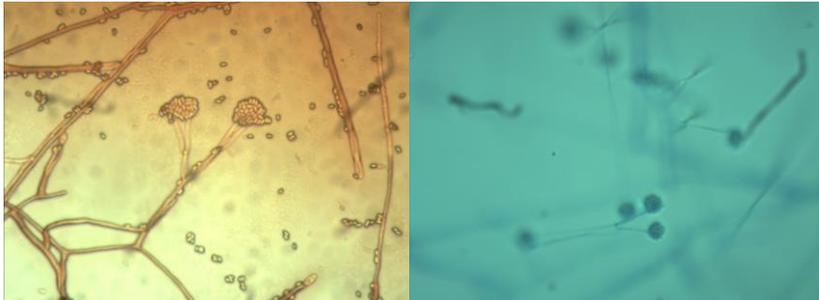
Cuadro 4. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* (continuación).

| Hongo y género propuesto | Características macroscópicas | Características Microscópicas |
|--|--|--|
| <p>HAE2</p> <p><i>Paecilomyces</i></p> |  |  |
| <p>HAE3</p> <p><i>Acremonium</i></p> |  |  |
| | <p>A. Micelio color blanco de textura plumosa, elevado al centro de la colonia y con menos densidad a los extremos. Presenta crecimiento radial y borde uniforme, además de la producción de exudado incoloro. B. Reverso con coloración marrón claro y anillos de crecimiento con leve pigmentación café. 15 días de crecimiento.</p> | <p>Micrografías (400X) teñidas con azul de lactofenol. Hifas delgadas, septadas y hialinas. Hay presencia de conidios redondos y hialinos que se encuentran de forma libre y agrupados en conidióforos, producen cadenas cortas de conidios ovalados, presenta fiálides en grupos de tres.</p> |
| | <p>A. Micelio color blanco de textura polvosa. Presenta crecimiento radial y bordes irregulares, con alta producción de exudado incoloro. B. Reverso color blanco con pigmentación marrón claro al centro. 18 días de crecimiento.</p> | <p>Micrografías (400X) teñidas con azul de lactofenol. Hifas septadas, hialinas, con presencia de conidios hialinos, ovalados, alargados y agrupados en conidióforos en la parte apical de las fiálides simulando una cabeza</p> |

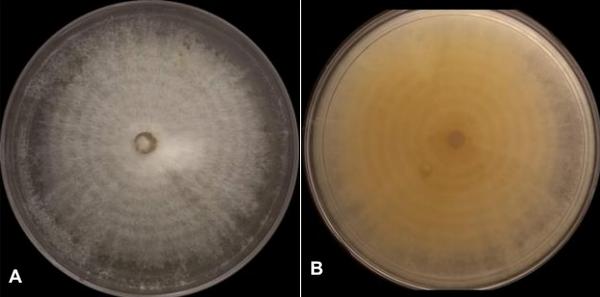
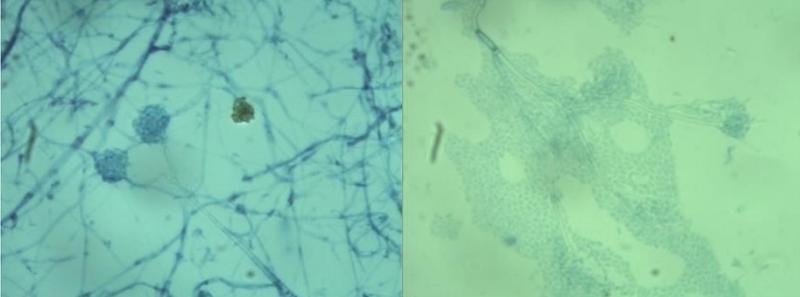
Cuadro 4. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* (continuación).

| Hongo y género propuesto | Características macroscópicas | Características Microscópicas |
|--|---|--|
| <p>HAE4</p> <p><i>Paecilomyces</i></p> |  <p>A. Micelio color amarillo al centro de la colonia y blanco a los extremos, de textura lanuda, con crecimiento radial y bordes filamentosos. No produce exudado. B. Reverso de color marrón claro y anillado, micelio menos denso a la periferia. 20 días de crecimiento.</p> |  <p>Micrografías (400X) teñidas con azul de lactofenol. Se observan hifas delgadas, septadas y hialinas. Hay presencia de conidios redondos y hialinos que se encuentran de forma libre y agrupados en conidióforos, producen cadenas cortas de conidios ovalados, presenta fiálides en grupos de tres.</p> |
| <p>HAE5</p> <p><i>Verticillium</i></p> |  <p>A. Micelio color blanco con textura algodonosa, de crecimiento radial y borde uniforme. B. Reverso de color blanco y micelio poco denso en la periferia. 15 días de crecimiento.</p> |  <p>Micrografías (400X) teñidas con azul de lactofenol. Hay presencia de conidios ovalados de forma libre y agrupados en conidióforos dispuestos en fiálides delgadas, largas y divergentes.</p> |

Cuadro 4. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* (continuación).

| Hongo y género propuesto | Características macroscópicas | Características Microscópicas |
|--|---|---|
| <p>HAE6</p> <p><i>Verticillium</i></p> |  <p>A. Micelio color blanco de textura plumosa, elevado en el centro de la colonia con crecimiento radial y borde uniforme. Presenta un exudado incoloro. B. Reverso coloración blanca con anillos de crecimiento. 15 días de crecimiento.</p> |  <p>Micrografías (400X) teñidas con azul de lactofenol (izq.) y rojo Congo (der). Se observan hifas septadas y hialinas. Hay presencia de conidios ovalados de forma libre y agrupados en conidióforos dispuestos en largas fiálides divergentes</p> |
| <p>HAE7</p> <p><i>Verticillium</i></p> |  <p>A. Micelio color blanco con tonalidades marrón claro, de textura aterciopelada, con crecimiento radial anillado y borde filamentosos. No presenta producción de exudado B. Reverso color blanco con marcados anillos de crecimiento marrón claro. 10 días de crecimiento.</p> |  <p>Micrografías (400X) teñidas con rojo Congo (izq.) y azul de lactofenol (der). Se observan hifas septadas y hialinas. Hay presencia de conidios ovalados de forma libre y agrupados en conidióforos dispuestos en largas fiálides divergentes.</p> |

Cuadro 4. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* (continuación).

| Hongo y género propuesto | Características macroscópicas | Características Microscópicas |
|--------------------------------------|--|--|
| <p>HAE8</p> <p><i>Acremonium</i></p> |  |  |
| <p>HAE9</p> <p><i>Acremonium</i></p> |  |  |
| | <p>A. Micelio de color blanco, de textura aterciopelada, con crecimiento radial y borde filamentoso. No produce exudado. B. Reverso color crema con marcados anillos de crecimiento color marrón claro. 18 días de crecimiento.</p> | <p>Micrografías (400X) teñidas con azul de lactofenol. Hifas septadas, hialinas, con presencia de conidios hialinos, ovalados, alargados y agrupados en conidióforos en la parte apical de las fiáldes simulando una cabeza.</p> |
| | <p>A. Micelio color blanco de textura polvosa, con crecimiento radial y borde uniforme. No presenta producción de exudado. B. Reverso color marrón claro con pigmentación café y rompimiento de agar al centro. 15 días de crecimiento</p> | <p>Micrografías (400X) teñidas con rojo Congo. Hifas septadas, hialinas, con presencia de conidios hialinos, ovalados, alargados y agrupados en conidióforos en la parte apical de las fiáldes simulando una cabeza.</p> |

2. Obtención de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio

Con la finalidad de evaluar el efecto fitotóxico de los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos aislados, se cultivaron utilizando arroz como medio sólido de crecimiento.

En todos los cultivos los aislamientos de hongos endófitos crecieron favorablemente colonizando todo el medio de cultivo en el período de incubación establecido y no hubo problemas de contaminación, además se obtuvieron rendimientos de extracto orgánico ideales (10 mg) para realizar pruebas de potencial fitotóxico en este estudio.

En el **Cuadro 4** se muestran los rendimientos promedio de las cuatro réplicas de los extractos orgánicos obtenidos del cultivo en medio arroz de los 14 endófitos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*. Los mejores rendimientos se obtuvieron utilizando AcOEt como disolvente de extracción, siendo mayores a 10 mg por gramo de arroz, con excepción de los extractos derivados de los hongos endófitos HAE6 y HAE9, en los cuales el rendimiento fue menor a 10 mg/g. Los extractos de los aislamientos HPE5 y HAE5 fueron los más abundantes, obteniéndose más de 2 g totales derivados de los cuatro cultivos realizados.

Cuadro 4. Rendimiento y gramos totales de los extractos orgánicos por aislado. Se muestra el promedio de las cuatro repeticiones y su desviación estándar.

| Hongo endófito | Rendimiento (mg de extracto / g de arroz) | | g totales de extractos orgánicos | |
|-------------------|--|---------------|-------------------------------------|--------------|
| | Extracto (mg) | Extracto (mg) | Extracto (g) | Extracto (g) |
| | hexano | AcOEt | hexano | AcOEt |
| HPE1 | 4.31 ± 0.84 | 10.83 ± 0.32 | 0.52 | 1.30 |
| HPE2 | 4.36 ± 0.26 | 12.78 ± 0.17 | 0.39 | 1.53 |
| HPE3 | 4.04 ± 0.35 | 19.28 ± 0.79 | 0.57 | 1.76 |
| HPE4 | 6.35 ± 0.57 | 15.10 ± 0.21 | 0.82 | 1.43 |
| HPE5 | 5.0 ± 0.42 | 17.41 ± 0.30 | 0.60 | 2.09 |
| HAE1 | 4.26 ± 0.42 | 10.87 ± 0.22 | 0.51 | 1.30 |
| HAE2 | 5.25 ± 0.11 | 15.84 ± 0.40 | 0.63 | 1.90 |
| HAE3 | 3.79 ± 0.25 | 18.32 ± 0.32 | 0.45 | 1.42 |
| HAE4 | 7.15 ± 0.29 | 14.05 ± 0.12 | 1.01 | 1.69 |
| HAE5 | 8.14 ± 0.88 | 19.80 ± 0.27 | 0.98 | 2.52 |
| HAE6 | 3.81 ± 0.14 | 6.18 ± 0.13 | 0.46 | 0.74 |
| HAE7 | 5.70 ± 0.33 | 12.31 ± 0.24 | 0.86 | 1.48 |
| HAE8 | 9.90 ± 0.18 | 12.39 ± 0.31 | 0.89 | 1.49 |
| HAE9 | 3.28 ± 1.04 | 8.10 ± 0.97 | 0.30 | 0.97 |
| Control | 1.83 ± 0.19 | 2.29 ± 0.11 | 0.11 | 0.14 |

2.1 Análisis cromatográfico en capa fina de los extractos orgánicos

Asimismo, con el fin de realizar pruebas biológicas se analizaron los perfiles cromatográficos de los 28 extractos obtenidos con ambos disolventes, dos para cada aislamiento puro. La CCF mostró que cada par de extractos (hexano y AcOEt) presenta similitud cromatográfica en la composición metabólica. Sin embargo, tomando en cuenta que los extractos obtenidos con hexano presentaron diferencias

físicas dada su naturaleza poco polar y al ser extractos cerosos, los cuales generalmente corresponden a ácidos grasos provenientes del cultivo de los microorganismos en MA (Ibarra-Martínez, 2015), se decidió no unirlos con los extractos obtenidos con AcOEt, ya que dada su abundancia podrían enmascarar la actividad biológica de los principales metabolitos secundarios biosintetizados por los endófitos en estudio (**Figura 4**).

