



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS DE HONGOS ENDÓFITOS DEL
GÉNERO *XYLARIA* CON POTENCIAL USO EN AGRICULTURA**

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

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Rogerio Alejandro Sebastian Saavedra Barrera

TUTORA

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad de México

Noviembre de 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento, a las siguientes Instituciones:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo el presente trabajo a través de los proyectos A1-S-20469 y IN207117, respectivamente, y por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría con número de becario 629501.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, el instituto de Química, la Facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM, que contribuyeron en mi formación profesional.

También expreso mi agradecimiento a mi tutora la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por abrirme las puertas de su país y de su grupo de investigación. Además, por su confianza y su acompañamiento en mi formación académica y profesional.

A cada uno de los miembros del jurado: Dr. Leovigildo Quijano, Dr. José Fausto Rivero Cruz, Dra. María Adelina Jiménez Arellanes, Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar y Dr. José Alberto Rivera Chávez por los aportes realizados durante la revisión de este trabajo.

A los siguientes técnicos académicos de los laboratorios del Instituto de Química, UNAM:

A la Q. María de los Ángeles Peña González y a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar por su ayuda en la obtención de espectros de RMN a 300 y 400 MHz, respectivamente. A la Dra. Beatriz Quiroz García del Laboratorio Universitario de RMN (LURMN) del IQ-UNAM, por los espectros de RMN realizados a 700 MHz.

A la Dra. María del Carmen García González y al Dr. Javier Pérez Flores, por la obtención de espectros de masas. A la responsable del laboratorio de Espectroscopia y Polarimetría, la Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya, por la obtención de espectros en la región de infrarrojo. Al M. en C. Simón Hernández Ortega del laboratorio de difracción de Rayos X, por su ayuda en la adquisición e interpretación de espectros. A las M. en C. Lucía del Carmen Márquez, y Lucero Ríos Ruiz del laboratorio de cromatografía, por su asesoría en el análisis cromatográfico. Al M. en C. Everardo Tapia Mendoza del LANCIC por su ayuda en la obtención de espectros por GC-MS.

Al Dr. José Alberto Rivera Chávez y la M. en C. Ingrid Yadira Martínez Aldino, por su asesoría en el aislamiento de compuestos por CLAR en modo semi-preparativo. Al Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero por su asesoría en el uso de herramientas estadísticas para el análisis de datos multivariados.

A mis padres, a mis queridos hermanos, a Laura, y a mis demás familiares por su seguridad en mis capacidades, su incansable apoyo y su cálida compañía a pesar de la distancia.

A Karol, Kate, Martha, Magda, León, Diana, Alan y Jorge por su compañía durante el desarrollo de mi Maestría. Y finalmente, a Gonzalo, Moni, Rossy, Joss, Bety, Lupita, Julio, Gastón, Yaja y Luis, por hacer de este viaje una experiencia enriquecedora.

Dedicatoria

A mis abuelos Carlos Elí Barrera y Rogerio Saavedra,
a quienes recordé con cariño en cada paso de este trabajo.

I. ANTECEDENTES

En la actualidad, la seguridad alimentaria a nivel global y local se encuentra amenazada por diferentes factores bióticos y abióticos, dentro de los cuales se destacan el crecimiento poblacional, la urbanización de la población, el cambio climático, las enfermedades de rápida propagación que afectan a los cultivos, entre otros. Todos estos factores impactan de manera negativa a la producción agrícola, generando un déficit entre la oferta y la demanda de alimentos, poniendo en riesgo el acceso a dietas adecuadas y la preferencia alimenticia por parte de algunos sectores de la población (1, 2). En este contexto, la investigación y el desarrollo en las industrias agrícola y agroquímica tienen un papel protagónico para garantizar el fortalecimiento de la seguridad alimentaria (3).

En México, la agricultura representa una de las actividades proyectadas para impulsar el desarrollo económico (4). Hoy en día, este sector aporta el 3.4% del producto interno bruto (5), además el país cuenta con una frontera agrícola de 30 millones de hectáreas y un 17% del territorio destinado a este uso (6). Sin embargo, existen factores como las plagas que han afectado los porcentajes de producción y que generan pérdidas por cosecha. Según la Encuesta Nacional Agropecuaria del 2017, el 44% de las unidades de producción agrícola en el país reportaron pérdidas por causas biológicas (7). A nivel global, se estima que las plagas son responsables de entre el 30 y el 40% de la pérdida de la productividad agrícola (8).

Dentro de las estrategias empleadas para reducir el daño causado por las plagas se encuentra el uso de plaguicidas de origen sintético (8). Con el fin de incrementar los rendimientos de producción en los cultivos, se ha desarrollado una amplia variedad compuestos químicos que controlan la propagación plagas de manera eficiente y a bajos costos. Hoy en día, los plaguicidas son parte integral de la sociedad moderna y son usados, no solo para la protección de cultivos, sino también para el cuidado de alimentos almacenados, jardinería, e inclusive para la erradicación de plagas transmisoras de enfermedades infecciosas para el hombre (9). Como consecuencia, en México se ha reportado un consumo elevado de estos productos, alcanzando las 47000 toneladas en el 2016 (10).

Más allá de los beneficios, el uso excesivo e inadecuado de los plaguicidas de origen sintético ha generado diversas problemáticas, cuyo análisis se hace necesario en el momento de evaluar la efectividad de estos productos en la protección de cultivos de interés. En cuanto a la salud humana, la exposición prolongada de los trabajadores y consumidores provoca daños que van desde alergias e hipersensibilidad, hasta cáncer y disrupción hormonal (11). Algunos plaguicidas son considerados contaminantes orgánicos persistentes y sus tiempos degradación prolongados generan problemas de bioacumulación que desembocan en la contaminación de acuíferos y la pérdida de biodiversidad (12,13). Además, su uso constante afecta la microbiota de los suelos, impactando negativamente la productividad de los cultivos y provocando el desarrollo de resistencia por parte de los organismos blanco (14).

Debido a lo anterior, muchos países han creado regulaciones que reducen el número de plaguicidas sintéticos disponibles para la agricultura, promoviendo de esta manera el desarrollo de nuevos ingredientes activos obtenidos a partir de fuentes de origen natural (15). Si bien existen diferentes alternativas basadas en el manejo integral de suelos, la erradicación manual, el biocontrol, el manejo de mantos orgánicos, entre otros, estas no tienen la misma eficiencia que los agroquímicos sintéticos y su implementación requiere inversiones considerables y/o conocimiento técnico, generando sobrecostos en la producción agrícola (15).

Por otra parte, muchos de los productos naturales con actividad plaguicida son el resultado de procesos biológicos vinculados a las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios, a través

de los cuales se han obtenido compuestos con diversas actividades biológicas (16,17). La amplia variedad de estructuras con que cuentan los metabolitos secundarios puede ser utilizada *per se*, o servir de andamiaje para el desarrollo de nuevos productos con uso en la agroindustria (18). Además, la complejidad estructural de algunos de ellos permite descubrir mecanismos de acción novedosos, evitando el desarrollo de plagas resistentes (19,20). Es importante resaltar que, los productos naturales suelen tener tiempos de vida cortos en el ambiente y se presume que sus estructuras químicas son fácilmente asimilables por organismos presentes en la microbiota del suelo e involucrados en la degradación (15).

En la actualidad, una de las fuentes promisorias para la obtención de productos naturales bioactivos útiles para la industria agrícola son los hongos endófitos (21). Estos microorganismos habitan durante parte o todo su periodo de vida, colonizando los tejidos internos de plantas hospederas, sin causar síntomas de enfermedad o daño aparente (22). Dentro de la planta se establece una relación endófito-hospedera a través de la cual, el hongo endófito recibe protección y nutrientes, y en contra partida, algunos proporcionan a la planta mejoras en los mecanismos de defensa frente a diversos factores de estrés (22,23). Esta relación se puede explicar, en parte, como un antagonismo balanceado, donde las estrategias de defensa de la hospedera y los factores de virulencia del hongo se encuentran en un equilibrio delicado que permite obtener una asociación aparentemente asintomática (24). Este balance es dinámico y puede verse afectado por diversas condiciones de estrés, que pueden llevar al hongo endófito a expresarse como patógeno desarrollando en la planta una condición de enfermedad (22). Más allá de la relación directa endófito-hospedera, dentro de los tejidos de la planta también existen asociaciones multitróficas entre grupos de endófitos, situación que incrementa la producción de metabolitos secundarios con potencial bioactivo sobre otros microorganismos fitopatógenos, virus, plantas e inclusive herbívoros (21).

