



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**POTENCIAL ALELOQUÍMICO DEL HONGO ENDÓFITO *XYLARIA*  
SP., AISLADO DE *CALLICARPA ACUMINATA* (VERBENACEAE)  
SOBRE EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS Y PLANTAS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

**P R E S E N T A**

**PAULETTE HUELGAS MARROQUÍN**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Dra. María Isabel Aguilar Laurents**  
**VOCAL:**                 **Dra. Perla Carolina Castañeda López**  
**SECRETARIO:**         **Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava**  
**1er. SUPLENTE:**       **Dr. Jose Fausto Rivero Cruz**  
**2º SUPLENTE:**         **Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano**

INSTITUTO DE QUÍMICA.

UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

**SUSTENTANTE:**

---

PAULETTE HUELGAS MARROQUÍN

## **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 la realización del presente trabajo a través de los proyectos 81017 (responsable, Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava) e IN230107 (responsable, Dra. Ana Luisa Anaya Lang), respectivamente.

A mi asesora la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava por el aprendizaje, el cariño y los buenos momentos que propició dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Ana Luisa Anaya por los conocimientos que me brindo.

A la Q.A Blanca Hernández por su gran apoyo en el trabajo de laboratorio y sus buenos consejos, por el cariño, las risas y la diversión.

A todos mis compañeros de laboratorio, en especial a la M.C. Aurora Saucedo por la ayuda en la identificación de *Xylaria* sp.

A los miembros del jurado por la revisión y los buenos consejos.

A la B. Carmen Loyola por la realización de las fotos del presente trabajo, pero sobre todo por los buenos consejos que da sin siquiera percatarse.

A mis queridísimas amigas Ale, Adri, Anlly, Cris, Tany, Mary, Chio por haberme acompañado a lo largo de la carrera, por las fiestas, la motivación, las noches de estudio, las sesiones de fotos y su cariño y apoyo incondicional. Por hacer de cada clase algo inolvidable y de gran valor sentimental, por las risas y los regaños. Sin ustedes la facultad no representaría tanto para mí.

A mi amigo Jorge por tanto años de amistad, por presionarme para ser mejor persona y estudiante, por las largas pláticas y tardes en Coyoacán, por enseñarme que la ciencia es insuficiente para comprender el misterio de la vida, por ser un ejemplo de fuerza de voluntad, por sus buenos deseos y por ser como es.

A mis queridísimas amigas de la prepa: a Ale por estos años juntas en los buenos y malos momentos y por tu motivación y cariño; a Rosh por enseñarme el valor de la amistad, por ser una persona desinteresada, llena de amor y por cultivar la amistad como lo hace.

A mis amigos, Nata, Oscar, Mary, Moni, Angel, Marco, Ara e Ivan, por todos los buenos momentos, por los viernes de estudio, por su amistad y por su interés en cultivar esta relación a pesar de sus ocupaciones.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Jordi, Lety, Emma, Rosita y Claudio por los buenos momentos, las comidas en la facultad, los partidos de básquetbol y por todo el apoyo, cariño y diversión a su lado.

A Claudio por todo el tiempo que dedico a diversas actividades relacionadas con las tesis, empezando con enseñarme a usar el HPLC. Pero sobre todo por haberse cruzado en mi camino, por su hermosa compañía y por dejarme descubrir a una persona llena de maravillas. Por alentar mis sueños y por compartir conmigo su vida y su felicidad.

A Mercedes, Raúl y todo el equipo de Cosmos por la confianza en mí, por el cariño y calidez, por todo lo que he aprendido de ustedes no solo en lo profesional sino también en lo personal. Sin su apoyo la finalización de mis estudios no habría sido posible. Muchas gracias.

A mi familia. A mi mami Paulette por ser un ejemplo de lucha y fortaleza, por su amor y apoyo incondicional. A mi papi Amílcar por dejarme ver sus errores y aprender de ellos, por enseñarme el valor de la iniciativa, por nunca rendirse y por todo su amor y enseñanzas. A mis hermanos Amira, Arantza y Amilcar, por enseñarme tanto, por ser brillantes, hermosas personas y por tantos años de diversión. A mi abuelita Martha por el apoyo, el amor y las enseñanzas. A todos ustedes los amo y es gracias a su apoyo y amor que puedo finalizar esta etapa y sentirme satisfecha con ella.

A la UNAM y a todos los profesores de la facultad que, sin perder un ápice de profesionalismo se esfuerzan por enseñarnos los valores de la honestidad, el esfuerzo y la disciplina, que con tanto despojo nos dan sus conocimientos, que nos alientan a ver el mundo desde una perspectiva desinteresada, por todos sus consejos y trabajo.

A todas las demás personas que han influido en mi y han dejado algo de ellas en mi vida.

A Dios por la fuerza para seguir adelante en los malos momentos, por todas las oportunidades que nos ha puesto en el camino y por la hermosa familia y amigos que me dio.

## **Dedicatoria**

**A mis padres, Paulette y Amilcar, a mi abuelita Martha  
y a mis hermanos Amilcar, Arantza y Amira.**

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. Ecología y ecología química	3
1.1. Los metabolitos secundarios	4
1.2. Alelopatía	4
2. Los hongos	6
2.1. Hongos endófitos	6
2.2. Hongos endófitos tropicales	10
3. <i>Xylariales</i>	11
3.1. Características y división del orden de los <i>Xylariales</i>	11
3.2. La familia <i>Xylariaceae</i>	12
3.3. Metabolitos secundarios producidos por el género <i>Xylaria</i>	15
4. Agricultura en México	15
4.1. La ecología química y la agricultura	16
III. HIPÓTESIS	28
IV. OBJETIVOS	29
4.1. Objetivo General	29

	Página
4.2. Objetivos particulares	29
<b>V. PARTE EXPERIMENTAL</b>	31
1. Material fúngico	31
2. Microorganismos de prueba	31
2.1. Microorganismos	31
2.2. Plantas	31
3. Preparación de medios de cultivo utilizado en los bioensayos y en la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de <i>Xylaria</i> sp.	32
3.1. Papa dextrosa	32
3.2. Caldo papa dextrosa	32
4. Determinación de la actividad biológica	32
4.1. Bioensayos de antagonismo	32
4.1.1. Análisis microscópico de las hifas en la zona de interacción antagónica	35
4.2. Determinación de la actividad antifúngica	36
4.3. Determinación de la actividad fitotóxica	37
5. Obtención de los cultivos del hongo endófito <i>Xylaria</i> sp.	38
5.1. Cultivos en pequeña escala	38
5.2. Cultivo en mediana escala	39
6. Obtención de los extractos orgánicos	39
7. Fraccionamiento Químico Biodirigido	40



	Página
7.1. Métodos cromatográficos generales	39
7.2. Fraccionamiento biodirigido de cultivos en mediana escala	40
<b>8. Purificación de metabolitos secundarios</b>	<b>43</b>
8.1. Obtención de la punctaporonina B (37)	43
8.1.1. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del metabolito secundario	43
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
1. Bioensayos de antagonismo	44
1.1. Antagonismo competitivo entre el endófito <i>Xylaria</i> sp. y dos endófitos de <i>Callicarpa acuminata</i>	46
Antagonismo entre <i>Xylaria</i> sp. y el aislamiento C <sub>4</sub> E <sub>13</sub>	46
Antagonismo entre <i>Xylaria</i> sp. y aislamiento C <sub>5</sub> E <sub>12</sub>	47
1.1. Antagonismo competitivo entre el endófito <i>Xylaria</i> sp. y diversos microorganismos fitopatógeno	49
Antagonismo directo entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>F. oxysporum</i>	49
Antagonismo directo entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>A. solani</i>	50
Antagonismo directo entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>Rhizoctonia</i> sp.	52
Antagonismo directo entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>P. capsici</i>	53
Antagonismo directo entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>Pestalotiopsis</i> sp.	54
Antagonismo directo entre <i>Xylaria</i> sp. y el aislamiento C <sub>5</sub> F <sub>3</sub>	55
2. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de <i>Xylaria</i> sp. y evaluación del potencial aleloquímico de sus extractos orgánicos	60
2.1. Obtención de cultivos en cultivos de pequeña escala	60

	Páginas
2.2. Efecto antifúngico	62
2.3. Efecto fitotóxico	63
3. Cultivo en mediana escala	65
3.1. Actividad antifúngica	66
3.2. Actividad fitotóxica	68
Crecimiento radicular	68
Respiración celular	70
4. Fraccionamiento biodirigido de los extractos activos del medio de cultivo y micelio en condiciones estáticas (cultivo a mediana escala)	74
4.1. Actividad fungitóxica	75
4.2. Actividad fitotóxica	76
4.3. Caracterización de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones	78
VII. CONCLUSIONES	87
VIII. PERSPECTIVAS	90
IX. BIBLIOGRAFÍA	91

**LISTA DE CUADROS**

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Metabolitos secundarios producidos por hongos del género <i>Xylaria</i> con actividad biológica.	17
<b>Cuadro 2.</b> Tipo de interacciones entre microorganismos, categorías y valores numéricos asignados.	34
<b>Cuadro 3.</b> Gradientes de flujo y sistemas de elución utilizados para la separación óptima de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos y en las fracciones primarias de los extractos orgánicos en mediana escala de <i>Xylaria</i> sp.	40
<b>Cuadro 4.</b> Fraccionamiento primario del extracto activo del medio de cultivo en condiciones estáticas de <i>Xylaria</i> sp.	41
<b>Cuadro 5.</b> Fraccionamiento primario del extracto activo del micelio en condiciones estáticas de <i>Xylaria</i> sp.	42
<b>Cuadro 6.</b> Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de <i>Xylaria</i> sp. y de los diferentes microorganismos competidores en los bioensayos de antagonismo.	56
<b>Cuadro 7.</b> Resumen de las mediciones realizadas sobre las hifas y vacuolas de <i>Xylaria</i> sp. y de los diferentes microorganismos fitopatógenos y endófitos utilizados en los bioensayos de antagonismo.	58
<b>Cuadro 8.</b> Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los cultivos en pequeña y mediana escala del endófito <i>Xylaria</i> sp.	61
<b>Cuadro 9.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y del micelio (200 µg/mL) en condiciones estáticas del hongo endófito <i>Xylaria</i> sp., sobre el crecimiento radial de cinco hongos fitopatógenos	62
<b>Cuadro 10.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y del micelio (200 µg/mL) del hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. obtenidos en condiciones de agitación, sobre el crecimiento radial de cinco hongos fitopatógenos.	63

	Página
<b>Cuadro 11.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (100 µg/mL) del hongo endófito <i>Xylaria</i> sp., obtenidos en condiciones de incubación estáticas sobre el crecimiento de la raíz de tres especies de plantas prueba.	64
<b>Cuadro 12.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (100 µg/mL) del hongo endófito <i>Xylaria</i> sp., obtenidos en condiciones de incubación con agitación, sobre el crecimiento de la raíz de tres especies de plantas prueba.	64
<b>Cuadro 13.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en condiciones de incubación estáticas, sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos a tres diferentes concentraciones de prueba.	67
<b>Cuadro 14.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en condiciones de incubación con agitación, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos a tres diferentes concentraciones de prueba.	68
<b>Cuadro 15.</b> Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en condiciones de incubación estáticas sobre el crecimiento de la raíz de tres semillas prueba a tres diferentes concentraciones.	69
<b>Cuadro 16.</b> Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en condiciones de incubación con agitación sobre el crecimiento de la raíz de tres semillas prueba a tres diferentes concentraciones.	69
<b>Cuadro 17.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio en condiciones estáticas sobre el consumo de oxígeno de tres plantas de prueba.	71
<b>Cuadro 18.</b> Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio en condiciones de agitación sobre el consumo de oxígeno de tres plantas de prueba.	73
<b>Cuadro 19.</b> Constantes espectroscópicas de IR y espectrométricas de la punctaporonina B (37).	80
<b>Cuadro 20.</b> Datos espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> y DMSO) y RMN <sup>13</sup> C (125MHz y DMSO) de la punctaporonina B (37).	83

LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estromas de <i>Xylaria</i> sp. formados en interacción antagónica con <i>Fusarium</i> sp.	14
<b>Figura 2.</b> Bioensayo de antagonismo en caja de Petri entre el hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. (A) y los diferentes microorganismos competidores (B). NI B zona de no interacción de B, NI A zona de no interacción de A, IA zona de interacción de A, IB zona de interacción de B.	32
<b>Figura 3.</b> Crecimiento del hongo endófito <i>Xylaria</i> sp. en cultivos en PDA.	45
<b>Figura 4.</b> Bioensayo de antagonismo entre los hongos <i>Xylaria</i> sp. (derecha) y C <sub>4</sub> E <sub>13</sub> (izquierda) a los 11 días inoculados al mismo tiempo (A y B) y a los 7 días de interacción antagónica, inoculados con 7 días de diferencia (C y D). A y C vista superior de los micelios. B y D vista inferior.	46
<b>Figura 5.</b> Bioensayo de antagonismo entre los hongos <i>Xylaria</i> sp. (derecha) y C <sub>4</sub> E <sub>13</sub> (izquierda) a los 11 días inoculados al mismo tiempo (A y B) y a los 7 días de interacción antagónica, inoculados con 7 días de diferencia (C y D). A y C vista superior de los micelios. B y D vista inferior.	46
<b>Figura 6.</b> Interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. y C <sub>4</sub> F <sub>13</sub> . A control de crecimiento <i>Xylaria</i> sp. B interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. (flecha rosa) y C <sub>4</sub> E <sub>13</sub> (flecha azul). C control de crecimiento de C <sub>4</sub> E <sub>13</sub> .	47
<b>Figura 7.</b> Bioensayo de antagonismo entre los hongos <i>Xylaria</i> sp. (izquierda) y C <sub>5</sub> E <sub>12</sub> (derecha) a los 11 días de interacción antagónica inoculados al mismo tiempo (A y B) y a los 7 días de interacción antagónica sembrados con 7 días de diferencia (D y E). A y E vista superior de los micelios. B y F vista inferior. C. acercamiento zona de interacción (vista superior). D acercamiento zona de interacción (vista inferior).	48
<b>Figura 8.</b> Interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. y C <sub>5</sub> F <sub>12</sub> . A control de crecimiento <i>Xylaria</i> sp. B interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. (flecha rosa) y C <sub>5</sub> F <sub>12</sub> (flecha azul). C control de crecimiento de C <sub>5</sub> F <sub>12</sub> .	49
<b>Figura 9.</b> Bioensayo de antagonismo entre los hongos <i>Xylaria</i> sp. y <i>Fusarium oxysporum</i> a los 7 días de interacción antagónica. A vista superior de los micelios. B vista inferior.	50

	Página
<b>Figura 10.</b> Interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>Fusarium oxysporum</i> . A control de crecimiento <i>Xylaria</i> sp. B interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. (flecha rosa) y <i>Fusarium oxysporum</i> (flecha azul). C control de crecimiento <i>Fusarium oxysporum</i> .	50
<b>Figura 11.</b> Bioensayo de antagonismo entre los hongos <i>Xylaria</i> sp. y <i>Alternaria solani</i> a los 7 días de interacción antagónica. A vista superior de los micelios. B vista inferior.	51
<b>Figura 12.</b> Interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>Alternaria solani</i> . A control de crecimiento <i>Xylaria</i> sp. B interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. (flecha rosa) y <i>A. solani</i> (flecha azul) C control de crecimiento <i>A. solani</i> .	51
<b>Figura 13.</b> Bioensayo de antagonismo entre los hongos <i>Xylaria</i> sp. y <i>Rhizoctonia</i> sp. a los 6 días de interacción antagónica. A vista superior de los micelios. B vista inferior.	52
<b>Figura 14.</b> Interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>Rhizoctonia</i> sp. A control de crecimiento <i>Xylaria</i> sp. B interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. (flecha roja) y <i>Rhizoctonia</i> sp. (flecha azul) C control de crecimiento <i>Rhizoctonia</i> sp.	52
<b>Figura 15.</b> Bioensayo de antagonismo entre los hongos <i>Xylaria</i> sp. y <i>P. capsici</i> a los 7 días de interacción antagónica. A vista superior de los micelios. B vista inferior.	53
<b>Figura 16.</b> Interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>P. capsici</i> . A control de crecimiento <i>Xylaria</i> sp. B interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>P. capsici</i> . C control de crecimiento <i>P. capsici</i> .	53
<b>Figura 17.</b> Bioensayo de antagonismo entre los hongos <i>Xylaria</i> sp. y <i>Pestalotiopsis</i> sp. a los 7 días de interacción antagónica. A vista superior de los micelios. B vista inferior.	54
<b>Figura 18.</b> Interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. y <i>Pestalotiopsis</i> sp. A control de crecimiento de <i>Xylaria</i> sp. B interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. (flecha roja) y <i>Pestalotiopsis</i> sp. (flecha azul). C control de crecimiento de <i>Pestalotiopsis</i> sp.	54

	Página
<b>Figura 19.</b> Bioensayo de antagonismo entre los hongos <i>Xylaria</i> sp. y $C_5F_3$ a los 7 días de interacción antagónica. A vista superior de los micelios. B vista inferior.	55
<b>Figura 20.</b> Interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp y $C_5F_3$ . A control de crecimiento <i>Xylaria</i> sp. B interacción antagónica entre <i>Xylaria</i> sp. (flecha roja) y $C_5F_3$ (flecha azul). C control de crecimiento de $C_5F_3$ .	56
<b>Figura 21.</b> Perfiles cromatográficos de los extracto del medio de cultivo (verde) y micelio (azul) del endófito <i>Xylaria</i> sp. obtenidos en condiciones de incubación estáticas (B) y con agitación (A), utilizando CLAR a $\lambda$ 239 nm.	66
<b>Figura 22.</b> Efecto del extracto del medio de cultivo obtenido en condiciones agitación sobre la respiración de las plántulas de <i>Lycopersicum esculentum</i> .	71
<b>Figura 23.</b> Efecto del extracto del medio de cultivo obtenido en condiciones estáticas sobre la respiración de las plantas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> .	72
<b>Figura 24.</b> Efecto fitotóxico del extracto del medio de cultivo (A-C) y micelio (D-F) en condiciones estáticas sobre el crecimiento de la raíz de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> (A y D), <i>Lactuca sativa</i> (B y E) y <i>Lycopersicon esculentum</i> (C y F).	73
<b>Figura 25.</b> Acercamiento del efecto fitotóxico del extracto del medio de cultivo (A y B) y micelio (C) en condiciones estáticas sobre el crecimiento de la raíz de <i>Lycopersicum esculentum</i> (A) y <i>Lactuca sativa</i> (B y C).	74
<b>Figura 26.</b> Efecto antifúngico de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos.	75
<b>Figura 27.</b> Efecto antifúngico de las fracciones primarias del extracto del micelio, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos.	76
<b>Figura 28.</b> Actividad fitotóxica de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo, sobre el crecimiento de tres plantas de prueba.	77
<b>Figura 29.</b> Actividad fitotóxica de las fracciones primarias del extracto del micelio, sobre el crecimiento de tres plantas de prueba.	78

	Página
<b>Figura 30.</b> Espectro de masas de la punctaporonina B (37).	81
<b>Figura 31.</b> Espectro de IR de la punctaporonina B (37).	82
<b>Figura 32.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ y DMSO) de la punctaporonina B (37).	84
<b>Figura 33.</b> RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ y DMSO) de la punctaporonina B (37).	85
<b>Figura 34.</b> Estructura de la punctaporonina B (37).	86
<b>Figura 35.</b> Vista estereoscópica de la punctaporonina B (37).	86



**LISTA DE ABREVIATURAS**

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
cm	Centímetros
COSY	Correlation spectroscopy (espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear)
CPD	Caldo-papa-dextrosa
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DEPT	Desacoplate enhancement proton test (experimento de desacoplamiento de protones)
DF	Distrito Federal
EM	Espectroscopía de masas
eV	Electrón-volts
g	Gramos
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
IE	Impacto electrónico

## Lista de Abreviaturas

---

IR	Infrarrojo
$J$	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
L	Litros
$M^+$	Ion molecular
m/z	Unidades de masa-carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
$\mu\text{g}$	Microgramos
MHz	Mega hercios
mL	Mililitros
mm	Milímetros
Mult.	Multiplicidad
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy (espectro del efecto nuclear de Overhauser)
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
p.f.	Punto de fusión
PDA	Papa-dextrosa-agar
RMN $^{13}\text{C}$	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN $^1\text{H}$	Resonancia magnética nuclear de protón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete

## Lista de Abreviaturas

---

t	Triple
TMS	Tetrametilsilano
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
$\nu_{\max}$	Frecuencia máxima

### I. INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos están representados por una amplia variedad de especies de micromicetos que colonizan los tejidos de su planta hospedera sin causar síntomas aparentes de enfermedad (Wilson *et al.*, 1995), la mayoría de ellos están clasificados dentro del grupo de los ascomicetos (Davis *et al.*, 2003) y se encuentran en una gran variedad de plantas y de ecosistemas (Petrini y Petrini, 1985); sin embargo, el conocimiento de su papel en las relaciones ecológicas que establecen aún es muy limitado. Diversos autores han descrito que las relaciones entre los hongos endófitos y su planta hospedera pueden variar desde la simbiosis (comensalismo o mutualismo) hasta la patogénesis y el oportunismo (Strobel *et al.*, 2004). Schulz y cols. (1999) y Schulz y Boyle (2005) proponen que las relaciones entre hongo endófito-planta hospedera no son neutras, es decir, en estas interacciones se establece un balance de antagonismo. De esta manera, los factores de virulencia del hongo compiten contra las defensas de la planta, las cuales limitan el desarrollo de los endófitos y de la enfermedad.

La gran importancia de los hongos endófitos se debe principalmente, a los metabolitos secundarios que producen los cuales presentan estructuras químicas novedosas y diversas actividades biológicas. Además, muchos de estos compuestos son útiles en áreas como la medicina y la agricultura (Gamboa, 2006). Por otro lado, el estudio de las relaciones ecológicas de estos microorganismos y la obtención de los metabolitos secundarios involucrados en dichas relaciones constituye un campo enorme para el descubrimiento de nuevas moléculas, con actividades biológicas interesantes (Strobel y Daysi, 2004). Asimismo, el estudio químico y biológico de estos hongos es relativamente reciente, lo cual los hace un campo de estudio muy prometedor. Uno de los géneros importantes dentro de los hongos endófitos es el género *Xylaria* el cual ha permitido la obtención de moléculas novedosas con actividades biológicas importantes.

En este contexto, el presente trabajo de investigación se desarrolló como parte de un proyecto que pretende estudiar la diversidad de hongos endófitos en México y contribuir al entendimiento de la función de estos microorganismos en las relaciones hospedero-endófito, así como el papel que desempeñan los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos, en dicha relación.

En el presente proyecto de tesis se estudió el potencial antagónico del hongo endófito *Xylaria* sp. aislado de hojas sanas de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae), colectadas en la reserva ecológica

“El Edén”, en Quintana Roo, frente a diferentes microorganismos endófitos y fitopatógenos a través de bioensayos de antagonismo directo, y se evaluó el potencial aleloquímico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de *Xylaria* sp. sobre el crecimiento de hongos y plantas, con el fin de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las complejas relaciones entre hongos endófitos, así como aportar conocimientos en el área agrícola, en la cual la identificación y caracterización de compuestos naturales menos dañinos al medio ambiente y a organismos no blanco, se ha convertido en uno de los principales objetivos de las industrias relacionadas.

## II. ANTECEDENTES

### 1. ECOLOGÍA Y ECOLOGÍA QUÍMICA

El término Ecología fue acuñado por Ernst H. Haeckel, y surge del vocablo *oekologie* (del griego *oikos* que significa casa o lugar donde se vive). Esta ciencia trata de las relaciones entre los seres vivos (de la misma o diferente población) con su ambiente biótico y de la influencia de los factores abióticos sobre ellas; todas llevadas a cabo dentro de ecosistemas (Margaleff, 1980).

La ecología a lo largo de su existencia como ciencia, ha demostrado la complejidad y la importancia de las interacciones entre organismos, nos ha enseñado cómo los seres vivos interactúan de forma variable con los diversos componentes del medio ambiente, cómo responden ante ellos y, a su vez, la manera en la que influyen de modo diverso en el ecosistema (Anaya, 2003). De las múltiples formas en las que un organismo responde a una situación particular, la liberación de compuestos químicos o metabolitos secundarios al medio ambiente tiene una importancia enorme aunque generalmente es poco evidente o difícilmente detectable. Estos compuestos químicos afectan significativamente las condiciones del organismo productor e influyen sobre el crecimiento, la salud, la conducta y en suma, en la biología poblacional de plantas, animales y microorganismos de modo distinto al relacionado con la nutrición. Este hecho determina la existencia de interacciones bióticas particulares, las relaciones químicas entre organismos, y es donde la ecología química encuentra su nicho (Anaya, 2003).

Como se explicó anteriormente, los productos químicos sintetizados y liberados por organismos son los actores principales en las relaciones que estudia la ecología química. Aún cuando antiguamente estos compuestos fueron considerados como desechos y no se relacionaron con funciones vitales del organismo productor, hoy se les atribuyen funciones tan importantes como atrayentes de polinizadores en plantas, compuestos antialimentarios, estimulantes de ovoposición, etc. (Rodríguez y Levin, 1976; Crock *et al.*, 1997; Pichersky y Gershenzon, 2002; Caissard *et al.*, 2004).

### **1.1. LOS METABOLITOS SECUNDARIOS**

Los compuestos producidos por los organismos, pueden clasificarse en dos grandes grupos. El primero de ellos está integrado por compuestos químicos presentes en todos los organismos vivos y cuyas funciones están relacionadas directamente con el desarrollo, la nutrición y la reproducción de los sistemas vivos y como es de esperarse, habitualmente ejercen algún efecto en las células del organismo productor. El segundo grupo es el de los metabolitos secundarios, cuya distribución se encuentra restringida y sus efectos son ejercidos en las células de un organismo receptor; estos compuestos son producidos generalmente por un organismo o grupo de organismos particulares y son una expresión de la individualidad de cada especie (Dewick, 2009). A pesar de las definiciones aceptadas para los metabolitos secundarios, resulta difícil una división bien marcada, por ejemplo, la mayoría de los ácidos grasos y azúcares son considerados metabolitos primarios, sin embargo, algunos de ellos son extremadamente raros y se encuentran sólo en algunas especies. Otro ejemplo son los esteroides, cuya estructura base está ampliamente distribuida y dentro de los cuales existe un grupo cuya presencia está restringida taxonómicamente, además de que presentan actividades biológicas importantes (Hanson 2003; Dewik, 2009).

Los metabolitos secundarios no son producidos en todas las condiciones y en la mayoría de las ocasiones su función y beneficio no son conocidos totalmente. En muchos casos, la razón de la producción de metabolitos secundarios es indudable y fácilmente visible, como ocurre en el caso de los compuestos tóxicos producidos para la defensa contra predadores, así como con los metabolitos volátiles biosintetizados para atraer individuos de la misma o de diferente especie, o los compuestos coloridos que atraen o dan alarma a otras especies. Sin embargo, en muchas otras situaciones la función no es tan evidente, por lo que es lógico asumir que todos ellos tienen una función vital para el organismo que los produce y un efecto sobre la biología del organismo receptor.

### **1.2. ALELOPATÍA**

El término alelopatía fue acuñado por Molish (1937) y proviene del griego *allelon* = de uno para otro y *phatós* = sufrir. El concepto ha sido descrito tradicionalmente por Rice (1984) como “cualquier efecto directo o indirecto causado por una planta (incluyendo microorganismos) sobre

otras a través de la producción de compuestos químicos que se liberan al medio ambiente”. Una definición más amplia propuesta por la Sociedad Internacional de Alelopatía (1996) es: “cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, que influyan en el crecimiento y en el desarrollo de sistemas biológicos y agrícolas”. En este sentido un alelopático será cualquier metabolito secundario capaz de originar el efecto biológico, producido por un organismo y liberado al medio ambiente (Rizvi *et al.*, 1992).

Aunque el fenómeno no se limita a las plantas, éstas han sido utilizadas como modelo en la alelopatía, debido a que su existencia sedentaria tiene un impacto profundo en la historia de vida de los individuos, causando una influencia en la ecología y en la evolución de la población entera. Así, las plantas que están sujetas a desarrollarse en el mismo lugar de su germinación, experimentan competencia proveniente de sus vecinos de una manera más agresiva que en el caso de los animales, donde este sedentarismo y anclaje son menos acentuados y otros tipos de defensa como el escape, la evasión y el mimetismo, son los que se han perfeccionado evolutivamente (Oliveros, 2008). La característica de movimiento restringido ha dado lugar a una serie de defensas, que se subdividen en mecánicas, fenológicas y químicas (Coley, 1983; Rosenthal G, 1991 y Aide T., 1993). De estas tres categorías, las últimas están relacionadas directamente con la alelopatía y están representadas por los metabolitos secundarios que actúan en detrimento del estrés ocasionado a la planta, por ejemplo, contra la herbivoría, el ataque por áfidos o patógenos y en otras funciones como la polinización o la atracción de parasitoides (Oliveros, 2008).

Los metabolitos secundarios han mostrado importantes y diversas funciones ecológicas y es debido a estas propiedades que se han convertido en un importante recurso y objeto de estudio. No es de sorprenderse el éxito que los productos naturales han mostrado actualmente en diferentes campos. De los 520 fármacos descubiertos entre 1983 y 1994, 39 % son metabolitos secundarios o derivados de éstos y cuyas principales aplicaciones incluyen antibióticos y antitumorales (Cragg *et al.*, 1997; Cragg *et al.*, 2006), de los fármacos producidos a partir de 1995, 244 estructuras químicas han sido seleccionadas como prototipos y de éstas, el 83 % proviene de fuentes naturales (animales, plantas y microorganismos) y únicamente el 17 % proviene de síntesis química o de modificaciones a compuestos ya existentes (Hayes *et al.*, 1999 Furtado, 2004).

Actualmente los metabolitos secundarios son responsables de una amplia variedad de actividades biológicas, con evidencia en ensayos *in vitro* o *in vivo* y se les sitúa como una prometedora fuente



de estudio con importantes aplicaciones médicas y agrícolas (Singh *et al.*, 2003). En la agricultura por ejemplo, el uso de preparaciones “naturales” para el control de enfermedades en las plantas es ancestral. La corteza de *Lonchocarpus* sp. (productor de rotenona) se ha utilizado en el combate de plagas en árboles frutales. En los años treinta se comercializaban preparaciones de raíz de *Derris elíptica*, *Lonchocarpus nicuo* y *Tephrosia* sp., como estos, existen un gran número de ejemplos de fuentes naturales utilizadas como agroquímicos que fueron substituidos poco a poco por productos sintéticos (Dubey *et al.*, 2011). Actualmente, se ha vuelto nuevamente la mirada hacia las moléculas obtenidas de plantas, hongos o bacterias que sean capaces de ejercer un efecto biológico y cuya repercusión en el medio ambiente no sea tan acentuada.

## 2. LOS HONGOS

Los hongos representan un grupo de organismos con formas, comportamiento y ciclos de vida muy variables. Son organismos únicos, capaces de producir un enorme número de esporas asexuales, las cuales son liberadas y dispersadas con gran eficiencia de tal modo que se pueden encontrar en prácticamente cualquier nicho ecológico. Se han descrito cerca de 69 000 especies de hongos y se estima que existen aproximadamente 1,5 millones de especies en el mundo (Hawksworth, 1991). Debido a que el reino está representado por una gran riqueza de organismos, a continuación se enlistan las características que definen a los hongos (Stephenson, 2010):

- Nutrición: heterotrófica (nunca fotosintéticos) y absorptiva.
- Talo: unicelular o filamentoso delimitado por una pared rígida. En las especies que tienen talo filamentoso (miceliar), éste puede ser o no septado, pero aquellos con septos son funcionalmente cenocíticos porque los septos son perforados. Los talos pueden hallarse dentro o sobre el sustrato u hospedante.
- Pared celular: bien definida típicamente formada de quitina.. Según el grupo pueden presentarse otros polisacáridos (manana, glucana, etc.).
- Movilidad: los hongos son generalmente inmóviles aunque presentan flujo citoplasmático dentro del micelio.