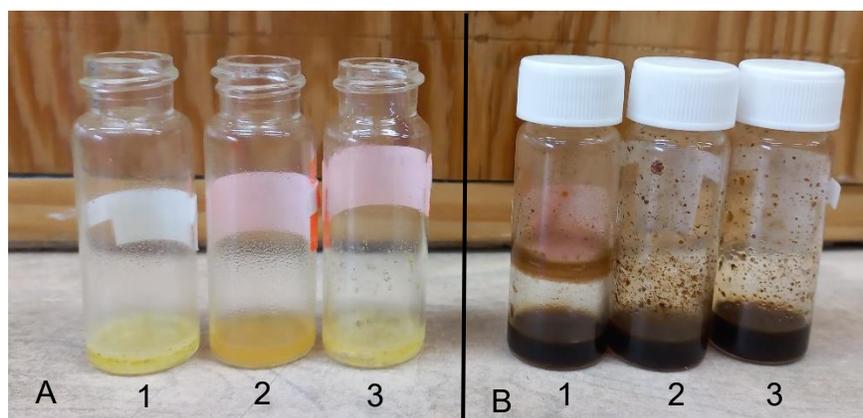


Figura 4. Extractos orgánicos derivados de 3 distintos aislamientos de hongos endófitos. A) Extractos obtenidos con hexano. B) Extractos obtenidos con AcOEt. Los números representan extractos de tres diferentes aislamientos: 1. HPE1; 2. HPE3; y 3. HAE5.

A manera de ejemplo, se muestra en la **Figura 5** el perfil cromatográfico comparativo de los extractos orgánicos derivados del aislamiento HAE5, cultivado en MA. Se observa que el extracto obtenido con el disolvente hexano contiene en mayor cantidad compuestos no polares, mientras que el extracto obtenido con AcOEt incluye compuestos de naturaleza medianamente polar y polar.

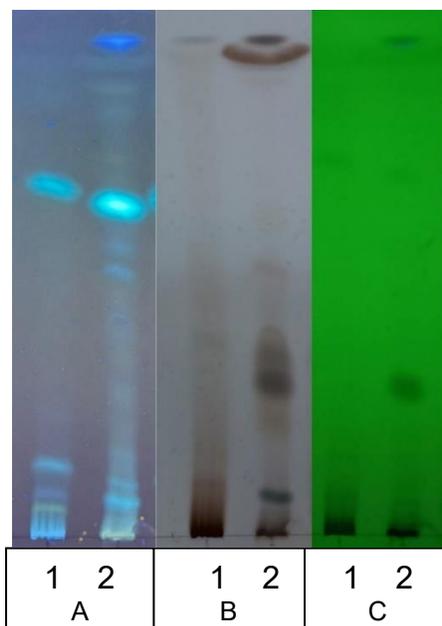


Figura 5. Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos derivados del aislamiento HAE5. Sistema de elución: CH₂Cl₂:CH₃OH (97:3). A. Cromatografía observada con luz UV a 365nm B. Cromatografía revelada con H₂SO₄ al 10% / 80°C. C. Cromatografía observada con luz UV a 254nm. 1. Extracto obtenido con hexano 2. Extracto obtenido con AcOEt.

Debido a que los extractos de hexano muestran los perfiles cromatográficos menos complejos y cuentan con características físicas de consistencia cerosa se determinó únicamente el potencial fitotóxico de los 14 extractos fúngicos obtenidos con AcOEt.

3. Evaluación de la actividad fitotóxica de los extractos orgánicos de AcOEt

El potencial fitotóxico de los extractos orgánicos obtenidos con AcOEt a partir de los 14 hongos endófitos aislados, se estableció sobre la germinación, el crecimiento de raíz y la respiración de las semillas *Amaranthus hypochondriacus*, *Trifolium pratense*, *Medicago sativa* y *Panicum miliaceum*, a una concentración de 100 µg/mL y utilizando el método de dilución en agar en cajas Petri.

En la **Figura 6** se muestra el efecto fitotóxico sobre las semillas de *A. hypochondriacus*. El crecimiento de la raíz fue el proceso fisiológico más afectado

durante el bioensayo, los tratamientos resultaron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) con respecto al control negativo, con excepción del extracto derivado del hongo HAE4 (5.8%). A su vez, los extractos orgánicos HPE1, HPE3, HAE1, HAE3, HAE5, HAE7, HAE8 y HAE9 alcanzaron un porcentaje de inhibición superior al 40%. El extracto derivado del aislamiento HAE1 tuvo el mayor porcentaje de inhibición (62.4%), comparable al generado por el control positivo RIVAL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (66.8%). Con respecto a la respiración de las plántulas sólo tres tratamientos presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los controles negativos: HPE4 (30.2 %), HAE2 (29.1%) y HAE5 (30.0%). Por último, el proceso de germinación no fue afectado, pues no se obtuvieron resultados significativos ($p < 0.05$) al comparar los extractos con los controles negativos.

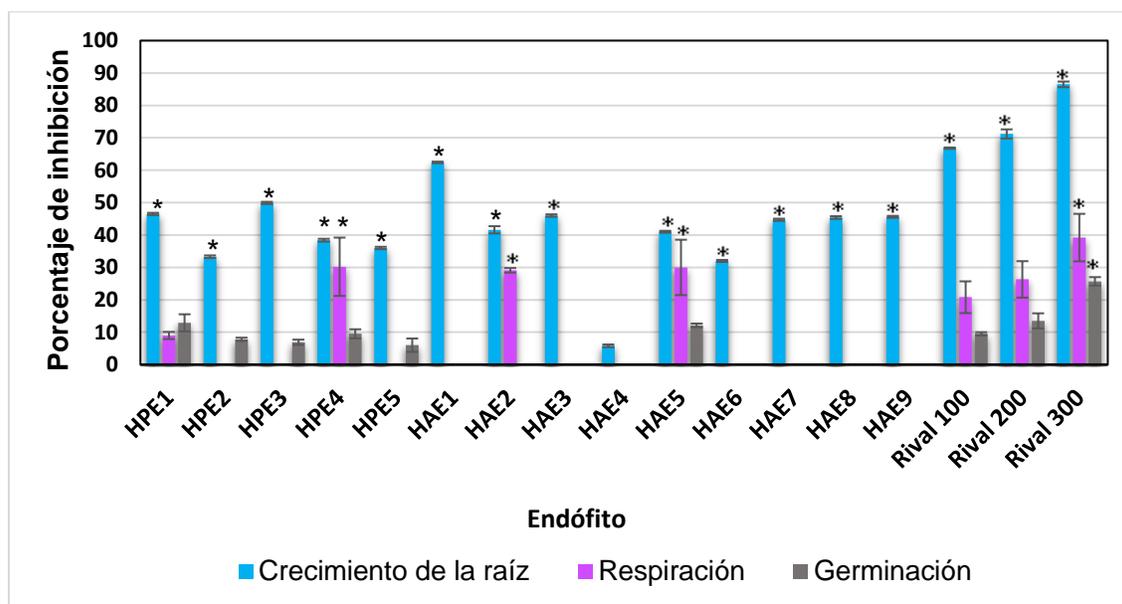


Figura 6. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos (AcOEt) de los aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* cultivados en medio arroz, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* evaluados a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. RIVAL: control positivo evaluado a 100, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos respecto al control negativo, Tukey HSD ($p < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones.

En la **Figura 7** se observa el efecto fitotóxico sobre las semillas de *T. patrense*, donde se muestra que el crecimiento de raíz fue el proceso más afectado, los tratamientos son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) con

respecto al control negativo, exceptuando el extracto derivado del endófito HAE6 (17.0%). En su mayoría los porcentajes de inhibición de los extractos orgánicos son superiores al 40%, omitiendo a los extractos de los aislamientos HPE3 (37.0%), HPE4 (37.4%), HPE5 (32.8%), HAE2 (36.2%), HAE4 (35.0%) y HAE8 (39.9%). Asimismo, con excepción del efecto del extracto de HAE6, todos los tratamientos mostraron efecto fitotóxico superior al provocado por el control positivo RIVAL (19.1%) evaluado a la misma concentración de prueba (100 µg/mL) y comparable o superior al efecto provocado por el RIVAL® a 300 µg/mL. En lo que concierne a la inhibición de la respiración, sólo hubo un valor significativo ($p < 0.05$) con el aislamiento HAE3 (26%). Finalmente, el proceso de germinación no sufrió afectaciones significativas ($p < 0.05$) con ningún tratamiento.

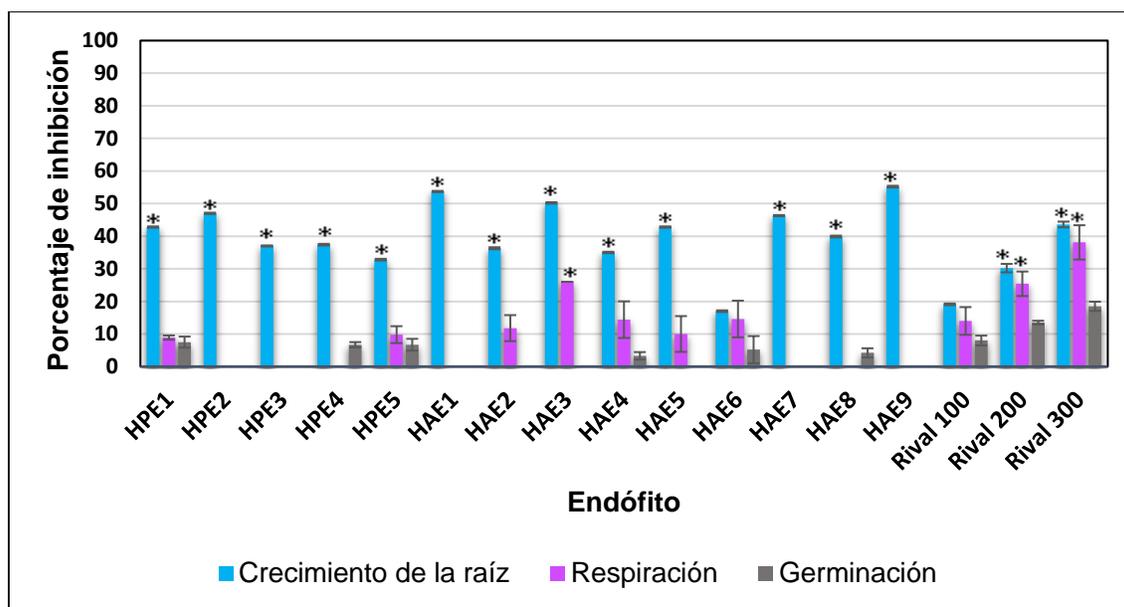


Figura 7. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos (AcOEt) de los aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* cultivados en medio arroz, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Trifolium patrense* evaluados 100 µg/mL. Rival: control positivo evaluado a 100, 200 y 300 µg/mL. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos respecto al control negativo, Tukey HSD ($p < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones.