Las asociaciones entre múltiples organismos juegan un papel importante en la biosíntesis por parte de los microorganismos, y en particular la de los hongos endófitos. Se ha demostrado que durante la fermentación en cultivos axénicos la producción de metabolitos involucrados en la comunicación inter-especie de los microorganismos disminuye, lo cual representa un problema al considerar que muchos de estos metabolitos poseen actividad biológica y podrían contribuir a la diversidad química de los compuestos aislados (25). Sin embargo, existen herramientas metodológicas para reducir la pérdida de información y explorar la diversidad química de los microorganismos. Estas se agrupan bajo el nombre de estrategias OSMAC (por sus siglas en inglés, *One Strain-Many Compounds*) y su ejecución implica, entre otros factores, variaciones en las condiciones de cultivo de los microorganismos bajo estudio (tales como, aireación, agitación, medio de cultivo, temperatura, pH), que estimulan la activación de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos considerados “crípticos u ocultos”(26–28). Sumado a esto, es posible evaluar los cambios en el perfil químico de los microorganismos haciendo uso de diferentes métodos y protocolos de la metabolómica (29). Estos protocolos requieren la aplicación de herramientas cromatográficas, espectrométricas y espectroscópicas que, complementadas con el análisis estadístico multivariado, permiten describir cambios en mezclas complejas, como lo son los extractos de origen fúngico. Como resultado se evalúa la correlación entre la composición química y las diversas variables discretas como el medio de cultivo, las cepas estudiadas, los géneros de endófitos, la bioactividad, el origen de la muestra, entre otros (28,30).

Dentro de los géneros de endófitos más estudiados para el aprovechamiento de metabolitos secundarios se encuentra el género *Xylaria*, perteneciente a la familia Xylariaceae. Actualmente, se han reportado más de 300 especies pertenecientes al género y solo en México existen reportes de más de 100 (31). Su distribución está ligada principalmente a zonas tropicales y subtropicales a lo largo de todo el mundo. Además, los hongos pertenecientes a este género se

encuentran asociados a plantas tanto vasculares como no vasculares y han sido clasificados principalmente como saprófitos y endófitos (32,33). De ellos se destaca la producción de metabolitos secundarios con diversas estructuras químicas, incluyendo citocalasinas, isocumarinas, lactonas, terpenoides, meleinas, entre otros, lo cual ha posicionado a este género como una fuente promisoría de metabolitos útiles en el campo de la medicina y la agroindustria (34,35).

Este trabajo pretende contribuir a la bioprospección de dos hongos del género *Xylaria* aislados previamente en el grupo de investigación, (laboratorio 1-4, del Instituto de Química de la UNAM), a través del estudio en las variaciones de sus perfiles químicos y de la evaluación de su potencial biológico (extractos, fracciones y metabolitos secundarios derivados de diferentes condiciones de cultivo), sobre el crecimiento de especies con impacto negativo en la agroindustria.

II. HIPÓTESIS

Los hongos endófitos pertenecientes al género *Xylaria* han sido estudiados por su capacidad de sintetizar metabolitos secundarios con una amplia gama de estructuras químicas. Mediante la variación de los medios de cultivo, es posible estimular la producción de metabolitos secundarios bioactivos, en los endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25. Los cuales se obtendrán mediante ensayos biodirigidos.

III. OBJETIVOS

1. Objetivos generales

Evaluar el potencial fitotóxico, antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos y de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de diferentes condiciones de cultivo *in vitro*, de los hongos endófitos *Xylaria* sp. aislamientos Gse24 y Gse25, por medio de un estudio químico biodirigido hacia el control de diferentes organismos fitopatógenos. Así, los resultados de este trabajo permitirán contribuir al conocimiento de la diversidad química del género *Xylaria* y como fuentes naturales potenciales para el control de plagas.

2. Objetivos específicos

- Evaluar los cambios en el rendimiento y perfiles metabólicos de los extractos obtenidos a partir de diferentes medios de cultivo de los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, haciendo uso de la cromatografía líquida de alta resolución y con el apoyo de herramientas estadísticas para el análisis de datos multivariados.
- Comparar el efecto fitotóxico, antifúngico y antioomiceto de los extractos obtenidos a partir de diferentes medios de cultivo con la finalidad de seleccionar el medio adecuado para la obtención de compuestos bioactivos.
- Aislar los metabolitos secundarios bioactivos por medio del estudio químico biodirigido de los extractos orgánicos, utilizando diferentes técnicas cromatográficas.
- Caracterizar los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, haciendo uso de técnicas espectrométricas, espectroscópicas y de difracción de rayos X

IV. METODOLOGÍA

1. Hongos endófitos

Los hongos endófitos *Xylaria* sp. aislamientos Gse24 y Gse25 se obtuvieron a partir de hojas sanas de *Gliricidia sepium* recolectadas en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH), en la estación biológica de la localidad de Quilamula, municipio de Tlalquitenango, Estado de Morelos (8°30'4.1"N - 98° 51'52"O y 18°32' 12.2"N - 99° 02'05"O 1080-1230 msnm). Una vez aislados en forma axénica, se conservaron en medio papa-dextrosa-agar (PDA) (36).

2. Organismos modelo

Los microorganismos empleados para evaluar el potencial antifúngico y antioomiceto, fueron donados por la Dra. Emma Zavaleta Mejía, el Ing. Manuel Silva Valenzuela y la M. C. Victoria Ayala Escobar, del Programa de Fitopatología del Instituto de Fitosanidad, del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México, así como por la Dra. Sylvia Patricia Fernández-Pavía de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (*Phytophthora capsici* 6143). En total, se utilizaron cuatro hongos, seleccionados debido a su impacto en la industria agrícola, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, y *Pestalotiopsis* sp., y dos oomicetos, *P. capsici* y *Pythium aphanidermatum* (36). Además, el potencial fitotóxico se evaluó sobre semillas de tres especies dicotiledóneas, *Medicago sativa*, *Trifolium pratense* y *Amaranthus hypochondriacus*; y una monocotiledónea, *Panicum miliaceum*, consideradas malezas según reportes de la CONABIO. Las semillas se adquirieron en la Casa Cobo, S.A. de C.V., en la Central de Abastos de la Ciudad de México (37).

3. Cultivo de los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25

3.1 Obtención de inóculos en medio líquido

Los inóculos se obtuvieron en 50 mL de medio caldo-papa-dextrosa (CPD) esterilizado en matraces Erlenmeyer de 125 mL. El CPD se preparó siguiendo la metodología reportada por Sánchez-Fernández (36). Como pre-inóculo se utilizaron cortes de micelio de un cm², obtenidos a partir de cultivos en PDA de 8 días de crecimiento. Posteriormente, los matraces se incubaron a 37 °C, con agitación de 150 rpm por 8 días (38).

3.2 Cultivos en medios sólidos

Los cultivos en arroz se prepararon depositando 300 g de arroz y 250 mL de agua destilada, en matraces Fernbach de 2.8 L. Después de esterilizar, se agregaron 50 mL del inóculo en medio líquido CPD (Inciso 3.1) (39,40). Los cultivos en cereal se obtuvieron utilizando 90 g de cereal Cheerios®, sabor miel, en matraces Erlenmeyer de 1 L. Luego de esterilizar el medio, se agregaron 50 mL de inóculo en medio CPD (41). Los cultivos se incubaron en condiciones estáticas, a temperatura ambiente durante un periodo de 40 días y con fotoperiodos de luz-oscuridad 12:12 h.