- Núcleo: eucariotas, los talos pueden ser multinucleados, con células homocarióticas, o heterocarióticas, típicamente haploides.
- Ciclo de vida: simple o complejo.
- Comportamiento sexual: anamorfo (asexual) o teleomórfico (sexual).
- Esporocarpos: microscópicos o macroscópicos.
- Hábitat: son ubicuos.
- Distribución: cosmopolita.

En los sistemas de clasificación actual los hongos pertenecen al reino fungi, con tres divisiones Gymnomycota, Mastigomycota y Amastigomycota. La división Gymnomycota se subdivide a su vez en Acrasiogimnomicotina y Plasmodiogimnomicotina; la Mastigomycota en Haploplastigimnomicotina y Diplomastigimnomicotina y, por último, la división Amastigomycota se subdivide en Zigomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Sumbali, 2005).

Los hongos tienen otras características importantes: poseen una alta capacidad de producción metabólica, misma que puede ser optimizada con la variación de condiciones de cultivo o bien por métodos biotecnológicos. Además, constituyen recursos renovables y su obtención a partir del medio ambiente tiene un bajo impacto, toda vez que se requiere únicamente una muestra pequeña para su estudio y evaluación (Bills, 1995).

Además de sus interesantes características biológicas, los hongos son hoy en día importantes objetos de estudio en el área química, cuya importancia tiene origen en el descubrimiento de la penicilina por Fleming y Chain (1930), un poderoso antibiótico producido por *Penicillium notatum* (Strobel *et al.*, 2004) y que evidenció a los hongos como una fuente promisoriosa y rica de compuestos químicos novedosos y marcó el inicio de las investigaciones químico/biológicas sobre esta clase de microorganismos.

### **2.1. HONGOS ENDÓFITOS**

Los hongos endófitos son aquellos que durante alguna etapa o durante toda su vida colonizan los tejidos internos vivos de su hospedero sin que éste muestre signos de enfermedad o daño aparente

(Stone *et al.*, 2000). La gran variedad de hongos endófitos se puede dividir en diferentes clases, de acuerdo con la planta hospedera que colonizan, siendo los siguientes los grupos principales (Zhang *et al.*, 2006):

- Hongos endófitos de la familia Clavicipitaceae.
- Hongos endófitos de dicotiledóneas.
- Hongos endófitos de líquenes.
- Hongos endófitos de briofitas y helechos.
- Hongos endófitos de plantas leñosas.
- Hongos endófitos de xilemas.
- Hongos endófitos de raíces.
- Hongos endófitos de agallas y quistes.
- Endófitos procarióticos (incluidas las bacterias y actinomicetos).

Dentro de estos organismos, los hongos endófitos de la clase de los ascomicetos han sido los mayormente estudiados (Davis *et al.*, 2003). Estos organismos principalmente colonizan de manera asintomática los tejidos aéreos vivos de las plantas (Carroll, 1986) algunos de ellos pueden colonizar raíces (Saikkonen *et al.*, 1998).

Los hongos endófitos forman con sus hospederos relaciones simbióticas complejas y aún existen un gran número de interrogantes acerca del funcionamiento de esta simbiosis; Petrini (1991) propone que existen como hongos saprófitos o bien hongos patógenos latentes, los cuales una vez que la planta entra en estado de senescencia comienzan a producir síntomas. Otros estudios han mostrado que la relación de los hongos endófitos con su planta hospedera puede variar desde la simbiosis hasta relaciones patogénicas. Una hipótesis sobre la función de estos hongos, es la ventaja proporcionada a la planta por medio de compuestos relacionados con la protección y supervivencia; por su parte la hospedera provee de nutrientes a los hongos fomentando una interacción beneficiosa para ambos organismos (Strobel *et al.*, 2004). Por lo menos para algunas plantas, las funciones ecológicas relacionadas con sus endófitos son nuevas, por ejemplo: la termotolerancia en el crecimiento vegetal de *Dichanthelium lanuginosum* en suelos geotermales

por el endófito *Curvaria* sp. (Redman *et al.*, 2001); otra función documentada tanto en pastos como en plantas leñosas es la producción de metabolitos secundarios por hongos endófitos, capaces de disminuir el ataque por herbivoría (Ganley *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2002), algunas más como antagonizar microorganismos fitopatógenos (Mejía *et al.*, 2008), aumentar el crecimiento de la planta (Ernst *et al.*, 2003), influenciar la biodiversidad dentro de la misma (Clay *et al.*, 1999), estimular la reproducción vegetativa (Clay y Schardler, 2002), y aumentar la eficiencia fotosintética (Pinto *et al.*, 2001).

Los hongos endófitos han cobrado gran importancia debido a que desde su descubrimiento en el siglo XIX (Léveillé, 1846; de Bary, 1866) han demostrado ser una de las mejores opciones en la identificación de fuentes naturales de compuestos con estructuras novedosas y una amplia gama de acciones biológicas, cuya importancia radica principalmente en áreas como la agricultura o la medicina (Gamboa, 2006), ya que se han encontrado compuestos antimicrobianos, antivirales, algunos otros con potencial para el tratamiento de enfermedades, como citotóxicos, antidiabéticos, agonistas o antagonistas de diferentes enzimas, inmunosupresores, antioxidantes, así como compuestos plaguicidas, etc. (Strobel *et al.*, 1999; Stierle *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1999; Demain, 2000; Guo *et al.*, 2000; Strobel *et al.*, 2002). Otra ventaja que presentan estos compuestos es el menor tiempo de permanencia en el medio ambiente, menor toxicidad para otros organismos, mayor especificidad y eficacia y menor problema de contaminación de suelos y aguas (Strobel *et al.*, 2004).

Estos microorganismos en realidad han sido poco estudiados. De las 300 000 especies de plantas superiores existentes en la tierra, únicamente las especies de pastos han sido investigadas ampliamente en relación con los endófitos que las habitan; si consideramos además que en cada especie de planta pueden ser encontrados más de una sola especie de estos microorganismos, entonces la oportunidad de encontrar nuevos organismos endófitos y metabolitos secundarios bioactivos es enorme (Strobel *et al.*, 2004). En relación con los hongos endófitos las oportunidades de encontrar nuevos géneros, especies y biotipos, son también muy altas. Hawksworth y Rossman estiman que existen cerca de 1.5 millón de especies diferentes, de las cuales únicamente se han descrito aproximadamente 100 000 (Hawksworth y Rossmam, 1987; Hawksworth *et al.*, 2001); por otra parte, Chapela (1994) estima que únicamente el número de hongos endófitos asciende a 1 millón de especies.

## 2.2. HONGOS ENDÓFITOS TROPICALES

Las selvas tropicales y subtropicales son los ecosistemas terrestres mayormente biodiversos, se extienden por aproximadamente 1.44 % de la superficie de la tierra resguardando cerca del 60 % de la biodiversidad terrestre (Mittermeier *et al.*, 1996). Es de esperarse que en zonas de gran endemividad de plantas existan también hongos endófitos específicos relacionados con las especies de plantas endémicas (Strobel, 2002); las selvas tropicales presentan además las tasas evolutivas más activas para la sobrevivencia, competencia alta, fuentes de nutrientes restringidas, y un pico en la presión de selección, lo que posiciona a las selvas tropicales como una prometedora fuente de nuevos metabolitos con estructuras novedosas y actividades biológicas importantes (Redell y Gordon, 2002).

Como se señaló anteriormente, la ubicuidad de los hongos es bien reconocida, sin embargo la biodiversidad de estos en diferentes zonas climáticas ha sido ampliamente discutida (Hawksworth, 1991; Lodge, 1997; Fröhlich y Hyde, 1999); tanto para hongos como para hongos endófitos las zonas tropicales se han postulado como las mayormente diversas (Bills y Polishook, 1995; Polishook, 1996; Arnol *et al.*, 2000 y 2001).

Las comunidades de hongos endófitos de grandes latitudes están caracterizados por relativamente pocas especies dentro de muchas clases de Ascomycota, mientras que los hongos endófitos tropicales pertenecen a un número pequeño de clases con un número grande de especies. Los hongos endófitos de plantas tropicales más fácilmente cultivables se encuentran en un amplio rango de hospederos, pero las comunidades dominantes están representadas por un gran número de especies raras y con un intervalo de hospederos poco claro. Las hojas de las plantas tropicales representan zonas de alta biodiversidad de especies fúngicas, muchas de ellas aun no encontradas en ningún otro bioma (Arnold *et al.*, 2007).

La biodiversidad fúngica tropical es de tal magnitud que en algunos estudios se aislaron más de 17 especies de endófitos de una sola hoja con una colonización localizada generalmente en sólo 2 mm de tejido vegetal (Lodge *et al.*, 1996, Gamboa y Bayman, 2001). Observaciones similares sugieren que existen más especies de endófitos que la totalidad de hongos hasta ahora conocidos (Chapela y Dreyfuss, 1994), y la mayoría de la diversidad de estos endófitos, aun no descubierta, se alberga en las hojas de árboles tropicales (Arnold *et al.*, 2000).

En este contexto el aislamiento, identificación y estudio de los hongos endófitos tropicales representa, no sólo una importante pieza en el conocimiento de las relaciones en estas zonas, sino también una enorme área de descubrimiento de nuevas especies y compuestos químicos.

### 3. *XYLARIALES*

#### 3.1. CARACTERÍSTICAS Y DIVISIÓN DEL ORDEN DE LOS *XYLARIALES*

Los *Xylariales* son un orden constituido por un número considerable de hongos ascomicetes unitunicados y periteciales. La delimitación de los *Xylariales* y las familias dentro del orden ha sido problemática; un gran número de clasificaciones han sido aplicadas, la mayoría de ellas basadas en las características morfológicas; se establecieron números desde tres hasta once familias dentro del orden. Las diferencias tan marcadas dentro de esta clasificación están relacionadas con el gran peso que se les otorga a ciertas características y la poca importancia que se le da a otro tipo de información (Smith *et al.*, 2003).

Sin embargo, las características aceptadas ampliamente para la unificación del orden de los *Xylariales*, son: la producción de estromas bien desarrollados, ascomas periteciales con paredes gruesas, ascas unitunicadas de ocho esporas con un aparato apical J+. Los paráfises son apicalmente libres y se desarrollan de la capa himeneal, las ascosporas, usualmente pigmentadas tienen poros o hendeduras germinativas y pueden o no estar septadas transversalmente y con una envoltura mucilaginosa (Hawksworth *et al.*, 1995). Los anamorfos de los *Xylariales* son generalmente hifomicetos con producción conidial holoblástica (Whalley, 1996).

Entre los datos más recientes de clasificación, se encuentran los aportados por Eriksson y cols. (2007) y por Kirk y cols. (2001). El primer autor acepta seis familias Amphisphaeriaceae, Clypeosphaeriaceae, Diatrypaceae, Graphostromataceae, Hyponectriaceae y Xylariaceae, mientras que el segundo autor suma además otras dos familias, Cainiaceae y Myelospermataceae. Los dos trabajos anteriores basaron la clasificación en características morfológicas; sin embargo, una parte de la clasificación de Eriksson y cols. (2007), está influenciada por datos sobre secuencia de ADN de la subunidad pequeña ribosomal (18S rDNA).

### 3.2. LA FAMILIA XYLARIACEAE

Es una larga y relativamente bien conocida familia de hongos perteneciente a la clase Pirenomicetes y el orden de los *Xylariales*. Esta familia engloba al menos 75 géneros y cerca de 800 especies (Kirk *et al.*, 2001; Eriksson, 2007).

Típicamente, las especies pertenecientes a esta familia son saprófitas, pero es común aislarlas también como endófitas y en algunas ocasiones como patógenas (Pinruan *et al.*, 2007; Sánchez Márquez *et al.*, 2007; Kodsueb *et al.*, 2008 a y b; Oses *et al.*, 2008). En general, los hongos pertenecientes a esta familia que han sido probados poseen una fuerte capacidad de degradación de lignina y celulosa (Nilsson *et al.*, 1989). Con excepción de los hongos endófitos o de las fases endofíticas de algunos taxos, la capacidad enzimática de degradación ha sido ampliamente estudiada.

La familia Xylariaceae puede ser categorizada por la posición o parte del hospedero o substrato que invade el hongo y por el tiempo de invasión en (Rogers, 2000):

- Especies que invaden hojas y tallos vivos, forman cuerpos fructíferos sobre los tejidos vivos.
- Especies que invaden tallos vivos, permaneciendo latentes hasta que el hospedero presenta algún tipo de estrés y es cuando el hongo coloniza rápida y violentamente al hospedero formando cuerpos fructíferos.
- Especies que descomponen raíces y madera viva, se mueven hacia la materia viva desde materia muerta.
- Especies que pueden formar cuerpos fructíferos en material en descomposición, pero pueden ser aislados como endófitos de hospederos vivos.
- Especies que fructifican en semillas y frutos.
- Especies que invaden estiércol.
- Especies que se asocian con hormigas y termitas.
- Especies que habitan en la capa vegetal del suelo y en suelos orgánicos
- Especies patógenas

Los hongos de la familia Xylariaceae han sido estudiados extensamente por sus propiedades bioactivas (Daferner *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1999; Isaka *et al.*, 2000; Quang *et al.*, 2006), y su química (Stadler *et al.*, 2004; Hellwig *et al.*, 2005; Stadler y Hellwig, 2005; Bitzer *et al.*, 2008), colocándolos como una fuente promisoría de compuestos bioactivos.

La familia Xylariaceae parece ser un grupo que contiene un gran número de endófitos. Su bien conocida capacidad de destruir material lignocelulósico y de causar una gran variedad de enfermedades basadas en su capacidad de degradación parecen permitir la aseveración de que el “estilo de vida” de estos hongos es el saprofitismo o parasitismo facultativos. De hecho, la familia Xylariaceae parece competir únicamente con la familia Clavicipitaceae en el número y distribución de endófitos (Rogers, 2000).

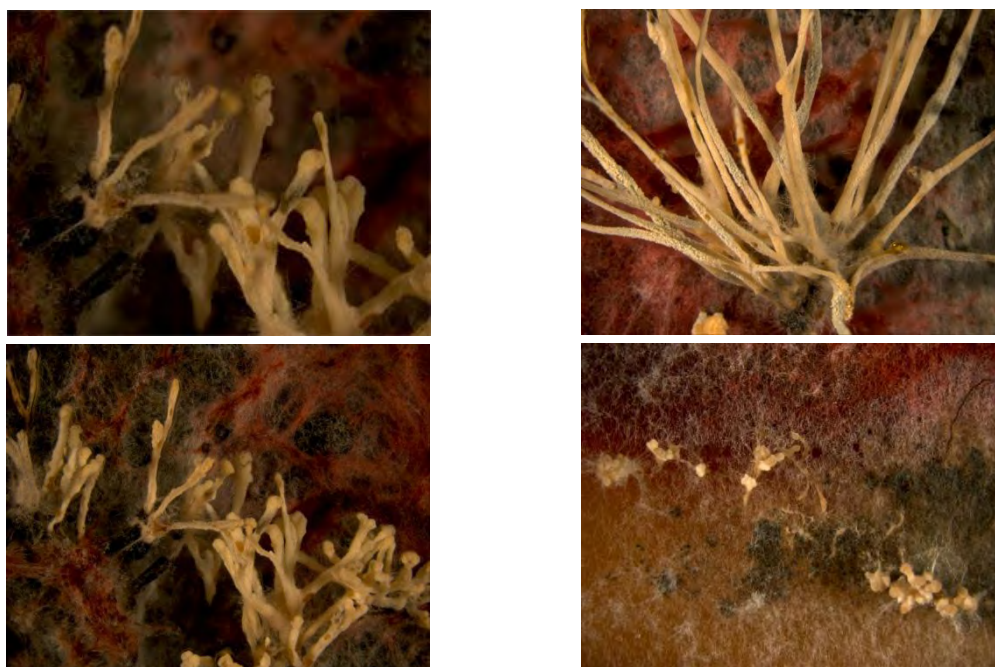
Rogers (2000) explica que el éxito de la familia Xylariaceae como endófitos parece estar relacionado con su hipótesis del “sneak”. Patógenos como *Hypoxylon fragiforme* aparentemente, invaden los tejidos vivos del hospedero sin penetrar o moverse a tejidos profundos (Chapela *et al.*, 1994); esta capacidad para “moverse” a través del hospedero sin la presencia de síntomas iniciales, parece estar ampliamente distribuido dentro de los Xylariaceae. El parásito puede invadir al hospedero y permanecer quiescente hasta que exista un cambio en el estado del hospedero permitiendo entonces la degradación de la madera y corteza, gracias a la activación de la maquinaria enzimática de degradación de lignina y celulosa. Esta capacidad de pasar a través de las defensas del hospedero, permite que muchos hongos Xylariaceos existan como endófitos mientras la señal de degradación no ocurra. Para Rogers, los endófitos probablemente persisten primariamente en sustratos predecibles donde el inóculo es colocado, es decir, se comportarán como endófitos dependiendo del sustrato, como patógenos latentes o bien saprófitos.

Dentro de la familia Xylariaceae se encuentra el género *Xylaria*, que es el primer hongo descrito perteneciente a la familia (Martin, 1970). Es uno de los taxones endófitos más comunes en los trópicos; mientras que en las zonas templadas es también común pero como hongos descomponedores de madera y no como endófitos (Rodríguez y Samuels, 1990; Rodríguez, 1994; Petrini *et al.*, 1995).

Una de las primeras hipótesis sobre el papel de los Xylariales en la ecología propone que estos hongos permanecen quiescentes hasta que la planta entra en estado de senescencia, donde el hongo degrada la celulosa y lignina (Petrini *et al.*, 1995; Walley, 1996), lo que les da una ventaja



sobre los hongos saprofiticos, teniendo el tejido disponible antes de que comience a descomponerse. Algunas especies se comportan como saprofiticas, en ocasiones, de ligera a fuertemente parasíticas para plantas leñosas, donde forman estromas elongados y erectos, también encontrados en aserrín, o suelo (Figura 1.) (Lee *et al.*, 2000). Recientemente se ha encontrado evidencia en la cual se muestra que lo anterior no es necesariamente cierto para todos los hongos pertenecientes al género donde algunos pueden existir únicamente como endófitos (Davis *et al.*, 2003), sin brindarle beneficios aparentes a la planta hospedera.



**Figura 1.** Estromas de *Xylaria* sp. formadas en interacción antagónica con *Fusarium* sp.

Diversos hongos pertenecientes al género *Xylaria* han sido encontrados en coníferas, monocotiledóneas, dicotiledóneas, helechos y licofitas (Brunner y Petrini, 1992), además de en tres divisiones de plantas, en dos continentes diferentes, mostrando así el rango de plantas que son sus hospederas (Davis *et al.*, 2003). El papel ecológico del género *Xylaria* no está bien determinado, estudios empíricos muestran mayores características relacionadas con el mutualismo. En estudios con *Schefflera* (Araliaceae) se encontraron diferentes especies de *Xylaria* tanto en hojas vivas como en descomposición (Laessle y Lodge, 1994), al igual que en hojas vivas de *Manilkara* (Sapotaceae) las especies encontradas de *Xylaria* son comparables con las encontradas en hojas descompuestas de la misma planta (Bayman *et al.*, 1998).

### **3.3. METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR EL GÉNERO *XYLARIA*.**

Existe una amplia variedad de metabolitos secundarios aislados de los hongos del género *Xylaria*, gran cantidad de ellos con actividad biológica, por ejemplo, compuestos con actividad antifúngica (Boonphong *et al.*, 2001), citotóxicos (Abate *et al.*, 1996; Espada *et al.*, 1997), inhibidores de la acetil colinesterasa (Lin *et al.*, 2001), entre otros. En el Cuadro 1 se muestran ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados del género *Xylaria*, así como su actividad biológica.

## **4. AGRICULTURA EN MÉXICO**

La agricultura representa la actividad humana más fuertemente ligada al medio ambiente y a la supervivencia del ser humano; por un lado debe atender la gran demanda de alimentos debido a la explosión demográfica y la inequidad social y por otro lado está fuertemente relacionada con el deterioro, la contaminación y el agotamiento de recursos naturales.

En México la tierra para agricultura corresponde aproximadamente a 23 millones de hectáreas, lo cual equivale a cerca del 12 % de la superficie total del país. De 1995 a 2006 la aportación de trabajo agrícola al producto interno bruto pasó de un 5 % a un 2.83 % (INEGI, Agosto de 2010), lo que prueba que la aportación de esta actividad no es equivalente a la porción de la población que participa en ella (Albert, 2005).

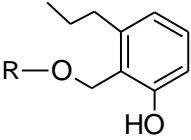
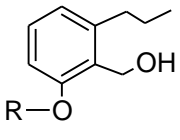
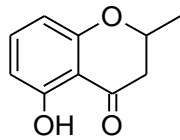
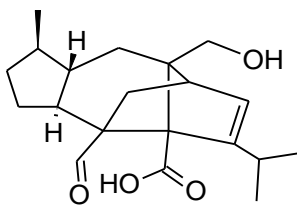
La agricultura en México está sujeta a una gran cantidad de problemas, sin tomar en cuenta los conflictos de tipo económico-político; el primero de ellos sería, como lo expresó Gabriel Quadri (2003), el que México ocupa uno de los primeros lugares en el mundo en deforestación, asociada principalmente con actividades agrícolas, destruyéndose entre 400 mil y un millón de hectáreas de ecosistemas forestales anualmente. Otro grave problema es el uso y el desperdicio del agua, que en nuestro país representa el 80 % del consumo total de agua y donde 2/3 partes son desperdiciadas. El tercer problema es el uso indiscriminado e irracional de plaguicidas y fertilizantes (Solleiro, 2004), lo cual ha generado consecuencias graves al medio ambiente, contaminado los mantos acuíferos, el suelo y el aire (Gavrilescu, 2005; Arias *et al.*, 2008).

#### **4.1 ECOLOGÍA QUÍMICA Y AGRICULTURA**

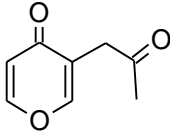
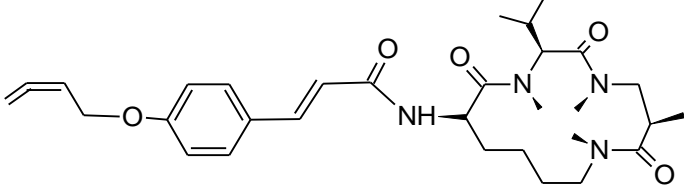
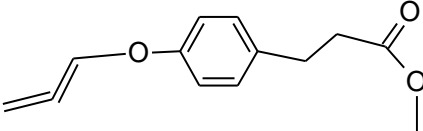
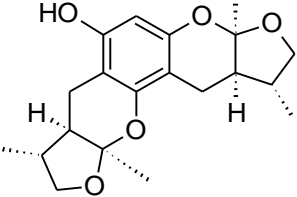
A pesar de que muchos estímulos son inadvertidos para el hombre; en la naturaleza existen una serie de complejos estímulos químicos vitales para plantas y animales. Estos estímulos han sido señalados como responsables de aspectos esenciales como el crecimiento, la salud, el comportamiento (atracción, repulsión) o la biología entre individuos de la misma o diferente especie. Estas interacciones, tan importantes en los ecosistemas naturales, han cobrado importancia hoy en día en el entendimiento y manejo de la agricultura.

La ecología química como la ciencia encargada del estudio de las interacciones producidas por los compuestos químicos; su acumulación, transformación, dispersión y permanencia en los ecosistemas, es una herramienta importante para el completo entendimiento de las implicaciones de los compuestos químicos en las relaciones ecológicas y por lo tanto su posible aplicación en el mejoramiento y sustentabilidad de las actividades agrícolas. Esta ciencia puede ser vista como un instrumento capaz de brindar no sólo importantes conocimientos científicos, sino también puede ser el recurso mediante el cual se aporte un verdadero desarrollo y bienestar social, siempre que los conocimientos básicos sean llevados a su aplicación y sean monitoreados a lo largo de aplicación en campo, todo ello será posible gracias a las disciplinas que la ecología química esgrime y la variedad de técnicas y métodos que utiliza.

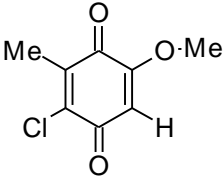
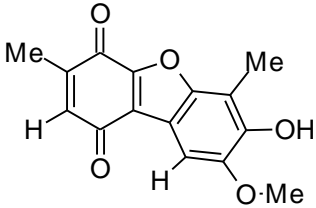
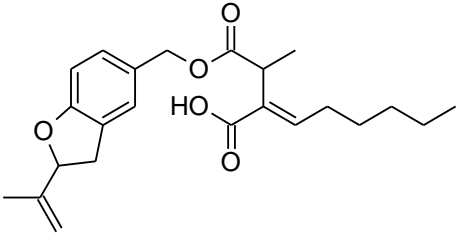
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Xylaria* con actividad biológica.

Nombre del compuesto	Actividad biológica	Estructura química	Cepa de <i>Xylaria</i> productora	Referencia
Xylarosida A	Antifungicos moderados vs <i>Candida albicans</i>	 <p>R=Glucosa (1)</p>	<i>Xylaria</i> sp. PSU-D14	Pongcharoen <i>et al.</i> , 2008
Xylarosida B		 <p>R=Glucosa (2)</p>		
2,3-Dihidro-5-hidroxi-2-metil-4H-1-benzopiran-4-ona		 <p>(3)</p>		
Sordaricina		 <p>(4)</p>		

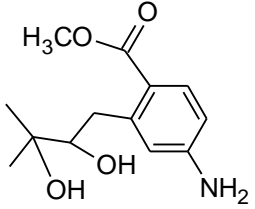
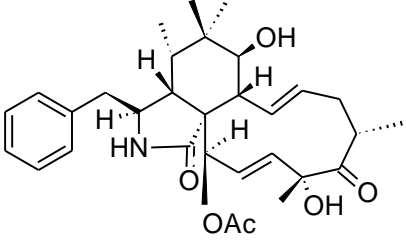
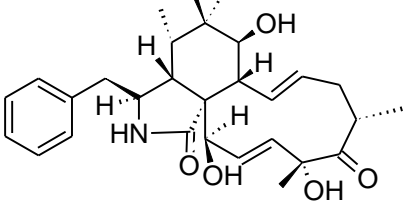
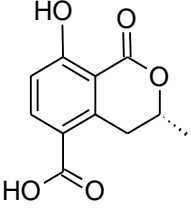
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Xylaria* con actividad biológica (Continuación).

Nombre del compuesto	Actividad biológica	Estructura química	Cepa de <i>Xylaria</i> productora	Referencia
Ácido xylárico, L-741,49 (Ácido 3-acético- $\gamma$ -pirona)	Inhibidor de la enzima convertidora de interleucina-1 $\beta$	 <p style="text-align: center;"><b>(5)</b></p>	<i>Xylaria</i> sp. MF 5809	Salvatore <i>et al.</i> , 1994
Xyloalenolide A	Citotóxico en células KB y KBv200. Actividad fungiestática vs <i>Cladosporium cladosporioides</i> . Actividad antagonista de canales L-calcio e inhibidor de la acetil colinesterasa	 <p style="text-align: center;"><b>(6)</b></p>	<i>Xylaria</i> sp. Cepa # 2508	Lin <i>et al.</i> , 2001 Xiaobo <i>et al.</i> , 2006 Feng <i>et al.</i> , 2009
Eucalipteno	Actividad antifúngica vs <i>Cladosporium cladosporioides</i>	 <p style="text-align: center;"><b>(7)</b></p>	<i>Xylaria</i> sp. Cepa # 2508	Lin <i>et al.</i> , 2001
Xylocetal B	Antioxidante	 <p style="text-align: center;"><b>(8)</b></p>	<i>Xylaria</i> sp. Cepa # 2508	Lin <i>et al.</i> , 2001 Lu <i>et al.</i> , 2010

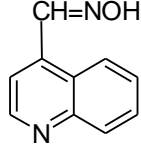
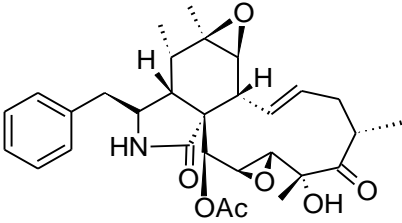
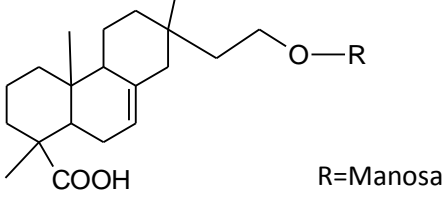
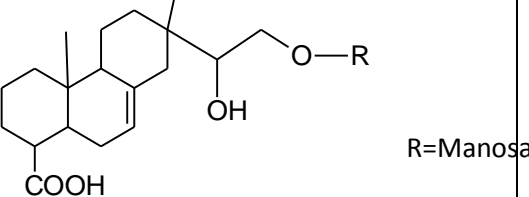
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Xylaria* con actividad biológica (Continuación).

Nombre del compuesto	Actividad biológica	Estructura química	Cepa ( <i>Xylaria</i> ) productora	Referencia
2-Cloro-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	Antimalárico y citotóxico vs células Vero	 <p style="text-align: center;"><b>(9)</b></p>	<i>Xylaria</i> sp. PBR-30	Tansuwan <i>et al.</i> , 2007
Xylariaquinona A		 <p style="text-align: center;"><b>(10)</b></p>		
Xyloéster A	Antimicrobiano vs <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , y <i>Sarcina lutea</i>	 <p style="text-align: center;"><b>(11)</b></p>	<i>Xylaria</i> sp. Cepa # 2508	Fang <i>et al.</i> , 2008

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Xylaria* con actividad biológica (Continuación).

Nombre del compuesto	Actividad biológica	Estructura química	Cepa ( <i>Xylaria</i> ) productora	Referencia				
Metil aminobenzoato	Citotóxico vs células Vero	 <p style="text-align: center;">(12)</p>	<i>Xylaria</i> sp. BCC 9653	Pongcharoen <i>et al.</i> , 2007				
Citocalasina D	Citotóxico vs células Vero	 <p style="text-align: center;">(13)</p>			<i>Xylaria</i> sp. BCC 9653	Pongcharoen <i>et al.</i> , 2007		
Desacetilcitocalasina D	Citotóxico vs células Vero	 <p style="text-align: center;">(14)</p>					<i>Xylaria</i> sp. BCC 9653	Pongcharoen <i>et al.</i> , 2007
5-carboximeleina	Citotóxico vs células Vero y antimicobacteriano débil v.s <i>Micobacterium tuberculosis</i>	 <p style="text-align: center;">(15)</p>						

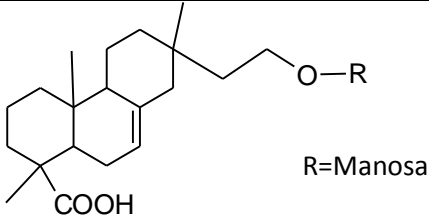
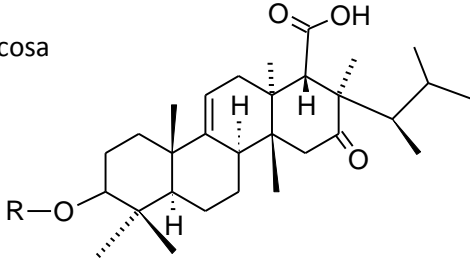
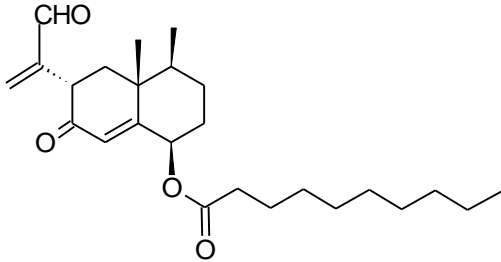
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Xylaria* con actividad biológica (Continuación).