En la **Figura 8** se observa el efecto fitotóxico de los extractos orgánicos sobre las semillas de *P. miliaceum*, mostrando en todos los casos resultados significativos ($p < 0.05$), con respecto al control negativo sobre el crecimiento de raíz y, en general

con porcentajes de inhibición superiores al 30%. Los tratamientos HPE2 (52.1%), HAE1 (51.7%) y HAE6 (55.4%) generaron el mayor efecto fitotóxico. Con respecto a la respiración, la mayoría de los extractos causaron un efecto inhibitorio significativo ($p < 0.05$) con respecto al control negativo: HPE1 (41.0%), HPE3 (27.4%), HPE4 (42.5%), HAE2 (23.3%) y HAE6 (29.4%). Por último, el proceso de germinación fue inhibido significativamente ($p < 0.05$) en presencia del extracto derivado del aislado HPE4 (19%). En ninguno de los casos el porcentaje de inhibición fue comparable al obtenido con el control positivo RIVAL a 100 $\mu\text{g/mL}$.

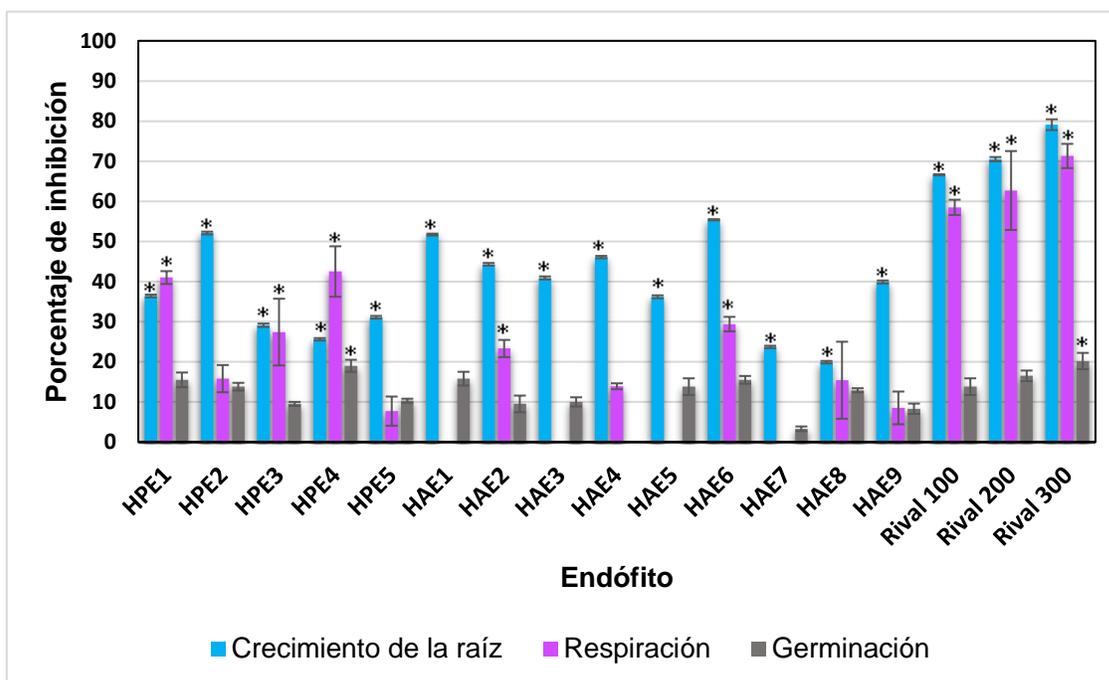


Figura 8. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos (AcOEt) de los aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* cultivados en medio arroz, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Panicum miliaceum* evaluados 100 $\mu\text{g/mL}$. Rival: control positivo evaluado a 100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$. **Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos respecto al control negativo, Tukey HSD ($p < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones.

Para finalizar, en la **Figura 9** se observan los porcentajes de inhibición sobre las semillas de *M. sativa*. Iniciando por la inhibición de crecimiento de raíz, los extractos mostraron valores significativos ($p < 0.05$), exceptuando HPE3 (18.0%)

con respecto al control negativo y, con excepción de HPE4 (22.4%), todos son superiores al valor obtenido con el control RIVAL (23.7%) a 100 µg/mL. De manera particular, el extracto del aislado HAE4 sobresalió por inhibir este proceso en un 50.4%, siendo superior al generado por el RIVAL (38.6%) a 300 µg/mL. Con respecto a la inhibición de la respiración, sólo el tratamiento HAE4 (20.8%) resultó significativo ($p < 0.05$). Por último, la inhibición del proceso de germinación no tuvo resultados significativos.

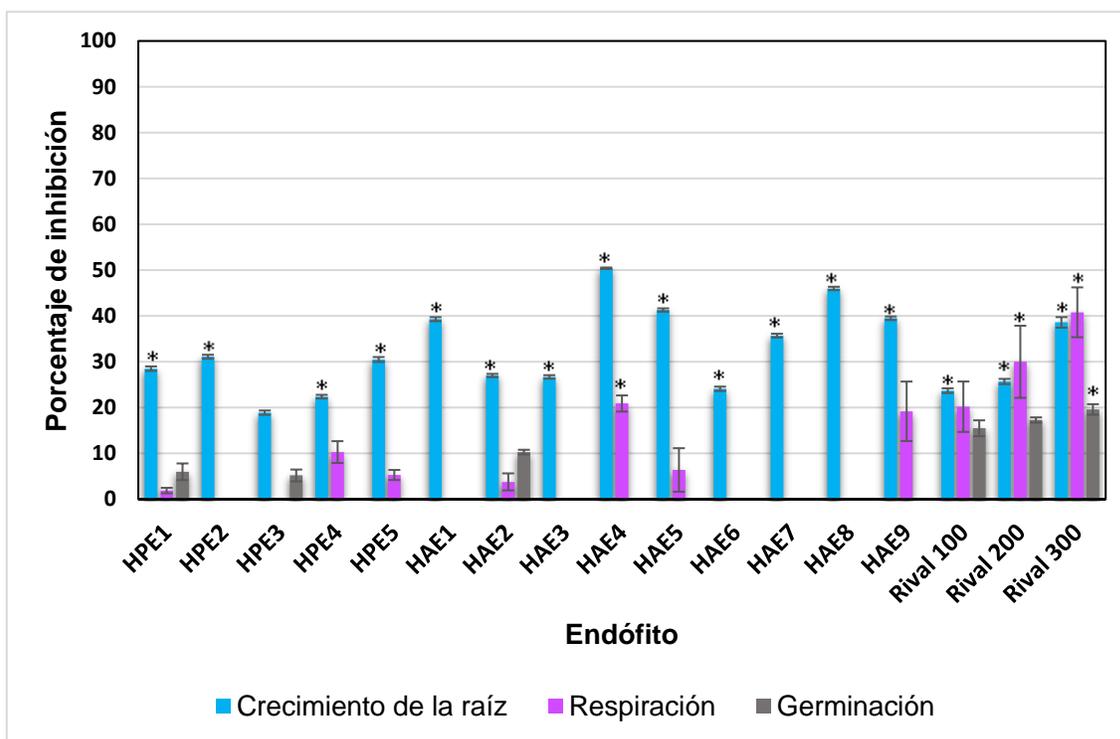


Figura 9. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos (AcOEt) de aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* cultivados en medio arroz, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Medicago sativa* evaluados 100 µg/mL. Rival: control positivo evaluado a 100, 200 y 300 µg/mL. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos respecto al control negativo, Tukey HSD ($p < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones.

En la **Figura 10** se muestran imágenes representativas del potencial fitotóxico a las 48 h de crecimiento de las plantas prueba en presencia de algunos de los extractos orgánicos con mayor actividad biológica. El crecimiento de raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* se inhibió en un 62.4% en presencia del extracto

orgánico obtenido del aislado HAE1. El crecimiento de la raíz de las semillas de *T. pratense* se inhibió en un 55.2% al evaluar el extracto del aislamiento HAE9. En semillas de *P. miliaceum*, el crecimiento de la raíz se inhibió en un 55.4% por el extracto del aislamiento HAE6. Por último, el crecimiento de la raíz de las semillas de *M. sativa* se inhibió en un 50.4% en presencia del extracto orgánico del endófito HAE4.

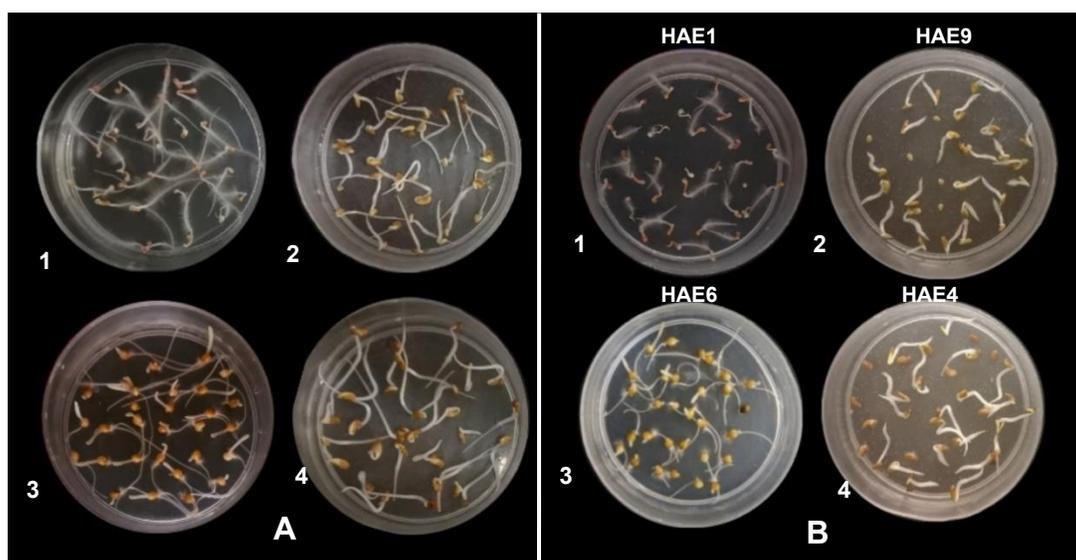


Figura 10. Efecto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos aislados con mayor inhibición sobre las plantas de prueba. A) Controles negativos a las 48 h de crecimiento. B) Plantas de prueba a las 48 h de exposición a los metabolitos secundarios presentes en los extractos fúngicos. **1.** *Amaranthus hypochondriacus*, **2.** *Trifolium pratense*, **3.** *Panicum miliaceum*, y **4.** *Medicago sativa*.