3.3 Cultivo en medio líquido

Los cultivos en medio líquido CPD se realizaron en matraces Fernbach de 2.8 L utilizando 1.2 L de medio, esterilizados posteriormente. Una vez esterilizado el medio se inocularon con cortes de micelio de *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 de un cm² obtenidos a partir de cultivos en medio PDA de 8 días de crecimiento y se incubaron en las mismas condiciones que los cultivos sólidos (37).

4 Obtención de extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio

Al finalizar el periodo de incubación, en el caso de los cultivos en medio líquido CPD, se separaron el medio de cultivo y el micelio, por medio de filtración al vacío. Los extractos del medio de cultivo se obtuvieron, mediante extracciones líquido-líquido, con disolventes de polaridad creciente (hexano, CH₂Cl₂, y AcOEt utilizados volúmenes iguales x5). En el caso del micelio y de los medios de los cultivos sólidos (arroz y cereal), los extractos se prepararon mediante maceración exhaustiva utilizando sucesivamente hexano (500 mL x5), CH₂Cl₂ (1 L x 3) y AcOEt (1 L x 3).

Los extractos obtenidos se compararon por cromatografía en capa fina (CCF) y se reunieron, luego de establecer su similitud química (37,43). Una vez reunidos los extractos (CH₂Cl₂ y AcOEt) se disolvieron en MeOH a una concentración de 10 mg/mL, y se extrajo exhaustivamente con hexano (volúmenes iguales x 5). Los extractos hexánicos (II) y metanólicos se concentraron y se almacenaron para evaluar su actividad biológica. En la **Figura 1** se resume el procedimiento para la obtención de los diferentes extractos.

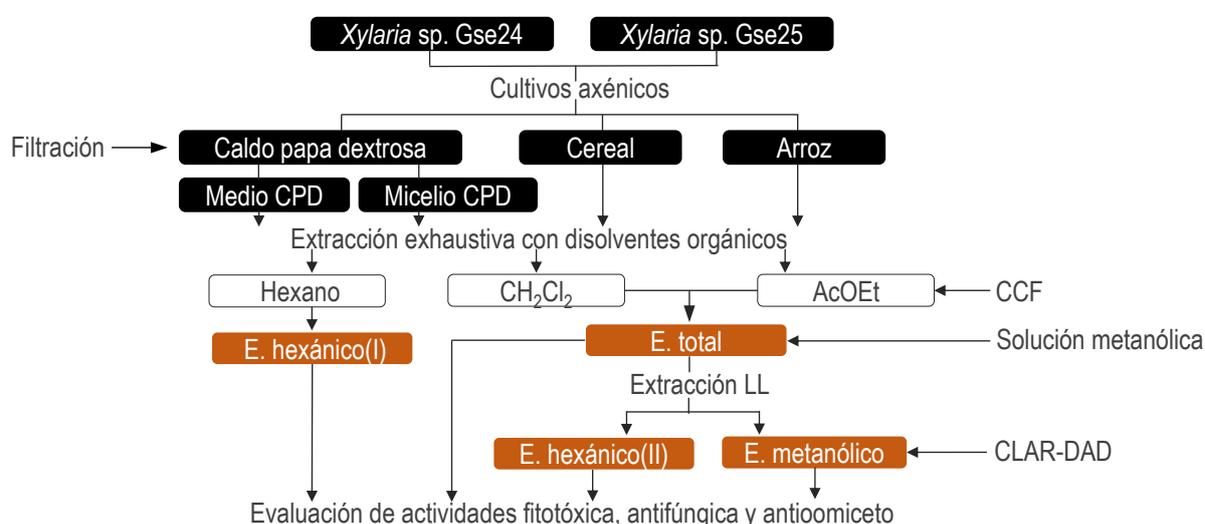


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso para la obtención de extractos a partir de cultivos axénicos de los hongos endófitos *Xylaria sp. Gse24* y *Gse25*.

5. Obtención de perfiles cromatográficos de extractos metanólicos por CLAR-DAD

Los perfiles químicos de los extractos metanólicos, obtenidos a partir de los diferentes medios de cultivo, así como los perfiles de las fracciones primarias y secundarias, se obtuvieron en un cromatógrafo líquido de alta resolución (CLAR, *Waters e2595*) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD, *Waters 2998*) y registrando la absorbancia entre 210-400 nm. Inyectando 40 µL de cada muestra, disueltas en MeOH grado HPLC a una concentración de 2000 µg/mL.

El análisis de los constituyentes presentes en los extractos metanólicos se llevó a cabo en una columna de fase reversa C18 (*Phenomenex Gemini C18 250 x 4.6 mm, 5 µm*), utilizando mezclas de CH₃CN-H₂O (con ácido fórmico 0.05% v/v) como fase móvil. El gradiente de elución utilizado fue el siguiente: inicialmente, 2% CH₃CN; con un gradiente del 2 al 40% de CH₃CN hasta 35 min, seguido de un gradiente del 40 al 100% de CH₃CN entre 35 y 50 min; y finalmente 100% de CH₃CN entre 50-75 min, con un flujo de 1 mL/min. La comparación de los perfiles químicos de los extractos metanólicos se realizó procesando los datos obtenidos a partir de los tiempos de retención y de los espectros UV de los picos cromatográficos, utilizando el software estadístico Statistica® 8. Para el análisis de componentes principales (PCA) la matriz de datos se construyó

mediante los picos cromatográficos observados a 250 nm, con áreas cromatográficas superiores al 2% y/o presentes en más de una de las fracciones analizadas (30).

El análisis cromatográfico de los constituyentes presentes en las fracciones primarias y secundarias se realizó en una columna de fase reversa C18 (*Agilent Polaris C18-A*, 150 x 4.0 mm, 5 µm) y se empleó como fase móvil una mezcla de CH₃CN-H₂O (con ácido fórmico 0.05% v/v). El gradiente de elución utilizado fue el siguiente: inicialmente, 5% CH₃CN; con incremento a 40% de CH₃CN entre 0 y 10 min; seguido de un incremento del 40 al 100% de CH₃CN entre 10 y 15 min, y finalmente elución isocrática entre 15 y 25 min, con 100% CH₃CN, con flujo de 1 mL/min.

6. Fraccionamiento químico por cromatografía en columna abierta

Los extractos metanólicos obtenidos a partir de diferentes los medios de cultivo de los endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 se reunieron una vez determinada su similitud química mediante CLAR-DAD. La separación de sus constituyentes se llevó a cabo en una columna cromatográfica empacada con 1 kg de sílica y 30 g del extracto metanólico, en un volumen muerto de 1.5 L. Como sistema de elución se emplearon mezclas de hexano-CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂-MeOH con polaridad creciente. Se recolectaron fracciones de 300 mL que fueron monitoreadas por CCF, aquellas que presentaron características cromatográficas similares se reunieron para generar XIV fracciones primarias (37). Las fracciones obtenidas se concentraron y almacenaron para su análisis por CLAR-DAD y para la evaluación de su potencial fitotóxico, antifúngico y antioomiceto. Las condiciones de elución y los rendimientos de aquellas fracciones con actividad biológica significativa se muestran en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Fracciones primarias con actividad biológica, obtenidas a partir del extracto metanólico derivados del cultivo de los hongos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 en diferentes medios.

Fracción primaria	Fracciones	Sistema de elución		Peso (g)
		Disolventes	Proporción	
IV	162-184	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	98:2	0.90
V	185-215	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	98:2 / 97:3	3.28
VI	216-237	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	97:3 / 96:4	1.65
VII	238-264	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	96:4 / 95:5	2.39
VIII	265-281	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	94:6	3.85
IX	282-311	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	94:6 / 93:7	2.75
X	312-326	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	93:7 / 92:8	2.14
XI	336-348	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	92:8 / 9:1	3.50
XII	379-380	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	9:1 / 8:2	2.45
XIII	391-397	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	7:3 / 5:5	2.44

El fraccionamiento de la fracción primaria V se realizó con 2.5 g de muestra, en una columna cromatográfica empacada con 230 g de sílica gel, en un volumen muerto de 400 mL. Como sistema de elución se emplearon mezclas de hexano-CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂-MeOH, recolectando volúmenes de 100 mL. Luego de la comparación mediante CCF se obtuvieron 13 fracciones secundarias que fueron almacenadas para su análisis por CLAR-DAD. Las condiciones de elución y los rendimientos se agrupan en el **Cuadro 2** (40).