Nombre del compuesto	Actividad biológica	Estructura química	Cepa ( <i>Xylaria</i> ) productora	Referencia
4-quinolinecarboxaldehído-oxima	Citotóxico vs Células Vero	 <p>(16)</p>	<i>Xylaria</i> sp. BCC 9653	Pongcharoen et al., 2007
19,20-Epoxicitocalacina Q	Antagonista del receptor quemocina CCR5	 <p>(17)</p>	<i>Xylaria hypoxylon</i> ; <i>Xylaria Obata</i>	Espada et al., 1997; Dagne et al.,; Jayasuriya et al., 2004
Ácido 16- $\alpha$ -D-manopiranosiloxyisopimar-7-en-19-oico	Citotóxico (Inductor de apoptosis) en células promielocíticas, myelogenosas y carcinoma cervical	 <p>(18)</p> <p>R=Manosa</p>	<i>Xylaria polymorpha</i>	Shiono et al., 2009
Ácido 15-hidroxi-16- $\alpha$ -D-manopiranosiloxyisopimar-7-en-19-oico	Citotóxico (Inductor de apoptosis) en células promielocíticas, mieloides y carcinoma cervical	 <p>(19)</p> <p>R=Manosa</p>		

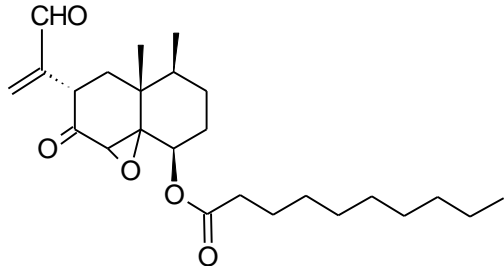
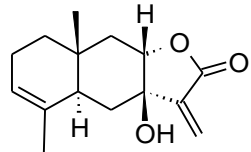
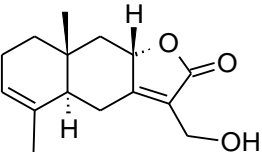
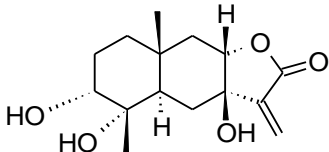
Antecedentes



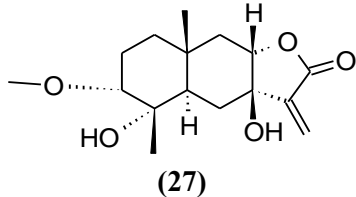
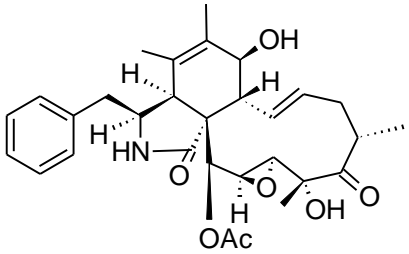
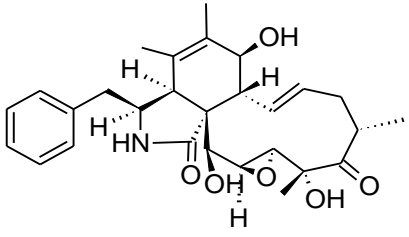
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Xylaria* con actividad biológica (Continuación).

Nombre del compuesto	Actividad biológica	Estructura química	Cepa ( <i>Xylaria</i> ) productora	Referencia
Ácido 16- $\alpha$ -D-glucopiranosiloxiisopimar-7-en-19-oico	Citotóxico (Inductor de apoptosis) en células promielocíticas, mielogenosas y carcinoma cervical	 <p style="text-align: center;">(20)</p>	<i>Xylaria polymorpha</i>	Shiono <i>et al.</i> , 2009
Colocosida A	Antibacteriano v.s <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	<p>R=Glucosa</p>  <p style="text-align: center;">(21)</p>	<i>Xylaria</i> sp.	Deyrup <i>et al.</i> , 2007
Xylarenals A	Ligando selectivo del receptor NPY Y5 (antiobesidad)	 <p style="text-align: center;">(22)</p>	<i>Xylaria persicaria</i>	Smith <i>et al.</i> , 2002

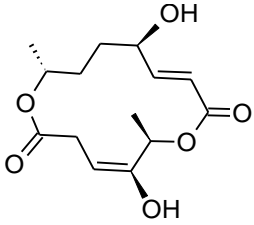
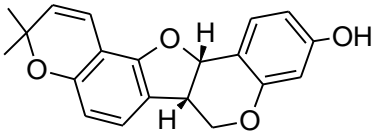
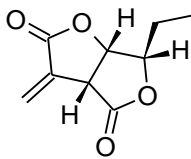
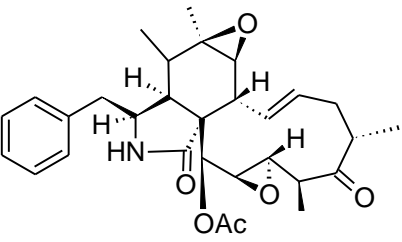
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Xylaria* con actividad biológica (Continuación).

Nombre del compuesto	Actividad biológica	Estructura química	Cepa ( <i>Xylaria</i> ) productora	Referencia
Xylarenals B	Ligando selectivo del receptor NPY Y5 (antiobesidad)	 <p style="text-align: center;">(23)</p>	<i>Xylaria persicaria</i>	Smith <i>et al.</i> , 2002
7 $\beta$ -Hidroxi-3,11(13)-eudesmadien-12,8-olida	Actividad antiplasmódica ( <i>Plasmodium falciparum</i> ), citotóxica v.s células vero y anticancerígeno	 <p style="text-align: center;">(24)</p>	<i>Xylaria ianthinovelutina</i>	Pittayakhajonwut <i>et al.</i> , 2009
13-Hidroxi-3,7(11)-eudesmadien-12,8-olida	Citotóxico y antiplasmódico	 <p style="text-align: center;">(25)</p>		
3 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Trihidroxi-11(13)-eudesmen-12,8-olida	Citotóxico (varias líneas celulares) y antiplasmódico	 <p style="text-align: center;">(26)</p>		

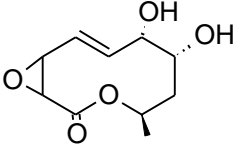
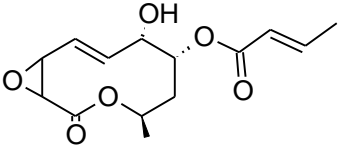
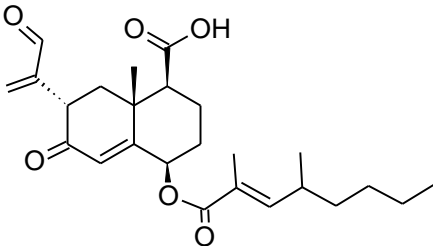
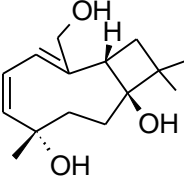
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Xylaria* con actividad biológica (Continuación).

Nombre del compuesto	Actividad biológica	Estructura química	Cepa ( <i>Xylaria</i> ) productora	Referencia
4 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Dihidroxi-3 $\alpha$ -metoxi-11(13)-eudesmen-12,8-olida	Citotóxico (varias líneas celulares) y antiplasmodico	 <p style="text-align: center;">(27)</p>	<i>Xylaria ianthinovelutina</i>	Pittayakhajonwut <i>et al.</i> , 2009
19,20-Epoxicitocalasina C	Citotóxico (varias líneas celulares)	 <p style="text-align: center;">(28)</p>	<i>Xylaria obovata</i> ; <i>Xylaria hypoxylon</i>	Abate <i>et al.</i> , 1997 y Espada <i>et al.</i> , 1997
Deacetil-19,20-epoxi-citocalasina C	Citotóxico (varias líneas celulares)	 <p style="text-align: center;">(29)</p>		

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Xylaria* con actividad biológica (Continuación).

Nombre del compuesto	Actividad biológica	Estructura química	Cepa ( <i>Xylaria</i> ) productora	Referencia
Clonostacidiol	Antihelmíntico	 <p>(30)</p>	<i>Xylaria obovata</i>	Abate <i>et al.</i> , 1997
Faseolinona	Fitotóxico	 <p>(31)</p>		
Xylobovida	Fitotóxico	 <p>(32)</p>		
Xylobovatina	Citotóxico (varias líneas celulares)	 <p>(33)</p>		

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Xylaria* con actividad biológica (Continuación).

Nombre del compuesto	Actividad biológica	Estructura química	Cepa ( <i>Xylaria</i> ) productora	Referencia
Multiplolida A	Antifúngico	 <p>(34)</p>	<i>Xylaria</i> Multiplex BCC 1111	Boonphong <i>et al.</i> , 2001
Multiplolida B	Antifúngico	 <p>(35)</p>		
Ácido intégrico	Inhibidor de la integrasa HIV-1	 <p>(36)</p>	<i>Xylaria</i> sp.	Singh <i>et al.</i> , 1999
Punctaporonina B	Antimicrobiano	 <p>(37)</p>	<i>Poronia punctata</i> *	Anderson <i>et al.</i> , 1984

\*Nota: *Poronia punctata* pertenece a la familia de los Xylariales.

### **III. HIPÓTESIS**

Los hongos endófitos de plantas tropicales al igual que el ecosistema del que son aislados forman comunidades de gran biodiversidad que interactúan estrechamente entre sí; por ello es probable que los compuestos que biosintetizan los hongos endófitos constituyan una fuente novedosa de metabolitos secundarios que posean actividad biológica.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial antagónico del hongo endófito *Xylaria* sp. sobre diferentes especies de microorganismos endófitos y fitopatógenos, así como estudiar el potencial aleloquímico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, sobre el crecimiento de microorganismos y diferentes plantas de prueba, con el fin de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones que se establecen entre las plantas hospederas y los hongos endófitos. Asimismo, contribuir al posible desarrollo de agroquímicos alternativos para el control de plagas y enfermedades.

#### 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer el potencial antagónico del hongo endófito *Xylaria* sp. mediante bioensayos de antagonismo directo utilizando dos hongos endófitos: los aislamientos C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> y C<sub>4</sub>E<sub>13</sub>; dos hongos fitopatógenos aislados de *Callicarpa acuminata*: *Pestalotiopsis* sp. y aislamiento C<sub>5</sub>F<sub>3</sub> y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora capsici* (fungoide).
- Realizar análisis microscópicos de los micelios en las zonas donde se establece una relación de antagonismo, con la finalidad de establecer si existen cambios morfológicos.
- Establecer las condiciones óptimas de crecimiento *in vitro* del hongo endófito *Xylaria* sp., mediante la realización de cultivos en pequeña escala (1 L), utilizando caldo papa dextrosa como medio de cultivo incubando en condiciones de agitación y estático.
- Obtener los extractos orgánicos a partir del medio de cultivo (partición) y del micelio (maceración) del endófito *Xylaria* sp.
- Evaluar el potencial aleloquímico de los extractos orgánicos del hongo *Xylaria* sp. sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos: *F. oxysporum*,

## Objetivos

---

*A. solani*, *Rhizoctonia* sp. y *Pestalotiopsis* sp. y sobre la germinación, la longitud de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las semillas de: *Amaranthus hypochondriacus*, *Lycopersicon esculentum*, *Lactuca sativa* e, *Ipomea tricolor*.

- Realizar cultivos en mediana escala (15 L) en condiciones estáticas y de agitación; preparar los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio. Verificar la actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos orgánicos resultantes.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos orgánicos activos del medio de cultivo y micelio de los cultivos en mediana escala, mediante un fraccionamiento químico biodirigido utilizando diversos procedimientos cromatográficos y monitoreando la actividad biológica por el método de dilución en agar.
- Determinar cuantitativamente el potencial aleloquímico de los metabolitos secundarios mayoritarios aislados de las fracciones activas, sobre el crecimiento de los hongos y sobre la germinación y la longitud de la raíz de las plantas blanco.
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios bioactivos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X.



## V. PARTE EXPERIMENTAL

### 1. MATERIAL FÚNGICO

El hongo endófito *Xylaria* sp. fue aislado en 2008 a partir de hojas sanas de *Callicarpa acuminata* Humb *et al.*, (Verbenaceae) colectadas en la reserva ecológica „El Edén“ en Quintana Roo. La identidad de este microorganismo fue establecida con base a sus características morfológicas macro y microscópicas por la M. en C. Aurora Saucedo García, del Instituto de Ecología, UNAM.

### 2. ORGANISMOS DE PRUEBA

#### 2.1. MICROORGANISMOS

Como microorganismos de prueba se utilizaron cinco hongos fitopatógenos tres de ellos con importancia agrícola: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. y *Alternaria solani* (Eumycota), y dos hongos aislados a partir de hojas de *C. acuminata*: *Pestalotiopsis* sp. y el aislamiento C<sub>5</sub>F<sub>3</sub>, y un fungoide fitopatógeno de importancia agrícola: *Phytophthora capsici* (Oomycota). Además, se utilizaron dos hongos endófitos aislados también de *C. acuminata*: los aislamientos C<sub>4</sub>E<sub>13</sub> y C<sub>5</sub>E<sub>12</sub>. Los microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola fueron donados por la Dra. Olga Gómez, del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Edo. de México.

#### 2.2. PLANTAS

Se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) [amaranto], *Lactuca sativa* (Asteraceae) [lechuga], *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) [jitomate] e *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). Las semillas de amaranto se obtuvieron en el Mercado de Tulyehualco, México, D.F; las semillas de lechuga fueron adquiridas en la casa comercial “Cosechando natural”; las de jitomate se compraron en “Semillas Berentsen”,

Celaya, Guanajuato, México y las de *I. tricolor* fueron colectadas e identificadas en Huichapan, Hidalgo por la Dra. Ana Luisa Anaya, del Instituto de Ecología, UNAM.

### **3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LOS BIOENSAYOS Y EN LA DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DE *XYLARIA* SP.**

#### **3.1 PAPA-DEXTROSA-AGAR (PDA)**

200 g de papa fresca previamente pelada y cortada en cubos, se hirvieron durante 20 minutos. La decocción resultante de papa se filtró a través de gasa y se le agregaron 20 g de dextrosa y 15 g de agar, por último, se añadió agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL (Ulloa y Hanlin, 1978).

#### **3.2. CALDO-PAPA-DEXTROSA (CPA)**

El caldo-papa-dextrosa se preparó siguiendo la metodología indicada para el medio papa-dextrosa-agar con la diferencia de que no se le adicionó agar.

### **4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

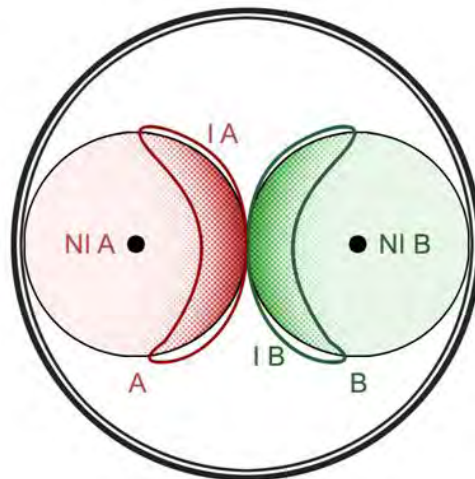
#### **4.1. BIOENSAYOS DE ANTAGONISMO**

Los bioensayos de antagonismo se realizaron entre el hongo endófito *Xylaria* sp. y todos los microorganismos de prueba indicados en el inciso 2.1.

Los microorganismos se inocularon de acuerdo a sus velocidades de crecimiento en cajas de Petri estériles de 10 cm de diámetro que contenían 20 mL de PDA, preparado con papas frescas. El hongo endófito *Xylaria* sp. crece lentamente (Figura 2; Resultados y Discusión) por lo que se sembró 5 días antes que sus competidores fitopatógenos (microorganismos de crecimiento rápido): *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *Alternaria solani* (Eumycota), *Pestalotiopsis* sp., *Phytophthora capsici* y el aislamiento C<sub>5</sub>F<sub>3</sub>. Los competidores endófitos

C<sub>4</sub>E<sub>13</sub> y C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> son hongos de crecimiento muy lento por lo que se inocularon 7 días antes que el endófito *Xylaria* sp. De manera adicional, se realizó un bioensayo de antagonismo entre *Xylaria* sp. y los hongos endófitos C<sub>4</sub>E<sub>13</sub> y C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> inoculándolos al mismo tiempo. Cada microorganismo competidor se sembró utilizando inóculos de 5 mm de diámetro, de los micelios previamente incubados en PDA por 10 días.

Los inóculos se colocaron equidistantes ocupando sólo un extremo de la caja Petri (Figura 2) y se incubaron a 28 °C con fotoperiodo luz-oscuridad naturales (12:12 hrs). Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. El procedimiento experimental se efectuó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar.



**Figura 2.** Bioensayo de antagonismo en caja de Petri entre el hongo endófito *Xylaria* sp. (A) y los diferentes microorganismos competidores (B). NI B zona de no interacción de B, NI A zona de no interacción de A, IA zona de interacción de A, IB zona de interacción de B (Murià, 2010).

Los resultados de crecimiento e interacción macroscópica y microscópica entre los microorganismos competidores, se registraron e interpretaron después de 7 días de haber sido sembrados los microorganismos fitopatógenos, después de 11 días de haber inoculado al mismo tiempo a *Xylaria* sp. y a sus competidores endófitos y después de 6 días de haber sembrado *Xylaria* sp. en los antagonismos con microorganismos endófitos incubados previamente por un período de 7 días.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ( $\alpha = 0.05$ ) y una prueba de comparación de medias Tukey HSD, utilizando el software estadístico STATISTICA versión 6.0 (Shearer, 1995; Yuen *et al.*, 1999; Saucedo, 2006; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

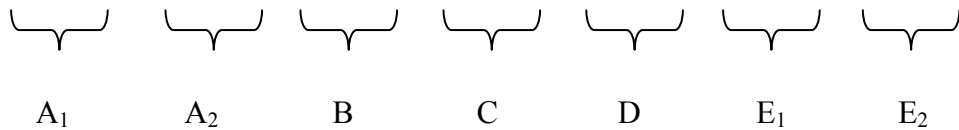
Los resultados de crecimiento radial se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento de cada uno de los microorganismos de prueba, comparando el crecimiento con el presentado en los controles de crecimiento de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\left( \frac{I - NI}{NI} \right) \times 100$$

I y NI son los radios de *Xylaria* sp. y de los diferentes microorganismos competidores en la zona de interacción (I) y en la de no interacción (NI) [Figura 3].

Para determinar el potencial antagónico que presenta el hongo endófito *Xylaria* sp. sobre sus competidores se calculó el índice de antagonismo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\mathbf{IA} = [(n) (-4)] + [(n) (-3)] + [(n) (0)] + [(n) (1)] + [(n) (2)] + [(n) (3)] + [(n) (4)]$$



Las categorías A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C, D, E<sub>1</sub> ó E<sub>2</sub> se asignan de acuerdo con las observaciones macroscópicas obtenidas al término de los bioensayos de antagonismo, a cada una de ellas se le atribuyó un valor numérico de acuerdo con el modificado de interpretación del tipo de interacción descrito por Yuen y colaboradores (1999) [Cuadro 2]; n, corresponde al número de veces que el hongo presentó la categoría de antagonismo correspondiente.

**Cuadro 2.** Tipo de interacciones entre microorganismos, categorías y valores numéricos asignados (modificado de Yuen *et al.*, 1999).

<b>Categorías</b>	<b>Tipos de interacción</b>	<b>Puntos</b>
<b>A<sub>1</sub></b>	La especie B inhibe a distancia a la especie A.	-4
<b>A<sub>2</sub></b>	La especie B entra en contacto con la especie A reduciendo el crecimiento de A.	-3
<b>B</b>	Las hifas de A se mezclan con las del microorganismo B, sin que exista reducción en el crecimiento de ninguna.	0
<b>C</b>	La especie A crece en contacto con B y cesa el crecimiento de ambas especies.	1
<b>D</b>	La especie B acumula pigmento al estar en contacto con A.	2
<b>E<sub>1</sub></b>	La especie A entra en contacto con la especie B reduciendo el crecimiento de B.	3
<b>E<sub>2</sub></b>	La especie A inhibe a distancia a la especie B.	4

#### **4.1.1. ANÁLISIS MICROSCÓPICOS DE LAS HIFAS EN LA ZONA DE INTERACCIÓN ANTAGÓNICA (I)**

Para observar la posible interacción entre las hifas de los hongos en los bioensayos de antagonismo directo, se realizó un análisis microscópico de los micelios en las zonas más cercanas a la interacción antagónica (IA e IB) [Figura 3]. Las preparaciones se obtuvieron tomando pequeñas muestras de los micelios y extendiéndolas con ayuda de una aguja de disección y de un microscopio estereoscópico dentro de una gota de rojo congo sobre un portaobjetos. Posteriormente, se realizaron observaciones en un microscopio óptico a 100x y se registraron las medidas del grosor de las hifas, cambios morfológicos y la formación y diámetro de vacuolas; utilizando el programa AxioVision (v 4.6.3.0) y se compararon con las obtenidas a partir de los micelios de los controles de crecimiento de cada microorganismo (colonias puras).

## 4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico de los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala, fracciones primarias y compuesto puro, se realizó mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos con importancia económica: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *Alternaria solani* y *Phytophthora capsici* utilizando el método de dilución en agar.

Los ensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro; las muestras a evaluar se disolvieron en metanol (~100-400 µL) y se prepararon disoluciones en PDA al 1%. Los ensayos preliminares se realizaron utilizando los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio obtenidos a partir de los cultivos en pequeña escala utilizando una concentración de 250 µg/mL. Los extractos obtenidos de los cultivos en mediana escala en condiciones estáticas y de agitación, se evaluaron utilizando concentraciones de 100, 200 y 300 µg/mL para el hongo *Rhizoctonia* sp. y el fungoide *P. capsici* y de 125, 250 y 500 µg/mL para los hongos *A. solani* y *F. oxysporum*. Las fracciones primarias se evaluaron a 250 µg/mL y la punctaporonina B (37) pura se evaluó a 100 µg/mL.

Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las cajas se incubaron de 3 a 5 días, dependiendo del microorganismo de prueba, a 28 °C con fotoperiodo luz-oscuridad (12:12 h) con luz fluorescente. Como controles negativos se utilizaron PDA y PDA-metanol (~100-400 µL). Como control positivo se utilizó el fungicida comercial Prozycar® 50 P.H (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato) [20, 50 y 150 µg/mL].

Al final de los bioensayos se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro del micelio de cada repetición y de cada especie de hongo de prueba. Los promedios se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ( $\alpha = 0.05$ ) y una prueba de contrastes de Tukey HSD (utilizando el programa STATISTICA versión 6.0). Los valores de concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) se determinaron mediante el programa de análisis de probabilidad de Finney (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2010).

### 4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FITOTÓXICA

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio, de las fracciones primarias y de los compuestos puros, se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación, la longitud de la raíz y la respiración de cuatro especies de plantas de prueba: *A. hypochondriacus*, *L. esculentum*, *I. tricolor* y *L. sativa*, utilizando el método de dilución en agar (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2010). Estas especies representan a los dos grandes grupos de plantas superiores: las dicotiledóneas y monocotiledóneas.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Cada una de las muestras a evaluar se disolvieron en metanol (~100-400 µL) y se prepararon disoluciones en agar al 1%; los extractos en pequeña escala y fracciones cromatográficas se evaluaron utilizando una concentración de 100 µg/mL. Los extractos derivados de los cultivos en mediana escala se evaluaron utilizando cuatro diferentes concentraciones: 50, 100, 150 y 200 µg/mL.

Para los extractos en pequeña escala y fracciones cromatográficas se evaluó únicamente el efecto fitotóxico sobre la germinación y la longitud de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus*, *L. esculentum* e *I. tricolor*. Para ello, se sembraron 10 semillas por caja de Petri de cada una de las especies de prueba. Para los extractos en mediana escala se utilizaron las plantas de *A. hypochondriacus*, *L. esculentum* y *L. sativa* y se determinó además, el efecto sobre la respiración, germinando 30 semillas por caja. En todos los casos, las cajas se incubaron en la oscuridad a 27 °C.

El efecto fitotóxico se registró después de 24 hrs para las semillas de *A. hypochondriacus*, 36 hrs. para las de *I. tricolor* y *L. sativa* y de 48 hrs. para las de *L. esculentum*. Paralelamente, se evaluaron controles positivos y negativos. Como control positivo se usó RIVAL<sup>®</sup> (Glifosato: sal monoamónica de N-(fosfonometil) glicina) a 100, 300 y 500 µg/mL para semillas de *L. esculentum*, a 100, 250 y 500 µg/mL para semillas de *L. sativa* y a 250, 500 y 750 µg/mL para *A. hypochondriacus* y como control negativo agar 1% y agar 1%-metanol (~100-400 µL). Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al

azar con cuatro repeticiones. Una vez transcurrido el periodo de incubación se determinó en un inicio, el efecto de cada uno de los tratamientos sobre la respiración mediante el registro del consumo de oxígeno de las plántulas, utilizando un electrodo de Clark tipo O<sub>2</sub> conectado a un oxímetro YSI® modelo 5300 a 27°C. Las plántulas de cada una de las cajas de Petri se transfirieron a un tubo de vidrio, adicionando 5 mL de agua desionizada. El consumo de oxígeno se registró cada 5 segundos durante 3 minutos (King-Díaz, *et al.*, 2005). El análisis mediante regresión lineal simple de cada una de las curvas permitió determinar cuantitativamente el oxígeno consumido por las plántulas de cada una de las semillas de prueba. Posteriormente, se determinó la longitud de las radículas. Los resultados del consumo de oxígeno, del crecimiento de la raíz, y de la germinación se analizaron mediante un ANOVA de una vía, modelo I ( $\alpha=0.05$ ) y una prueba de contrastes de Tukey HSD (utilizando el programa STATISTICA versión 6.0) [Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2010]. Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron mediante el programa de análisis de probabilidad de Finney.

## **5. OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS DEL HONGO ENDÓFITO *XYLARIA* SP.**

### **5.1. CULTIVOS EN PEQUEÑA ESCALA**

Los cultivos en pequeña escala (5 L) se llevaron a cabo en condiciones estáticas y de agitación, utilizando como medio de cultivo Caldo-Papa-Dextrosa preparado con papas frescas (CPD), incubación por un período de 30 días, a temperatura de 28 °C y con fotoperíodo de luz artificial, oscuridad 12:12 hrs.

Los cultivos en condiciones de agitación se realizaron en 10 matraces Erlenmeyer de 1000 mL conteniendo 500 mL de medio de cultivo. Los matraces se incubaron utilizando un agitador orbital (Shaker orbital, Lab Line modelo 1250). Para realizar los cultivos en condiciones estáticas se utilizaron 5 matraces Fernbach de 2800 mL con 1000 mL de medio de cultivo. El inóculo consistió en cinco cortes circulares del micelio del hongo *Xylaria* sp. cultivado en PDA durante 8 días, realizados con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro. Concluido el proceso de incubación, se realizaron preparaciones microscópicas



para verificar la pureza de los cultivos. Posteriormente, se separó el medio de cultivo del micelio, mediante una filtración utilizando gasa (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2010).

## **5.2. CULTIVOS EN MEDIANA ESCALA**

Para la obtención del cultivo a mediana escala (15 L) en condiciones estáticas se utilizaron 3 garrafones de vidrio con capacidad para 18 L, se colocaron 5 litros de CPD a cada uno, los garrafones se taparon con un tapón de gasa y se esterilizaron en autoclave. En condiciones estériles, cada garrafón se inoculó con 10 cortes del micelio del endófito *Xylaria* sp. realizados con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro, sobre el micelio de *Xylaria* sp. previamente incubado en PDA por 8 días. Los garrafones se mantuvieron estáticos a una temperatura de 28°C durante un periodo de 60 días, con fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 hrs.

Para la obtención de los cultivos en mediana escala (15 L) con agitación se utilizaron 3 matraces Erlenmeyer de 6 L de capacidad. A cada uno se le adicionó 5 L de CPD y como inóculo 10 cortes de 5 mm de diámetro del micelio de *Xylaria* sp. de un cultivo sólido del endófito previamente incubado en PDA por un periodo de 8 días. Cada uno de los matraces se incubó durante 30 días a 28 °C con agitación de 200 rpm utilizando un agitador orbital (New Brunswick Scientific, Excella E25). Una vez concluidos los periodos de incubación, el micelio se separó del medio de cultivo mediante filtración utilizando gasa (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2010).

## **6. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS**

Los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio en pequeña y mediana escala se obtuvieron como se describe a continuación:

El micelio húmedo se sometió a un proceso de maceración con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), realizándose cinco extracciones con un volumen de 0.5 L de disolvente para los cultivos en pequeña escala y de 2 L para los de mediana escala, dejando entre cada extracción un

periodo de tres días. Inmediatamente después y con el mismo procedimiento, se realizaron cinco extracciones más con acetato de etilo (AcOEt). Al término de la maceración, los extractos resultantes se filtraron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. Los extractos del medio de cultivo y micelio, obtenidos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y con AcOEt se compararon por cromatografía en capa fina (CCF), resultado cromatográficamente similares, por lo que se decidió unirlos (extracto del medio de cultivo CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt y extracto del micelio CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt, pequeña y mediana escala, respectivamente).

Los extractos del micelio se obtuvieron mediante sucesivas particiones empleando también CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt como disolventes de extracción. La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. Nuevamente, los dos extractos orgánicos se unieron de acuerdo con el análisis por CCF.

## **7. FRACCIONAMIENTO QUÍMICO BIODIRIGIDO**

### **7.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS GENERALES**

Los extractos orgánicos obtenidos de los cultivos en mediana escala en condiciones estáticas del hongo endófito *Xylaria* sp. se fraccionaron mediante cromatografía de adsorción en columna abierta, empleando como adsorbente gel de sílice (Sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230). Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Sílica Gel 60 GF<sub>254</sub> Merck de 0.25 mm de espesor), varios sistemas de eluyentes (Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Hex-CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH en diversas proporciones) y como agentes cromogénicos una disolución de ácido sulfúrico al 10% y reactivo de Dragendorf; para obtener el desarrollo del color fue necesario calentar cada cromatoplaqueta por dos minutos aproximadamente a 110 °C (Waksmundzka *et al.*, 2008). Para el fraccionamiento secundario se utilizó cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) utilizando para ello un equipo Waters con módulo de separación Alliance 2695 y un detector de fotodiodos Waters 2996. Las condiciones óptimas de separación se establecieron utilizando una columna analítica Clipeus C<sub>18</sub> (150 x 4.6 mm,

5µm), mientras que para la separación de los constituyentes mayoritarios de las fracciones primarias se utilizó una columna semi-preparativa Clipeus C<sub>18</sub> (150 x 10 mm, 5µm), en ambos casos los análisis se realizaron a 30 °C y como fase móvil se utilizó agua y acetonitrilo (MeCN) en diferentes gradientes de concentración y de flujo. En el Cuadro 3 se resumen las condiciones utilizadas para cada uno de los experimentos. También se utilizó cromatografía preparativa en capa delgada, empleando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> Merck de 20 x 20 cm y de 0.25 mm de espesor, aplicando en cada cromatoplaaca aproximadamente 5 mg de muestra y utilizando como fase móvil cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y metanol (MeOH) en proporción 95:5.

**Cuadro 3.** Gradientes de flujo y sistemas de elución utilizados para la separación óptima de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos y en las fracciones primarias de los extractos orgánicos en mediana escala de *Xylaria* sp.

Muestra	Condiciones de corrida
Extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, obtenidos en condiciones de agitación.	Flujo: 1 mL/min. Gradiente de fase móvil: Inicio: 75 % H <sub>2</sub> O 25 % MeCN Final: 50 % H <sub>2</sub> O 50 % MeCN Duración del gradiente: 10 min. Tiempo de corrida: 9 min. Temperatura: 30 °C
Fracciones primarias	Flujo: 1 mL/min. Isocrático: 55 % H <sub>2</sub> O 45 % MeCN Tiempo de corrida: 9 min. Temperatura: 30 °C

## 7.2. FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DE CULTIVOS EN MEDIANA ESCALA

Los extractos activos del medio de cultivo (~6 g de un sólido de color café rojizo) y micelio (~4 g de un sólido de color café rojizo) obtenidos en mediana escala en condiciones estáticas, se fraccionaron mediante una cromatografía en columna abierta, utilizando 250 g de gel de sílice, obteniéndose un total de 163 y 114 fracciones de 100 mL cada una, respectivamente. Aquellas fracciones que presentaron características cromatográficas similares se combinaron para generar 16 fracciones primarias para el extracto orgánico del medio de cultivo y 13 para el extracto orgánico del micelio. En los cuadros 4 y 5 se

Parte Experimental

resumen los sistemas de elución empleados, las fracciones combinadas y su actividad biológica.