De manera general, se observó un efecto fitotóxico significativo sobre los procesos fisiológicos evaluados en presencia de la mayoría de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de *H. acapulcensis* y *H. patens*, lo que sugiere que los extractos fúngicos obtenidos poseen metabolitos secundarios con propiedades fitotóxicas, los cuales posiblemente están involucrados en los mecanismos de defensa de su hospedera y le benefician evitando la presencia de competidores vegetales (Sánchez-Fernández, 2016; García-Méndez, *et al.*, 2016; Schulz *et al.*, 2015). Cabe resaltar que la planta más afectada fue

A. hypochondriacus y las inhibiciones más altas se obtuvieron utilizando los extractos de los aislamientos HAE1, HAE9, HAE6 y HAE4, estos aislamientos se perfilan como candidatos prometedores para futuras investigaciones orientadas en su estudio químico biodirigido con la finalidad de aislar y caracterizar bioplaguicidas con uso potencial en aplicaciones agroquímicas como agentes herbicidas alternativos.

4. Evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos volátiles orgánicos

Con la finalidad de establecer si los hongos endófitos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* sintetizan VOCs bioactivos, se seleccionaron diez hongos endófitos. Para evaluar el potencial fitotóxico de la mezcla de VOCs se llevaron a cabo bioensayos en cajas de Petri divididas con el endófito de prueba y las semillas prueba. El control positivo consistió en una mezcla de los alcoholes 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol y alcohol fenilético a la concentración de 1.25 µg/mL. Para el control negativo se elaboraron cajas con semillas, pero sin los aislamientos de hongo (Roque-Flores, 2019). Cabe mencionar que estos alcoholes se han aislado previamente como parte de los constituyentes de las mezclas de VOCs producidos por diferentes hongos endófitos del género *Hypoxylon* y *Xylaria*, entre otros (Macías-Rubalcava *et al.*, 2018; Roque-Flores, 2019; Sánchez-Ortiz *et al.*, 2016; Ulloa-Benítez *et al.*, 2016). De manera general, los VOCs producidos a los 7 días de crecimiento por los hongos endófitos seleccionados presentaron un efecto inhibitorio significativo sobre los tres procesos fisiológicos evaluados.

En la **Figura 11** se muestran los porcentajes de inhibición sobre las semillas de *A. hypochondriacus*. Todos los tratamientos, exceptuando la mezcla de VOCs producidos por el aislado HAE3 (16.9%) presentaron una inhibición estadísticamente significativa ($p < 0.05$), con respecto al control negativo sobre el crecimiento de raíz y en algunos casos mayor que el provocado por la mezcla de

alcoholes (69.0%) utilizada como control positivo. Los VOCs sintetizados por los aislamientos HAE1, HAE5, HAE6 y HAE8 lograron inhibir por completo el crecimiento de la raíz. Con respecto a la inhibición de la respiración, cinco aislamientos produjeron resultados significativos ($p < 0.05$): HPE1 (43.3%), HPE5 (40%) HAE1 (40.6%), HAE5 (55.4%) y HAE6 (53.4%), los últimos dos siendo mejores que el control positivo (45.0%). Por último, la mezcla de VOCs producidos por los aislamientos HAE1, HAE5 y HAE6 inhibieron la germinación en un 100% y los tratamientos con los VOCs producidos por los aislamientos HPE1 (70%), HPE4 (22.5%), HPE5 (51.1%) también fueron significativos ($p < 0.05$).

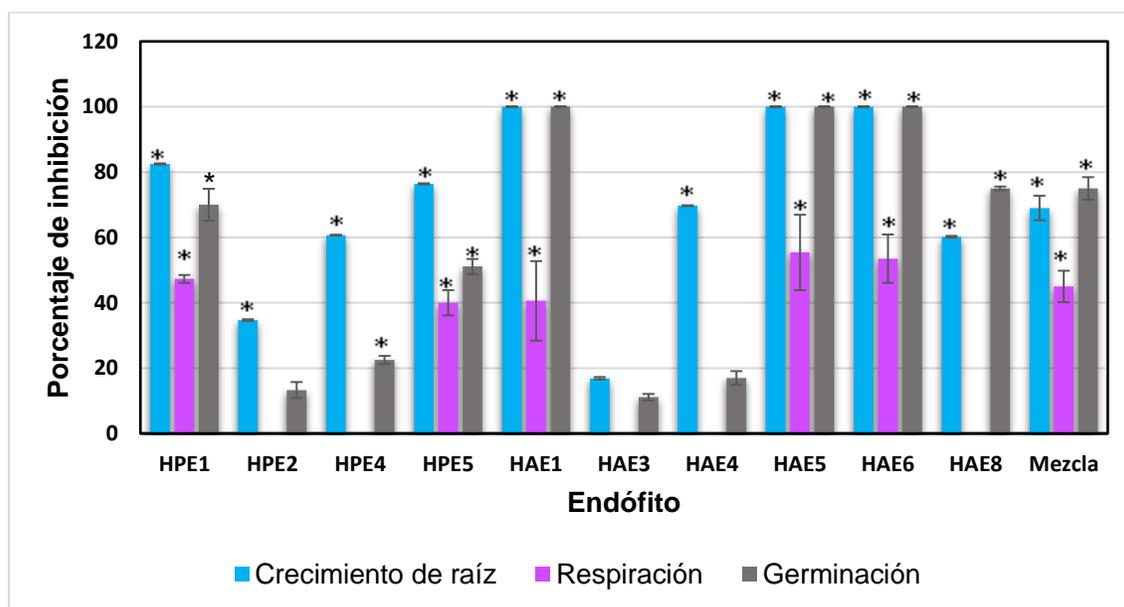


Figura 11. Efecto fitotóxico de los VOCs producidos por los aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* a los 7 días de crecimiento, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*. Mezcla de alcoholes 3-metil-1-butanol y alcohol feniletílico evaluados 1.25 $\mu\text{g/mL}$. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos respecto al control negativo, Tukey HSD ($p < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones.

En la **Figura 12** se muestra el porcentaje de inhibición de la mezcla de VOCs producidos por los aislamientos en estudio sobre las semillas de *T. pratense*. Se obtuvieron valores de inhibición del 100% sobre el crecimiento de raíz en presencia de los VOCs de los aislamientos HPE1, HPE4, HAE1, HAE4, HAE5 y HAE6, con

mejor porcentaje de inhibición que el obtenido con el control positivo (66.0%). El aislamiento HAE4 fue el que tuvo el menor porcentaje de inhibición (40.7%) significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo. En cuanto a la inhibición de respiración, también se obtuvieron resultados significativos ($p < 0.05$) en siete tratamientos: HPE1 (51.4%), HPE4 (65.6%), HPE5 (75.0%), HAE1 (84.1%), HAE5 (80.1), HAE6 (50.2%) y HAE8 (73.8%), en donde todos inhibieron en mayor porcentaje que el control positivo (36.0%). Cabe destacar que el tratamiento con los VOCs del aislamiento HPE5 no inhibe significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de la raíz (2.7%), inhibe en un 75.0% la respiración de las plántulas. La germinación fue inhibida en un 100% por la mezcla de VOCs producidos por los aislamientos HPE1, HPE4, HAE1, HAE5, HAE6 y HAE8. El porcentaje de inhibición del control positivo fue menor al de estos aislamientos (62.0%). Aunque con menor porcentaje de inhibición, los resultados de los aislamientos HPE5 (25.6%) y HAE4 (26.7%) también fueron estadísticamente significativos con respecto al control negativo.

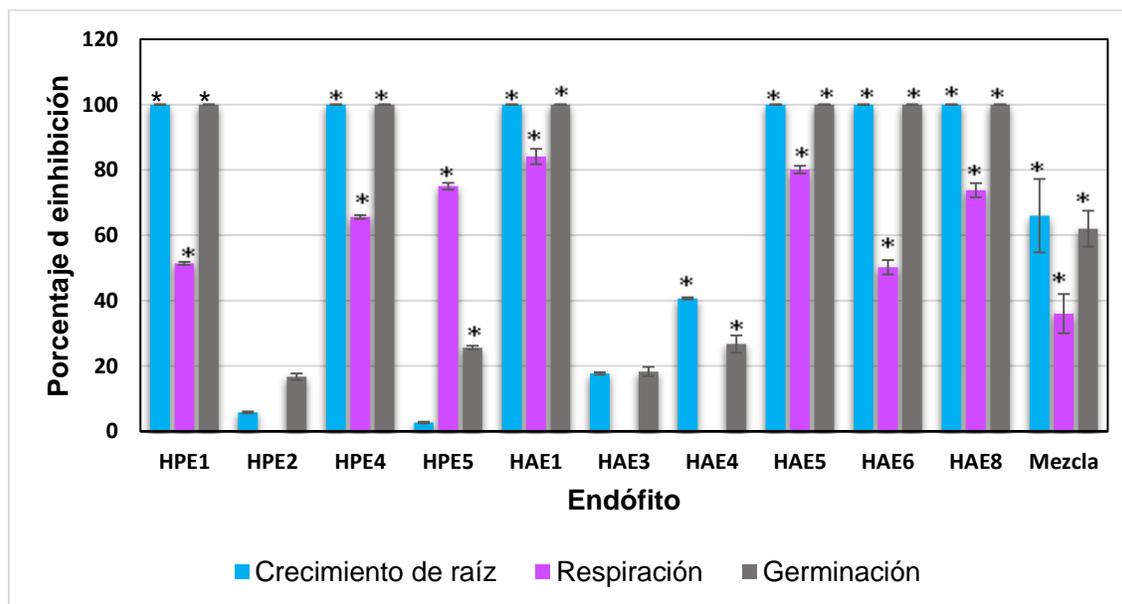


Figura 12. Efecto fitotóxico de los VOCs producidos por los hongos endófitos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* a los 7 días de crecimiento, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Trifolium pratense*. Mezcla de alcoholes 3-metil-1-butanol y alcohol feniletílico evaluados 1.25 µg/mL. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos respecto al control negativo, Tukey HSD ($p < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones.

En la **Figura 13** y se observan los porcentajes de inhibición causados por la mezcla de VOCs de los endófitos selectos sobre las semillas de *P. miliaceum*. Se registraron como valores significativos ($p < 0.05$) con respecto al control negativo sobre el crecimiento de la raíz los tratamientos: HPE4, HAE1, HAE3, HAE5 y HAE6 con una inhibición del 100%, así como los tratamientos, HPE1 (59.3%), HPE5 (57.2%) HAE4 (47.4%) y HAE8 (44.21%), todos con un mayor porcentaje de inhibición que el control positivo (38.0%). Con respecto a la respiración todos los tratamientos fueron significativos ($p < 0.05$), exceptuando a los VOCs producidos por el aislamiento HPE2. Los aislamientos HPE4 (87.9%), HAE1 (61.56%), HAE3 (55.8%), HAE6 (52.9%) y HAE8 (49.53%) presentaron una inhibición mayor a la obtenida con el control positivo (25.0%). Por último, el proceso de germinación también fue significativamente ($p < 0.05$) afectado por los VOCs de los aislamientos HPE4, HAE1, HAE3, HAE5 y HAE6 en un 100%, así como también por los tratamientos HPE1 y HPE5 (ambos, 48%), en todos los casos la inhibición fue mayor que el control positivo (35.0%).