Para el fraccionamiento de la fracción primaria VII se usaron 2.3 g de muestra en una columna cromatográfica empacada con 120 g de sílice, en un volumen muerto de 180 mL. Como sistema de elución se utilizaron mezclas de hexano-CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂-MeOH. Los volúmenes recolectados fueron de 30 mL. Las fracciones concentradas se compararon por CCF y se reunieron para formar 11 fracciones secundarias, almacenadas para su análisis por CLAR-DAD. Los rendimientos y condiciones de elución se describen en el **Cuadro 3** (40).

Cuadro 2. Fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria V.

Fracción secundaria	Fracciones	Sistema de elución		Peso (g)
		Disolventes	Proporción	
V_1	1-46	Hexano-CH ₂ Cl ₂	1:0 / 4:6	0.02
V_2	47-71	Hexano-CH ₂ Cl ₂	3:7 / 1:9	0.01
V_3	72-98	Hexano-CH ₂ Cl ₂	1:9 / 0:1	0.01
V_4	99-118	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	0:1 / 99:1	0.02
V_5	119-121	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98:2	0.01
V_6	122-137	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98:2	0.02
V_7	138-146	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	97:3	0.34
V_8	147-152	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	97:3	0.55
V_9	153-157	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	97:3	0.06
V_10	158-176	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	97:3	0.79
V_11	177-184	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	96:4 / 95:5	0.26
V_12	185-200	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5 / 92:8	0.14
V_13	201-205	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	1:1 / 0:1	0.07

Cuadro 3. Fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria VII

Fracción secundaria	Fracciones	Sistema de elución		Peso (g)
		Disolventes	Proporción	
VII_1	1-11	Hexano - CH ₂ Cl ₂	9:1 / 0:1	0.03
	12-72	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	99:1 / 98:2	
VII_2	73-76	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	97:3	0.11
VII_3	77-83	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	97:3	0.02
VII_4	84-103	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	97:3 / 96:4	0.21
VII_5	104	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	96:4	0.06
VII_6	105-112	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	96:4	0.23
VII_7	113-126	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	96:4 / 94:6	0.62
VII_8	127-133	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	94:6	0.17
VII_9	134-157	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	94:6 / 9:1	0.13
VII_10	158-160	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	8:2 / 6:4	0.05
VII_11	167-170	MeOH	1	0.04

7. Evaluación del potencial fitotóxico, antifúngico y antioomiceto

La evaluación del potencial fitotóxico, antifúngico y antioomiceto, de cada uno de los extractos, y fracciones primarias se realizó por medio de ensayos de dilución en agar. Las fracciones primarias evaluadas fueron aquellas con rendimientos mayores al 3% (39).

Para determinar el potencial fitotóxico se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas modelo mencionadas en el inciso 2. Los extractos y fracciones, se disolvieron en 100 µL de metanol y agar al 1%, a una concentración de 200 µg/mL, y posteriormente se vaciaron en cajas Petri de 5 cm de diámetro. En las cajas con tratamiento se depositaron 30 semillas y se incubaron en ausencia de luz, a 28°C. Los controles negativos fueron agar-agua al 1% y MeOH al 0.15% en agar; como control positivo se utilizó el herbicida comercial Faena Fuerte® (glifosato: sal de potasio de *N*-(fosfonometil)-glicina al 35.8%) a una concentración equivalente a 200 µg/mL de principio activo (37).

El efecto sobre la respiración se evaluó depositando las 30 semillas de cada tratamiento en un recipiente de vidrio con agua destilada (3-5 mL) a 27 °C. El oxígeno disuelto en el agua se monitoreo durante 4 min haciendo uso de un electrodo tipo Clark, conectado a un oxímetro. El consumo de oxígeno se consideró como la pendiente en la curva de porcentaje de oxígeno vs

tiempo. Tanto el porcentaje de germinación, como la longitud de las raíces y la respiración se determinaron a las 24 h para las semillas de *A. hypochondriacus* y a las 48 h para las de *T. pratense*, *M. sativa* y *P. miliaceum* (37).

El potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos y fracciones se evaluó estableciendo el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento del micelio de cuatro especies de hongos y dos oomicetos señalados en el inciso 2. Los extractos y fracciones, disueltos en 100 µL de metanol, se diluyeron en medio PDA con agar al 1%, a una concentración de 250 µg/mL, y se distribuyeron en cajas Petri estériles de 5 cm de diámetro. Como controles negativos se utilizaron PDA al 1% y metanol 0.15% en PDA; los controles positivos fueron Prozicar 50® (Carbendazim: metil-2-benzimidazolcarbamato, 50% en peso) y Ridomil 4E® (Metalaxil-M: éster metílico de *N*-(2,6dimetilfenil)-*N*-(metoxiacetil)-*D*-alanina 45,3% en peso), y fueron evaluados a una concentración de principio activo de 250 µg/mL (44). Los inóculos utilizados en cada tratamiento consistieron en cortes de micelio de 5 mm de diámetro obtenidos a partir de los fitopatógenos de prueba en PDA. Las cajas se incubaron a 27 °C con fotoperiodo de luz-oscuridad de 12/12 h. El área del micelio se midió luego de un periodo de incubación de 24 h para *P. aphanidermatum*; 48 h para *P. capsici*, *R. solani*, *Pestalotiopsis* sp, y 72 h para *A. alternata* y *F. oxysporum* (44).

Todos los tratamientos se evaluaron por cuatruplicado y los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar. La comparación de los diferentes tratamientos se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, seguido de una prueba de contrastes de Tukey HSD ($p < 0.05$) para determinar diferencias significativas con respecto al control negativo (37,44). El análisis estadístico de los datos se realizó por medio del programa StatGraphics® Centurion VI.

Las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) sobre el crecimiento de semillas, hongos y oomicetos, determinadas para el extracto hexánico (II) y metanólico, se calcularon por medio del programa GraphPad Prism v 5.0 (43,44) a partir de los porcentajes de inhibición a diferentes concentraciones (100-1000 µg/mL).

8. Identificación, aislamiento y purificación de metabolitos secundarios

8.1 Identificación del ácido benzoico y ácido fenilacético

El análisis por CLAR-DAD (250 nm) de la fracción terciaria V_9 (47 mg), se realizó siguiendo los parámetros cromatográficos indicados en el inciso 5, con el siguiente sistema de elución: de 0 a 5 min, 25% CH₃CN; seguido de un incremento de 25 a 100% de CH₃CN entre 5 y 15 min, y finalmente un sistema isocrático de 100% CH₃CN entre 15 y 20 min. Mediante 39 inyecciones de 50 µL de una solución metanólica de 5000 µg/mL, se logró recolectar el pico en t_R de 6.5 min (0.8 mg, el cual se inyectó en un cromatógrafo GC-MS (*Agilent* 7890B, 5977A), equipado con una columna con fase estacionaria polar (*HP5-MS*, 5% fenil,metil-siloxano), con la siguiente programación de temperatura: inicialmente 40 °C, seguido de una rampa de calentamiento de 8 °C/min hasta alcanzar 310 °C y finalmente una isoterma durante 6 min. La identificación presuntiva de los componentes presentes en la fracción se llevó a cabo por comparación de sus índices de retención lineales y espectros de masas (I.E. 70 eV) con los reportados en la literatura (45,46).

8.2 Aislamiento de la 5-carboxil-(*R*)-meleina

La 5-carboxil-(*R*)-meleina precipitó de manera espontánea como un sólido blanco a partir de la fracción primaria V (Cuadro 1). El compuesto se purificó por recristalización con CH₂Cl₂-MeOH (6.2 mg). Adicionalmente, a partir de la fracción secundaria V_9, se aislaron mediante CLAR-DAD y bajo las condiciones cromatográficas reportadas para los ácidos benzoico y fenilacético (inciso 8.1), 3.8 mg del compuesto puro (t_R 9.6 min).