**Cuadro 4.** Fraccionamiento primario del extracto activo del medio de cultivo en condiciones estáticas de *Xylaria* sp.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Peso (mg)	Clave
Hexano	100	1-11	24.8	Me-I
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	12-23		
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	24-31		
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	32-39		
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	40-42 43-48	19.4	Me-II
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	49-56		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	57 58-63	191.0	Me-III
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	100	64-71		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	72	45.7	Me-IV
		73-77 78-79		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	80-87	468.9	Me-VI <sup>a,b</sup>
		88-91	103.2	Me-VII <sup>a,b</sup>
		92-95	201.8	Me-VIII <sup>a,b</sup>
		96-98		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	97:3	99-109 110-114	187.0	Me-IX <sup>a,b</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	96:4	115-118 119-127	244.3	Me-X <sup>a,b</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	128 129-138		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	94:6	139	261.2	Me-XI <sup>a,b</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	140-146	296.4	Me-XII <sup>a,b</sup>
		147	296.4	Me-XII <sup>a,b</sup>
		148-151	380.8	Me-XIII <sup>a,b</sup>
		152-153	363.8	Me-XIV <sup>b</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	154-155	236.8	Me-XV <sup>a,b</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH		156-163	79.9	Me-XVI

Fracciones fungitóxicas <sup>a</sup>, Fracciones fitotóxicas <sup>b</sup>

**Cuadro 5.** Fraccionamiento primario del extracto activo del micelio en condiciones estáticas de *Xylaria* sp.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Peso (mg)	Clave
Hexano	100	1	139.3	Mi-I <sup>b</sup>
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	2		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	100	3-7 8-17 18-20		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	21 22-29	140.5	Mi-II <sup>a,b</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	30-34	98.6	Mi-III <sup>a,b</sup>
		35-52	964.8	Mi-IV <sup>a,b</sup>
		53-59	122.5	Mi-V <sup>a,b</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	97:3	60-70	308.8	Mi-VI <sup>a</sup>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	96:4	71-81		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	82	78.6	Mi-VII
		83-88	166.0	Mi-VIII <sup>a</sup>
		89		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	90-91	99.8	Mi-X
		92-93	316.2	Mi-XI <sup>a</sup>
		94-96		
		97-98		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	99	481.5	Mi-XII
		100-102		
		103-105		
		106-107		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	70:30	108-109 110-113	29.6	Mi-XIII
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	114		

Fracciones fungitóxicas <sup>a</sup>, Fracciones fitotóxicas <sup>b</sup>

## 8. PURIFICACIÓN DEL METABOLITO SECUNDARIO

### 8.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS, ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se describen sin corregir. La rotación óptica se registró en un polarímetro digital JASCO DIP 360. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H) y de carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C) se obtuvieron en un aparato Varian UNITY PLUS 500, el cual se operó a una frecuencia de 300 y 125 MHz, respectivamente. Los espectros de resonancia magnética nuclear de los productos naturales se obtuvieron en un aparato Bruker DM X500. Todos los espectros se registraron en CDCl<sub>3</sub> y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se asignaron en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) empleado como referencia interna. El espectro en el infrarrojo (IR) se registro en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599B, en pastilla de bromuro de potasio (KBr). Los espectros de masas se registraron en un aparato JEOL JMS-AX505 HA mediante introducción directa a 70 eV. El análisis de difracción de rayos X se efectuó en un difractómetro Nicolet R3m.

### 8.2. OBTENCIÓN DE LA PUNCTAPORONINA B (39)

De la fracción primaria activa X del extracto de medio de cultivo en condiciones estáticas (244 mg) precipitó un sólido cristalino de color blanco, el cual tras sucesivas recristalizaciones con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (99:1) generó 15 mg de punctaporonina B (39) soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH y con un p.f. de 188°C (Anderson *et al.*, 1984; Edwards *et al.*, 1989).

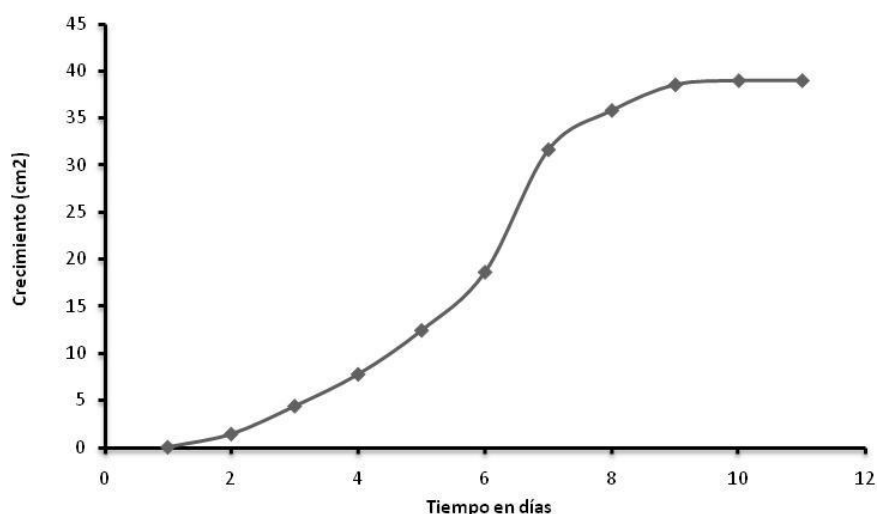
### VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de determinar el potencial antagonico del hongo endófito *Xylaria* sp. sobre diferentes especies de microorganismos endófitos y fitopatógenos, así como estudiar el potencial aleloquímico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, sobre el crecimiento de microorganismos y diferentes plantas de prueba, con el fin de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las relaciones que se establecen entre las plantas hospederas y los hongos endófitos. Asimismo, contribuir al posible desarrollo de nuevos agentes de control de plagas y enfermedades en plantas. Los resultados obtenidos se dividen en cuatro partes. La primera corresponde a la determinación del potencial antagonico sobre el crecimiento de diferentes microorganismos endófitos y fitopatógenos. La segunda abarca la obtención de cultivos en pequeña escala en condiciones estáticas y de agitación y la evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio. La tercera comprende la obtención y evaluación de cultivos en mediana escala y el aislamiento y purificación de uno de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos y fracciones activas del hongo endófito *Xylaria* sp. Por último, la cuarta parte se enfoca a la caracterización de uno de estos compuestos.

#### 1. BIOENSAYOS DE ANTAGONISMO

La determinación del potencial antagonico del hongo endófito *Xylaria* sp. se realizó mediante bioensayos de antagonismo directo entre este endófito y cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola: *F. oxysporum*, *A. solani*, *Rhizoctonia* sp. y *P. capsici*, dos hongos fitopatógenos aislados de *C. acuminata*: *Pestalotiopsis* sp. y el aislamiento C<sub>5</sub>F<sub>3</sub>; y dos hongos endófitos aislados también de *C. acuminata*: los aislamientos C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> y C<sub>4</sub>E<sub>13</sub>.

Con la finalidad de establecer la velocidad de crecimiento del hongo endófito *Xylaria* sp. se realizó una curva de crecimiento en PDA (Figura 3). La tasa de crecimiento observada para este microorganismo es de 2.5 cm<sup>2</sup>/día. Con base en este resultado se estableció que el hongo endófito *Xylaria* sp. aislado de *C. acuminata* crece lentamente (Figura 3), por lo que se sembró cinco días antes que sus competidores fitopatógenos todos ellos, microorganismos de crecimiento rápido. Por el contrario, sus competidores endófitos (aislamientos C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> y C<sub>4</sub>E<sub>13</sub>) son hongos de crecimiento muy lento por lo que se inocularon de dos maneras; los dos endófitos al mismo tiempo y siete días antes que el hongo endófito *Xylaria* sp.



**Figura 3.** Crecimiento del hongo endófito *Xylaria* sp. en cultivos en PDA

Los resultados de los bioensayos de antagonismo entre *Xylaria* sp. y los diferentes microorganismos competidores se registraron e interpretaron siete días después de haber sido sembrados los microorganismos fitopatógenos, y once días después de haber inoculado al mismo tiempo a *Xylaria* sp. y a sus competidores endófitos y siete días después de haber sembrado *Xylaria* sp. en los antagonismos con microorganismos endófitos incubados previamente por un periodo de siete días.



**1.1. ANTAGONISMO COMPETITIVO ENTRE EL ENDÓFITO *XYLARIA* SP. Y DOS ENDÓFITOS DE *CALLICARPA ACUMINATA*.**

**ANTAGONISMO ENTRE *XYLARIA* SP. Y EL AISLAMIENTO C<sub>4</sub>E<sub>13</sub>**

En las Figuras 4 A y B se presenta el antagonismo directo entre los hongos endófitos *Xylaria* sp. y el aislamiento C<sub>4</sub>E<sub>13</sub> a los 11 días de interacción, sembrados al mismo tiempo, observándose que ambos microorganismos compiten fuertemente, inhibiendo en ambos casos el crecimiento de su competidor en un 25 %.

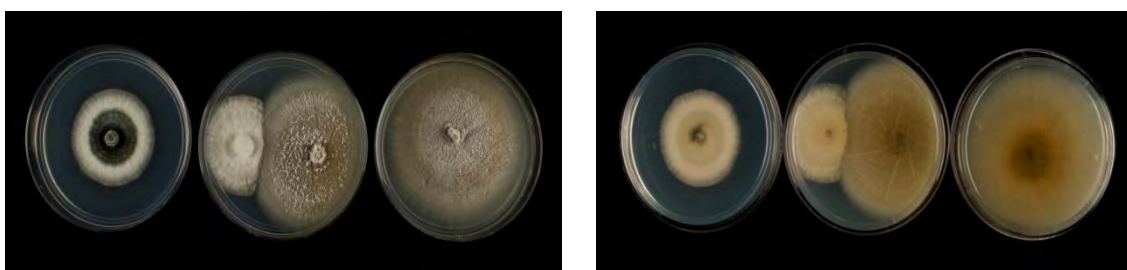
Por el contrario, en las Figuras 4 C y D, se observa el antagonismo a los 7 días de interacción antagónica entre el aislamiento C<sub>4</sub>E<sub>13</sub> y *Xylaria* sp., esta última sembrada 7 días después que el endófito C<sub>4</sub>E<sub>13</sub>. El aislamiento C<sub>4</sub>E<sub>13</sub> inhibe significativamente el crecimiento de *Xylaria* sp., inhibiendo su crecimiento radial en un 44 %. El crecimiento del endófito C<sub>4</sub>E<sub>13</sub> no es afectado por la presencia de *Xylaria* sp. (Cuadro 7).



A

B

**Figura 4.** Bioensayo de antagonismo entre los hongos *Xylaria* sp. (derecha) y C<sub>4</sub>E<sub>13</sub> (izquierda) a los 11 días inoculados al mismo tiempo (A y B) y a los 7 días de interacción antagónica, inoculados con 7 días de diferencia (C y D). A y C vista superior de los micelios. B y D vista inferior.

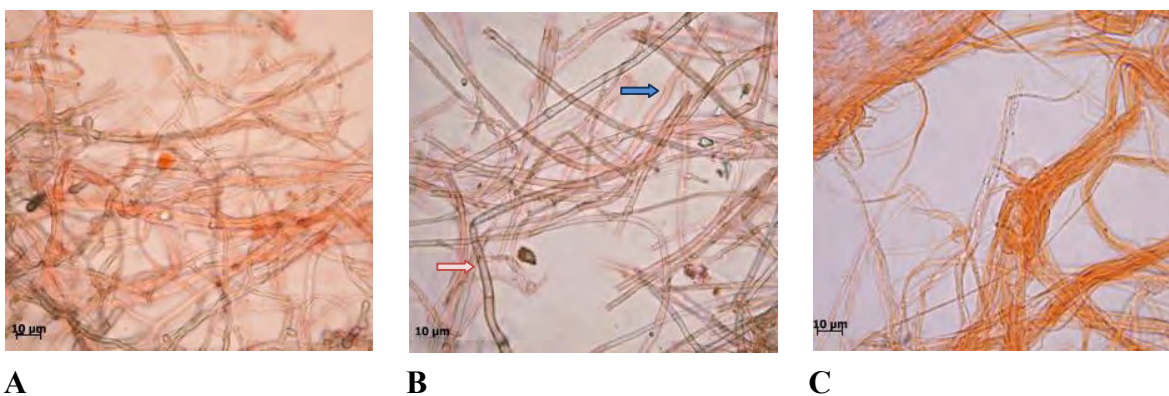


C

D

**Figura 5.** Bioensayo de antagonismo entre los hongos *Xylaria* sp. (derecha) y C<sub>4</sub>E<sub>13</sub> (izquierda) a los 11 días inoculados al mismo tiempo (A y B) y a los 7 días de interacción antagónica, inoculados con 7 días de diferencia (C y D). A y C vista superior de los micelios. B y D vista inferior.

Con la finalidad de establecer si el potencial antagonico demostrado por el hongo endófito *Xylaria* sp. provoca cambios en la morfología de las hifas, de las vacuolas o en el número de estas, se realizó un análisis microscópico de los micelios en las zonas más cercanas a la interacción antagonica (Figura 2). En la Figura 6 se presentan las observaciones microscópicas en la zona de interacción (I) y de no interacción (NI), observándose que no hay cambio morfológicos en las estructuras de los dos hongos endófitos.



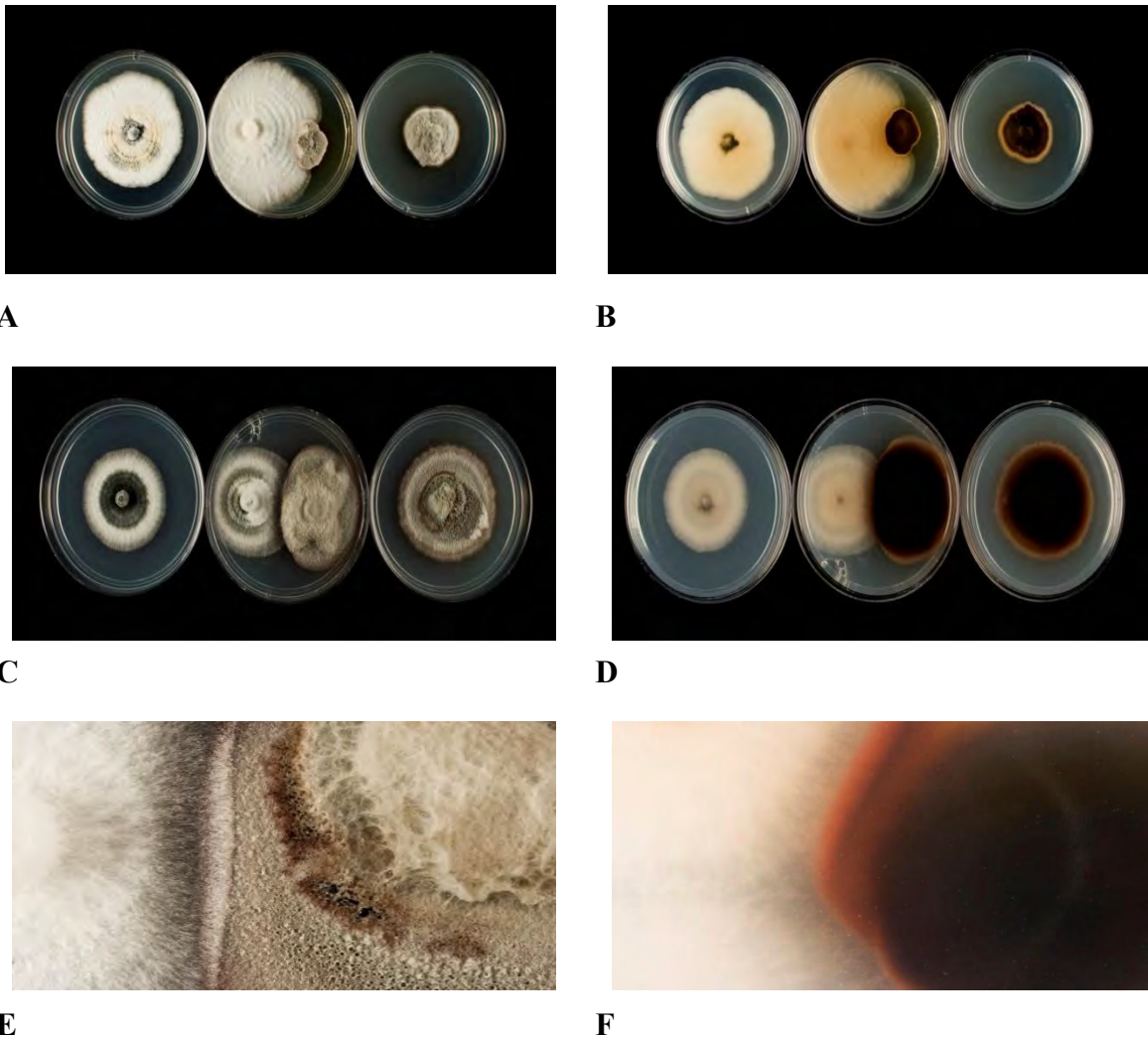
**Figura 6.** Interacción antagonica entre *Xylaria* sp. y C<sub>4</sub>F<sub>13</sub>. **A** control de crecimiento *Xylaria* sp. **B** interacción antagonica entre *Xylaria* sp. (flecha rosa) y C<sub>4</sub>E<sub>13</sub> (flecha azul). **C** control de crecimiento de C<sub>4</sub>E<sub>13</sub>.

### ANTAGONISMO ENTRE *XYLARIA* SP. Y AISLAMIENTO C<sub>5</sub>E<sub>12</sub>

En las Figuras 7 A y B, se muestra el antagonismo entre los hongos endófitos *Xylaria* sp. y el aislamiento C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> a los 11 días de antagonismo, inoculando ambos microorganismos al mismo tiempo. Los micelios de las dos especies endófitas crecen hasta hacer contacto, *Xylaria* sp. inhibe el crecimiento del aislamiento C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> en un 23 % y aislamiento C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> estimula el crecimiento del *Xylaria* sp. en un 30 % .

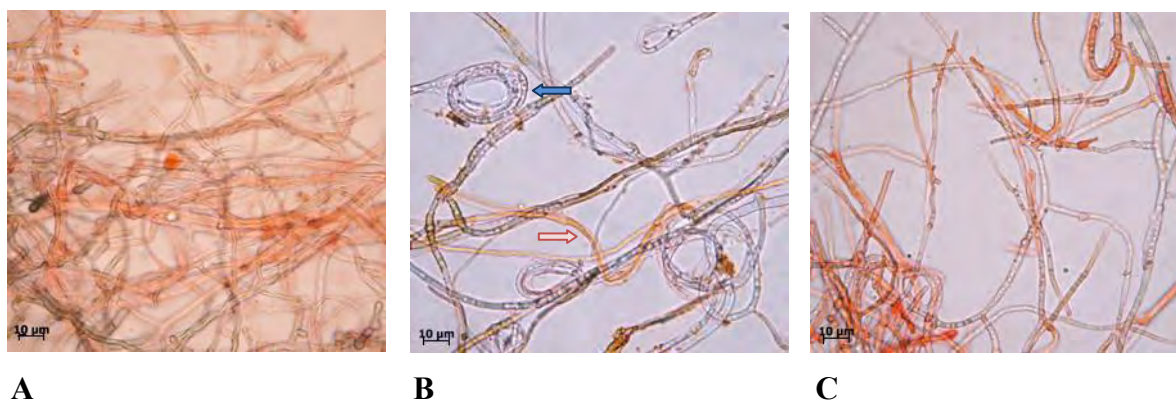
Por otra parte, en las Figuras 7 C y D se presenta el antagonismo directo entre los hongos endófitos *Xylaria* sp. y el aislamiento C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> a los 7 días de interacción antagonica, inoculando el hongo C<sub>5</sub>E<sub>12</sub>. 7 días antes que el endófito *Xylaria* sp. Ambos microorganismos ejercen un efecto antagonista sobre el crecimiento de su competidor. El micelio de los endófitos crece en contacto, el aislamiento C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> es inhibido significativamente por la presencia *Xylaria* sp. en un 39 %. Por su parte, el endófito C<sub>5</sub>E<sub>12</sub>

inhibe el crecimiento de *Xylaria* sp. en un 15 %. El micelio de ambas especies cambia morfológicamente con respecto a los controles de crecimiento; el micelio de *Xylaria* sp. reduce la proliferación de hifas, mientras que el endófito C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> forma una barrera micelial (Figura 7C), además de acumulación de pigmento rojo en la zona de interacción (Figura 7D).



**Figura 7.** Bioensayo de antagonismo entre los hongos *Xylaria* sp. (izquierda) y C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> (derecha) a los 11 días de interacción antagónica inoculados al mismo tiempo (**A y B**) y a los 7 días de interacción antagónica sembrados con 7 días de diferencia (**D y E**). **A y E** vista superior de los micelios. **B y F** vista inferior. **C** acercamiento zona de interacción (vista superior). **D** acercamiento zona de interacción (vista inferior).

Las observaciones microscópicas realizadas en la zona de interacción revelan que no hay cambios morfológicos entre los micelios de los dos endófitos competidores. Las mediciones realizadas sobre las hifas, tamaño y número de vacuolas, no muestran diferencias significativas (Figura 8; Cuadro 7).



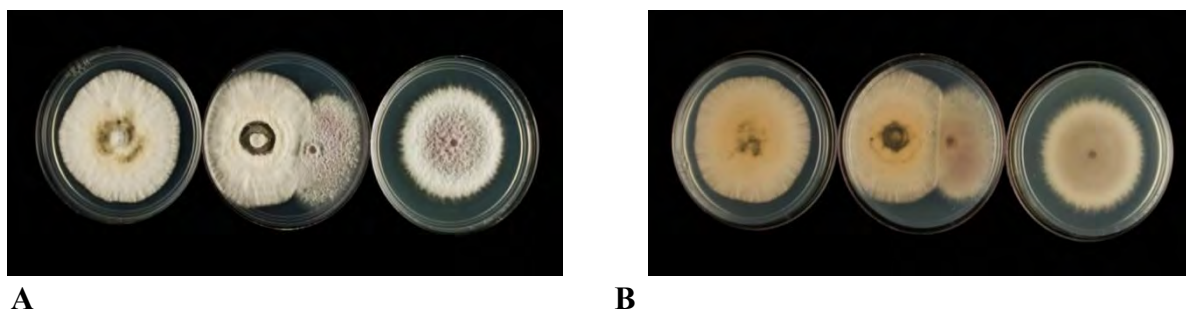
**Figura 8.** Interacción antagonica entre *Xylaria* sp y  $C_5F_{12}$ . **A** control de crecimiento *Xylaria* sp. **B** interacción antagonica entre *Xylaria* sp. (flecha rosa) y  $C_5F_{12}$  (flecha azul). **C** control de crecimiento de  $C_5F_{12}$ .

### 1.2. ANTAGONISMO COMPETITIVO ENTRE EL ENDÓFITO *XYLARIA* SP. Y DIVERSOS MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS

Con la finalidad de establecer el posible papel de *Xylaria* sp. en la defensa química de su planta hospedera contra microorganismos fitopatógenos, se realizaron bioensayos de antagonismo entre el endófito *Xylaria* sp. y seis microorganismos fitopatógenos.

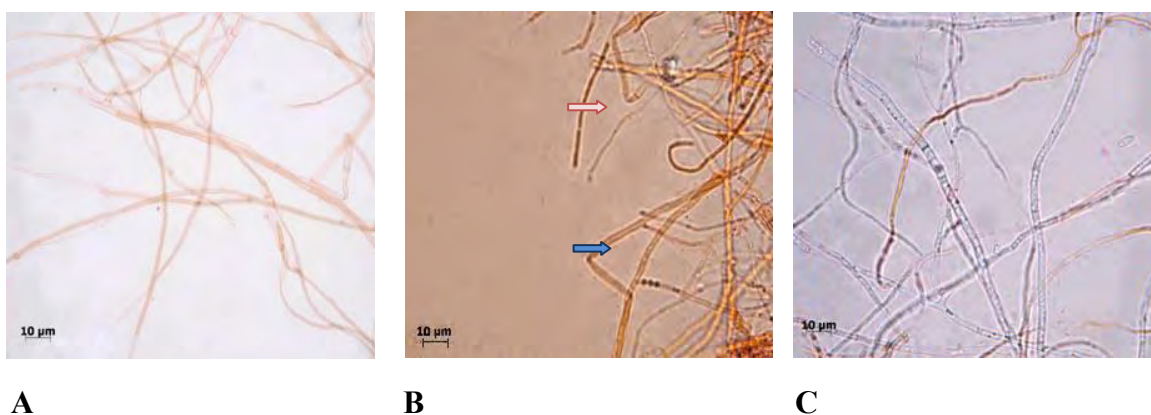
#### ANTAGONISMO DIRECTO ENTRE *XYLARIA* SP. Y *F. OXYSPORUM*

En la Figura 9 se presenta el bioensayo de antagonismo entre el hongo endófito *Xylaria* sp. y el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*. Los micelios de los dos microorganismos crecen hasta entrar en contacto, *Xylaria* sp. forma una barrera micelial blanca (Figura 9.B), posiblemente, como respuesta a la presencia del fitopatógeno. El crecimiento de *F. oxysporum* es inhibido significativamente en un 49 % por la presencia de *Xylaria* sp., por su parte, el crecimiento del endófito *Xylaria* sp. no es afectado por *F. oxysporum*.



**Figura 9.** Bioensayo de antagonismo entre los hongos *Xylaria* sp. y *Fusarium oxysporum* a los 7 días de interacción antagonística. **A** vista superior de los micelios. **B** vista inferior.

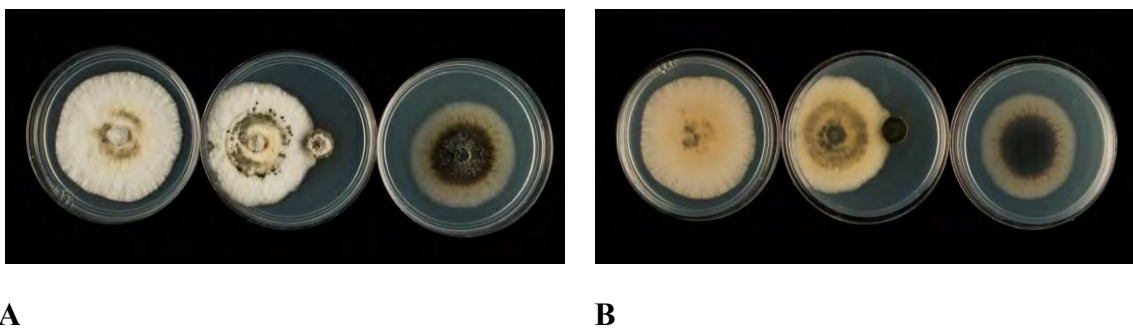
En la Figura 10 se muestran las observaciones microscópicas en la zona I, observándose nuevamente, que no existe diferencia en la morfología de las hifas o en el número de vacuolas, en ninguno de los dos hongos competidores.



**Figura 10.** Interacción antagonística entre *Xylaria* sp. y *Fusarium oxysporum*. **A** control de crecimiento *Xylaria* sp. **B** interacción antagonística entre *Xylaria* sp. (flecha rosa) y *Fusarium oxysporum* (flecha azul). **C** control de crecimiento *Fusarium oxysporum*.

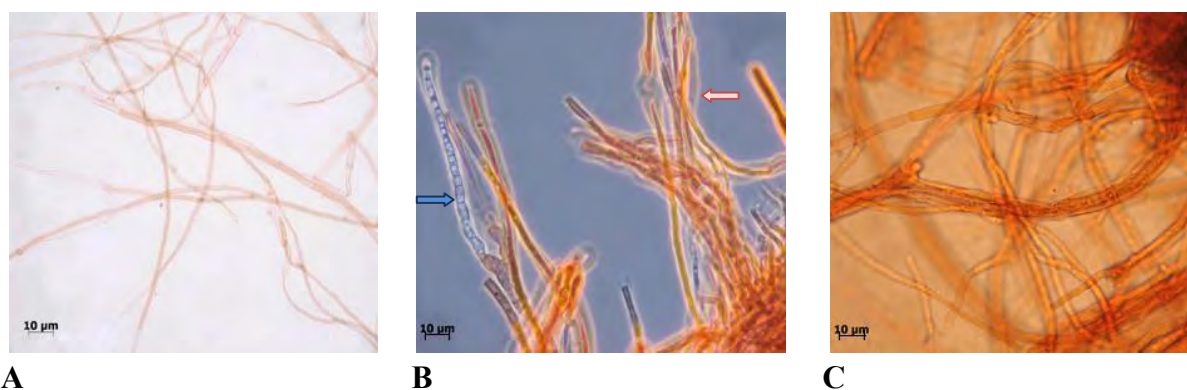
#### ANTAGONISMO DIRECTO ENTRE *XYLARIA* SP. Y *ALTERNARIA SOLANI*

En la Figura 11 se presenta el antagonismo entre *Xylaria* sp. y el hongo fitopatógeno *Alternaria solani*. El endófito *Xylaria* sp. inhibe a distancia el crecimiento de *A. solani* de manera importante, observándose una inhibición del 94 % después de 7 días de interacción antagonística. *A. solani* es el competidor fitopatógeno más afectado por la presencia de *Xylaria* sp. El crecimiento del endófito *Xylaria* sp. no es inhibido por su competidor fitopatógeno.



**Figura 11.** Bioensayo de antagonismo entre los hongos *Xylaria* sp. y *Alternaria solani* a los 7 días de interacción antagonica. **A** vista superior de los micelios. **B** vista inferior.

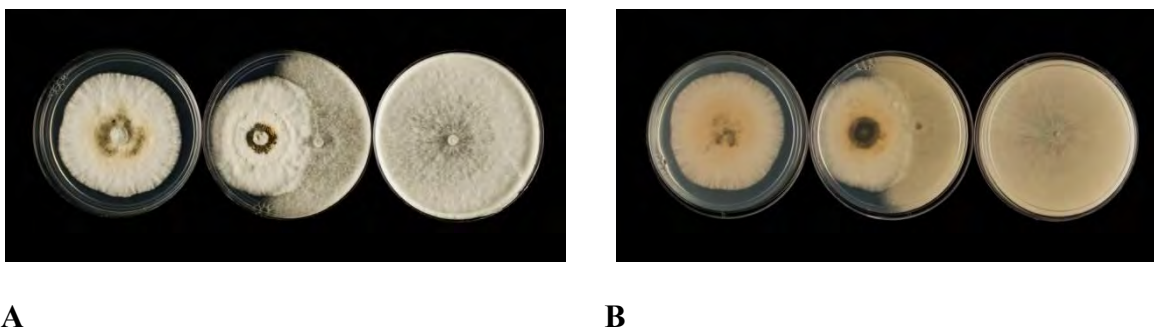
Las observaciones microscópicas realizadas en la zona de interacción antagonica muestran un aumento considerable en el número de vacuolas presentes en las hifas de *A. solani*, incrementando en un intervalo de 10-15 a uno de 50-70 por campo; así mismo, se observó la formación de vacuolas más grandes (Figura 12 B). Las vacuolas observadas en las preparaciones realizadas con los controles de crecimiento de *A. solani* presentan un diámetro de 1.06 a 1.45  $\mu\text{m}$ , mientras que en la zona de interacción se registró un aumento de 1.65 a 2.68  $\mu\text{m}$  (Cuadro 7). Estas observaciones permiten inferir que el potencial antagonico demostrado en los bioensayos de antagonismo, así como los cambios microscópicos observados, se deben a la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica que son difundidos en el medio de cultivo y que inhiben a distancia el crecimiento de *A. solani*.



**Figura 12.** Interacción antagonica entre *Xylaria* sp. y *Alternaria solani*. **A** control de crecimiento *Xylaria* sp. **B** interacción antagonica entre *Xylaria* sp. (flecha rosa) y *A. solani* (flecha azul) **C**. control de crecimiento *A. solani*.