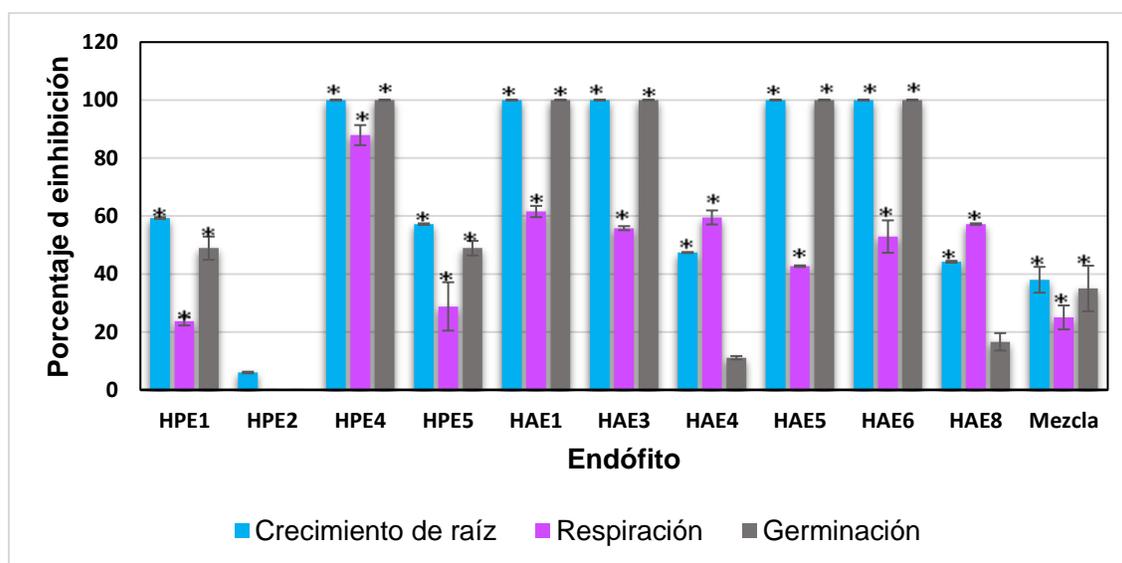


Figura 13. Efecto fitotóxico de los VOCs producidos por los aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* a los 7 días de crecimiento, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Panicum miliaceum*. Mezcla de alcoholes 3-metil-1-butanol y alcohol feniletílico evaluados 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos respecto al control negativo, Tukey HSD. Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones.

En la **Figura 14** se muestra la inhibición obtenida en presencia la mezcla de VOCs producidos por los hongos endófitos en estudio sobre las semillas de *M. sativa*. El crecimiento de raíz presentó inhibición significativa ($p < 0.05$), con respecto al control negativo en todos los tratamientos, destacando a los endófitos HPE1, HPE4, HPE5, HAE1, HAE4, HAE6 y HAE8 por inhibir el crecimiento de raíz en su totalidad, obteniendo además mejores resultados que con el control positivo (42.0%). En lo que concierne a la respiración, los VOCs producidos por los aislamientos HPE5 (20%), HAE1 (69.7%), HAE5 (32.3%), HAE6 (72.9%) y HAE8 (75.9%) redujeron significativamente este proceso y, además, con un porcentaje de inhibición mayor al obtenido con el control positivo (24.0%). Por último, la germinación también fue significativamente inhibida por los aislamientos HPE1, HPE4, HPE5, HAE1, HAE4, HAE6 y HAE8 en un 100%, superando al control positivo (62.0%). Los aislamientos HPE2 (20%), HAE3 (25%) y HAE5 (40%) también inhibieron significativamente la germinación.

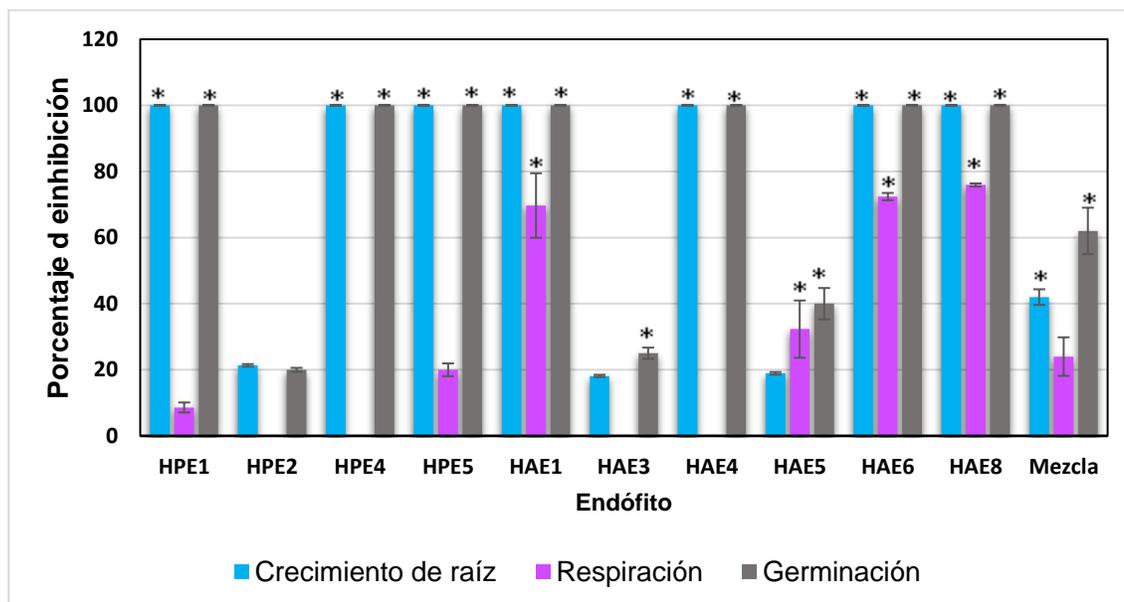


Figura 14. Efecto fitotóxico de los VOCs producidos por los aislamientos de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens* a los 7 días de crecimiento, sobre el crecimiento de raíz, respiración y germinación de las semillas de *Medicago sativa*. Mezcla de alcoholes 3-metil-1-butanol y alcohol feniletílico evaluados 1.25 $\mu\text{g/mL}$. *Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($p < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de las cuatro repeticiones.

Por último, en la **Figura 15** se muestran imágenes del potencial fitotóxico de la mezcla de VOCs producidos por el aislamiento HAE1 a los 7 días de incubación. Este es el único aislado que inhibió por completo la germinación y el crecimiento de la raíz de las cuatro plantas maleza y redujo la tasa de respiración en más del 40%.

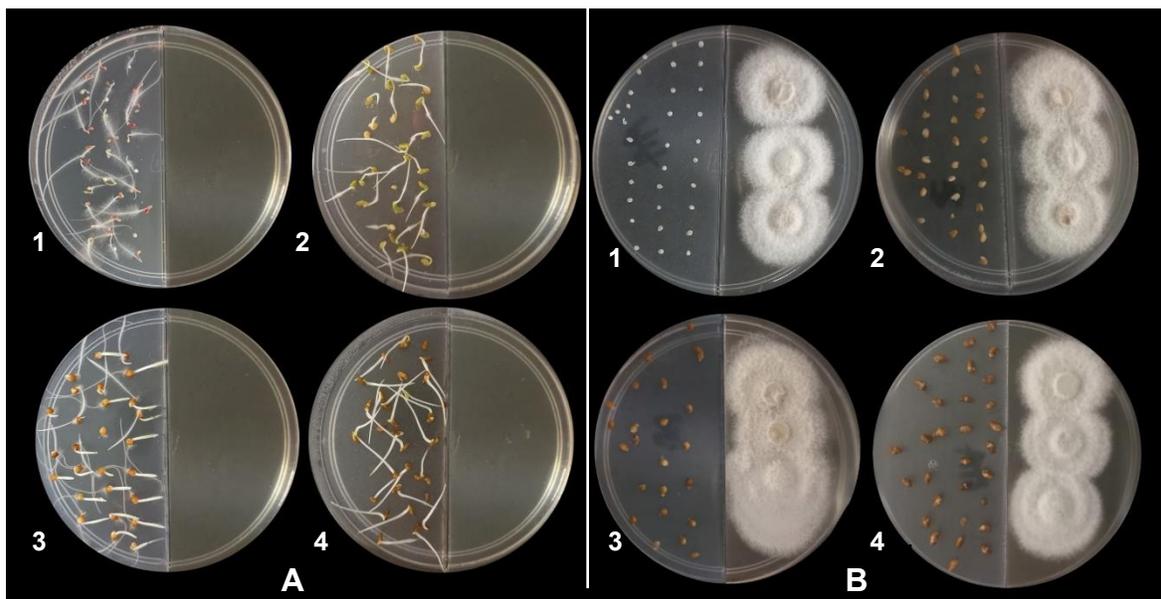


Figura 15. Efecto fitotóxico de los compuestos orgánicos volátiles del hongo endófito HAE1 a los 7 días de crecimiento sobre las plantas pruebas. A) Plantas prueba control negativo a las 48 h de crecimiento. B) Plantas prueba a las 48 h de exposición a los VOCs del endófito HAE1. 1. *Amaranthus hypochondriacus*, 2. *Trifolium pratense*, 3. *Panicum miliaceum*, 4. *Medicago sativa*.

Los resultados obtenidos evidenciaron que los diez aislamientos de hongos endófitos seleccionados producen VOCs con elevado potencial fitotóxico. Esto sugiere que es probable que los compuestos volátiles funjan papeles importantes en la defensa de hábitat e inhibición de crecimiento de sus competidores (Yim *et al.*, 2007), dada su alta fitotoxicidad. Es importante mencionar que las plantas más afectadas fueron *T. pratense* y *M. sativa* y que el aislado HAE1 mostró un efecto inhibitorio del 100% sobre la germinación y crecimiento de raíz de todas las plantas prueba.

VII. Resumen y conclusiones

Se obtuvieron 27 aislamientos de hongos endófitos, de los cuales 14 son pertenecientes a *Hippocratea acapulcensis* y 13 a *Hamelia patens*. De los aislamientos antes mencionados, se reconocieron nueve morfotipos para *H. acapulcensis* y cinco para *H. patens*.

El análisis detallado de las características microscópicas y macroscópicas de los morfotipos aislados permitió determinar preliminarmente a los aislamientos HPE1, HPE3, HPE4, HPE5, HAE5, HAE6 y HAE7 como pertenecientes al género *Verticillium*, a los aislamientos HPE2, HAE3, HAE8 y HAE9 como integrantes del género *Acremonium*, a los aislamientos HAE2 y HAE4 como pertenecientes al género *Paecilomyces* y, por último, el género del aislamiento HAE1 sigue indeterminado.

El cultivo de los hongos endófitos en condiciones estáticas utilizando medio arroz permitió un buen desarrollo de micelio y un rendimiento apropiado de los extractos orgánicos para llevar a cabo su evaluación biológica. En todos los casos el mejor rendimiento de extracción se obtuvo utilizando AcOEt, generando un rendimiento mayor a 10 mg por gramo de arroz con excepción de los extractos obtenidos a partir de los endófitos HAE6 y HAE9.

De los 14 extractos fúngicos obtenidos con AcOEt y evaluados, 13 mostraron un efecto fitotóxico significativo sobre las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*. El extracto derivado del endófito HAE1 presentó el mayor porcentaje de inhibición (62.4%) sobre el crecimiento de raíz, siendo el único comparable con el control positivo el herbicida comercial Rival evaluado a 100 µg/mL.