8.3 Aislamiento de la xilaricina

La xilaricina se obtuvo a partir de la fracción secundaria VII_7 (77 mg) utilizando CLAR-DAD a nivel semipreparativo con una columna *Kinetex® EVO C18* (250 mm x 10 mm, 5 µm). La separación se llevó a cabo en un equipo CLAR (*Waters 2535*), con un detector DAD (*Waters 2998*), con una fase móvil compuesta por mezclas de CH₃CN-H₂O acidulada al 0.05% con ácido fórmico y un sistema de elución isocrático CH₃CN-H₂O (27:73). El pico que contenía la xilaricina (3.9 mg) se colectó en el t_R de 9.5 min (26,47,48).

8.4 Aislamiento de la estachilina-D

La estachilina-D se obtuvo a partir de la fracción secundaria VII_10 (32 mg), empleando el mismo sistema cromatográfico usado para la obtención de la xilaricina. En este caso se utilizó el siguiente sistema de elución: 20% de CH₃CN entre 0 y 4 min; con un incremento de 20 a 45% de CH₃CN entre 4 y 11 min, y finalmente una elución isocrática entre 11-18 min con 45% de CH₃CN. La estachilina-D (6 mg) se purificó a partir del pico cromatográfico colectado en el t_R de 11.0

9. Análisis espectroscópico y espectrométrico de los compuestos aislados.

Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C (700 y 175 MHz, respectivamente), incluidos los experimentos COSY, NOESY, HMBC y HSQC, se obtuvieron en un equipo *Bruker Advance III HD 700*. Los espectros de difracción de rayos X se obtuvieron en un difractómetro *Bruker Smart*, equipado con monocromador de cobre (1.54-184 Å). La masa molecular de los compuestos se determinó a través de ionización por análisis directo en tiempo real (DART, por sus siglas en inglés), en modo positivo, utilizando un espectrómetro de masas *Jeol JMS-T100LC*, con analizador de tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) (37,43).

V. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Actualmente, existe interés en el aprovechamiento de los hongos endófitos como fuente de metabolitos secundarios con uso potencial en la agroindustria. Siguiendo esta iniciativa, en este trabajo se utilizaron dos cepas de hongos endófitos aisladas a partir de la planta *Gliricidia sepium*, *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, seleccionadas debido a su potencial antagónico sobre otros endófitos y sobre algunos fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura (36). Las cepas fueron previamente identificadas de acuerdo con sus características micro y macroscópicas como hongos pertenecientes al género *Xylaria* (36).

Los resultados presentados se agrupan en tres secciones: en la primera, se analiza la variación de la bioactividad y el rendimiento de los extractos obtenidos a partir de los hongos endófitos cultivados en diferentes medios, utilizando bioensayos, técnicas cromatográficas y herramientas estadísticas para el análisis de datos multivariados, buscando identificar aquellos medios de cultivo que estimulan la producción de metabolitos bioactivos; en la segunda parte se describe el aislamiento de los metabolitos secundarios mediante el fraccionamiento químico biodirigido. Finalmente, se caracterizan los metabolitos secundarios aislados, dando además una breve reseña de su potencial biológico, con base en los reportes disponibles en la literatura.

1. Determinación de las condiciones de cultivo de los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25

1.1 Cultivo y obtención de extractos orgánicos

Los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 se cultivaron en diferentes medios de cultivo (inciso 3) y a partir de ellos se obtuvieron los extractos orgánicos (inciso 4). La comparación de los perfiles químicos por CCF de los extractos obtenidos utilizando CH₂Cl₂ con sus análogos obtenidos a partir de AcOEt, no evidenció diferencias en la composición de metabolitos

secundarios, por lo cual se reunieron. En el **Cuadro 4** se presentan las cantidades de los extractos orgánicos obtenidos a partir de cada medio de cultivo. La comparación de la cantidad de extracto producido por cada hongo se realizó por medio de un análisis estadístico para muestras pareadas, mediante el cual se concluyó que no existió diferencia significativa (95% de confianza). Por otra parte, al comparar la cantidad de extracto entre los diferentes medios de cultivo empleados se observó una diferencia significativa entre los extractos obtenidos de los cultivos en medios sólidos (arroz y cereal) con respecto a los obtenidos de los cultivos en CPD. Los rendimientos más altos se obtuvieron con los cultivos en cereal, siendo el mayor el de *Xylaria* sp. Gse25. En este caso, la relación de extracto obtenido vs medio de cultivo fue de 40 mg de extracto/g de cereal, siendo casi cuatro veces mayor a la alcanzada en arroz, 11 mg de extracto/g de arroz. Algunos autores relacionan el incremento en la producción de metabolitos en los medios sólidos con una mayor disponibilidad de oxígeno para el desarrollo de los hongos, ligada a una mayor área superficial (49), coincidiendo con lo observado en los cultivos sólidos de *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, para los cuales el cultivo en cereal presentó rendimiento significativamente mayor. De igual manera, se ha planteado que el incremento en la producción de metabolitos secundarios está relacionado con una mayor similitud a su ambiente de crecimiento natural-(27).

Cuadro 4. Cantidad de extracto orgánico obtenido a partir de cultivos de los hongos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 en diferentes medios y fraccionamientos primario.

<i>Xylaria</i> sp.	Medio de cultivo	Sustrato	Cantidad de extracto			Rendimiento	Proporción (%)	
			(mg)		n		Hexano	Metanol
Gse24	CPD Micelio	1.2 L	270 ± 41		4	0.2 mg/mL	28	63
	CPD Med de cultivo	1.2 L	360 ± 73		4	0.3 mg/mL	5	86
	Cereal	90 g	3300 ± 230		6	36.7 mg/g	49	44
	Arroz	300 g	2100 ± 360		6	7.0 mg/g	35	55
Gse25	CPD Micelio	1.2 L	300 ± 51		4	0.3 mg/mL	23	60
	CPD Med de cultivo	1.2 L	640 ± 49		4	0.5 mg/mL	9	72
	Cereal	90 g	3600 ± 410		6	40.0 mg/g	32	55
	Arroz	300 g	3300 ± 480		5	11.0 mg/g	56	37

En el caso de los endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, la proporción de los extractos hexánicos extractos obtenidos de los cultivos en cereal y arroz fue mayor (35-56% del extracto total), que en los cultivos en medio CPD (5-28% del extracto total); lo cual coincide con lo observado por VanderMolen *et al.* (50) en la estandarización de medios de cultivo de hongos con interés farmacológico.

1.2 Comparación de perfiles cromatográficos

La obtención y comparación de los perfiles cromatográficos de los extractos metanólicos provenientes de los diferentes medios de cultivo de los hongos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, se llevó a cabo por CLAR-DAD. La superposición de los perfiles cromatográficos generados a 250 nm se muestra en la **Figura 2A**. Por otra parte, con la finalidad de comparar de manera simultánea los perfiles cromatográficos se realizó un PCA, tomando como variables las áreas cromatográficas de 41 picos, detectados a una longitud de onda de 250 nm. En la **Figura 2B**, se observa el resultado de este análisis, representando el 50% de la varianza total de los datos. La distancia entre los puntos permitió estimar la diferencia en los perfiles cromatográficos y por lo tanto, en su composición química. En general, se observó mayor similitud entre los perfiles cromatográficos de los dos endófitos cultivados en el mismo medio, que entre extractos metanólicos del mismo endófito obtenidos a partir de medios de cultivo diferentes. Teniendo en cuenta estas similitudes, se podría estimar que los endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, corresponden a dos morfotipos de la misma especie. Sin embargo, esta afirmación requiere comprobación con estudios taxonómicos que permitan determinar la identidad inequívoca entre las especies.