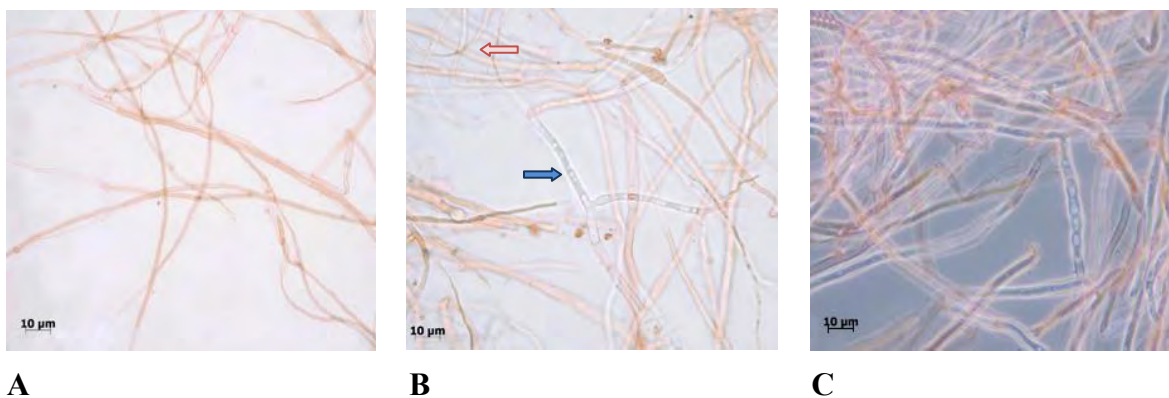
**ANTAGONISMO DIRECTO ENTRE *XYLARIA* SP. Y *RHIZOCTONIA* SP.**

En la Figura 13, se observa el antagonismo entre *Xylaria* sp. y el fitopatógeno *Rhizoctonia* sp. El micelio de *Xylaria* sp. crece en contacto con el de *Rhizoctonia* sp. e inhibe su crecimiento en un 57 %. Una vez que los micelios de los dos hongos entran en contacto se observó un aumento en la proliferación de las hifas de *Xylaria* sp. y con ello la formación de una barrera micelial de color blanco en la zona de interacción (Figura 11 B).



**Figura 13.** Bioensayo de antagonismo entre los hongos *Xylaria* sp. y *Rhizoctonia* sp. a los 6 días de interacción antagonica. **A** vista superior de los micelios. **B** vista inferior.

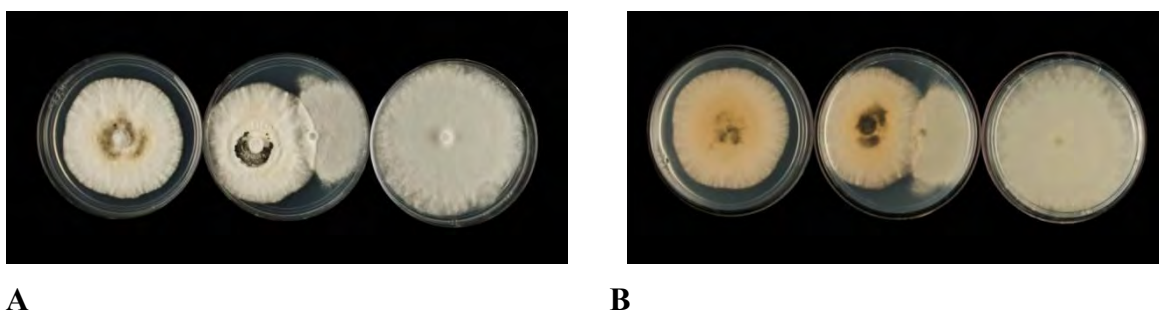
En la Figura 14 se muestran los resultados del análisis microscópico del bioensayo de antagonismo, observándose que no existe ningún cambio morfológico entre las hifas de los micelios de los microorganismos (Figura 14 B). Los valores de grosor de hifas y vacuolas, así como los de diámetro de las vacuolas no muestran diferencias importantes (Cuadro 7).



**Figura 14.** Interacción antagonica entre *Xylaria* sp. y *Rhizoctonia* sp. **A** control de crecimiento *Xylaria* sp. **B** interacción antagonica entre *Xylaria* sp. (flecha roja) y *Rhizoctonia* sp. (flecha azul) **C.** control de crecimiento *Rhizoctonia* sp.

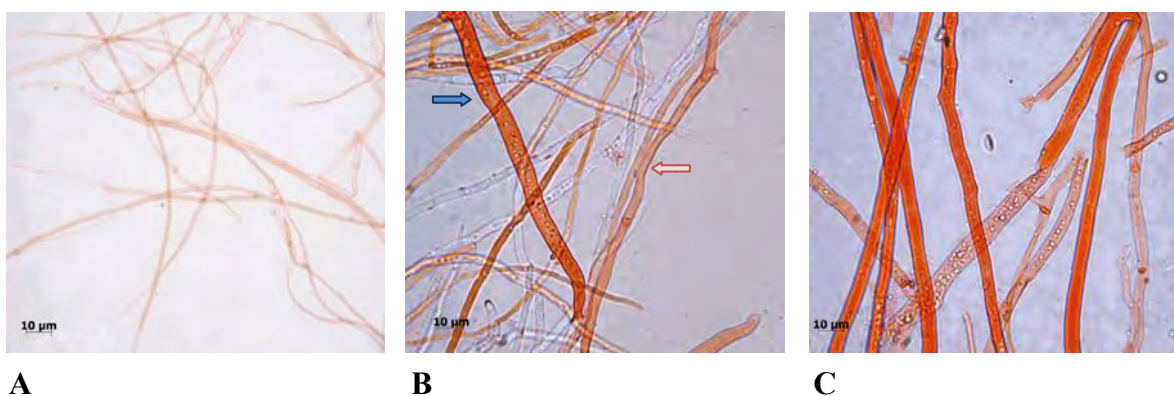
**ANTAGONISMO DIRECTO ENTRE *XYLARIA* SP. Y *P. CAPSICI***

En la Figura 15, se presenta el antagonismo entre *Xylaria* sp. y el fungoide fitopatógeno *P. capsici*, como se puede observar después de 6 días de interacción *Xylaria* sp. comienza a crecer sobre *P. capsici* inhibiendo su crecimiento en un 64 %, además forma una barrera de hifas de color blanco intenso en donde los micelios de ambos microorganismos se encuentran (zona I). Por su parte, *Xylaria* sp. no es inhibida por la presencia de *P. capsici*.



**Figura 15.** Bioensayo de antagonismo entre los hongos *Xylaria* sp. y *P. capsici* a los 7 días de interacción antagonica. **A** vista superior de los micelios. **B** vista inferior.

Por otro lado, en el análisis microscópico en la zona de interacción antagonica no demostró diferencias importantes (Figura 16).

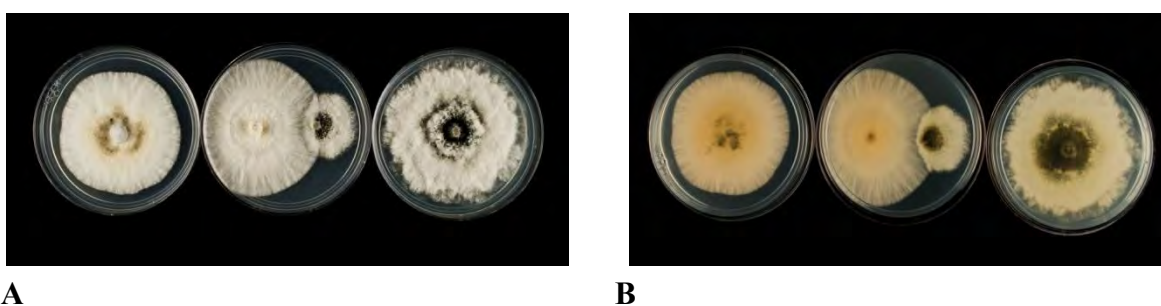


**Figura 16.** Interacción antagonica entre *Xylaria* sp. y *P. capsici*. **A** control de crecimiento *Xylaria* sp. **B** interacción antagonica entre *Xylaria* sp. y *P. capsici*. **C** control de crecimiento *P. capsici*.



**ANTAGONISMO DIRECTO ENTRE *XYLARIA* SP. Y *PESTALOTIOPSIS* SP.**

En la Figura 17 se muestra el ensayo de antagonismo entre el endófito *Xylaria* sp. y el fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp. aislado de *C. acuminata*. Ambos microorganismos crecen hasta que sus micelios entran en contacto, *Xylaria* sp. comienza a crecer sobre el fitopatógeno al tiempo que inhibe de manera significativa su crecimiento. El crecimiento de *Pestalotiopsis* sp. es inhibido en un 80 % mientras que el crecimiento de *Xylaria* sp. no es afectado. A diferencia de lo observado en los antagonismos anteriores, *Xylaria* sp. no forma una barrera micelial en este caso las hifas disminuyen su proliferación en la zona de interacción.



**Figura 17.** Bioensayo de antagonismo entre los hongos *Xylaria* sp. y *Pestalotiopsis* sp. a los 7 días de interacción antagonica. **A** vista superior de los micelios. **B** vista inferior.

De nueva cuenta, las observaciones microscópicas realizadas en la zona de interacción antagonica demostraron que no hay ninguna modificación morfológica que entre las hifas del endófito *Xylaria* sp. y del fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp.

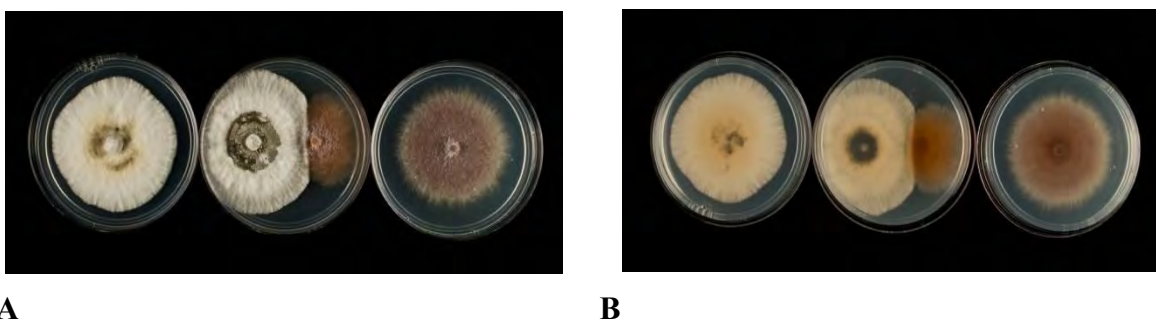


**Figura 18.** Interacción antagonica entre *Xylaria* sp. y *Pestalotiopsis* sp. **A** control de crecimiento de *Xylaria* sp. **B** interacción antagonica entre *Xylaria* sp. (flecha roja) y *Pestalotiopsis* sp. (flecha azul). **C.** control de crecimiento de *Pestalotiopsis* sp.

**ANTAGONISMO DIRECTO ENTRE *XYLARIA* SP. Y EL AISLAMIENTO C<sub>5</sub>F<sub>3</sub>**

En la Figura 19 se presenta el bioensayo de antagonismo entre el endófito *Xylaria* sp. y el fitopatógeno C<sub>5</sub>F<sub>3</sub>. *Xylaria* sp. inhibe significativamente el crecimiento de su competidor fitopatógeno C<sub>5</sub>F<sub>3</sub>, inhibiendo su crecimiento en un 84 %, por su parte, el hongo C<sub>5</sub>F<sub>3</sub> no inhibe significativamente el crecimiento de *Xylaria* sp. (13 %).

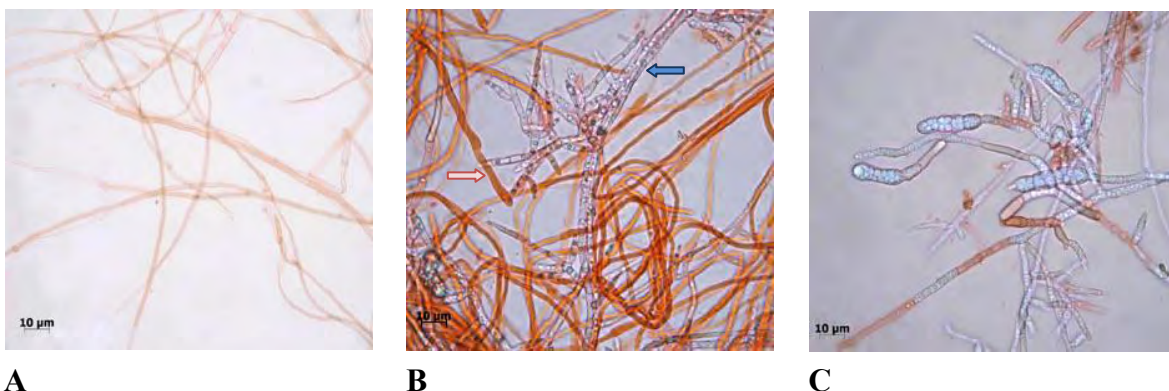
En la parte posterior de los micelios se observa claramente una barrera de color amarillo (Figura 19B).



**Figura 19.** Bioensayo de antagonismo entre los hongos *Xylaria* sp. y C<sub>5</sub>F<sub>3</sub> a los 7 días de interacción antagónica. **A** vista superior de los micelios. **B** vista inferior.

Las observaciones microscópicas realizadas muestran que el control de crecimiento del hongo fitopatógeno C<sub>5</sub>F<sub>3</sub> presenta hifas de mayor grosor en los extremos y con acumulación de vacuolas, así como estructuras tempranas (Figura 20C). Las observaciones en la zona de interacción antagónica no muestran estructuras “maduras”, engrosadas ni llenas de vacuolas, únicamente se observan hifas de menor tamaño y con un contenido vacuolar menor (Figura 20 B).

En resumen, los resultados de los bioensayos de antagonismo entre el hongo endófito *Xylaria* sp. y los diferentes microorganismos competidores, permiten establecer que *Xylaria* sp. es un hongo endófito que posee potencial antifúngico, ya que en general inhibió significativamente el crecimiento de todos sus competidores.



**Figura 20.** Interacción antagonica entre *Xylaria* sp y  $C_5F_3$ . **A** control de crecimiento *Xylaria* sp. **B** interacción antagonica entre *Xylaria* sp. (flecha roja) y  $C_5F_3$  (flecha azul). **C** control de crecimiento de  $C_5F_3$ .

Los porcentajes de inhibición provocados sobre el crecimiento de *Xylaria* sp. debidos a la presencia de los diferentes microorganismos competidores confirman que este endófito presenta importante potencial antifúngico, ya que únicamente es inhibido de manera significativa por el aislamiento  $C_4E_{13}$  cuando *Xylaria* sp. se inoculó seis días después que su competidor endófito (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *Xylaria* sp. y de los diferentes microorganismos competidores en los bioensayos de antagonismo.

	% de inhibición de <i>Xylaria</i> sp.	% de inhibición del microorganismo competidor
<b>Bioensayo Endófitos</b>		
<i>Xylaria</i> sp. vs Aislamiento $C_4E_{13}$ (indulados con 7 días de diferencia)	44%*	0%
<i>Xylaria</i> sp. vs Aislamiento $C_5E_{12}$ (inoculados con 7 días de diferencia)	15%	39%*
<i>Xylaria</i> sp. vs Aislamiento $C_4E_{13}$ (inoculados al mismo tiempo)	25%*	25%*
<i>Xylaria</i> sp. vs Aislamiento $C_5E_{12}$ (inoculados al mismo tiempo)	-30%* <sup>a</sup>	23%*

\* n=4 p<0.05; <sup>a</sup>el signo negativo indica estimulación del crecimiento radial.

**Cuadro 6.** Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *Xylaria* sp. y de los diferentes microorganismos competidores en los bioensayos de antagonismo (Continuación).

	% de inhibición de <i>Xylaria</i> sp.	% de inhibición del microorganismo competidor
<b>Bioensayos con fitopatógenos</b>		
<i>Xylaria</i> sp. vs <i>F. oxysporum</i>	0%	49%*
<i>Xylaria</i> sp. vs <i>A. solani</i>	0%	94%*
<i>Xylaria</i> sp. vs <i>Rhizoctonia</i> sp.	0%	50%*
<i>Xylaria</i> sp. vs <i>P. capsici</i>	0%	64%*
<i>Xylaria</i> sp. vs <i>Pestalotiopsis</i> sp.	0%	80%*
<i>Xylaria</i> sp. vs Aislamiento C <sub>5</sub> F <sub>3</sub>	13%	84%*

\* n=4 p<0.05; <sup>a</sup>el signo negativo indica estimulación del crecimiento radial.

Por otra parte, para determinar cuantitativamente el potencial antagónico que presenta *Xylaria* sp. sobre los competidores evaluados, se calculó el índice de antagonismo de acuerdo con el tipo de interacción observada entre los microorganismos competidores, asignando un valor numérico conforme con el modificado de interpretación del tipo de interacción descritas por Yuen y colaboradores (1999), permitiendo calcular un índice de antagonismo de 6 para los hongos endófitos, y de 19 para los microorganismos fitopatógenos. Cabe mencionar que los índices de antagonismo reflejan la habilidad de un hongo para competir contra un grupo de microorganismos, lo que podría indicar que *Xylaria* sp. es más antagónico contra microorganismos fitopatógenos que contra endófitos. Esto podría ser consecuencia de las interacciones entre endófitos llevadas a cabo dentro de la planta hospedera, lo que obliga a estos microorganismos a ser más competitivos por espacio y nutrientes y quizá la razón por la que en los bioensayos de antagonismo entre *Xylaria* sp. y los endófitos, ambos hongos son inhibidos por la presencias de su competidor. Al mismo tiempo, un índice de antagonismo mayor sobre los microorganismos fitopatógenos permite inferir que *Xylaria* sp. podría contribuir directamente en la defensa de su planta hospedera contra microorganismos fitopatógenos, mediante la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica, o bien, inhibiendo directamente la colonización de los microorganismo fitopatógenos.

## Resultados y Discusión

Con respecto al análisis microscópico realizado utilizando los micelios en las zonas más cercanas a la interacción antagónica (zona I), es posible establecer que con excepción del fitopatógeno *A. solani* y del endófito C<sub>5</sub>F<sub>3</sub>, no existen modificaciones morfológicas en las hifas del hongo endófito *Xylaria* sp. ni en las de sus diferentes competidores, ya que no se observó destrucción de las hifas (lisis) o cambio en su grosor a pesar de que los micelios de los microorganismos se entremezclaran o de que uno de los microorganismos creciera encima del otro. Tampoco se observó aumento en el número de vacuolas o modificaciones en sus dimensiones. En el Cuadro 7 se presentan los intervalos de las mediciones realizadas en el grosor y número de las hifas, así como en las dimensiones de las vacuolas en los bioensayos de antagonismo entre *Xylaria* sp. y los diferentes microorganismos endófitos y fitopatógenos evaluados.

**Cuadro 7.** Resumen de las mediciones realizadas sobre las hifas y vacuolas de *Xylaria* sp. y de los diferentes microorganismos fitopatógenos y endófitos utilizados en los bioensayos de antagonismo.

Bioensayo con endófitos		Grosor de hifa (µm)	Diámetro de vacuola (µm)	No. de vacuolas por campo
<i>Xylaria</i> sp. vs Aislamiento C <sub>4</sub> E <sub>13</sub>	Control Xy	2.19-2.49	----	----
	Interacción Xy	1.89-3.01	----	----
	Interacción C <sub>4</sub> E <sub>13</sub>	1.45-3.23	0.33-1.59	50-90
	Control C <sub>4</sub> E <sub>13</sub>	1.5-2.81	0.22-1.66	50-90
<i>Xylaria</i> sp. vs Aislamiento C <sub>5</sub> E <sub>12</sub>	Control Xy	2.19-2.49	----	----
	Interacción Xy	1.80-2.98	----	----
	Interacción C <sub>5</sub> F <sub>3</sub>	1.87-3.54	0.9-2.2	100-150
	Control C <sub>5</sub> F <sub>3</sub>	2.09-3.44	0.9-1.9	100-150
Bioensayo con fitopatógenos		Grosor de hifa (µm)	Diámetro de vacuola (µm)	No. de vacuolas por campo
<i>Xylaria</i> sp. vs <i>F. oxysporum</i>	Control Xy	1,76-3,17	----	----
	Interacción Xy	1,65-3,10	----	----
	Interacción Fu	3,20-4,16	1,29-1,90	15-20
	Control Fu	3,05-4.07	1,17-1,87	19-23
<i>Xylaria</i> sp. vs <i>A. solani</i>	Control Xy	1,76-3,17	----	----
	Interacción Xy	1,00-3,89	----	----
	Interacción Al	3.13-4.44	1.65-2.68	10-15
	Control Al	3.47-5.6	1.06-1.45	50-70

## Resultados y Discusión

**Cuadro 7.** Resumen de las mediciones realizadas sobre las hifas y vacuolas de *Xylaria* sp. y de los diferentes microorganismos fitopatógenos y endófitos utilizados en los bioensayos de antagonismo (Continuación).

Bioensayo con fitopatógenos	Grosor de hifa (µm)	Diámetro de vacuola (µm)	No.de vacuolas por campo	No.de vacuolas por campo
<i>Xylaria</i> sp. vs <i>Rhizoctonia</i> sp.	Control Xy	1,76-3,17	----	----
	Interacción Xy	2,79-3,98	----	----
	Interacción Rh	2,17-3,00	1,33-1,76	10-23
	Control Rh	2,52-2,81	1,09-1,77	11-19
<i>Xylaria</i> sp. vs <i>P. capsis</i>	Control Xy	1,76-3,17	----	----
	Interacción Xy	1,80-3,58	----	----
	Interacción Py	4,25-6,89	1,22-2,96	44-91
	Control Py	4,3-5,92	1,07-2,84	50-80
<i>Xylaria</i> sp. vs <i>Pestalotiopsis</i> sp.	Control Xy	1,76-3,17	----	----
	Interacción Xy	1,09-2,96	----	----
	Interacción Pe	1,59-3,06	2,35-2,98	15-20
	Control Pe	1,99-2,98	1,08-2,61	15-20
<i>Xylaria</i> sp. vs Aislamiento C <sub>5</sub> F <sub>3</sub>	Control Xy	1,76-3,17	----	----
	Interacción Xy	1,75-3,67	----	----
	Interacción C <sub>5</sub> F <sub>3</sub>	2,04-4,32	1,56-3,09	>200
	Control C <sub>5</sub> F <sub>3</sub>	2,22-3,96	1,38-2,76	>200

---- No presentó vacuolas

Estas observaciones en conjunto, permiten sugerir que las interacciones establecidas entre *Xylaria* sp. y los microorganismo fitopatógenos y endófitos evaluados, son mediadas principalmente por metabolitos secundarios producidos por los microorganismos competidores, sin embargo, con los resultados obtenidos hasta este punto no es posible asegurar que la biosíntesis de estos compuestos se produzca en respuesta al microorganismo presente en el antagonismo, no obstante, si es posible proponer que los metabolitos secundarios son capaces de intervenir en diferente grado sobre el crecimiento y desarrollo morfológico de su competidor, tal es el caso de la estimulación en la producción del número de vacuolas observadas en *A. solani* y de la inhibición de su crecimiento por la presencia de *Xylaria* sp.; de la formación de barreras miceliales por parte de *Xylaria* sp. en respuesta a la presencia de *F. oxisporum*, *P.capsici* y *Rhizoctonia* sp.; de la disminución de proliferación micelial de *Xylaria* sp. en presencia de *Pestalotiopsis* sp. y del endófito C<sub>5</sub>E<sub>12</sub>

o de la acumulación de pigmento por parte del endófito C<sub>5</sub>E<sub>12</sub> en la zona de interacción y del cambio de estructuras microscópicas en el hongo fitopatógeno C<sub>5</sub>F<sub>3</sub>.

La gran diversidad de respuestas por parte de los microorganismos en condiciones de competencia demuestra que las estrategias con las que un hongo responde ante la presencia de otro microorganismo varían en magnitud y en forma, y son tan específicas y diferentes como cada uno de los hongos y de las interacciones que es capaz de sostener.

### **2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DE *XYLARIA* SP. Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ALELOQUÍMICO DE SUS EXTRACTOS ORGÁNICOS.**

Con el propósito de confirmar que el potencial antagónico demostrado por el endófito *Xylaria* sp. se debe principalmente a la producción de metabolitos secundarios bioactivos, se evaluó el efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio sobre el crecimiento de microorganismo fitopatógenos de prueba. De manera adicional, se evaluó la posible interacción endófito planta mediante evaluación del efecto de los extractos sobre la germinación y la longitud de la raíz de tres plantas objeto de estudio.

#### **2.1. OBTENCIÓN DE CULTIVOS EN PEQUEÑA ESCALA**

En primer lugar, se establecieron las condiciones óptimas de crecimiento del hongo *Xylaria* sp. mediante la realización de cultivos en pequeña escala (1L), verificando el desarrollo del endófito en caldo papa dextrosa (CPD), utilizando condiciones de incubación estáticas y con agitación por un período de 30 días, con fotoperíodo de luz artificial oscuridad 12:12 hrs., a 28 °C.

Cabe mencionar, que el medio de cultivo de papa-dextrosa es un medio ampliamente utilizado para cultivar microorganismos fúngicos (Ulloa, M. Hanlin, R 1978), en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se encontró que también es un medio de cultivo altamente eficiente para el crecimiento de hongos endófitos (Murià, 2008; Macías-

Rubalcava *et al.*, 2008; 2010; Sánchez, 2009). Además el CPD es un medio de cultivo que se extrae en muy bajo rendimiento con los disolventes utilizados durante el proceso de obtención de los extractos orgánicos.

En ambos casos se obtuvieron los extractos orgánicos a partir del micelio húmedo (maceración) y del medio de cultivo (partición), utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOET como disolventes de extracción. En el Cuadro 8 se presentan los rendimientos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, observándose diferencias significativas en el rendimiento de los extractos del medio de cultivo en función de las condiciones de incubación. Los rendimientos de los extractos de los cultivo en condiciones de agitación son mayores.

**Cuadro 8.** Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los cultivos en pequeña y mediana escala del endófito *Xylaria* sp.

<b>Cultivos en pequeña escala</b>	<b>Rendimiento (mg/L)</b>	<b>Cultivos en mediana escala</b>	<b>Rendimiento (mg/L)</b>
<b>Medio-estático (Med-Est-PE)</b>	21.06	<b>Medio estático (Med-Est-ME)</b>	445.11
<b>Micelio-estático(Mic-Est-PE)</b>	83.04	<b>Micelio-estático (Mic-Est-ME)</b>	295.19
<b>Medio-agitación(Med-Ag-PE)</b>	126.5	<b>Medio-agitación (Med-Ag-ME)</b>	14.62
<b>Micelio-agitación (Mic-Ag-PE)</b>	90.4	<b>Micelio-agitación (Mic-Ag-ME)</b>	10.2

A continuación, cada uno de los extractos obtenidos se analizó por CCF, observándose diferencias en la composición entre los extractos del medio de cultivo y micelio, por lo que se decidió evaluarlos por separado.

Posteriormente, se evaluó cuantitativamente el potencial efecto alelopático de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del endófito *Xylaria* sp. mediante la determinación de su efecto sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba y sobre la germinación y la longitud de la raíz de tres plantas de prueba, mediante el método de dilución en de la caja de Petri.



## 2.2 EFECTO ANTIFÚNGICO

El posible efecto antifúngico de los extractos orgánicos del hongo endófito *Xylaria* sp. se evaluó cuantitativamente mediante la determinación de su efecto, sobre el crecimiento radial de cinco hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *Alternaria solani*, *Pestalotiopsis* sp. y el aislamiento C<sub>5</sub>F<sub>3</sub> de *C. acuminata*.

**Cuadro 9.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y del micelio (200 µg/mL) en condiciones estáticas del hongo endófito *Xylaria* sp., sobre el crecimiento radial de cinco hongos fitopatógenos

% de Inhibición del crecimiento radial					
Tratamientos (200 µg/mL)	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria solani</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Aislamiento C <sub>5</sub> F <sub>3</sub>
Exto. Medio de cultivo	32.5 ± 0.15*	43.5±0.21*	73.2 ± 0.19*	49.9 ± 0.27*	42.5 ± 0.15*
Exto. Micelio	51.5 ± 0.22*	56.4±0.14*	75.0 ± 0.22*	86.4 ± 0.18*	56.8 ± 0.14*

. \*n=4 p<0.05.

En el Cuadro 9 se presenta el efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio a 200 µg/mL en condiciones de incubación estáticas sobre el crecimiento de los microorganismos de prueba. El extracto orgánico de micelio inhibe significativamente el crecimiento de todos los microorganismos fitopatógenos evaluados, inhibiendo su crecimiento en más del 50%. *Pestalotiopsis* sp. es el fitopatógeno más afectado por la presencia de este extracto, inhibiendo su crecimiento en un 86 %. El extracto del medio de cultivo también inhibe de manera significativa el crecimiento de todos los microorganismos de prueba, sin embargo, los porcentajes de inhibición son menores a los provocados por el extracto del micelio. *Alternaria solani* es el fitopatógeno más afectado por el extracto del medio de cultivo, inhibiendo su crecimiento en un 73 % y *Rhizoctonia* sp. es el hongo menos afectado (33% de inhibición).

En el Cuadro 10 se presenta el efecto de los extractos del medio de cultivo y del micelio obtenidos en condiciones de agitación sobre el crecimiento de los cinco hongos fitopatógenos de prueba. Ambos extractos inhiben significativamente el crecimiento de los microorganismos evaluados. El extracto del medio de cultivo inhibe en mayor grado el

crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Pestalotiopsis* sp., inhibiendo más del 60 % su crecimiento. Por su parte, el extracto orgánico del micelio es más activo sobre el crecimiento de los hongo fitopatógeno *Rhizoctonia* sp., *Alternaria solani* y *Pestalotiopsis* sp., de nuevo la inhibición del crecimiento es mayor al 60%.

**Cuadro 10.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y del micelio (200 µg/mL) del hongo endófito *Xylaria* sp. obtenido en condiciones de agitación, sobre el crecimiento radial de cinco hongos fitopatógenos.

<b>% de Inhibición del crecimiento radial</b>					
<b>Tratamientos (200 µg/mL)</b>	<b><i>Rhizoctonia</i> sp.</b>	<b><i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i></b>	<b><i>Alternaria</i> <i>solani</i></b>	<b><i>Pestalotiopsis</i> sp.</b>	<b>Aislamiento C<sub>5</sub>F<sub>3</sub></b>
<b>Exto. Medio de cultivo</b>	39.1 ± 0.16*	63.4 ± 0.25*	69.6 ± 0.16*	72.4 ± 0.24*	53.4 ± 0.12*
<b>Exto. Micelio</b>	64.0 ± 0.20*	59.7 ± 0.14*	75.2 ± 0.23*	67.4 ± 0.17*	56.5 ± 0.15*

\*n=4 p<0.05

### 2.3. EFECTO FITOTÓXICO

Por otra parte, la determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala obtenidos en condiciones de crecimiento - agitación y estáticamente, se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de tres especies de plantas de prueba: *Amaranthus hypochondriacus*, *Lycopersicum esculentum* e *Ipomoea tricolor*.

En los Cuadros 12 y 13 se muestran los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de las tres plantas blanco. Los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio inhiben significativamente el crecimiento de la raíz de las tres plantas de prueba a una concentración de 100 µg/mL, en todos los casos la inhibición es mayor al 50 %. Los extractos obtenidos en condiciones de incubación con agitación inhiben en mayor grado el crecimiento radical de todas las especies de prueba, sin embargo, los resultados no muestran diferencias significativas entre extractos de medio de cultivo y micelio, ni entre

tipo de condiciones de crecimiento (agitación vs estático), es decir el potencial fitotóxico es muy similar en todos los casos.

**Cuadro 11.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (100 µg/mL) del hongo endófito *Xylaria* sp., obtenidos en condiciones de incubación estáticas sobre el crecimiento de la raíz de tres especies de plantas prueba.

% de inhibición			
Tratamientos (100 µg/mL)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	<i>Ipomoea tricolor</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Exto. del Medio de cultivo	60.5 ± 0.15*	66.8 ± 0.23*	58.2 ± 0.25*
Exto. del Micelio	75.5 ± 0.18*	50.8 ± 0.22*	76.4 ± 0.19*

\*n=4 p<0.05.

**Cuadro 12.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio (100 µg/mL) del hongo endófito *Xylaria* sp., obtenidos en condiciones de incubación con agitación, sobre el crecimiento de la raíz de tres especies de plantas prueba.