Trece de los 14 extractos fúngicos evaluados a la concentración de 100 µg/mL resultaron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) con respecto al control negativo, el mayor efecto fitotóxico sobre el crecimiento de la raíz se presentó al utilizar el extracto del aislamiento HAE9 (55.2%). El efecto fitotóxico generado por los extractos de los endófitos HPE2, HAE1, HAE3, HAE7 y HAE9 fue mayor al obtenido con el herbicida comercial Rival a la concentración de 300 µg/mL.

Todos extractos fúngicos evaluados a 100 µg/mL mostraron efecto fitotóxico significativo sobre el crecimiento de raíz de *Panicum miliaceum*, no obstante, ningún tratamiento generó porcentaje de inhibición comparable con el control positivo Rival a la misma concentración de estudio.

Los 14 extractos fúngicos evaluados a la concentración de 100 µg/mL presentaron efecto fitotóxico significativo sobre el crecimiento de raíz de *Medicago sativa*. El extracto del aislado HAE4 obtuvo el mayor porcentaje inhibición (50.4%) en crecimiento de raíz y de manera general, los porcentajes de inhibición fueron comparables o mayores que los causados por el control positivo Rival (100 µg/mL). Los extractos obtenidos de los endófitos HPE1, HPE2, HPE5, HAE1, HAE2, HAE3, HAE4, HAE5, HAE7, HAE8 y HAE9 provocaron mayor fitotoxicidad que el control positivo a la concentración de 300 µg/mL.

La planta más afectada por los extractos fúngicos evaluados fue *A. hypochondriacus* y el extracto orgánico del hongo endófito HAE1 destacó por mantener su alta actividad fitotóxica sobre el crecimiento de la raíz en tres de las cuatro plantas prueba inhibiendo su crecimiento en más del 50%: *A. hypochondriacus*, *T. pratense* y *P. miliaceum*.

De los 14 hongos endófitos aislados de *Hippocratea acapulcensis* y *Hamelia patens*, diez morfotipos demostraron la capacidad para producir VOCs. Los VOCs de nueve aislamientos presentaron potencial fitotóxico significativo sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus*. Los endófitos HAE1, HAE5, y HAE6 inhibieron en un 100% la germinación y el crecimiento de raíz de las semillas. El endófito HPE1 inhibió en un 70% la germinación y en un 82.5% el crecimiento de la raíz, indicando que, a pesar de que el 30% de las semillas de *A. hypochondriacus* lograron germinar, enfrentan dificultades para subsistir.

Siete de los 10 aislamientos evaluados por producir VOCs, presentaron potencial fitotóxico significativo sobre las semillas de *T. pratense*. Los hongos endófitos HPE1, HPE4, HAE1, HAE5, HAE6 y HAE8 inhibieron en un 100% la germinación y el crecimiento de raíz de la planta y en más del 50% la respiración. El endófito HPE5 inhibió en 75% de la respiración de las plantas, sin afectar el crecimiento de la raíz.

Los VOCs de ocho aislados exhibieron potencial fitotóxico significativo sobre *P. miliaceum*. Los endófitos HPE4, HAE1, HAE3, HAE5 y HAE6 inhibieron en un 100% la germinación y el crecimiento de raíz de la planta y con excepción del hongo HPE4 (87.9%) inhibieron entre 40-60% la respiración de las semillas.

Siete de los hongos endófitos productores de VOCs demostraron potencial fitotóxico significativo sobre las semillas de *M. sativa*. Los hongos endófitos HPE1, HPE4, HPE5, HAE1, HAE4, HAE6 y HAE8 inhibieron en un 100% la germinación y el crecimiento de raíz de *M. sativa*. Los morfotipos HPE1, HAE6 y HAE8 inhibieron en 70% o más la respiración de las semillas.

Se evidenció la producción de compuestos orgánicos volátiles con potencial fitotóxico significativo en diez hongos aislados de *H. acapulcensis* y *H. patens*. Las plantas más afectadas fueron *T. pratense* y *M. sativa*. El hongo endófito HAE1 inhibió por completo la germinación y el crecimiento de raíz de todas las plantas prueba.

La presente investigación evidenció la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles en hongos endófitos de *H. acapulcensis* y *H. patens*, los cuales podrían jugar un importante papel en la protección de la hospedera. Además, se demostró la actividad biológica a nivel de extractos orgánicos y de compuestos orgánicos volátiles, exponiendo así la presencia de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica, generando un interés académico en los hongos endófitos utilizados en este proyecto, para realizar estudios biodirigidos con el fin de obtener compuestos útiles y novedosos en el desarrollo de herbicidas con un menor impacto ambiental.

VIII. Perspectivas

- Clasificar taxonómicamente con ayuda de métodos moleculares los 14 hongos endófitos aislados.
- Obtener los perfiles metabólicos de los extractos orgánicos mediante HPLC.
- Cultivar en distintos medios y condiciones a los hongos endófitos con mayor potencial biológico para establecer las mejores condiciones de cultivo.
- Aislar y purificar mediante estudios químicos biodirigidos a los metabolitos secundarios bioactivos presentes en los extractos orgánicos.
- Establecer la concentración inhibitoria media los extractos fúngicos y metabolitos secundarios sobre los procesos de germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las plantas de prueba.
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislamientos mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas y de difracción de rayos X.
- Determinar la composición del volatiloma de los hongos endófitos productores de metabolitos secundarios volátiles, utilizando microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

IX. Referencias

Abubacker, M. N., Sathya, C., y Prabakaran, R. (2013). *In vitro* antifungal potentials of *Hamelia patens* Jacq. (Rubiaceae) aqueous extracts of leaves, flowers and fruits. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 10(2), 699-704.

Alam, B., Li, J., Ge, Q., Khan, M. A., Gong, J., Mehmood, S., y Gong, W. (2021). Mycoparasitism of From symbiosis to secondary metabolite communications or vice versa? *Frontiers in Plant Science*, 12, 3060.

Allaby, M. (2010). A dictionary of ecology. Cuarta Edición. Oxford Quick Reference.

Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Müller, W. E. G., Kozytska, S., Hentschel, U., Proksch, P., Ebel, R. (2008). Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry*, 69(8), 1716–1725.

Amaro-Rosales, M., y Gortari-Rabiela, R. D. (2016). Políticas de transferencia tecnológica e innovación en el sector agrícola mexicano. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 13(3), 449-471.

Andrés, M. F., Diaz, C. E., Giménez, C., Cabrera, R., y González-Coloma, A. (2017). Endophytic fungi as novel sources of biopesticides: The Macaronesian Laurel forest, a case study. *Phytochemistry Reviews*, 16, 1009-1022.

Anke, H., y Sterner, O. (1997). Nematicidal metabolites from higher fungi. *Current organic chemistry*, 1(4), 361-374.

Arenas, R., (1993). Micología Médica Ilustrada. Clínica, laboratorio y terapéutica. Primera Edición. McGraw Hill. México D.F. 397 pg.

Arimura, G. I., Shiojiri, K., y Karban, R. (2010). Acquired immunity to herbivory and allelopathy caused by airborne plant emissions. *Phytochemistry*, 71(14-15), 1642-1649.

Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal biology reviews*, 21(2-3), 51-66.

Arthurs, S., y Dara, S. K. (2019). Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of invertebrate pathology*, 165, 13-21.

Banco Mundial. (2022). *Agricultura y alimentos*. Extraído de: <https://www.bancomundial.org/es/topic/agriculture/overview#:~:text=La%20agricultura%20puede%20ayudar%20a,dedican%20principalmente%20a%20labores%20agr%C3%ADcolas>

Barnett, H. L., y Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4. a edición. *Saint Paul: American Phytopathological Society*.

Bastida-Tapia, A. 2017. Evolución y situación actual de la agricultura protegida en México. *In: Sexto congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas*. 281-294 pp.

Bautista, E. J., Mesa, L., y Gómez Álvarez, M. I. (2018). Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe. *Scientia Agropecuaria*, 9(4), 585-604.

Berlanger, I., y Powelson, M. L. (2000). *Verticillium* wilt. The Plant Health Instructor. 22 Sept. 2018.

Bertinetti, B. V. (2012). *Búsqueda de agroquímicos naturales con potencial uso en agricultura sustentable a partir de cultivos de hongos* [Tesis de doctorado], Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Biasetto, C. R., Somensi, A., Abdalla, V. D. C., Abreu, L. M. D., Gualtieri, S. C., Pfenning, L. H., y Araujo, A. R. (2019). Phytotoxic constituents from endophytic fungus *Xylaria cubensis* associated with *Eugenia brasiliensis*. *Química Nova*, 42(5), 485-488.

Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21-32.

Brakhage, A. A. *et al.* Aspects on evolution of fungal β -lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of *trans*-acting factors. *Phytochemistry* 70, 1801–1811 (2009).

Bruisson, S., Alfiky, A., L'Haridon, F., y Weisskopf, L. (2023). A new system to study directional volatile-mediated interactions reveals the ability of fungi to specifically react to other fungal volatiles. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1128514.

Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., y Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 447-459.

Cao, R., Liu, X., Gao, K., Mendgen, K., Kang, Z., Gao, J., y Wang, X. (2009). Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes *in Vitro*. *Current Microbiology*, 59 (6), 584

Carreón, L. S., y Fentanes, E. G. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Revista de la Academia de Ciencias*, 77-88

Castillo-Reyes, F., Castillo-Quiroz, D., Muñoz-Flores, H. J., y Sánchez, A. R. (2018). Uso de bio-pesticidas de origen vegetal en el manejo de enfermedades de cultivos en México. *Mitigación del Daño Ambiental Agroalimentario y Forestal de México*, 4.

CEDRSSA. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. (2020, mayo). Uso y regulación de herbicidas en México. <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/76Herbicidas.pdf>. CEDRSSA

CEDRSSA. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (2020, octubre). *Impacto del uso de plaguicidas en el sector agropecuario*. <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/54IMPACTO%20DE%20LOS%20PLAGUICIDAS.pdf> CEDRSSA.

CIMMYT. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. (2021). *La importancia de conocer las malezas*. Cimmyt.org. <https://idp.cimmyt.org/la-importancia-de-conocer-las-malezas/>

Chen, L., Chen, J., Zheng, X., Zhang, J., y Yu, X. (2007). Identification and antifungal activity of the metabolite of endophytic fungi isolated from *Ilex cornuta*. *Revista de Ciencias de Pesticidas*. 9, 143–150.

CONANP. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (2021). Conanp.gob.mx. Extraído de: <https://simec.conanp.gob.mx/ficha.php?anp=107®=7>

CONAP. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (2005). Programa de conservación y manejo reserva de la biosfera Sierra de Huautla. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.

Contreras-Cornejo, H. A., López-Bucio, J. S., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, Á. A., y López-Bucio, J. (2015). Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* root-system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(6), 701-710.