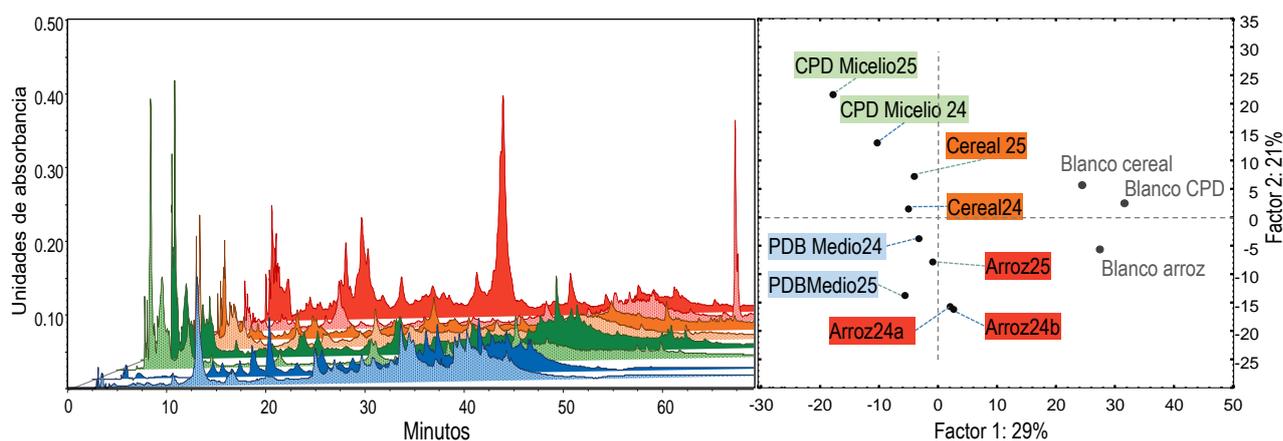


Figura 2. A) Perfiles cromatográficos obtenidos por CLAR-DAD (250 nm), a partir de los extractos metanólicos de diferentes medios de cultivo de *Xylaria* sp. Gse24 ■ y Gse25 ■. B) Análisis de componentes principales, construido a partir de picos cromatográficos a 250 nm.

1.3 Evaluación del potencial fitotóxico

El potencial fitotóxico de los extractos obtenidos a partir de los cultivos de los endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 en diferentes medios de crecimiento, se realizó evaluando su efecto sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de cuatro las semillas modelo (inciso 2), a la concentración de 200 µg/mL.

En general, no se observó efecto inhibitorio significativo sobre la germinación de las semillas de prueba. El porcentaje de inhibición más alto se reportó para el extracto metanólico del micelio del cultivo en CPD correspondiente a *Xylaria* sp. Gse24, sobre la especie *P. miliaceum* (20%). De manera general, la inhibición en el crecimiento de la raíz fue el proceso fisiológico más afectado por los tratamientos a una concentración de 200 µg/mL. Como se puede observar en el **Cuadro 5**, los efectos inhibitorios más altos fueron provocados en su mayoría por los extractos metanólicos (aproximadamente 40%). Dentro de ellos, el extracto metanólico obtenido a partir del cultivo del endófito *Xylaria* sp. Gse24 en medio arroz, presentó el mayor potencial fitotóxico inhibiendo significativamente la raíz de las semillas de *P. miliaceum* (62%), *T. pratense* (52%), *A. hypochondriacus* (46%) y *M. sativa* (38%), y en todos los casos con valores superiores a los alcanzados por el control positivo glifosato evaluado a la misma concentración (200 µg/mL). Los extractos metanólicos obtenidos del cultivo de *Xylaria* sp. Gse25 en medio arroz y del micelio en CPD de *Xylaria* sp. Gse24, también mostraron efectos fitotóxicos superiores al control positivo sobre el crecimiento de la raíz de *T. pratense* (60%) y *P. miliaceum* (55%), respectivamente.

En general, los extractos obtenidos a partir de cultivos de *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 en cereal, presentaron porcentajes de inhibición bajos sobre el crecimiento de la raíz de las semillas evaluadas; de ellos solo fueron significativos y con valores superiores al 40% de inhibición, el efecto del extracto total y del extracto metanólico del endófito *Xylaria* sp. Gse24, sobre *P. miliaceum* (42% y 41% respectivamente) y el del extracto total de *Xylaria* sp. Gse25, sobre la misma semilla (43%). Por otra parte, el extracto hexánico (I) obtenido del micelio del cultivo en CPD de Gse24 mostró el porcentaje de inhibición más alto, afectando, principalmente, las semillas de *A. hypochondriacus* (74%). De la misma forma, el extracto hexánico (I) del cultivo en cereal y del medio CPD de *Xylaria* sp. Gse24 causaron valores significativos iguales o superiores al 40% de inhibición sobre la raíz de *P. miliaceum* (52%) y *A. hypochondriacus* (48%) y sobre las semillas de *T. pratense* (44%) y *A. hypochondriacus* (40%), respectivamente.

Cuadro 5. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, sobre el crecimiento de la raíz de semillas modelo.

<i>Xylaria</i> sp.	Medio	Tratamiento	Inhibición sobre el crecimiento de la raíz (%)			
			<i>M. sativa</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>P. miliaceum</i>	<i>T. pratense</i>
<i>Xylaria</i> sp.	Control	Glifosato	24 ± 5.1*	38 ± 5.9*	42 ± 4.2*	29 ± 4.4*
	Positivo	Hexazinona	26 ± 3.7*	25 ± 3.9*	42 ± 6.0*	28 ± 5.1*
Gse24	CPD	E. total	14 ± 1.7*	23 ± 5.1*	21 ± 5.7*	50 ± 4.4*
		Medio de cultivo	E. metanólico	15 ± 3.7*	27 ± 3.1*	36 ± 2.4*
		E. hexano (II)	22 ± 3.0*	40 ± 2.6*	36 ± 1.5*	44 ± 1.2*
		E. total	44 ± 5.5*	17 ± 2.0*	24 ± 4.7*	15 ± 1.9*
	CPD	E. metanólico	39 ± 2.1*	35 ± 2.4*	55 ± 2.4*	48 ± 2.0*
		Micelio	E. hexano (II)	0 ± 0.0	12 ± 3.8*	0 ± 0.0
		E. hexano (I)	17 ± 3.0*	74 ± 0.7*	39 ± 2.2*	17 ± 3.0*
		E. total	31 ± 4.3*	22 ± 4.9*	42 ± 3.7*	30 ± 4.6*
	Cereal	E. metanólico	29 ± 3.7*	17 ± 3.4*	41 ± 3.1*	33 ± 2.4*
		E. hexano (II)	3 ± 3.3	0 ± 0.0	4 ± 2.9	17 ± 3.1*
		E. hexano (I)	13 ± 2.8*	37 ± 3.1*	39 ± 2.7*	9 ± 4.7
		E. total	2 ± 0.9	19 ± 2.9*	50 ± 2.7*	29 ± 2.9*
Arroz	E. metanólico	38 ± 3.2*	46 ± 2.5*	62 ± 1.6*	52 ± 1.1*	
	E. hexano (II)	19 ± 4.4*	16 ± 4.9*	8 ± 3.1*	19 ± 3.5*	
	E. hexano (I)	23 ± 4.1*	48 ± 1.2*	52 ± 2.6*	28 ± 2.1*	
	E. total	3 ± 1.3	21 ± 1.7*	41 ± 5.3*	13 ± 3.7*	
Gse25	CPD	E. total	3 ± 1.3	21 ± 1.7*	41 ± 5.3*	13 ± 3.7*
		Medio de cultivo	E. metanólico	5 ± 3.0	9 ± 3.4*	37 ± 2.7*
		E. hexano (II)	0 ± 0.0	25 ± 2.7*	16 ± 2.4*	16 ± 2.2*
		E. total	0 ± 0.0	23 ± 4.0*	51 ± 4.0*	29 ± 3.6*
	CPD	E. metanólico	12 ± 3.6*	21 ± 2.2*	35 ± 2.9*	43 ± 1.6*
		Micelio	E. hexano (II)	0 ± 0.0	11 ± 2.1*	24 ± 2.9*
		E. hexano (I)	4 ± 3.5	31 ± 2.9*	27 ± 2.3*	6 ± 2.8
		E. total	0 ± 0.0	12 ± 4.3*	43 ± 3.9*	14 ± 3.5*
	Cereal	E. metanólico	5 ± 4.0	4 ± 2.6	15 ± 4.2*	26 ± 2.1*
		E. hexano (II)	8 ± 3.7	16 ± 3.8*	10 ± 3.0*	11 ± 3.6*
		E. hexano (I)	9 ± 4.3	32 ± 1.7*	30 ± 2.3*	7 ± 3.7
		E. total	0 ± 0.0	6 ± 3.5	49 ± 3.9*	15 ± 1.8*
Arroz	E. metanólico	34 ± 3.0*	34 ± 2.9*	41 ± 1.3*	60 ± 0.7*	
	E. hexano (II)	6 ± 3.8	11 ± 1.9*	11 ± 4.1*	21 ± 2.1*	
	E. hexano (I)	9 ± 4.8	4 ± 2.3	32 ± 2.4*	0 ± 0.0	

Resultados expresados como promedio ± desviación estándar ($n=4$). *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo, según Tukey HSD ($p<0.05$). Controles positivos: glifosato y hexazinona. Los extractos y los controles positivos fueron evaluados a 200 mg/L. E= Extracto.