% de inhibición			
Tratamientos (100 µg/mL)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	<i>Ipomoea tricolor</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Exto. del Medio de cultivo	77.0 ± 0.12*	71.6 ± 0.22*	71.0 ± 0.26*
Exto. del Micelio	76.3 ± 0.15*	60.2 ± 0.19*	78.2 ± 0.21*

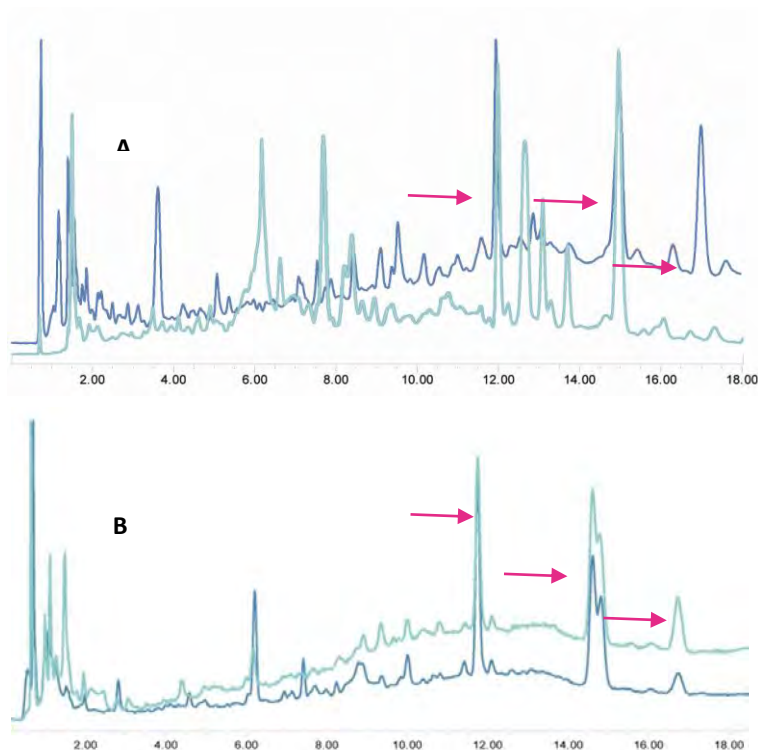
\*n=4 p<0.05.

Con base en la actividad biológica demostrada por los extractos orgánicos obtenidos de los cultivos del hongo endófito *Xylaria* sp. incubándolo bajo dos diferentes condiciones y principalmente los mostrados sobre el crecimiento radial de los hongos fitopatógenos, podemos confirmar que los metabolitos secundarios producidos por *Xylaria* sp. son los responsables del potencial antagónico demostrado en los bioensayos de antagonismo directo y que también poseen actividad biológica sobre el crecimiento de las plantas de prueba. En general, la actividad fitotóxica es mayor que la actividad antifúngica.

### 3. CULTIVO EN MEDIANA ESCALA

Con la finalidad de realizar un estudio químico biodirigido de los extractos activos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito *Xylaria* sp. se obtuvieron cultivos en mediana escala en condiciones estáticas (15 L) y de agitación (15 L). En el Cuadro 8 se muestra el rendimiento de los extractos obtenidos, observándose diferencias considerables, en los rendimientos de los extractos. Los extractos derivados del cultivo en condiciones estáticas resultaron más abundante que los obtenidos previamente en cultivos en pequeña escala. Por el contrario, el rendimiento de los extractos obtenidos de los cultivos en condiciones de agitación son inferiores a los derivados del cultivo en pequeña escala, lo cual indica que el crecimiento del endófito depende, además de las condiciones de cultivo, de la calidad del inóculo, es decir, del estado metabólico o de la recombinación de genes del fragmento de micelio seleccionado.

Cada uno de los extractos obtenidos, se analizó por cromatografía CLAR, observándose que en general, los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos bajo las mismas condiciones de incubación no muestran diferencias importantes en el número de señales, pero si en su abundancia. Sin embargo, se observan diferencias en la composición metabólica entre las dos condiciones de incubación. Los perfiles cromatográficos del medio de cultivo y micelio en condiciones estáticas presentan mayor cantidad de señales (Figura 21). Adicionalmente, el análisis por CLAR permitió identificar tres picos importantes presentes en todos los extractos orgánicos y en las fracciones primarias activas (Flechas rojas). La reacción positiva con reactivo de Dragendorff y su espectro en UV permitieron establecer que estos tres compuestos corresponden a una familia de metabolitos secundarios de naturaleza alcaloidal. A la fecha únicamente se ha logrado la separación y purificación del pico mayoritario.



**Figura 21:** Perfiles cromatográficos de los extractos del medio de cultivo (verde) y micelio (azul) del endófito *Xylaria* sp. obtenidos en condiciones de incubación estáticas (B) y con agitación (A) y utilizando CLAR a  $\lambda$  239 nm.

A continuación, se corroboró cuantitativamente la actividad biológica de los extractos de los cultivos en mediana escala, mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba.

### 3.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

En el Cuadro 13 se muestra el efecto antifúngico de los extractos del medio de cultivo y micelio en condiciones de incubación estáticas sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia económica utilizando tres concentraciones de prueba. Todas las concentraciones evaluadas inhiben significativamente el crecimiento radial de los cuatro microorganismos de prueba. Con excepción de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) del extracto del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. todos los valores de  $CI_{50}$  resultaron menores a 252 ppm. *P. capsici* es el microorganismo más afectado por la presencia del extracto de micelio.

**Cuadro 13.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en condiciones de incubación estáticas, sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos a tres diferentes concentraciones de prueba (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> µg/mL).

Tratamiento (µg/mL)	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	CI <sub>50</sub> µg/mL
<b>Microorganismos fitopatógenos</b>				
<b>% de inhibición del crecimiento radial</b>				
<b>Extracto del medio de cultivo</b>				
<i>P. capsici</i>	34.33 ± 1.5*	43.88±3.7*	57.61 ± 0.5*	240.64
<i>Rhizoctonia sp.</i>	23.45 ± 1.3*	31.01± 1.9*	48.87 ± 1.6*	>300
<i>F.oxysporum</i>	42.08±1.52*	54.34±0.7*	62.18±1.13*	205.14
<i>A. solani</i>	16.73±1.59	58.72±1.74*	73.67±0.71*	251.82
<b>Extracto del micelio</b>				
<i>P. capsici</i>	37.61 ± 1.8*	52.54 ± 0.9*	75.22 ± 0.9*	172.72
<i>Rhizoctonia sp.</i>	34.95 ± 1.8*	50.98 ± 0.6*	54.31 ± 1.6*	217.24
<i>F.oxysporum</i>	46.17±1.5*	50.94±0.9*	57.41±1.45*	207.70
<i>A. solani</i>	24.20±0.61*	70.11±1.0*	100.0±0.0*	190.85

\* C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> corresponden a concentraciones de 100, 200 y 300 µg/mL, respectivamente para los bioensayos con *Rhizoctonia sp.* y *P. capsici*, y concentraciones de 125, 250 y 500 µg/mL para los ensayos con *A. solani* y *F. oxysporum*. \*n=4 p<0.05

En el cuadro 14 se presentan los valores de CI<sub>50</sub> para los extractos del medio de cultivo y micelio en condiciones de agitación. Con excepción del efecto antifúngico provocado por el extracto del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Rhizoctonia sp.* y del efecto del extracto del micelio sobre *A. solani*, los valores de CI<sub>50</sub> son menores 215 µg/mL. El oomiceto *P. capsici* es inhibido potentemente por los extractos del medio de cultivo y micelio inhibiendo el 50% de su crecimiento a 88.7 y 73.2 µg/mL, respectivamente.

Las CI<sub>50</sub> correspondientes al control positivo (Prozicar ®) únicamente resultaron menores en los bioensayos con *Rhizoctonia sp.* (IC<sub>50</sub> de 30 µg/mL) y *F. oxysporum*, en donde la concentración más baja (20 µg/mL) inhibió al 100% al microorganismo de prueba; en los demás casos el Prozicar ® resulto menos efectivo: *A. solani* (> 150 µg/mL) y *P. capsici* (90 µg/mL).

**Cuadro 14.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en condiciones de incubación con agitación, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos a tres diferentes concentraciones de prueba (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> µg/mL).

Tratamiento (µg/mL)	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	CI <sub>50</sub> µg/mL
<b>Microorganismos fitopatógenos</b>	<b>% de inhibición del crecimiento radial</b>			
<b>Extracto del medio de cultivo</b>				
<i>P. capsici</i>	51.69 ± 1.8 *	79.1 ± 0.6 *	100 ± 0.0*	88.68
<i>Rhizoctonia sp.</i>	38.58 ± 1.0*	47.35 ± 1.4*	50.98 ± 0.6*	266.04
<i>F. oxysporum</i>	42.08 ± 0.7*	52.98 ± 1.2*	62.52 ± 0.7*	210.63
<i>A. solani</i>	25.62 ± 1.55*	70.82 ± 0.71*	100 ± 0.0*	187.33
<b>Extracto del micelio</b>				
<i>P. capsici</i>	55.22 ± 1.3*	68.96 ± 1.9*	74.63 ± 0.9*	73.20
<i>Rhizoctonia sp.</i>	40.7 ± 1.5*	50.38 ± 1.5*	56.43 ± 0.9*	192.61
<i>F. oxysporum</i>	45.6 ± 1.4*	62.5 ± 1.3*	88.9 ± 1.0*	204.98
<i>A. solani</i>	10.68 ± 1.55	51.60 ± 1.0*	70.11 ± 1.0*	286.71

\* C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> corresponden a concentraciones de 100, 200 y 300 µg/mL, respectivamente para los bioensayos con *Rhizoctonia sp.* y *P. capsici*, y concentraciones de 125, 250 y 500 µg/mL para los ensayos con *A. solani* y *F. oxysporum*. \*n=4 p<0.05

### 3.2 ACTIVIDAD FITOTÓXICA

#### CRECIMIENTO RADICULAR

Asimismo, se determinó la actividad fitotóxica de los extractos del medio de cultivo y micelio sobre el crecimiento de las semillas de *A. hypochondriacus*, *L. sativa* y *L. esculentum*, utilizando cuatro diferentes concentraciones de prueba; 10, 25, 50 y 100 µg/mL. En el Cuadro 15 se presenta el efecto de los extractos orgánicos derivados del cultivo en condiciones estáticas. En general, todos los tratamientos inhiben significativamente y en forma dependiente de la concentración el crecimiento de la raíz de las tres plantas de prueba. Los valores de CI<sub>50</sub> obtenidos para el extracto del medio de cultivo son menores a 32 µg/mL y los del micelio menores a 46 µg/mL.

Es importante resaltar que el potencial fitotóxico demostrado por los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del endófito *Xylaria sp.* es mayor al efecto antifúngico observado (Cuadro 12).

## Resultados y Discusión

**Cuadro 15.** Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en condiciones de incubación estáticas sobre el crecimiento de la raíz de tres semillas de prueba, a cuatro diferentes concentraciones (10, 25, 50 y 100 µg/mL). \*n=4 p<0.05

Tratamiento (µg/mL)	10	25	50	100	CI <sub>50</sub> µg/mL
<b>Planta de Prueba</b>	<b>% de inhibición del crecimiento de la raíz</b>				
<b>Extracto del medio de cultivo</b>					
<i>A. hypochondriacus</i>	10.64±0.37	49.61±0.19*	71.32±0.07*	82.32±0.12*	29.94
<i>L. sativa</i>	18.2±0.14	51.9±0.18*	72.0±0.07*	82.8±0.12*	26.87
<i>L. esculentum</i>	35.70±0.19*	43.93±0.28*	53.02±0.19*	72.18±0.26*	30.91
<b>Extracto del micelio</b>					
<i>A. hypochondriacus</i>	21.47±0.49*	39.13±0.39*	56.49±0.18*	71.47±0.15*	38.06
<i>L. sativa</i>	24.9±0.46*	40.6±0.39*	57.8±0.16*	66.3±0.30*	38.40
<i>L. esculentum</i>	24.63±0.42*	35.84±0.16*	56.71±0.17*	61.39±0.08*	45.66

En el Cuadro 16 se muestran los valores de CI<sub>50</sub> para los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en condiciones de agitación. De nueva cuenta, todas las concentraciones de prueba inhiben significativamente el crecimiento de la raíz de las tres semillas de prueba y los valores de CI<sub>50</sub> para el extracto de micelio (CI<sub>50</sub> >51 µg/mL) también son menores a los del medio de cultivo (CI<sub>50</sub> >80 µg/mL). Sin embargo, los extractos obtenidos bajo condiciones de incubación estáticas son más fitotóxicos que los derivados del cultivo en condiciones de agitación (Cuadro 16).

**Cuadro 16.** Efecto fitotóxico de los extractos del medio de cultivo y micelio obtenidos en condiciones de incubación con agitación sobre el crecimiento de la raíz de tres semillas de prueba a tres diferentes concentraciones (C1, C2 y C3 µg/mL) \*n=4 p<0.05

Tratamiento (µg/mL)	25	50	100	150	200	CI <sub>50</sub> µg/mL
<b>Planta de Prueba</b>	<b>% de inhibición del crecimiento de la raíz</b>					
<b>Extracto del medio de cultivo</b>						
<i>A.hypochondriacus</i>	29.62±0.33*	57.59±0.16*	67.63±0.1*	72.46±0.0*	80.15±0.29*	49.42
<i>L. sativa</i>	31.0±0.13*	54.6±0.41*	66.0±0.14*	68.2±0.30*	77.9±0.20*	50.56
<i>L. esculentum</i>	48.9±0.25*	67.3±0.20*	76.0±0.11*	82.4±0.16*	81.8±0.25*	21.79
<b>Extracto del micelio</b>						
<i>A.hypochondriacus</i>	17.39±0.24	44.99±0.25*	59.01±0.1*	64.77±0.33*	68.90±0.13*	78.81
<i>L. sativa</i>	17.2±0.28	46.1±0.10*	60.3±0.08*	65.7±0.16*	68.0±0.33*	77.33
<i>L. esculentum</i>	28.5±0.27*	61.6±0.50*	77.0±0.23*	80.4±0.08*	81.6±0.15*	43.69



Cabe mencionar, que en todos los casos los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para el herbicida comercial RIVAL<sup>®</sup> son mayores a los demostrados por los extractos orgánicos de *Xylaria* sp. La  $IC_{50}$  para las semillas de *A. hypochondriacus* es de 290  $\mu\text{g/mL}$ , para las semillas de *L. sativa* de 125.98  $\mu\text{g/mL}$  y para las de *L. esculentum* de 90  $\mu\text{g/mL}$ .

### RESPIRACIÓN CELULAR

Con la finalidad de explorar de forma más detallada el potencial herbicida demostrado por los extractos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito *Xylaria* sp., se evaluó el efecto de los mismos sobre la respiración durante el proceso de germinación de las tres plantas de prueba.

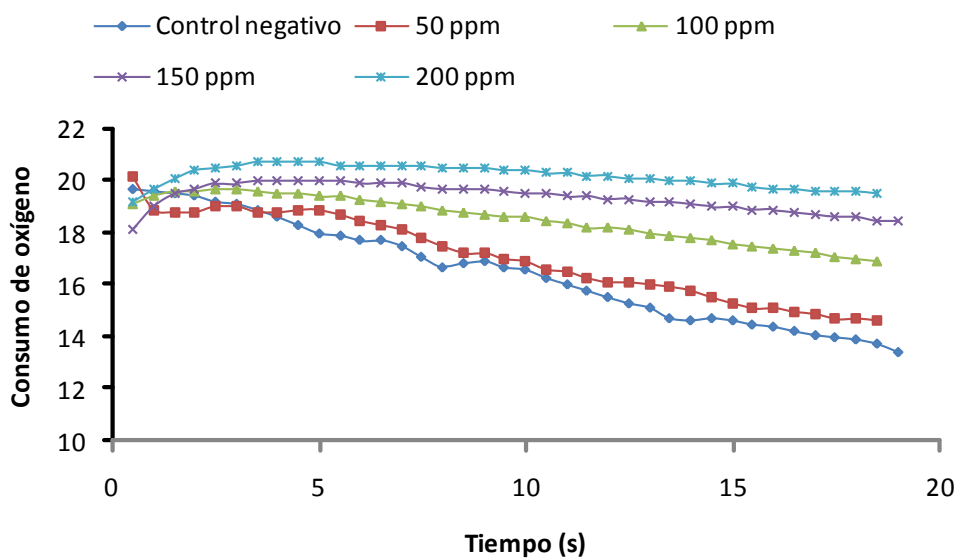
En el Cuadro 17 se presenta el efecto de los extractos orgánicos derivados del cultivo en condiciones estáticas, sobre el consumo de oxígeno de las tres plántulas de prueba, utilizando concentraciones de 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g/mL}$ . El análisis mediante regresión lineal de cada uno de los tratamientos permitió determinar cuantitativamente el oxígeno consumido por las plántulas. Con excepción del efecto inhibitorio del extracto del medio de cultivo sobre la respiración de las plántulas de *L. sativa*, todos los tratamientos inhiben más de 55 % el consumo de oxígeno a la máxima concentración de prueba. Sin embargo, en la mayoría de los casos el efecto inhibitorio sobre el consumo de oxígeno no es dependiente de la concentración, observándose un claro efecto de saturación, es decir, no hay diferencias significativas entre las diferentes concentraciones evaluadas, y en consecuencia no es posible determinar la  $CI_{50}$  para todas las plantas utilizadas, siendo mas evidente este efecto en presencia del extracto del micelio.

A manera de ejemplo en la Figura 22 se muestra el efecto dependiente de la concentración del extracto del medio de cultivo obtenido en condiciones de agitación sobre la respiración de las plántulas de *L. esculentum* y en la Figura 23 se presenta un claro efecto de saturación, observándose que no hay diferencias significativas sobre la respiración de las plántulas de *A. hypochondriacus* al incrementar la concentración del extracto de medio de cultivo obtenido en condiciones de incubación.

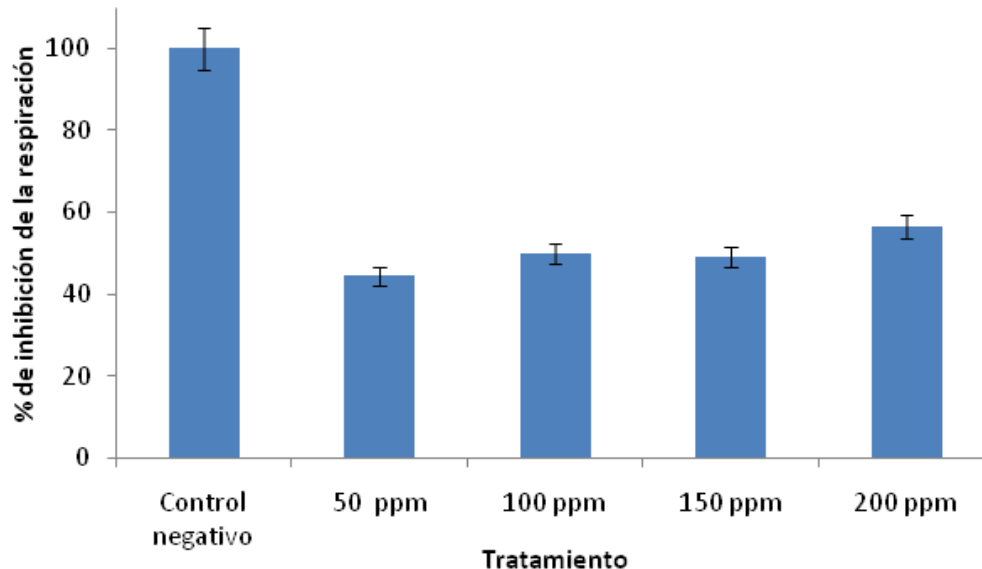
**Cuadro 17.** Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio en condiciones estáticas sobre el consumo de oxígeno de tres plantas de prueba.

Tratamiento (µg/mL)	50	100	150	200	CI <sub>50</sub> µg/mL
Planta de prueba	% de inhibición sobre el consumo de oxígeno				
<b>Extracto del medio de cultivo</b>					
<i>A. hypochondriacus</i>	24.8±0.04*	45.3±0.001*	53.4±0.001*	61.9±0.01*	127.06
<i>L. sativa</i>	0.0±0.02	23.29±0.02*	28.66±0.02*	28.55±0.03*	> 200
<i>L. esculentum</i>	18.54±0.02	31.40±0.03*	59.77±0.02*	65.60±0.01*	131.33
<b>Extracto del micelio</b>					
<i>A. hypochondriacus</i>	44.4±0.01*	49.9±0.002*	49.3±0.02*	56.5±0.01*	-----
<i>L. sativa</i>	0.0±0.02	0.0±0.01	54.56±0.03*	57.37±0.02*	-----
<i>L. esculentum</i>	15.10±0.05	34.62±0.03*	46.74±0.04*	58.22±0.05*	160.27

\*n=4 p<0.05



**Figura 22.** Efecto del extracto del medio de cultivo obtenido en condiciones agitación sobre la respiración de las plántulas de *Lycopodium esculentum*.



**Figura 23.** Efecto del extracto del medio de cultivo obtenido en condiciones estáticas sobre la respiración de las plantas *de Amaranthus hypochondriacus*.

Por otra parte, en el Cuadro 18 se muestra el efecto de los extractos orgánicos de los cultivos en condiciones de agitación, sobre la respiración de las plantas de prueba, observándose un comportamiento semejante al demostrado por los extractos de los cultivos estáticos. En general, estos extractos inhiben más de 50 % el consumo de oxígeno a la máxima concentración de prueba (200  $\mu\text{g/mL}$ ) y el efecto inhibitorio provocado por los diferentes tratamientos tampoco es dependiente de la concentración.

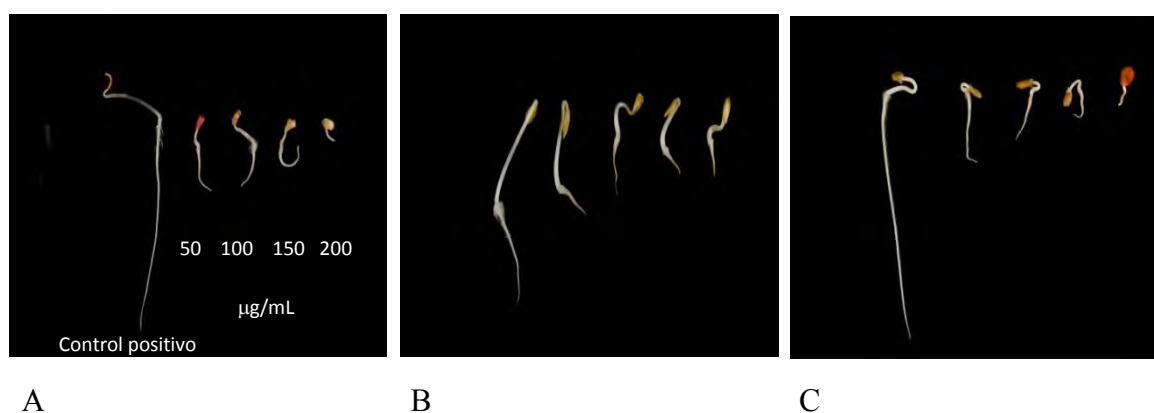
Cabe aclarar que las  $CI_{50}$  obtenidas para el herbicida comercial RIVAL<sup>®</sup> sobre el consumo de oxígeno de las tres plantas blanco son mayores a las demostradas por los extractos orgánicos de *Xylaria* sp. En todos los casos los valores de  $CI_{50}$  para el RIVAL<sup>®</sup> son mayores a 200  $\mu\text{g/mL}$ . Para *Amarantus hypochondriacus* el valor de  $CI_{50}$  es de 230  $\mu\text{g/mL}$ , para la planta de prueba *Lactuca sativa* fue de 255  $\mu\text{g/mL}$  y por último para *Lycopersicum esculentum* fue de 265  $\mu\text{g/mL}$ .

**Cuadro 18.** . Efecto de los extractos del medio de cultivo y micelio en condiciones de agitación sobre el consumo de oxígeno de tres plantas de prueba.

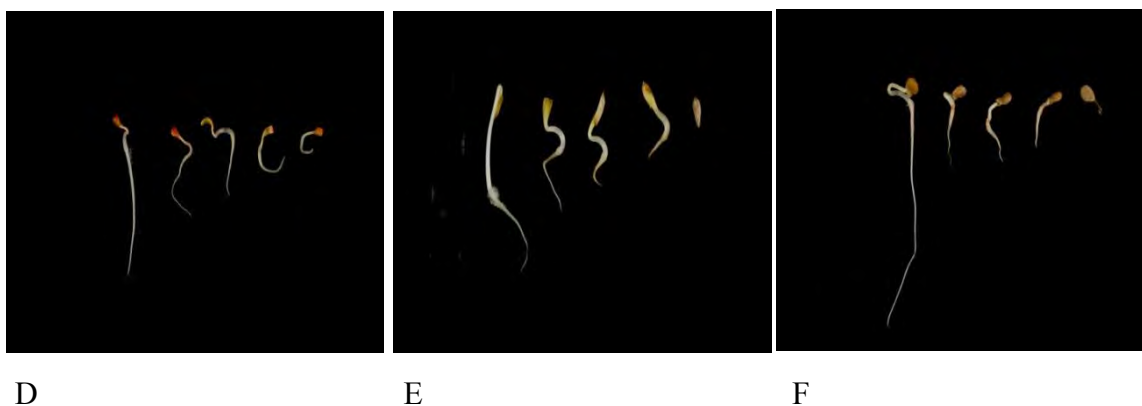
Tratamiento (µg/mL)	50	100	150	200	CI <sub>50</sub> µg/mL
Planta de prueba	% de inhibición sobre el consumo de oxígeno				
<b>Extracto del medio de cultivo</b>					
<i>A. hypochondriacus</i>	31.34±0.004*	37.53±0.01*	53.47±0.01*	54.82±0.01*	167.86
<i>L. sativa</i>	0.0	0.0	54.56±0.08*	57.33±0.06*	-----
<i>L. esculentum</i>	14.58±0.04	31.74±0.01*	58.40±0.03*	67.27±0.01*	132.17
<b>Extracto del micelio</b>					
<i>A. hypochondriacus</i>	35.8±0.05*	34.4±0.02*	33.7±0.02*	38.1±0.03*	> 200
<i>L. sativa</i>	0.0±0.02	18.05±0.03	31.57±0.01*	61.46±0.01*	191.03
<i>L. esculentum</i>	11.46±0.03	17.35±0.05	27.43±0.02*	39.0±0.03*	>200

\*n=4 p<0.05

Adicionalmente, en la Figura 24 se muestra el efecto fitotóxico provocado por los extractos del medio de cultivo y micelio, sobre la raíz de las tres plantas de prueba a las concentraciones evaluadas en los bioensayos de respiración. El crecimiento de la raíz de las tres plántulas es inhibido significativamente por todos los tratamientos, además se observa que las radículas crecen retorcidas en comparación con el control de crecimiento y que el número de raíces secundarias disminuye. Por otro lado, es importante mencionar que la coloración blanca de las raíces cambia a café, indicando un daño morfológico y fisiológico severo, este efecto es observado principalmente en las puntas de las radículas (Figura 25).



**Figura 24.** Efecto fitotóxico del extracto del medio de cultivo (A-C) y micelio (D-F) en condiciones estáticas sobre el crecimiento de la raíz de *Amaranthus hypochondriacus* (A y D), *Lactuca sativa* (B y E) y *Lycopersicon esculentum* (C y F).



**Figura 24.** Efecto fitotóxico del extracto del medio de cultivo (A-C) y micelio (D-F) en condiciones estáticas sobre el crecimiento de la raíz de *Amaranthus hypochondriacus* (A y D), *Lactuca sativa* (B y E) y *Lycopersicon esculentum* (C y F) (Continuación).



**Figura 25.** Acercamiento del efecto fitotóxico del extracto del medio de cultivo (A y B) y micelio (C) en condiciones estáticas sobre el crecimiento de la raíz de *Lycopersicon esculentum* (A) y *Lactuca sativa* (B y C).

#### 4. FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DE LOS EXTRACTOS ACTIVOS DEL MEDIO DE CULTIVO Y MICELIO EN CONDICIONES ESTÁTICAS (CULTIVO A MEDIANA ESCALA)

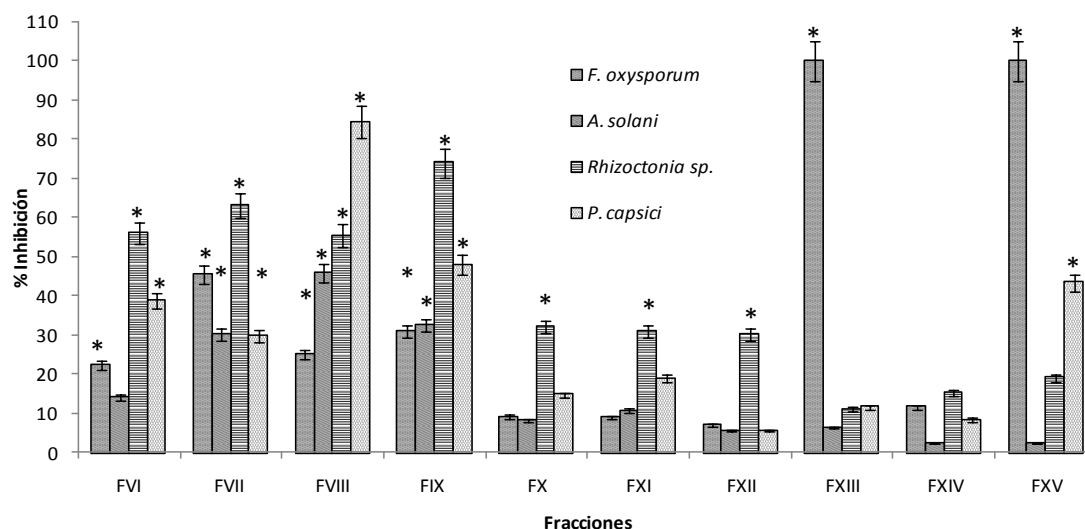
Una vez que se demostró el potencial aleloquímico de los extractos, se procedió al aislamiento de los metabolitos secundarios bioactivos a partir de los extractos derivados de los cultivos en mediana escala, utilizando un procedimiento biodirigido. Con base en los rendimientos y en la actividad biológica demostrada por los extractos orgánicos se seleccionaron a los extractos del medio de cultivo y micelio en condiciones estáticas. Como

ensayo de monitoreo de la actividad antifúngica y fitotóxica se utilizó el método de dilución en agar (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010).

El fraccionamiento biodirigido de los extractos activos del medio de cultivo (~6 g) y micelio (~4 g) utilizando cromatografía en columna abierta, permitió obtener 16 y 13 grupos de fracciones primarias, respectivamente. En los Cuadros 4 y 5 de la sección experimental, se presentan los rendimientos de las fracciones obtenidas. A continuación se describen los resultados obtenidos en la determinación del potencial aleloquímico de las fracciones primarias.

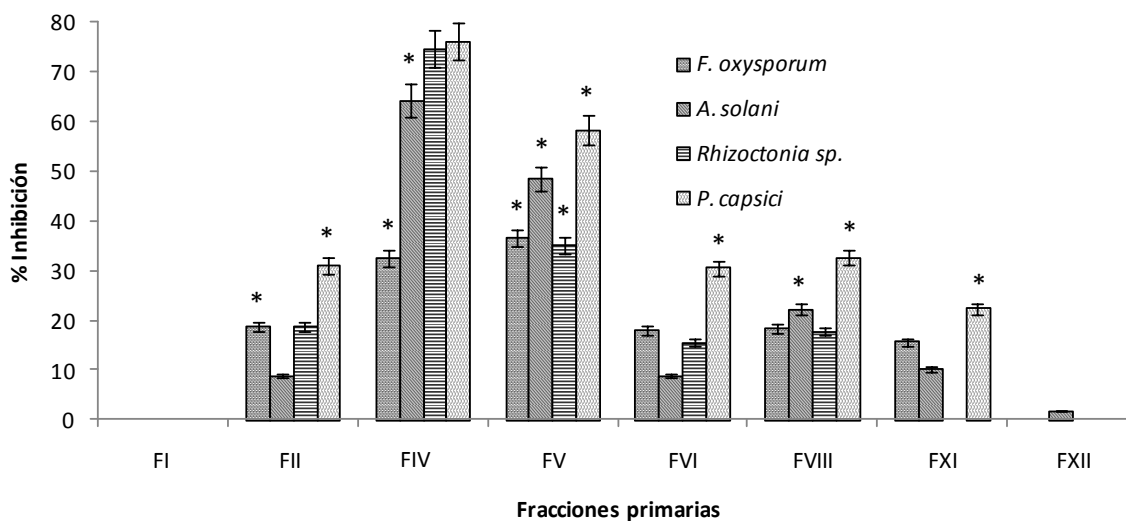
#### 4.1 ACTIVIDAD FUNGITÓXICA

En la Figura 26 se presenta la actividad antifúngica demostrada por las fracciones primarias evaluadas del extracto del medio de cultivo, sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *A. solani* y *P. capsici*. Las fracciones Me-VI a Me-IX presentan el mayor potencial antifúngico, en general, inhiben significativamente el crecimiento de todos los microorganismos de prueba. Las fracciones Me-X a Me-XII inhiben significativamente el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. y la fracción primaria Me-XIV no presenta actividad antifúngica sobre las especies evaluadas. Las fracciones Me-XII y Me-XV inhiben selectivamente el crecimiento de *F. oxysporum*, inhibiendo su crecimiento en un 100 %.