Dai, J., Krohn, K., Flörke, U., Draeger, S., Schulz, B., Kiss-Szikszai, A. (2006). Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2006, 3498–3506.

de la Rosa, C. M., y Suárez, M. N. S. (2022). La Revolución Verde y la soberanía alimentaria como contrapropuesta. Veredas. *Revista del Pensamiento Sociológico*, (42), 105-131.

de León, S. G., y Mier, T. (2011). Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. *Sociedades rurales, producción y medio ambiente*, (20), 37-63.

Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., y Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1), 16-32.

Dugan, F., (2006). The identification of fungi. 2ª edición. United States of America.

Effmert U, Kalderas J, Warnke R, Piechulla B (2012) Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology* 38:665–703

Ellis, D. H., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R., y Bartley, R. (2007). *Descriptions of medical fungi* (Vol. 2). Adelaide: University of Adelaide.

EPA. Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos 2010. Biopesticide demonstration grant program. (En línea). Disponible en: Washington, DC U.S. Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs (7511P) EPA 731-F-10-004. US Environmental Protection Agency. http://www.epa.gov/pestp/publications/biodemo/bdp_brochure.pdf

Essiedu, J. A., Adepoju, F. O., y Ivantsova, M. N. (2020). Benefits and limitations in using biopesticides: A review. In *AIP conference proceedings* (Vol. 2313, No. 1). AIP Publishing.

Faeth, S. H. (2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualists?. *Oikos*, 98(1), 25-36.

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (1995). Enseñanzas de la revolución verde: hacia una nueva revolución verde. Obtenido de <http://www.fao.org/dmarrón/clarop/003/w2612s06>. Html.

Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., y Peñuelas, J. (2016). Bidirectional interaction between phyllospheric microbiotas and plant volatile emissions. *Trends in Plant Science*, 21(10), 854-860.

Fernández-Jiménez MA, Bulla-Castañeda DM, Sanabria-Villate AM, Pulido-Medellin MO. 2019. Implementación de hongos nematófagos para el control de parásitos gastrointestinales. *Pensamiento y Acción*, 27: 7-20.

Flores-Reséndiz, M., Lappe-Oliveras, P., y Macías-Rubalcava, M. L. (2021). Mitochondrial damage produced by phytotoxic chromenone and chromanone derivatives from endophytic fungus *Daldinia eschscholtzii* strain GsE13. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(10), 4225–4239. doi:10.1007/s00253-021-11318-7.

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. (2021). The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. www.fao.org. <https://www.fao.org/state-of-food-security-nutrition/2021/en/>

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations 2020. OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2028. OECDi-Library. Doi: 10.1787/7b2e8ba3-es

Gan, H., y Wickings, K. (2017). Soil ecological responses to pest management in golf turf vary with management intensity, pesticide identity, and application program. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 246, 66–77.

García-Loza. V. (2016). Uso y manejo tradicional de los recursos vegetales en comunidades de la mixteca poblana [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma de Puebla.

García-Méndez, M. C., Macías-Ruvalcaba, 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.

Gómez-Rivera, Á. S., Mis, X. J. C., López, C. Y., y Burgos, M. M. (2016). Caracterización morfológica de hongos endófitos aislamientos de *Hamelia patens* Jacq. y *Lantana camara* L. de Chetumal, Quintana Roo, México. *Teoría y Praxis*, (19), 33-44.

González, M. C., Anaya, A. L., Glenn, A. E., Macías-Rubalcava, M. L., Hernández-Bautista, B. E., y Hanlin, R. T. (2009). *Muscodor yucatanensis*, a new endophytic ascomycete from Mexican chakah, *Bursera simaruba*. *Mycotaxon*.

Gouttefanjat, F. (2021). Revolución Verde, neoliberalismo y transgénicos en México: hacia una subordinación del maíz al capital. [Green Revolution, neoliberalism and transgenic crops in Mexico: towards a subordination of corn to capital]. *Forum International Journal of Social Sciences and Humanities*, 3(4), 108-119.

Harker, K. N., O'Donovan, J. T. (2013). Recent weed control, weed management, and integrated weed management. *Weed Technology*, 27(1), 1-11.

Harman GE, Kubicek CP, editores. 2014. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. Vol. 1. Boca Raton (USA): CRC Press.

Harwood, J. (2020). "Whatever happened to the Mexican Green Revolution?" *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 1–10.

Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105, 1422-1432.

Heimpel, G. E., y Mills, N. J. (2017). Biological control. Cambridge University Press.

Heredia-Abarca, G. P. (2020). La importancia de los hongos (Fungi) en los servicios ecosistémicos. *Bioagrobiencias*, 13(2).

Herrera, T., Ulloa, M. El Reino de los Hongos, micología básica y aplicada, UNAM-Fondo de Cultura Económica, México, D. F. (1990), p. 552

Hoog GS de, Guarro J, Gené J, Figueras MJ (2017). Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures

Huerta-Sobalvarro, K. K., y, Martínez-Centeno. A. (2018). La revolución verde. *Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático*, 4(8), 1040-1052.

Hussain, H., Akhtar, N., Draeger, S., Schulz, B., Pescitelli, G., Salvadori, P., y Krohn, K., (2009). New *bioactive* 2,3-epoxycyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus azorica*. *European Journal of Organic Chemistry*. 2009, 749–756.

Ibarra-Martínez, G. (2015). Hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae) productores de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y herbicida. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.

Inamdar, A. A., Morath, S., y Bennett, J. W. (2020). Fungal volatile organic compounds: more than just a funky smell?. *Annual review of microbiology*, 74, 101-116.

Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., and Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. 6(12), e28341.

INECC. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2018). Estudio sobre el uso de plaguicidas en México 1980-2018. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728079/141_2022_Estudios_plaguicidas_Mexico_1980-2018.pdf

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2014). Encuesta Nacional Agropecuaria. Extraído de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ena/2014/doc/ena2014_pres.pdf

Kaddes, A., Fauconnier, M. L., Sassi, K., Nasraoui, B., y Jijakli, M. H. (2019). Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. *Molecules*, 24(6), 1065.

Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., y Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in plant science*, 6, 151.

Khan, A. L., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., Jung, H. Y., Lee, J. H., *et al.* (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology*. 12:3.

Khan, M. S., Gao, J., Munir, I., Zhang, M., Liu, Y., Xue, J., y Zhang, X. (2021). Characterization of endophytic fungi, *Acremonium* sp., from *Lilium davidii* and analysis of its antifungal and plant growth-promoting effects. *BioMed Research International*, 2021.

Khanna, R., y Gupta, S. (2018). Agrochemicals as a potential cause of ground water pollution: a review. *International Journal of Chemical. Studies*, 6(3), 985-990.

Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., y Mishra, V. (2021). An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants*, 10(6), 1185.

Kusari, S., Hertweck, C., y Spiteller, M. (2012). Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, 19(7), 792–798.

Kusari, S., y Spiteller, M. (2012). Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. In *Metabolomics*, U. Roessner, ed. (Rijeka, Croatia: InTech), pp. 241–266.

Lechón, W., y Chicaiza, J. (2019). De la agricultura familiar campesina a las microempresas de monocultivo. Reestructura socioterritorial en la sierra norte del Ecuador. *Eutopía: Revista de Desarrollo Económico Territorial*, (15), 192-210.

Lee, S.O., Kim, H. Y., Choi, G. J., Lee, H. B., Jang, K. S., Choi, Y. H., y Kim, J. (2009). Mycofumigation with root rot on moth orchid *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and rhizoctonia. *Journal of Applied Microbiology*, 106 (4), 1213-1219.

Li, J. Y., Strobel, G., Harper, J., Lobkovsky, E., y Clardy, J. (2000). Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Organic Letters* 2, 767–770.

Liao, Z., Chen, M., Sun, X., y Tang, K. (2006). Micropropagation of endangered plant species. *Methods Molecular Biology*, 318, 179–185.

López, J., y Ortega, A. (2017, abril). Protocolo para la identificación molecular de malezas. SAGARPA. Recuperado 1 de noviembre de 2021, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/240519/PROTOCOLO_PARA_LA_IDENTIFICACION_MOLECULAR_DE_MALEZAS.pdf

Macías-Rubalcava, M. L., Hernández, B., Jiménez, M., González, C., Gleen, A., Hanlin, R., Hernandez, S., Saucedo, A., Muria, J., Anaya, A. (2008). Naphthoquinone Spiroketals whit allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry*, 69 (5), 1185-9

Macías-Rubalcava, M. L., Hernández-Bautista, B. E., Oropeza, F., Duarte, G., González, M. C., Glenn, A. E., Anaya, A. L. (2010). Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodor yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(10), 1122–1131. doi:10.1007/s10886-010-9848-5

Macías-Rubalcava, M. L., Sánchez-Fernández, R. E., Roque-Flores, G., Lappe-Oliveras, P., y Medina-Romero, Y. M. (2018). Volatile organic compounds from *Hypoxylon anthochroum* endophytic strains as postharvest mycofumigation alternative for cherry tomatoes. *Food microbiology*, 76, 363-373.

Macías-Rubalcava, M. L., y Garrido-Santos, M. Y. (2022). Phytotoxic compounds from endophytic fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(3), 931-950.

Martínez, B., Infante, D., y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.

McCreath, S. B., y Delgoda, R. (2017). *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. Academic Press.

Meléndez-González, C., Murià-González, M. J., Anaya, A. L., Hernández-Bautista, B. E., Hernández-Ortega, S., González, M. C., Glen, Macías-Rubalcava, M. L. (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(1), 133-147.

Mena-Jiménez, F. (2018). Estrategias ecológicas y culturales para garantizar la disponibilidad de productos forestales no maderables: árboles medicinales en la selva baja del sur de Morelos [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Mendoza Cantú, A., e Ize Lema, I. A. R. (2017). Las sustancias químicas en México. Perspectivas para un manejo adecuado. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(4), 719-745.

Mercier, J., Jiménez-Santamaría, J. I., y Tamez-Guerra, P. (2007). Development of the volatile-producing fungus *Muscodor albus* Worapong, Strobel, and Hess as a novel antimicrobial biofumigant. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(2), 173-179.

Mesa, A. M., Marin, P. A., Ocampo, O., Calle, J., y Monsalve Fonnegra, Z. I. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. Ediciones INTA.

Mesa-Vanegas, A. M., Marín, A., y Calle-Osorno, J. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades biológicas*, 41(111), 32-44.

Morin, L. (2020). Progress in biological control of weeds with plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, 58, 201-223.

Mosquera, W. G., Criado, L. Y., y Guerra, B. E. (2020). Actividad antimicrobiana de hongos endófitos de las plantas medicinales *Mammea americana* (Calophyllaceae) y *Moringa oleifera* (Moringaceae). *Biomédica*, 40(1), 55-71.

Mousa, W. K., y Raizada, M. N. (2013). The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in microbiology*, 4, 65.

Netzker, T., Shepherdson, E. M., Zambri, M. P., y Elliot, M. A. (2020). Bacterial volatile compounds: functions in communication, cooperation, and competition. *Annual Review of Microbiology*, 74, 409-430.

Oerke, E.C., Dehne, H.W., Schonbeck, F. and Weber, A. (1994) *Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops*. Elsevier, Amsterdam.

Orozco-Lugo, L., Guillén-Servent, A., Valenzuela-Galván, D., y Arita, H. T. (2013). Descripción de los pulsos de ecolocalización de once especies de murciélagos insectívoros aéreos de una selva baja caducifolia en Morelos, México. *Therya*, 4(1), 33-46.

Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M. G., Bonifacio-Flores, A., Vino-Nina, L., y Serrano-Canaviri, T. (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de Kiphak iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1), 2-25.

Paramanatham, P., Pattnaik, S., y Siddhardha, B. (2019). Natural products from endophytic fungi: synthesis and applications. *Advances in Endophytic Fungal Research: Present Status and Future Challenges*, 83-103.

Perdomo, H., Sutton, D. A., García, D., Fothergill, A. W., Cano, J., Gené, J., y Guarro, J. (2011). Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1), 243-256.

Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves* (pp. 179-197). New York, NY: Springer New York.

Pitt, J. I., y Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519, p. 388). New York: Springer.

Pongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Kühn, T., Pelzing, M., Sakayaroj, J., y Taylor, W.C. (2008). Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. *Phytochemistry* 69, 1900–1902

Pongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., and Sakayaroj, J. (2006). Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44. *J. Nat. Prod.* 69, 856–858.

Prats, G. (2006). *Microbiología Clínica*. Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Ramírez-Juárez, J. (2022). Seguridad alimentaria y la agricultura familiar en México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(3), 553-565.

Redecker, D., Kodner, R., y Graham, L.E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289,1920–1921.

Rodrigo, S., García-Latorre, C., y Santamaria, O. (2021). Metabolites produced by fungi against fungal phytopathogens: Review, implementation and perspectives. *Plants*, 11(1), 81.

Rodrigo, S., Santamaria, O., Halecker, S., Lledó, S., y Stadler, M. (2017). Antagonism between *Byssochlamys spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*) and plant pathogens: Involvement of the bioactive compounds produced by the endophyte. *Annals of Applied Biology*, 171(3), 464-476.

Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, A. R. A. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), 314-330.

Roque-Flores, G. (2019). Metabolitos secundarios volátiles y no volátiles del hongo endófito *Hypoxylon Anthochroum* aislamiento SMEG4 con actividad biológica útil para el desarrollo de bioplaguicidas y agentes de biocontrol [Tesis de maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.

Royet-Barroso, J. 2020. Control biológico de malezas: un enfoque microbiológico. Obtenido de: https://www.researchgate.net/publication/344399379_CONTROL_BIOLOGICO_DE_E_MALEZAS_UN_ENFOQUE_MICROBIOLOGICO_BIOLOGICAL_CONTROL_OF_WEEDS_A_MICROBIOLOGICAL_APPROACH

Rustamova, N., Bozorov, K., Efferth, T., y Yili, A. (2020). Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties. *Phytochemistry reviews*, 19, 425-448.

Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., y Sullivan, T. J. (1998). A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 319-343.

Sánchez-Fernández, R. E., Diaz, D., Duarte, G., Lappe-Oliveras, P., Sánchez, S., y 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. doi:10.1007/s00248-015-0679-3.

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

Sánchez-Fernández, R.E. (2010). Potencial Alelopático de Extractos de Micelio y Medio de Cultivo de un Hongo Endófito Aislado de *Lonchocarpus castilloi* (Fabaceae). Universidad Nacional Autónoma de México.

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 *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Applied Microbiology* 120:1313–1325.

Sánchez-Ortiz, B. L. (2016). Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae) útiles en agricultura. Universidad Autónoma de México.

Sandoval-Espinoza, Y.K.M., (2014) Aislamiento y purificación de hongos endófitos con potencial antifúngico y fitotóxico de *Lysiloma acapulcense*. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.

Santos-Cruz, J. S., da Silva, C. A., y Hamerski, L. (2020). Natural products from endophytic fungi associated with Rubiaceae species. *Journal of Fungi*, 6(3), 128.

Sarandón, S. J. (2020). Biodiversidad, agroecología y agricultura sustentable. *Libros de Cátedra*.

Schulz, B., y Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(6), 661-686.

Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K., y Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological research*, 106(9), 996-1004.

Schulz, B., Haas, S., Junker, C., Andrée, N., y Schobert, M. (2015). Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science*, 39-45.

Schulz, B., Römmert, A. K., Dammann, U., Aust, H. J., & Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*, 103(10), 1275-1283.

Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S. y Aust, H.-J. (1993) Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 97: 1447–1450

Schulz-Bohm, K., Zweers, H., De Boer, W., y Garbeva, P. (2015). A fragrant neighborhood: volatile mediated bacterial interactions in soil. *Frontiers in microbiology*, 6, 1212.

Sciortino Jr, C. V. (2017). *Atlas of clinically important fungi*. Ed John Wiley y Sons.

Scofield, D. 1998. All Native Plants of South Florida. Disponible en: www.fig.cox.miami.edu

Selim, K., El-beih, A., Abdel-rahman., y El-diwany, A., 2012. Biology of endophytic fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* ., 2(1), p.31-82

SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2019). SEMARNAT impulsa procesos agroecológicos ante el uso excesivo de plaguicidas. Gob.mx. <https://www.gob.mx/semarnat/prensa/la-semarnat-impulsa-procesos-agroecologicos-ante-el-uso-excesivo-de-plaguicidas>.

Sinclair, J. B., y Cerkauskas, R. F. (1996). Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. *Endophytic fungi in grasses and woody plants*, 3-29.

Singh, J., y Yadav, A. N. (2020). *Natural bioactive products in sustainable agriculture*. Springer Nature.

Sparks, T. C., Sparks, J. M., y Duke, S. O. (2023). Natural product-based crop protection compounds— origins and future prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(5), 2259-2269.

Sparks, T. C., y Duke, S. O. (2021). Structure simplification of natural products as a lead generation approach in agrochemical discovery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(30), 8324-8346.

Statista (2020). Tema: El sector agrícola en México. Retrieved September 21, 2021, from Statista website: <https://es.statista.com/temas/7029/el-sector-agricola-en-mexico/>.

Stierle, A. y G. Strobel. (1995). The Search for a Taxol-Producing Microorganism Among the Endophytic Fungi of the Pacific Yew, *Taxus Brevifolia*. *Journal of natural products*, 58 (9), 1315-1324.

Stone, J., & Petrini, O. (1997). Endophytes of forest trees: a model for fungus-plant interactions. In *Plant Relationships Part B: Part B* (pp. 129-140). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Strobel, G. A. 2011. *Muscodor* species-endophytes with biological promise. *Photochemical Review*, 10:163–172.

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. y Harper J. (2004) Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products* 67, 257-268.

Strobel, G., y Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural *Products*. *Microbiology and molecular biology review*, 67 (4), 491-502.

Tilocca, B., Cao, A., y Migheli, Q. (2020). Scent of a killer: Microbial volatilome and its role in the biological control of plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11, 41.

Tiwari, P., Srivastava, Y., y Bae, H. (2021). Trends of pharmaceutical design of Endophytes as anti-infective. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 21(17), 1572-1586.

Tiwari, P., y Bae, H. (2022). Endophytic fungi: Key insights, emerging prospects, and challenges in natural product drug discovery. *Microorganisms*, 10(2), 360.

Torres, F., y Rojas, A. (2018). El suelo agrícola en México: retrospección y prospectiva para la seguridad alimentaria. Realidad, datos y espacio. *Revista Internacional de Estadística y Geografía*, 9(3).

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 *Hypoxylon anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia* (Burseraceae). *Journal of Applied Microbiology*, 121(2), 380–400.

Viera-Arroyo, W. F. (2020). Rol de los microorganismos benéficos en la Agricultura Sustentable. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 67-68.

Viera-Arroyo, W. F., Tello-Torres, C. M., Martínez-Salinas, A. A., Navia-Santillán, D. F., Medina-Rivera, L. A., Delgado-Párraga, A. G., y Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149.

Villanueva-Silva, R. (2017). Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y antioomiceto de hongos endófitos con potencial antagónico aislamientos de *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarpum*. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.

Vinchira-Villarraga, D. M., y Moreno-Sarmiento, N. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 2-5.

Wang J, Huang Y, Fang M, Zhang Y, Zheng Z, Zhao Y, Su W (2002). Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *Med microbiol immunol* 34:51–57.

Wang, W., y Wang, T. T. (2023). Fungal secondary metabolites as valuable chemical entities for medicines and agrochemicals. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1150023.

Watanabe T. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Boca Raton: CRC Press. 2010. p. 397

Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*. Cambridge university press.

Wheeler, D. L., Dung, J. K. S., y Johnson, D. A. (2018). From pathogen to endophyte: an endophytic population of *Verticillium dahliae* evolved from a sympatric pathogenic population. *New Phytologist*, 222(1), 497-510.

Wiewiora B, Zurek G, Panka D (2015) Is the vertical transmission of *Neotyphodium lolii* in perennial ryegrass the only possible way to the spread of endophytes? *PLoS One* 10(2):e0117231.

Wilches Ortiz, W. A. (2019). Manejo integrado de plagas y enfermedades en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) para una mayor seguridad alimentaria de pequeños productores en el Altiplano Cundiboyacense, Colombia. Extraído de: www.repositorio.unadmexico.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/393/MA_NEJO%20INTEGRADO%20DE%20PLAGAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y

WRM. World Rainforest Movement. 2004. La colonización y papel de la agricultura en pocas palabras. Boletín 85. Extraído de <https://www.wrm.org.uy/es/articulos-del-boletin/la-colonizacion-y-el-papel-de-la-agricultura-en-pocas-palabras>

Xie, Y., Tian, L., Han, X., y Yang, Y. (2021). Research advances in allelopathy of volatile organic compounds (VOCs) of plants. *Horticulturae*, 7(9), 278.

Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C., y Shao, D. (2019). Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 3327-3340.

Yim, G., Wang, H. H., y Frs, J. D. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 362(1483), 1195-1200.

You, F., Han, T., Wu, J. Z., Huang, B. K., y Qin, L. P. (2009). Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(3), 162-165.

Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P. y Qin, L., 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, 165(6), p.437-49.

Yuan, J. I., Jian-Nan, B. I., Bing, Y. A. N., y Xu-Dong, Z. (2006). Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol. *Chinese journal of biotechnology*, 22(1), 1-6.

Zeilinger, S., García-Estrada, C., y Martín, J. F. (2015). Fungal secondary metabolites in the "OMICS" Era. *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Volume 2*, 1-12.

Zelaya-Molina, L. X., Chávez-Díaz, I. F., de los Santos-Villalobos, S., Cruz-Cárdenas, C. I., Ruíz-Ramírez, S., y Rojas-Anaya, E. (2022). Control biológico de plagas en la agricultura mexicana. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(SPE27), 69-79.

Zepeda-Jazo, I. (2018). Manejo sustentable de plagas agrícolas en México. *Agricultura, Sociedad Y Desarrollo*, 15(1), 99-108.

Zhao, X., Zhou, J., Tian, R., y Liu, Y. (2022). Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13, 922450.

Zoschke, A., y Quadranti, M. (2002). Integrated weed management: Quo vadis? *Weed Biology and Management*, 2(1), 1-10.

Zou, W. X., Meng, J. C., Lu, H., Chen, G. X., Shi, G. X., Zhang, T. Y., y Tan, R. X. (2000). Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products*, 63, 1529-1530.