Con respecto al efecto de los extractos sobre la respiración de las plántulas, los mayores efectos fitotóxicos sobre el consumo de oxígeno fueron provocados por el extracto hexánico (I) del micelio en CPD de *Xylaria* sp. Gse24 sobre *A. hypochondriacus* (65%) y el del extracto metanólico del medio de cultivo en CPD de *Xylaria* sp. Gse25 sobre las semillas de *P. miliaceum* (58%), siendo este último valor superior al provocado por el control positivo el glifosato evaluado a la misma concentración (200 µg/mL) sobre las semillas de *P. miliaceum* (36%).

1.4 Evaluación del potencial antifúngico y antioomiceto

En el **Cuadro 6** se resumen los resultados de la evaluación el potencial antifúngico y antioomiceto. En general, se observó que los extractos metanólicos causaron los mayores efectos inhibitorios sobre el crecimiento del micelio de hongos y oomicetos.

Cuadro 6. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, sobre el crecimiento del micelio de microorganismos fitopatógenos modelo.

<i>Xylaria</i> sp.	Medio	Tratamiento	Inhibición sobre el crecimiento del micelio (%)						
			<i>A. alternata</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>R. solani</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>P. capsici</i>	
Gse24	Controles positivos	Ridomil	46 ± 4.0*	8 ± 5.5	43 ± 4.5*	15 ± 6.5*	98 ± 0.5*	89 ± 4.2*	
		Carbendazim	61 ± 5.2*	96 ± 2.5*	97 ± 1.3*	98 ± 0.7*	52 ± 6.2*	40 ± 5.3*	
	CPD Medio de cultivo	E. metanol	22 ± 3.3*	19 ± 3.3*	51 ± 1.0*	52 ± 3.3*	56 ± 3.0*	55 ± 1.3*	
		E. hexano (II)	93 ± 0.4*	33 ± 1.4*	-	-	-	-	
	CPD Micelio	E. metanol	25 ± 3.2*	19 ± 3.3*	64 ± 2.6*	49 ± 3.6*	74 ± 1.4*	60 ± 0.8*	
		E. hexano (II)	21 ± 1.9*	13 ± 3.3*	32 ± 2.1*	27 ± 4.6*	54 ± 3.0*	22 ± 3.9*	
		E. hexano (I)	20 ± 4.1*	22 ± 0.8*	29 ± 4.0*	45 ± 3.3*	32 ± 5.7*	9 ± 5	
	Cereal	E. metanol	51 ± 2.0*	11 ± 3.5*	39 ± 3.7*	27 ± 3.3*	20 ± 3.0*	24 ± 4.1*	
		E. hexano (II)	12 ± 5.4	0 ± 0	18 ± 2.6*	51 ± 1.7*	8 ± 3.4	0 ± 0	
		E. hexano (I)	0 ± 0	0 ± 0	24 ± 2.7*	41 ± 1.8*	47 ± 2.7*	0 ± 0	
	Arroz	E. metanol	27 ± 4.0*	15 ± 5.1*	41 ± 2.9*	0 ± 0	34 ± 5.3*	24 ± 5.0*	
		E. hexano (II)	0 ± 0	4 ± 3.2	6 ± 3.6	0 ± 0	14 ± 1.0*	0 ± 0	
		E. hexano (I)	18 ± 2.2*	21 ± 3.1*	32 ± 4.6*	40 ± 1.4*	42 ± 2.3*	6 ± 4.7	
	CPD Medio de cultivo	E. metanol	27 ± 3.2*	6 ± 4	65 ± 2.8*	35 ± 3.7*	52 ± 3.8*	65 ± 2.1*	
		E. hexano (II)	10 ± 3.6*	-	-	-	-	-	
Gse25	CPD Micelio	E. metanol	21 ± 4.2*	12 ± 5.2	56 ± 1.5*	44 ± 1.2*	63 ± 2.2*	31 ± 3.5*	
		E. hexano (II)	18 ± 4.1*	8 ± 4.1	34 ± 4.2*	75 ± 1.5*	17 ± 5.2*	0 ± 0	
		E. hexano (I)	9 ± 3.7	10 ± 2.7*	23 ± 2.8*	40 ± 2.7*	51 ± 3.3*	31 ± 3.8*	
	Cereal	E. metanol	10 ± 3.1	16 ± 4.6*	47 ± 1.7*	18 ± 1.8*	45 ± 3.5*	41 ± 3.1*	
		E. hexano (II)	0 ± 0	12 ± 4.6	25 ± 2.8*	39 ± 2.6*	22 ± 4.5*	0 ± 0	
		E. hexano (I)	0 ± 0	0 ± 0	16 ± 4.0*	37 ± 1.7*	18 ± 5.7*	0 ± 0	
	Arroz	E. metanol	28 ± 2.1*	8 ± 4	41 ± 2.7*	26 ± 4.8*	45 ± 4.5*	40 ± 2.8	
		E. hexano (II)	0 ± 0	9 ± 2.5	18 ± 4.3*	11 ± 4.5*	15 ± 2.5*	0 ± 0	
		E. hexano (I)	0 ± 0	5 ± 2.8	12 ± 3.5*	13 ± 4.6*	25 ± 4.3*	0 ± 0	

Resultados expresados como promedio ± desviación estándar ($n=4$). * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo, según Tukey HSD ($p<0.05$). Controles positivos Ridomil y Carbendazim. Los extractos, y los controles positivos fueron evaluados a 250 mg/L. E= Extracto.

Los valores de inhibición más altos fueron producidos por los extractos provenientes tanto del medio de cultivo como del micelio obtenidos a partir de los cultivos en CPD, de los dos aislamientos de *Xylaria* sp. El extracto hexánico (II) del medio de cultivo en CPD de Gse24 provocó el porcentaje de inhibición más alto sobre el crecimiento del micelio de *A. alternata* (93%), siendo superior al generado por el control positivo Carbendazim (61%), evaluado a la misma concentración (250 µg/mL). Asimismo, el extracto hexánico (II) del micelio de CPD de Gse25 causó el mayor porcentaje de inhibición sobre *R. solani* (75%).

Con respecto a los extractos metanólicos, los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron del extracto proveniente del micelio en CPD, del endófito *Xylaria* sp. Gse24. Este presentó resultados significativos sobre el crecimiento de los hongos *Pestalotiopsis* sp. (64%) y *R. solani* (49%), y sobre los oomicetos *P. aphanidermatum* (74%) y *P. capsici* (60%). El extracto obtenido a partir del medio de cultivo en CPD también presentó valores significativos y superiores al 50% de inhibición sobre los mismos hongos y oomicetos con porcentajes de inhibición de 51, 52, 56 y 55%, respectivamente. El tratamiento con el extracto metanólico del medio de cultivo en CPD del aislamiento Gse25, también generó resultados significativos y superiores al 50% de inhibición sobre el hongo *Pestalotiopsis* sp. (65%) y los oomicetos *P. aphanidermatum* (52%) y *P. capsici* (65%), mientras que el del micelio fue activo sobre el hongo *Pestalotiopsis* sp. (56%) y el oomiceto *P. aphanidermatum* (63%). En general, a la concentración de prueba que fue de 250 µg/mL, los extractos y fracciones obtenidos a partir de cultivos en cereal y arroz provocaron porcentajes de inhibición menores al 50%.