**Figura 26.** Efecto antifúngico de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo (Me), sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos

Por otra parte, en la Figura 27 se muestra la actividad antifúngica demostrada por las fracciones primarias evaluadas del extracto del micelio. Las fracciones Mi-IV y Mi-V inhiben significativamente el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, siendo mas importante el efecto inhibitorio de la fracción Mi-IV, con excepción de *F. oxysporum* el crecimiento de todos los microorganismos es inhibido mas del 60 %. Las fracciones Mi-II, Mi-VI, Mi-VIII y Mi-XI inhiben significativamente el crecimiento de *P. capsici*.

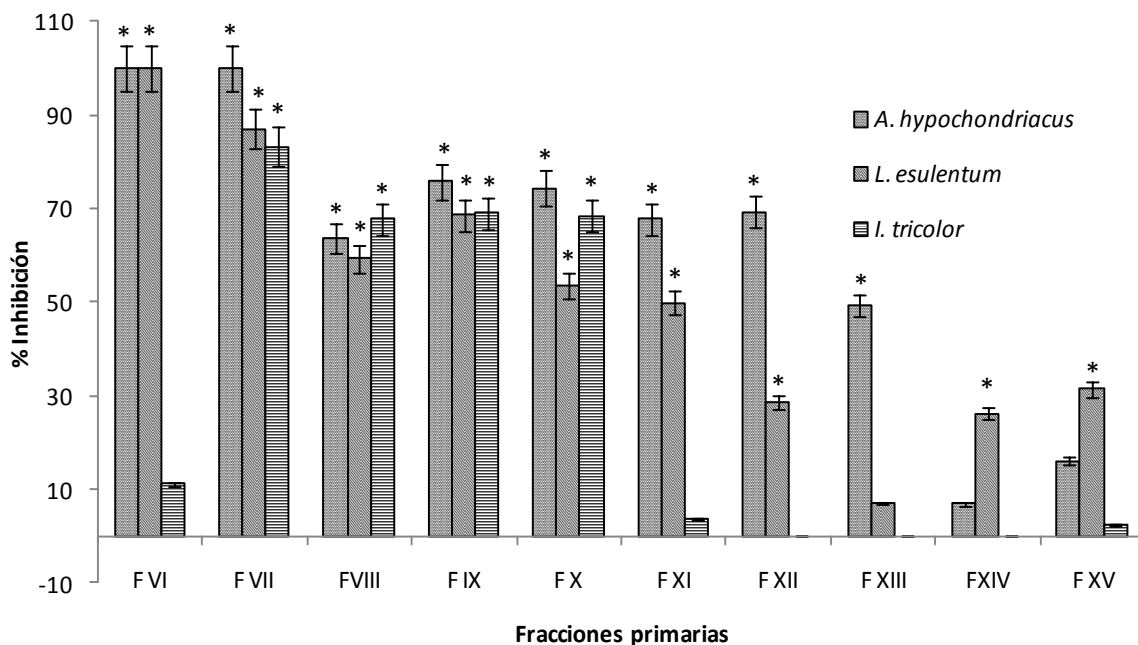


**Figura 27.** Efecto antifúngico de las fracciones primarias del extracto del micelio (Mi), sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos.

#### 4.2 ACTIVIDAD FITOTÓXICA

En la Figura 28 se presenta el efecto fitotóxico provocado por las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo, sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus*, *L. esculentum* e *I. tricolor*. Las fracciones Me-VI-Me-XII inhiben significativamente el crecimiento de la raíz de las tres plantas de prueba, en general, inhiben su crecimiento más del 50 %. Las semillas de *A. hypochondriacus* son las mas afectadas por la mayoría de los tratamientos, las fracciones Me-VI y Me-VII inhiben en un 100 % su crecimiento.

Al igual que los extractos del medio de cultivo y micelio, las fracciones primarias son mas activas sobre el crecimiento de plantas que sobre el de microorganismos.

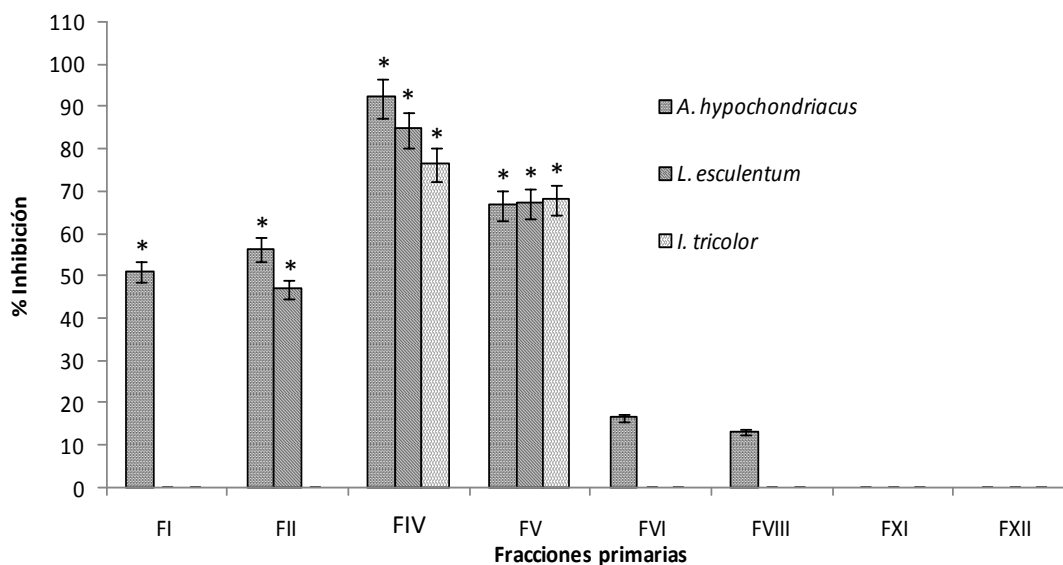


**Figura 28.** Actividad fitotóxica de las fracciones primarias del extracto del medio de cultivo (Me), sobre el crecimiento de tres plantas de prueba.

En la Figura 29 se observa que el efecto fitotóxico de las fracciones primarias del extracto del micelio, se concentró en las fracciones Mi-IV y Mi-V, éstas fracciones inhiben significativamente el crecimiento de las tres semillas de prueba, inhibiendo el crecimiento de la raíz más del 60 %. Los resultados de estas evaluaciones confirman que los metabolitos secundarios producidos por el hongo endófito *Xylaria* sp. poseen mayor potencial como agentes fitotóxicos que como fungitóxicos.

Debido a que las fracciones primarias menos polares no son solubles en un disolvente adecuado (MeOH, H<sub>2</sub>O o CH<sub>3</sub>OCH<sub>3</sub>) para realizar los bioensayos con microorganismos fitopatógenos y plantas, no se pudo determinar su potencial aleloquímico.





**Figura 29.** Actividad fitotóxica de las fracciones primarias del extracto del micelio (Mi), sobre el crecimiento de tres plantas de prueba.

Como producto del fraccionamiento biodirigido del extracto activo del micelio, utilizando diversos procedimientos cromatográficos, se aisló y purificó la punctaporonina B (**37**).

#### 4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES

La punctaporonina B (**37**) se aisló como un sólido cristalino incoloro, soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y con un punto de fusión de 187-188 °C. Su fórmula molecular se determinó por espectrometría de masas de alta resolución. El espectro de masas presenta un ión molecular en una relación de masa carga ( $m/z$ ) de 234 ( $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ ) [Figura 30] y permite establecer una fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3$ , la cual admite un índice de insaturación de cuatro (Cuadro 19). El espectro en el infrarrojo (IR) [Figura 31] de este compuesto presenta bandas de absorción asociadas con grupos hidroxilo ( $\nu_{\text{max.}} 3397 \text{ cm}^{-1}$ ), grupos metilo ( $\nu_{\text{max.}} 2962 \text{ cm}^{-1}$ ) y con la presencia de dobles enlaces ( $\nu_{\text{max.}} 3060 \text{ cm}^{-1}$ ) [Cuadro 19].

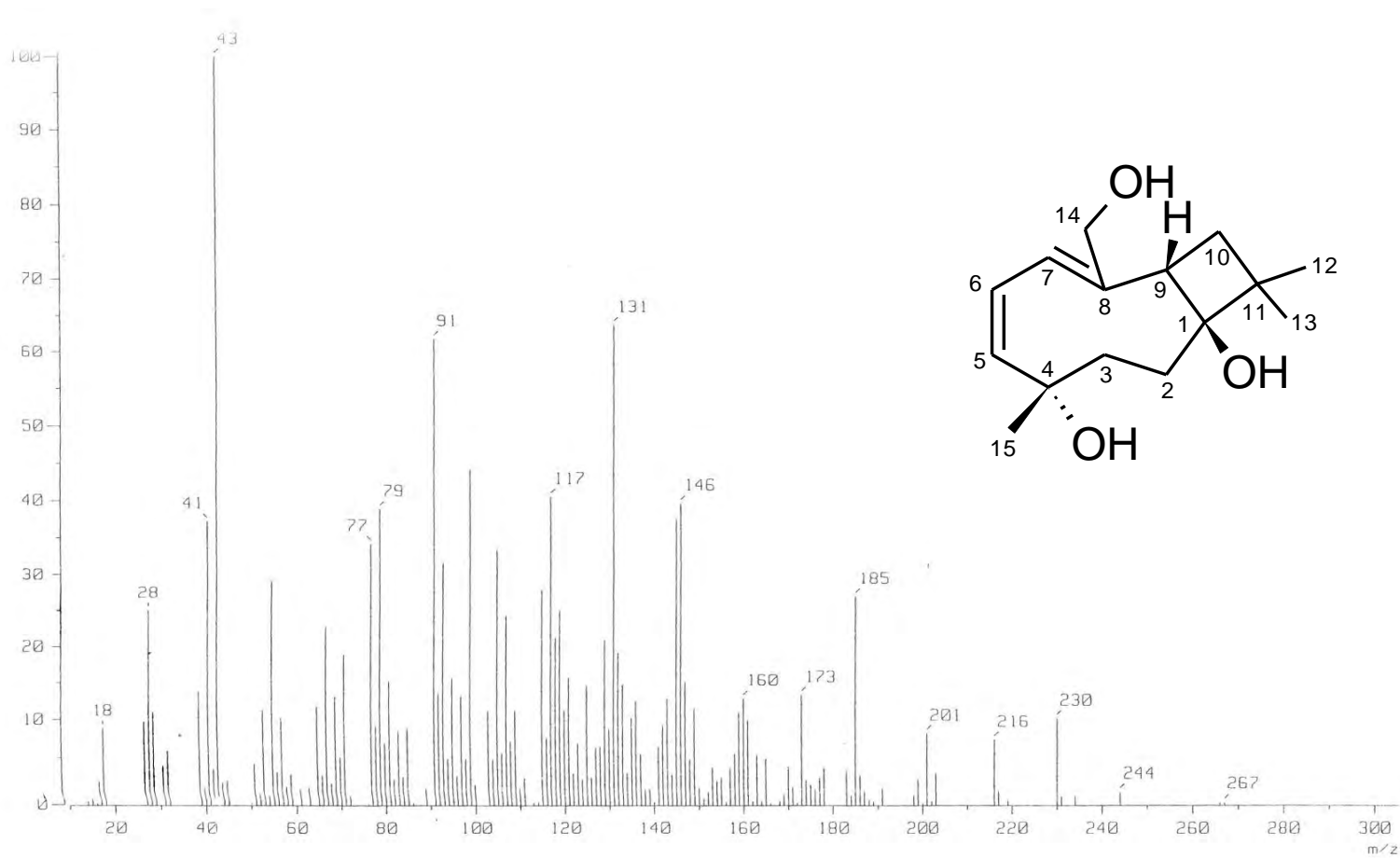
Los espectros de resonancia magnética unidimensionales ( $\text{RMN}-^1\text{H}$  y  $\text{RMN}-^{13}\text{C}$ ) y bidimensionales (HSQC, HMBC, COSY y NOESY) permitieron establecer que el producto natural contienen un núcleo cariofileno (Anderson et al., 1984b; Edward, *et al.*, 1989; Deyrup, *et al.*,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

- El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 32) presenta señales para 15 átomos de carbono en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas. El análisis del espectro en su modalidad DEPT permitió establecer que cuatro señales corresponden a metinos ( $\delta_C$  42.0, 123.2 y 125.4 142.5 ppm), cuatro a metilenos ( $\delta_C$  28.9, 33.2 ; 34.1 y 64.2), tres a grupos metilos ( $\delta_C$  22.3 , 24.0 y 31.4) y cuatro a carbonos cuaternarios ( $\delta_C$  40.4; 73.7, 80.1 y 139.7).[Cuadro 20, Figura 32].
- El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Cuadro 14, Figura 33) del compuesto **37** presenta señales para tres grupos hidroxilo en  $\delta_H$  3.53 (OH-1, s),  $\delta_H$  5.10 (OH- 4, s) y  $\delta_H$  5.5 (OH-14; *dd*).
- En la región de los protones vinílicos se encuentra un grupo de señales correspondientes a tres protones que conforman un sistema ABC [ $\delta_H \sim 5.67$  (CH-6) *dt*,  $J_1 = 13.2$ ,  $J_{2,3} = 2.7$  Hz;  $\delta_H$  5.80 *dt* (CH-7)  $J_1 = 3.2$ ,  $J_2 = 1.7$ ; y  $\delta_H$  5.80 *m* (CH-5)] y que correlacionan con los carbonos de los metino C-5 ( $\delta_C$  142.5), C-6 ( $\delta_C$  123.2) y C-7 ( $\delta_C$  125.4) en el espectro de correlación heteronuclear HSQC.
- A campo alto, el espectro presenta tres señales múltiples centradas en  $\delta_H$  1.57 (2 H), 1.84 (1 H) y 2.40 (1 H), asignables a los metilenos de carácter alifático CH<sub>2</sub>-2 y CH<sub>2</sub>-3 el núcleo base de la molécula, cada uno de ellos presenta una correlación en el espectro HSQC con los carbonos en  $\delta_C$  34.1 y 28.9, respectivamente. También se observa una señal múltiple y una señal doble de doble, la primera en  $\delta_H$  1.5 (*m*, H-1) y la segunda en 2.16 (*dd*,  $J_1 = 9.9$  Hz,  $J_2 = 12$  Hz, H-1) que integran cada una para un hidrógeno, asignables al metileno CH<sub>2</sub>-10 el cual correlaciona con la señal en  $\delta_C$  33.6 en el espectro HSQC, el segundo grupo de señales se aprecia en  $\delta_H$  3.88 (*dd*,  $J_1 = 5.1$  Hz,  $J_2 = 11.4$  Hz, H-1) y en  $\delta_H$  4.10 (*dt*,  $J_1 = 2.4$  Hz,  $J_2 = 11.1$  Hz, H-1) asignables al metileno CH<sub>2</sub>-14 del núcleo base y que se encuentra geminal a uno de los grupos hidroxilo evidenciado anteriormente ( $\delta_H$  5.50) y que muestra una correlación con la señal en  $\delta_C$  64.2 en el espectro HSQC. Finalmente, en esta zona del espectro se observa un señal en  $\delta_H$  3.45 (*dd*,  $J_1 = 9.9$  Hz,  $J_2 = 12$  Hz, H-1) que integra para un hidrógeno, asignable al metino CH-9, el cual correlaciona con la señal en  $\delta_C$  42.0 en el espectro HSQC (Cuadro 14).

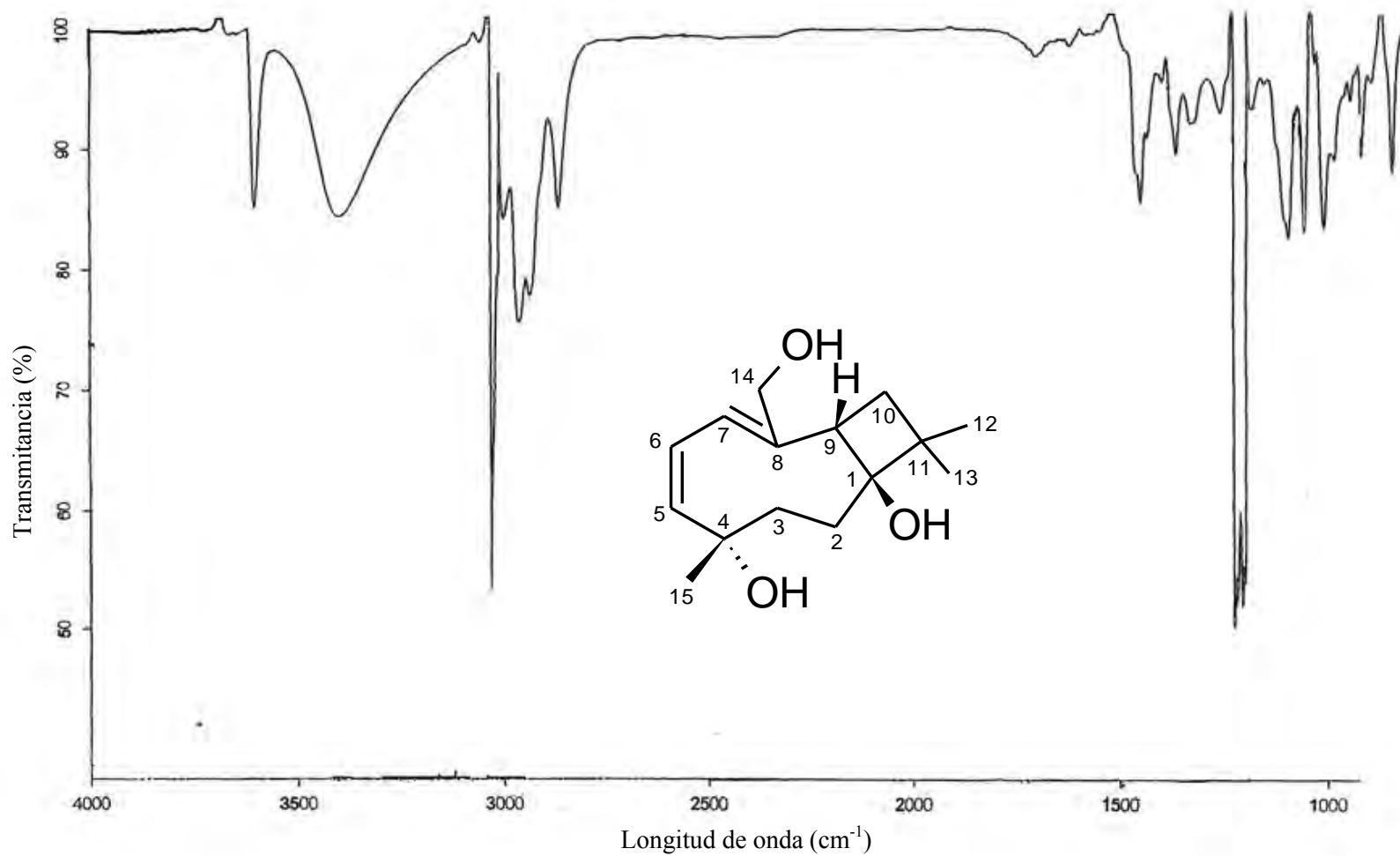
- En  $\delta_H$  1.00, 1.11 y 1.20 se observan tres señales simples atribuibles a tres grupos metilo cada uno de ellos presenta una correlación con los carbonos en  $\delta_C$  22.3, 24.0 y 31.4, respectivamente (Cuadro 20).
- Finalmente, los carbonos restantes observados en el espectro de RMN- $^{13}C$  se asignaron a cuatro carbonos cuaternarios en  $\delta_C$  73.7 (C-1), 80.2 (C-4), 139.7 (C-8) y 40.4 (C-11). De acuerdo con los desplazamientos químicos observados, dos de estos carbonos se encuentran unidos a funciones oxigenadas (C-1, C-4) [Cuadro 20].
- Con base en el análisis espectroscópico anterior, la estructura del producto natural (**37**) se estableció como la de la punctaporonina B (Figura 34). Cabe señalar que todos los datos espectroscópicos del producto natural **37** se encuentran en armonía con los descritos previamente en la literatura (Anderson *et al.*, 1984 y 1988; Edward *et al.*, 1989)

**Cuadro 19.** Constantes espectroscópicas de IR, y espectrométricas de la punctaporonina B (**37**).

<b>IR <math>\nu_{max}</math>. (KBr) <math>cm^{-1}</math></b>	<b>3397, 2962, 3060</b>
<b>EM-IE m/z (intensidad relativa)</b>	43 (100), 131 (63), 91 (61), 117 (39), 146 (38), 79 (37), 41 (36), 77 (34), 185 (26), 28 (25), 173 (13) , 160 (12), 230 (12), 18 (11), 201 (9), 216 (8), 234 (1)



**Figura 30.** Espectro de masas de la punctaporonina B (37)



**Figura 31.** Espectro de IR de la punctaporonina B (37)

Punctaporonina B				
13C		1H ( $\delta$ , mult., <i>J</i> en Hz)		
Posición	ppm	ppm	COSY	HMBC
1	73.7	-----		
2a	34.1	2.40 ( <i>m</i> , 1H)		
2b		1.57 ( <i>m</i> , H2)		
3a	28.9	1.84 ( <i>m</i> , 1H)		
3b		1.57 ( <i>m</i> , 2H)		
4	80.1	-----		
5	142.5	5.80 ( <i>m</i> , 1H)		H15, OH-14
6	123.2	5.67 ( <i>dt</i> , 13.2, 2.7, 1H)		
7	125.4	5.80 ( <i>dt</i> , 13.2, 1.7, 1H)		H14, H9
8	139.7	-----		
9	42.0	3.45 ( <i>dd</i> , 12, 8.1, 1H)		H14, H7
10a	33.2	2.16 ( <i>dd</i> , 12, 9.9, 1H)	H12	
10b		1.5 ( <i>m</i> , 1H)		
11	40.4	-----		
12	24.0	1.11 ( <i>s</i> , 3H)	H10	
13	22.3	1.00 ( <i>s</i> , 3H)		
14 a	64.2	3.88 ( <i>dd</i> , 11.4, 5.1)		
14 b		4.10 ( <i>dt</i> , 11.1, 2.4)		
15	31.4	1.20 ( <i>s</i> , 3H)	H5	
OH-1		3.53 ( <i>s</i> )		
OH-4		5.1 ( <i>s</i> )	H5	
OH-14		5.50 ( <i>dd</i> , 3.6, 5.0, 1H)		

**Cuadro 20** Datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  y DMSO), de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$  y DMSO) de la punctaporonina B (**37**) y principales correlaciones de los espectros COSY y HMBC.

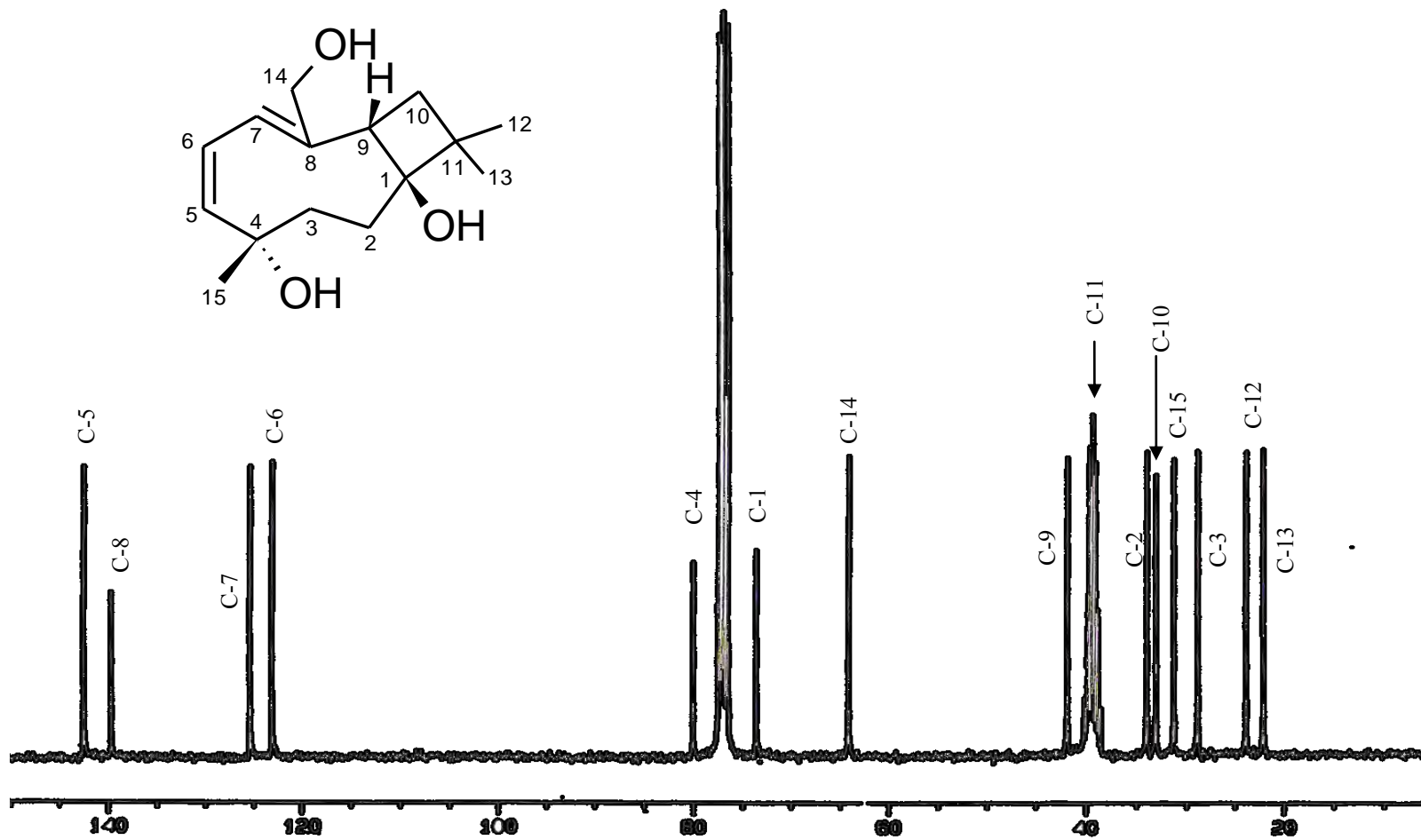


Figura 32. RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, CDCl<sub>3</sub> y DMSO) de la punctaporonina B (37)

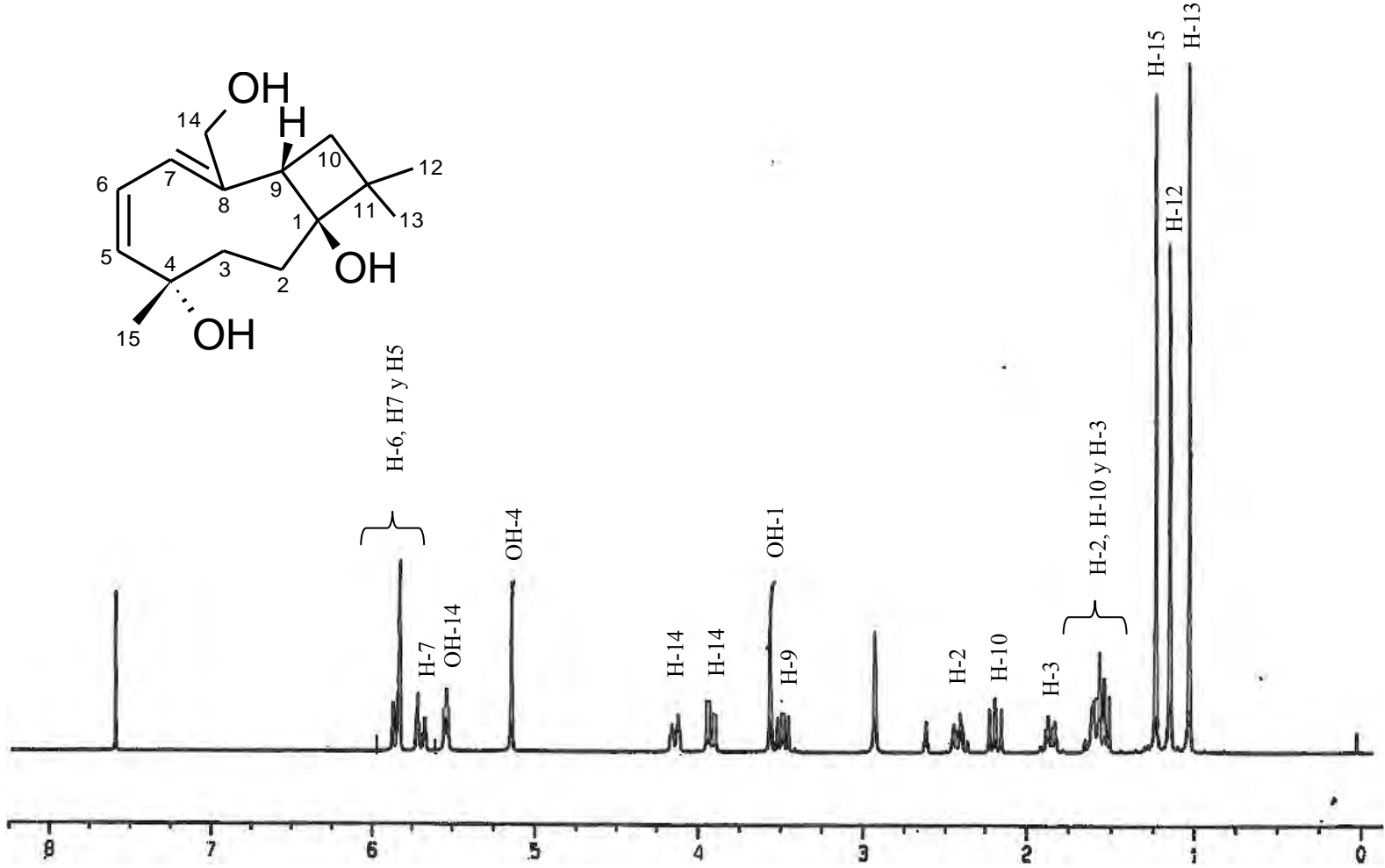
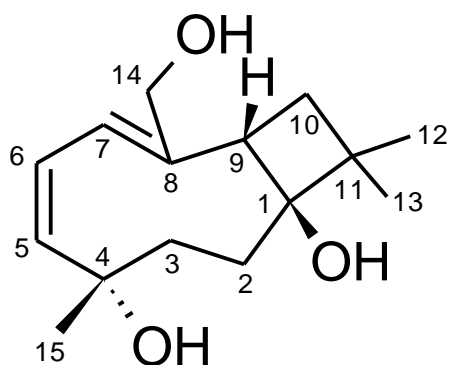


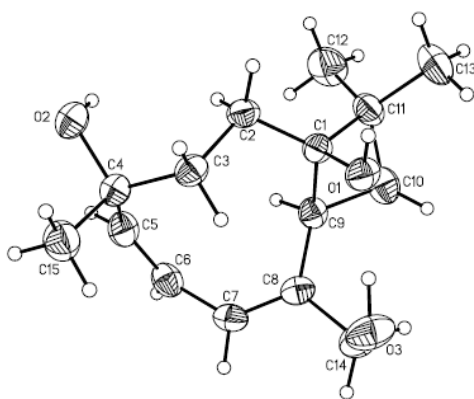
Figura 33. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  y DMSO) de la punctaporonina B (37)





**Figura 34.** Estructura de la punctaporonina B (37)

La estructura de punctaporonina B (37) se confirmó de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X. En la Figura 35 se muestra una vista estereoscópica de este compuesto.



**Figura 35.** Vista estereoscópica de la punctaporonina B (37)

La punctaporonina B (37) ha sido aislada previamente a partir del hongo coprófilo *Poronia punctata* (Anderson *et al.*, 1984a; Anderson *et al.*, 1984b) y de los saprófitos *Hipoxylon terrícola* (Edward *et al.*, 1989) y *Pestalotiopsis disseminata* (Dryp, *et al.*, 2006). En diversas fuentes se menciona que la punctaporonina B tiene actividad antimicrobiana, sin embargo, no mencionan los microorganismos evaluados ni proporcionan los datos de concentración mínima inhibitoria (Anderson *et al.*, 1984a; Edward *et al.*, 1989).

## VII. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en los bioensayos de antagonismo directo entre el hongo endófito *Xylaria* sp. y sus competidores indican que *Xylaria* sp. presenta una actividad fungitóxicas marcada sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos y una interacción más competitiva con los hongos endófitos, sugiriendo así que su papel ecológico puede estar relacionado con la defensa de su planta hospedera, mediante la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica, o bien, inhibiendo directamente la colonización de los microorganismos fitopatógenos. Es necesario realizar estudios posteriores para fortalecer esta hipótesis.
- Las observaciones microscópicas realizadas en las zonas de interacción antagónica también permiten sugerir que las relaciones entre los microorganismos evaluados son mediadas principalmente por los metabolitos secundarios que produce *Xylaria* sp., es decir, en condiciones de antagonismo es probable que *Xylaria* sp. incremente la producción de metabolitos secundarios bioactivos que se difunden en el medio de cultivo inhibiendo el crecimiento de sus competidores. Asimismo, son los responsables de inducir mecanismos de defensa en el microorganismo competidor, dando como resultado diferentes cambios morfológicos, por ejemplo, la mayor producción de vacuolas observada en la interacción antagónica con *Alternaria solani*.
- La determinación de las condiciones óptimas de crecimiento del hongo endófito *Xylaria* sp. permitieron establecer que *Xylaria* sp. crece adecuadamente en caldo papa dextrosa en condiciones de incubación estáticas y con agitación, incubándolo por un período de 30 días, con fotoperiodo de luz artificial oscuridad 12:12 hrs., a 28 °C.

- Los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito *Xylaria* sp. poseen actividad antifúngica significativa sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Pestalotiopsis* sp., *Rhizoctonia* sp. y el aislamiento C<sub>5</sub>F<sub>3</sub>, confirmando que los metabolitos secundarios producidos por *Xylaria* sp. son los responsables del potencial antagónico demostrado por *Xylaria* sp. en los bioensayos de antagonismo directo.
- Los extractos del medio de cultivo y micelio de *Xylaria* sp. también presentan actividad biológica significativa sobre el crecimiento de la raíz de *Amaranthus hypochondriacus*, *Lycopersicon esculentum* e *Ipomoea tricolor*. En general, los extractos orgánicos evaluados presentan mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las plantas de prueba que sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos evaluados.
- Los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de *Xylaria* sp., inhiben significativamente la respiración durante el proceso de germinación de las tres plantas objeto de evaluación. En general, todos los tratamientos inhiben más de 50 % el consumo de oxígeno a la máxima concentración de prueba. Sin embargo, en la mayoría de los casos el efecto inhibitorio sobre la respiración no es dependiente de la concentración, observándose un claro efecto de saturación. Los valores de CI<sub>50</sub> obtenidos para inhibición del crecimiento de la raíz y la respiración celular parecen indicar que el principal mecanismo de fitotoxicidad no es la respiración ya que los valores de IC<sub>50</sub> de esta última, son mayores que los obtenidos sobre la inhibición de crecimiento de la raíz de las plantas de prueba.
- El estudio químico biodirigido del extracto activo del medio de cultivo del hongo endófito *Xylaria* sp. permitió el aislamiento y caracterización de un sesquiterpeno; la puntaporonina B y la identificación de una familia de compuestos de alcaloides.

- El potencial aleloquímico demostrado por los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de *Xylaria* sp. permiten proponerlo como un posible agente de biocontrol y como un candidato para el posible desarrollo de agroquímicos alternativos de origen natural.
- El presente proyecto constituye una contribución al conocimiento de las posibles relaciones ecológicas que establece *Xylaria* sp. con otros microorganismos endófitos y fitopatógenos de su misma planta hospedera, así como, al posible papel de sus metabolitos secundarios en estas complejas relaciones. Los estudios sobre la química ecológica de los hongos endófitos además de permitir el conocimiento de las relaciones que se establecen entre los microorganismos colonizadores de una planta, aportan información valiosa para la búsqueda de nuevas estructuras químicas con actividad biológica y posible utilidad en la agricultura.

## VIII. PERSPECTIVAS

- Clasificar taxonómicamente hasta especie al hongo endófito *Xylaria* sp. aislado de *Callicarpa acuminata* mediante la aplicación de técnicas moleculares.
- Aislar y purificar a los metabolitos secundarios de naturaleza alcaloidea responsables de la actividad antifúngica y fitotóxica demostrada por los extractos orgánicos y fracciones cromatográficas del cultivo en mediana escala de *Xylaria* sp.
- Determinar cuantitativamente el efecto antifúngico y fitotóxico (incluyendo a *Callicarpa acuminata*) de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas de los extractos orgánicos de *Xylaria* sp.
- Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas y de difracción de rayos X.
- Evaluar el potencial antibacteriano, antifúngico y fitotóxico de la Punctaporonina B.
- Determinar el efecto citotóxico de los extractos y de los aleloquímicos aislados sobre diversas líneas celulares con la finalidad de establecer posibles efectos tóxicos sobre el hombre y los animales.
- Profundizar en el estudio del papel ecológico de los distintos metabolitos secundarios en las complejas relaciones que establece *Xylaria* sp. con su planta hospedera.

**IX. BIBLIOGRAFÍA**

- Abate Dawit, Wolf-rainer Abraham y Holger Meyer. 1997. **Cytochalasins and phytotoxins from the fungus *Xylaria obovata***. *Phytochemistry*, 44, 1443-1448.
- Aide T. 1993. **Patterns of leaf development and herbivory in a tropical understudy community**. *Ecology Monography*, 74, 455-466.
- Anaya L. 2003. **Ecología Química**. Editorial Plaza y Valdez. México, D.F.
- Anderson, J. R., Edwards. R. L. Freer. A. A.. Mabelis. R. P.. Poyser. J. P..Spencer. H. y: Whalley A. J. S. 1984. **Punctatins B and C (antibiotics M95154 and M951560: further sesquiterpene alcohols from the fungus *Poronia punctata***. *Journal of the Chemical Society. Chemical Communications*, 1, 917-919.
- Anderson J., Briand C., Edwards R., Mabelis R., Poyser J.,Spencer H., Whalley A. 1984. **Punctaporin A (Antibiotic M95464): X-Ray crystal structure of sesquiterpene alcohol with a new carbon skekleton from fungus *Poronia puntata***. *Journal of the Chemical Society. Chemical Communications*.1, 405-406.
- Arias-Estévez Manuel, López-Periago Eugenio, Elena Martínez-Carballo Elena, Simal-Gándara Jesús, Mejuto Juan-Carlos, García-Río Luis. 2008. **The mobility and degradation of pesticidas in soils and the pollution of groundwater resources**. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 123, 247–260.
- Arnold, A.Elizabeth, Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D., Kursar, T.A., 2000. **Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?** *Ecology Letters*, 3, 267–274.
- Arnold A. Elizabeth. 2002. **Fungal endophytes in neotropical trees: abundance, diversity, and ecological interactions**. PhD dissertation thesis, Tucson, AZ, USA:University of Arizona.
- Arnold A. Elizabeth y Lutzon F..2007. **Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?** *Ecology*, 88, 541–549.
- Bayman P., Angulo-Sandoval P., Báez-Ortiz Z. and Lodge J. 1998. **Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico**, *Mycological Research* 102, 944–948.
- Bills, G. F. 1995. **Analyses of microfungal diversity from a users perspective**. *Canadian Journal of Botany* 73, 33-41.
- Bitzer, J., Laessøe, T., Fournier, J., Kummer, V., Decock, C., Tichy, H., Piepenbring, M., Peršoh, D. and Stadler, M. (2008). **Affinities of *Phylacia* and the daldinoid *Xylariaceae*, inferred from chemotypes of cultures and ribosomal DNA sequences**. *Mycological Research*, 112, 251-270.

- Boonphong Surat, Kittakoo Prasat, Isaka Masahiko, Pittayakhajonwut Daraporn, Tanticharoen Morakot, y Thebtaranonth Yodhathai. 2001. **Multiplolides A and B, New Antifungal 10-Membered Lactones from *Xylaria multiplex***. Journal of Natural Products, 64, 965-967.
- Boonphong Surat, Kittakoo Prasat, Isaka Masahiko, Pittayakhajonwut Daraporn, Tanticharoen Morakot, y Thebtaranonth Yodhathai, 2001. **Multiplolides A and B, New Antifungal 10-Membered Lactones from *Xylaria multiplex***. Journal of Natural Products, 64, 965-967
- Caissard Jean-Claude, Meekijjironroj Aroonrat, Sylvie Baudino, y Ansett Marie Charlotte. 2004. **Localization of production and emission of pollinator attractant on whole leaves of *chamaerops humilis* (arecaceae)**. American Journal of Botany, 91, 1190–1199
- Carroll, G. 1988. **Fungal endophytes in stems and leaves from latent pathogen to mutualistic symbiont**. Ecology, 69, 2-9.
- Chapela, I. H., Dreyfuss, M. M. 1994. **Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals**. In *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*, 49-80. Butterworth- Heinemann, London.
- Clay Keith y Holah Jenny. 1999. **Fungal Endophyte Symbiosis and Plant Diversity in Successional Fields**. *Science* 285, 1742-1744
- Clay Keith., Holah J, y Rudgers J. A. 2005. **Herbivores cause a rapid increase in hereditary symbiosis and alter plant community composition**. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 12465
- Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. 1997. **Natural products in drug discovery and development**. Journal of Natural Products, 60, 52-60.
- Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Yang, S. S. 2006. **Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience**. Journal of Natural Products, 69, 488-498.
- Crock, J., M. Wildung, y Croteau R.. 1997. **Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone**. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 12833-12838.
- Coley P. 1983. **Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical Forest**. *Ecol. Monog*, 53, 209-233.
- Daferner, M., Mensch, S., Anke, T. and Sterner, O. 1999. **Hypoxysordarin, a new sordarin derivative from *Hypoxylon croceum***. *Zeitschrift für Naturforschung*, 54: 474-480.
- Dagne E., Asmellash, S., Abate, D., Gunatilaka, A. A. L. and Kingston, G. D. I., 1994, . **Two new cytotoxic cytochalasins from *Xylaria obovata***. *Tetrahedron*, 50, 5615.

- Davis Christine, Franklin Joseph B Shaw Jonathan, y Vilgalys Rytas. 2003. **Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution and symbiosis.** American Journal of Botany, 90, 1661–1667.
- Davis Rohan A. 2005. **Isolation and Structure Elucidation of the New Fungal Metabolite (-)-Xylariamide A.** *J. Nat. Prod.*, 68, 769-772.
- Darkes M.J.M., Plosker G.L., 2002. Cefditoren pivoxil. *Drugs* 62: 319–336. de Bary A, 1866. *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten.* Engelmann, Leipzig.
- Demain, A. L. 2000. **Microbial natural products: A past with a future,** 3–16. In S. K. Wrigley, M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Chrystal, and N. Nicholson (ed.), *Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries.* The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra.
- Deyrup T. Stephen, Swenson Dale C., Gloer James B. y Wicklow Donald T. Caryophyllene 2006. **Sesquiterpenoids from fungicolous isolate of *Pestalotipsis disseminata*.** *Journal of Natural Products.* 69, 608-611
- Deyrup Stephen T., Gloer James B., O'Donnell Kerry, y Wicklow Donald T.. 2007. **Kolokosides A-D: Triterpenoid Glycosides from a Hawaiian Isolate of *Xylaria* sp.** *J. Nat. Prod.*, 70, 378-382.
- Paul M. Dewik. 2009. **Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach.** Ed. Wiley. Inglaterra, pp 7-31
- Edwards R., Maitland D., 1989. **Metabolites of the higher fungi. Cytochalasin N, O, P, Q, and R. new cytochalasin from the fungus *Hypoxylon terricola* Mill.** *Journal of Chemistry Society Perkin*, 57-65.
- Eriksson, O.E. 2007. **Outline of Ascomycota.** *Myconet*, 13, 1-58
- Ernst Michael, Mendgen Kurt W. y Wirsel Stefan G. R.. 2003. **Endophytic Fungal Mutualists: Seed-Borne *Stagonospora* Spp. Enhance Reed Biomass Production in Axenic Microcosms.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 580–5.
- Espada A., Rivera-Sagredo A., De La Fuente J. M., Hueso-Rodriguez J. A., Elson S. W. 1997. **New Cytochalasins from the Fungus *Xylaria hypoxylon*.** *Tetrahedron*, 53, 6485-6492.
- Fang Xu, Yi Zhang, Jiajun Wang, Jiyan Pang, Caihuan Huang, Xiongyu Wu, Zhigang She, L. L. P. Vrijmoed, E. B. Gareth Jones, and Yongcheng Lin , 2008. **Benzofuran Derivatives from the Mangrove Endophytic Fungus *Xylaria* sp. (#2508).** *Journal of Natural Products*, 71, 1251–1253
- Feng Zhu, Xin Chen, Yihua Yuan, Meizhen Huang, Huili Sun and Wenzhou Xiang. 2009. **The Chemical Investigations of the Mangrove Plant *Avicennia marina* and its Endophytes.** *The Open Natural Products Journal.*, 2, 24-32
- Furtado, N. A. J. C. 2004. **Estudo sobre as condições de produção e as atividades antibiótica e antichagásica de substâncias isoladas de *Aspergillus fumigatus*.**



- Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Fröhlich, J. & Hyde, K. D. 1999. **Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic?**. *Biodiversity and Conservation* 8: 977-1004
- Gavrilescu M. 2005. **Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation**. *Engineering in Life Science*, 5, 497–526.
- Gamboa, M. A. y P. Bayman. 2001. **Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (Guarea guidonia: Meliaceae)**. *Biotropica*, 33, 352–360.
- Gamboa M. A. 2006. **Hongos endófitos: Conocimiento actual y perspectivas**. *Acta biológica colombiana*, 11, 3-20
- Ganley Rebecca J., Brunsfeld Steven J. y Newcombe George. 2004. **A community of unknown, endophytic fungi in western white pine**. *PNAS* 101, 10107–10112
- Guo, B., J. Dai, S. Ng, Y. Huang, C. Leong, W. Ong, and B. K. Carte. 2000. **Cytotoxic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species**. *J. Nat. Prod.* 63:602–604.
- Hanson James R. 2003. **Natural Products. The secondary metabolites**. The royal Society of Chemistry. Italy.
- Hayes, R. Thomas, E. J. T. Chrystal, and N. Nicholson. **Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom.
- Hawksworth, D. L. 1991. **The fungal dimension of biodiversity : magnitude, significance, and conservation**. *Mycological Research* 95: 641-655.
- Hawksworth, D. C., and A. Y. Rossman. 1987. **Where are the undescribed fungi?** *Phytopathology*, 87,888-891.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. y Pegler, D.N. 1995. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th edition**. CAB International, Oxon, UK.
- Hawksworth. 2000. **The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited** *Mycological Research*, 105, 1422-1432
- Isaka, M., Jaturapat, A., Kladwang, W., Punya, J., Lertwerawat, Y., Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y. 2000. **Antiplasmodial compounds from the wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC 1067**. *Planta Medica*, 66, 473-47.
- Jayasuriya Hiranthi, Herath Kithsiri B., Ondeyka John G., Polishook Jon D., Bills Gerald F., Dombrowski Anne W., Springer Marty S., Siciliano Sal, Malkowitz Lorraine, Sanchez Manuel, Guan Ziqiang, Tiwari Suroojnauth, Stevenson Dennis W., Borris Robert P., y Singh Sheo B. 2004. **Isolation and Structure of Antagonists of Chemokine Receptor (CCR5)**. *Journal of Natural Products*, 67, 1036-1038.

- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and Stalpers, J.A. 2001. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**, 9th ed. CABI International University Press, Wallingford, UK
- Kodsueb, R., McKenzie, E.H.C., Lumyong, S. and Hyde, K.D. 2008. **Fungal succession on woody litter of *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae)**. Fungal Diversity, 30, 55-72.
- Laseøee T., y D.J Rogers 1994. **Tree host specific *Xylaria* species**. Mycologia, 86, 436-446.
- Lee, J., E. Lobkovsky, N. B. Pliam, G. A. Strobel, y J. Clardy. 1995. **Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans***. J. Org. Chem, 60,7076–7077.
- Lee J. S, Ko Kwan Soo, y Jung Hack Sung. 2000. **Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences**. FEMS Microbiology letters, 187, 89-93.
- Léveillé JH.1946. **Considérations mycologiques suivis d'une nouvelle classification des champignons**. Paris;
- Lin Yongcheng, Wu Xiongyu, Feng Shuang, Jiang Guangce, Luo Jinghui, Zhou Shining, Vrijmoed L. L. P., Jones E. B. G., Krohn Karsten, Steingro Klaus y Zsila Ferenc. 2001. **Five Unique Compounds: Xyloketal from Mangrove Fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea Coast**. J. Org. Chem, 66, 6252-6256.
- Liu Xiaoli, Dong Mingsheng, Chen Xiaohong, Jiang Mei, Lu Xin y Zhou Jianzhong. 2007. **Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin**. Appl Microbiol Biotechnol, 78, 241–247
- Liu Xiaoli, Dong Mingsheng, Chen Xiaohong, Jiang Mei, Lu Xin y Yan Guijun. 2007. **Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba***. Food Chemistry, 105, 548–554
- Lodge, D. J., P. J. Fisher, and B. C. Sutton. 1996. **Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico**. Mycologia, 88, 733–738.
- Lodge, D. J. 1997. **Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests**. Biodiversity and Conservation, 6, 681-688.
- Lodge JD. 2001. **World and regional diversity of fungi**. In: Hernández HM, García-Aldrete A., Álvarez F., Ulloa M., eds. Contemporary approaches for the study of biodiversity. México: Instituto de Biología, UNAM, 291–304.
- Lu Xi-lin, Yao Xiao-li, Liu Zhiyong, Zhang Heng, Li Wei, Li Zhenxing, Wang Guan-Lei, Pang Jiyan, Lin Yongcheng, Xu Zhongliang, Chen Ling, Pei Zhong, y Zeng Jinsheng. 2010. **Protective effects of Xyloketal B against MPP+-induced neurotoxicity in *C. elegans* and PC12 cells**. Brain research, 1332, 110-9
- Macias Rubalcava, M., Hernández, B. B., Jiménez, E. M., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., Hernández, O. S. Saucedo, G. A., Muria, G. J., Anaya, A. L. 2008

- Naftoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*.** *Phytochemistry*, 69, 1185.
- Margaleff, R. 1980. **Ecología.** Ediciones Omega. S.A., Barcelona, España.
- Martin, P. 1970. **Studies in the Xylariaceae: VIII. *Xylaria* and its allies.** *J. S. African. Bot.* 36, 73.
- Mejía Luis C., Rojas Enith I., Maynard Zuleyka, Van Bael Sunshine, Arnold A. Elizabeth, Hebbar Prakash, Samuels Gary J., Robbins Nancy y Allen Herrera Edward. 2008. **Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens.** *Biological Control*, 46, 4-14.
- Miller J. David, Mackenzie Sabrena, Foto Mark, Adams Gregory W. y Findlay John A.. 2002. **Needles of white spruce inoculated with rugulosin-producing endophytes contain rugulosin reducing spruce budworm growth rate.** *Mycol. Res.*, 106, 471-479.
- Mitterneier, R.A.. N. Meyers, P.R. Gil y C.G. Mitterneier, 1999. **Hostpots: Earth's biologically richest and most endangered ecoregions.** Toppan printing Co. Jappan.
- Molisch, H. 1937. **Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie.** Jena, Fischer.
- Murià González M. J. 2007. **Búsqueda de actividad antifúngica y fitotóxica en algunos hongos endófitos aislados de hojas de árboles de la selva mediana subperenifolia de Quintana Roo.** (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
- Nilsson, T., Daniel, G., Kirk, T. K. y Obst, J. R. 1989. **Chemistry and microscopy of wood decay by some higher ascomycetes.** *Holzforschung*, 43, 11-18.
- Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Sanfuentes, E. and Rodríguez, J. 2008. **Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay.** *Fungal Diversity*, 33, 77-86.
- Petrini y Brunner F. O. 1991 **Taxonomy of some *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis.** *Mycological Research*, 96, 723.
- Petrini, O., Petrini, L. E. & Rodrigues, K. F. 1995. **Xylariaceous endophytes.** *Fitopatologia Brasileira*. 78, 93-98
- Pichersky, E., y Gershenzon J. 2002. **The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense.** *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 237-243.
- Pinruan, U., Hyde, K.D., Lumyong, S., McKenzie, E.H.C. and E.B.G. Jones .2007. **Occurrence of fungi on tissues of the peat swamp palm *Licuala longicalycata*.** *Fungal Diversity*, 25, 157-173.
- Pinto, L. S. R. C., J. L. Azevedo, J. O. Pereira, M. L. C. Vieira, y C. A. Labate. 2001. **Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency.** *New Phytologist*, 147, 609-615.

- Pittayakhajonwut Pattama, Usuwat Atit, Intaraudom Chakapong, Veeranondha Sukitaya, Srikitikulchai Prasert. 2009. **Sesquiterpene Lactone 12,8-Eudesmanolides from the Fungus *Xylaria ianthinovelutina***. Publicación en línea. Planta Médica.
- Pongcharoen Wipapan, Rukachaisirikul Vatcharin, Isaka Masahiko, y Sriklun Kanlayanee. 2007. **Cytotoxic Metabolites from the Wood-Decayed Fungus *Xylaria* sp. BCC 9653**. Chem. Pharm. Bull, 55,1647-1648.
- Pongcharoen Wipapan, Rukachaisirikul Vatcharin, Phongpaichit Souwalak, Kühn Till, Pelzing Matthias, Sakayaroj Jariya, Taylor Walter C.. 2008. **Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14**. Phytochemistry,69, 1900-1902.
- Quang, D.N., Stadler, M., Fournier, J. and Asakawa, Y. 2006. **Carneic Acids A and B, Chemotaxonomically Significant Antimicrobial Agents from the xylariaceous ascomycete *Hypoxylon carneum***. Journal of Natural Products 69:1198-202
- Redell P., and V. Gordon. 2000. **Lessons from nature: can ecology provide new leads in the search for novel bioactive chemicals from rainforests?**, In S. K. Wrigley, M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Chrystal, and N. Nicholson (ed.), Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, United Kingdom, 205–212.
- Redman Regina S., Sheehan Kathy B., Stout Richard G., Rodriguez Russell J. y Henson Joan M.. 2001. **Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis**. Science, 298, 1581.
- Rice E. 1984. **Allelopathy**, 2da ed. Academic Press, Orlando, FL.
- Rizvi, S.J.H.; Haque, H.; Singh,U.K. y Rizvi, V. 1992. **A discipline called allelopathy**. in: Rizvi, S.J.H. y Rizvi, H. (Eds.) Allelopathy: Basic and applied aspects. London, Chapman & Hall, 1-10.
- Rizvi, S.J.H. & Rizvi, V. 1992 **Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity**. In: RIZVI, S.J.H. & RIZVI, H. Allelopathy: Basic and applied aspects. London, Chapman & Hall, 443-472.
- Rodriguez, E., y Levin D. A. 1976. **Biochemical parallelism of repellent and attractants in higher plants and arthropods**. In J. W. Wallace and R. L. Mansell, Biochemical interaction between plants and insects, 214–270. Plenum, New York, USA.
- R.J. Rodriguez R.J y Redman R.S. 1997. **Fungal Life-Styles and Ecosystem Dynamics: Biological Aspects of Plant Pathogens, Plant Endophytes and Saprophytes**. Advances in Botanical Research, 24, 169-193.
- Rodrigues K.F y Samuels G.J. 1990. **Preliminary study of endophytic fungi in tropical palm**. Mycol. Res., 97, 827-830
- Rodrigues, K. F. 1994. **The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe Oleraceae***. Mycologia, 86, 376-385.
- Rogers, j. D. 1979 **The Xylariaceae: Systematic, biological and evolutionary aspects**. *Mycologia*, 71, 1-42

- Rogers, J. D. 1979. **2001 Thoughts and musings on tropical Xylariaceae**. Mycological Reserch. 104, 1412-1420
- Rogers, J.D., Hellwig, V., Ju, Y.M., Fournier, J. and Stadler, M. 2005. **Hypomiltin, a novel azaphilone from *Hypoxylon hypomiltum* and chemotypes in *Hypoxylon* sect. *Hypoxylon* as inferred from analytical HPLC profiling**. Mycological Progress, 4, 39-54.
- Rosenthal G, Berenbaum M. 1991. **Herbivores, Their Interactions with Secondary Plant Metabolites**. 2a ed. Vol. 1. San Diego/CA: Academic Press.
- Saikkonen K., Wäli P., Helander M. y Faeth S. H. 2004. **Evolution of latency in foliar fungi**. *Trends in Plant Science.*, 9, 275
- Sánchez Márquez, S., Bills, G.F. and Zabalgoageazcoa, I. 2007. **The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata***. Fungal Diversity, 27, 171-195.
- Sánchez Márquez, S., Bills, G.F. and Zabalgoageazcoa, I. 2008. **Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses**. Fungal Diversity, 33, 87-100.
- Salvatore M. J., Hensens O. D, Zink, J. Liesch D. L, Dufresne C., Ondeyka J. G., Jurgens T. M., Borris R. P., Raghoobar S, McCauley E., L. Kong, S.E. Gartner, G. E. Koch, F. Pelaez, M. T. Diez, C. Cascales, I. Martin, J. D. Polishook, M. J. Balick, H. T. Beck, S. R. King, A. Hsu y R. B. Lingham. 1994. **L-741,494, A fungal metabolite that is an inhibitor of interleukin- 1 $\beta$  converting enzyme** Journal of Natural Products, 57; 755.
- Saucedo, G. A. 2006 **Búsqueda de compuestos bioactivos en hongos antagónicos endófitos de plantas con potencial aleloquímico de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo** (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Shiono Yoshihito, Motoki Sadayoshi, Koseki Takuya, Murayama Tetsuya, Tojima Masato, Kimura Kenichi. 2009. **Isopimarane diterpene glycosides, apoptosis inducers, obtained from fruiting bodies of the ascomycete *Xylaria polymorpha***. Phytochemistry 70, 935–939.
- Shearer, C. A. **Fungal competition**. 1995. Canadian Journal of Botany. 73 (S1): 1259–1264.
- Singh, S.B., Zink, D., Polishook, J., Valentino, D., Shafiee, A., Silverman, K., Felock, P., and Teran, A. 1999. **Structure and absolute stereochemistry of HIV-1 integrase inhibitor integric acid. A novel eremophilane sesquiterpenoid produced by a *Xylaria* sp.** Tetrahedron Letters 40: 8775-8779.
- Singh H, Batish D, Kohli R. 2003. **Allelopathic Interactions and Allelochemicals: New Possibilities for Sustainable Weed Management** Crit. Rev. Plant Sci. 22:239-311.
- Solleiro Jose Luis. **Biotechnología para un desarrollo agrícola sustentable en el libro Alimentos transgénicos: Ciencia, ambiente y mercado**. Editorial Siglo XXI, 149-150.

- Smith Cameron J., Morin Nancy R., Bills Gerald F., Dombrowski Anne W., Salituro Gino M., Smith Scott K., Zhao Anne, y MacNeil Douglas J. 2002. **Novel Sesquiterpenoids from the Fermentation of *Xylaria persicaria* Are Selective Ligands for the NPY Y5 Receptor**. *J. Org. Chem.*, 67, 5001-5004.
- Smith, G.J.D., Liew, E.C.Y. and Hyde, K.D. (2003). **The Xylariales: a monophyletic order containing 7 families**. *Fungal Diversity*,13,185-218.
- Solleiro José y del Valle Ma. Del Carmen. 1996. **Investigación desarrollo y difusión de la tecnología en el cambio tecnológico en la agricultura y las agroindustrias en México**. Ed. Siglo XXI
- Stadler, M., Ju, Y.M. y Rogers, J.D. 2004. **Chemotaxonomy of *Entonaema*, *Rhopalostroma* and other Xylariaceae**. *Mycological Research*, 108, 239-256.
- Stadler, M., Læssøe, T. and Vasilyeva, L. 2005. **The genus *Pyrenomyxa* and its affinities to other cleistocarpous Hypoxyloideae as inferred from morphological and chemical traits**. *Mycologia*, 97, 1129-1139.
- Stadler, M. y Hellwig, V. 2005. **Chemotaxonomy of the Xylariaceae and remarkable bioactive compounds from Xylariales compounds from Xylariales and their associated asexual stages**. *Recent Research in Developmental Phytochemistry*, 9, 1120.
- Steven L. Stephenson. 2010 . **The kingdom fungi** in: Steven L. Stephenson. *The biology of mushrooms, molds and lichens*. Tiember press. China.
- Stierle, A., G. A. Strobel, y D. Stierle. 1993. **Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae***. *Science*, 260, 214–216.
- Strobel G.A. 2002. **Microbial gifts from rainforest**. *Can J. Plant pathology.*, 24, 14-20
- Strobel G.A 2002. **Rainforest endophytes and bioactive products**. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 22, 315-333
- Strobel, G. A., E. Ford, J. Worapong, J. K. Harper, A. M. Arif, D. M. Grant, P. C. W. Fung, y K. Chan. 2002. **Ispolestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities**. *Phytochemistry*, 60, 179–183.
- Strobel, G. A., R. V. Miller, C. Miller, M. Condrón, D. B. Teplow, y W. M. Hess. 1999. **Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina***. *Microbiology*, 145, 1919–1926.
- Strobel G. A. 2003. **Endophytes as sources of bioactive products**. *Microbes and Infection*, 5, 535-544.
- Strobel Gary, Daisy Bryn, Castillo Uvidelio, y Harper James. 2004. **Natural Products from Endophytic Microorganisms**. *J. Nat. Prod.* 67, 257-268.
- Stone J. K., Bacon C.W. y White J. F., 2000, en **An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined**, ed. C. W. Bacon and J. F. White, Jr., M. Dekker, Inc., New York, 3-5.

- Sumbali G. 2005. **The fungi**. Editorial Alpha Science. India.
- Tansuwan Srinuan, Pornpakakul Surachai, Roengsumran Sophon, Petsom Amorn, Muangsin Nongnuj, Sihanonta Prakitsin, Chaichit Narongsak. 2007. **Antimalarial Benzoquinones from an Endophytic Fungus, *Xylaria* sp.** *Journal of Natural Products*. 70, 1620-1623.
- Ulloa y Hanlin. 1978. **Atlas de micología básica**. Concepto, 150-155
- Whalley A. J. S. **The xylariaceous way of life**. 1996. *Mycal. Res.*, 100, 897-922.
- Yuen T.K.; Hyde, K.D.; Hodgkiss, I.J. 1999. **Interspecific Interactions among Tropical and Subtropical Freshwater Fungi**. *Microbial Ecology*. 37, 257-262.
- Zhang, B., G. Salituro, D. Szalkowski, Z. Li, Y. Zhang, I. Royo, D. Vilella, M. Dez, F. Pelaez, C. Ruby, R. L. Kendall, X. Mao, P. Griffin, J. Calaycay, J. R. Zierath, J. V. Heck, R. G. Smith, and D. E. Moller. 1999. **Discovery of small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice**. *Science*, 284,974-981
- Zhang Hua Wei, Song Yong Chun y Tan Ren Xiang. 2006. **Biology and chemistry of endophytes**. *Natural Product Reports*, 18, 448