1.5 Selección de las condiciones de cultivo

La selección de condiciones de cultivo se llevó a cabo tomando en cuenta los rendimientos de extracción y la actividad biológica demostrada por los extractos y fracciones obtenidos a partir de los hongos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 a través de un análisis de PCA. En la **Figura 3**, se muestran los resultados del análisis de PCA construido a partir de los resultados de inhibición sobre la longitud de raíz (**Cuadro 4**) y sobre el crecimiento de micelio (**Cuadro 5**). En la **Figura 3A**, la proyección de variables del PCA, que explica un 66% de la varianza total de los datos, permitió ubicar los extractos en tres regiones del diagrama: 1) con mayor actividad antifúngica y antioomiceto (cuadrante superior-izquierdo), 2) con mayor actividad fitotóxica (cuadrante inferior-izquierdo) y 3) sin actividad inhibitoria sobre los organismos evaluados (extremo derecho). En el diagrama de dispersión de casos de la **Figura 3B**, se pudo observar la tendencia de las muestras a agruparse de acuerdo a su naturaleza química: en extractos metanólicos (grupo azul) y extractos hexánicos (grupo verde). A partir de este diagrama se resumen los resultados de bioactividad concluyendo que, de manera general, los extractos metanólicos tienden a ser más activos que los extractos hexánicos. Al relacionar la bioactividad con los medios de cultivo empleados, se observó una tendencia mayor a la actividad antifúngica y antioomiceto con extractos obtenidos a partir de los cultivos en CPD, y que, además los tratamientos relacionados con extractos provenientes del cultivo en arroz exhibieron una actividad fitotóxica mayor.

Finalmente, los diagramas PCA generados a partir de los perfiles cromatográficos (**Figura 2**) y de los resultados de actividad biológica (**Figura 3**), permitieron observar de manera gráfica que, el cambio del medio de cultivo representó un factor importante tanto en la variación del perfil químico como en la selectividad en la inhibición sobre diferentes organismos blanco (27,29,50).

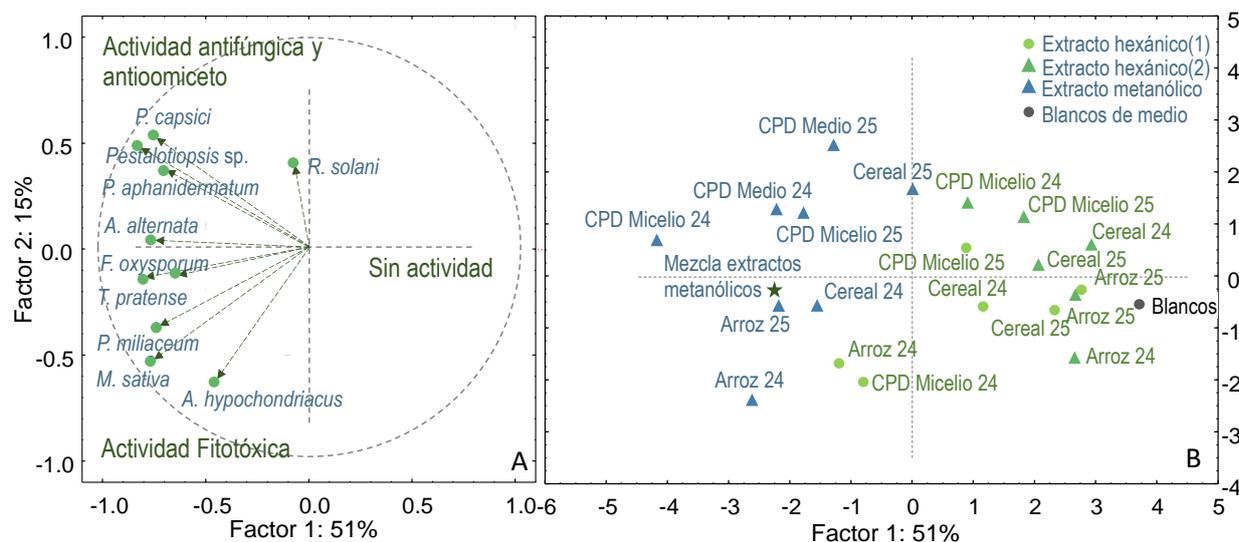


Figura 3. Análisis de componentes principales teniendo en cuenta los resultados de la actividad biológica. A) proyección de variables. B) Diagrama de distribución de extractos y fracciones primarias.

Con base en los resultados de bioactividad y con el fin de llevar a cabo el fraccionamiento químico enfocado en el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica demostrada a nivel de extractos, que conduzca al descubrimiento de metabolitos secundarios de interés para el desarrollo de agroquímicos alternativos, en el presente proyecto de investigación se decidió continuar el proceso de aislamiento con la mezcla de los extractos metanólicos obtenidos a partir de las diferentes condiciones de cultivo. Cabe mencionar que, en el caso de los cultivos en cereal, a pesar de mostrar la menor actividad biológica, estos extractos se incorporaron a las mezclas con el fin de enriquecerlas con aquellos metabolitos responsables del potencial bioactivo, debido a su alto rendimiento de extracción.

1.6 Concentración inhibitoria media de los extractos

La determinación de las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) de los extractos hexánico (II) y metanólico, se llevó a cabo evaluando el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de las semillas y microorganismos modelo, utilizando al menos cinco concentraciones en un rango entre 200 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. En los **Cuadros 7 y 8** se resumen los valores de CI_{50} , observando que tanto las semillas como los microorganismos evaluados fueron más sensibles al extracto metanólico que al hexánico (II). En todos los casos el extracto metanólico demostró efectos dependientes de la concentración en el intervalo de concentraciones de 100-700 $\mu\text{g/mL}$.

En el **Cuadro 7** se observa que las semillas más sensibles al extracto metanólico fueron las de *T. pratense* (CI_{50} 480 $\mu\text{g/mL}$). Para esta especie el extracto provocó un efecto fitotóxico mayor que el provocado por el control positivo glifosato (CI_{50} 650 $\mu\text{g/mL}$).

Cuadro 7. Concentraciones inhibitorias medias de los extractos de los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, sobre el crecimiento de la raíz de semillas modelo.

Tratamiento	Concentración inhibitoria media [$\mu\text{g/mL}$]			
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>M. sativa</i>	<i>T. pratense</i>	<i>P. miliaceum</i>
Extracto hexánico (II)	>1000	>1000	750 \pm 34	>1000
Extracto metanólico	690 \pm 34	500 \pm 25	480 \pm 22	500 \pm 37
Glifosato	330 \pm 18	610 \pm 28	650 \pm 30	450 \pm 21

Resultados expresados como pendiente promedio \pm error del modelo (95%, $n=4$).

Por otra parte, en el **Cuadro 8** se observa que el extracto metanólico mostró un efecto inhibitorio mayor sobre los oomicetos *P. capsici* (CI_{50} 300 $\mu\text{g/mL}$) y *P. aphanidermatum* (CI_{50} 310 $\mu\text{g/mL}$), seguido por el efecto sobre el hongo *Pestalotiopsis* sp. (CI_{50} 440 $\mu\text{g/mL}$).

Cuadro 8. Concentraciones inhibitorias medias de los extractos de los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, sobre el crecimiento del micelio de microorganismos fitopatógenos modelo

Tratamiento	Concentración inhibitoria media [$\mu\text{g/mL}$]					
	<i>A. alternata</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>R. solani</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>P. capsici</i>
Extractos hexánicos	>1000	>1000	>1000	589 \pm 56	>1000	>1000
Extractos metanólicos	500 \pm 26	720 \pm 42	440 \pm 34	540 \pm 18	310 \pm 15	300 \pm 19
Carbendazim®	<100	<100	<100	<100	-	-
Ridomil®	-	-	-	-	<100	<100

Resultados expresados como pendiente \pm error del modelo ($n=4$). F= Fracción

2. Fraccionamiento químico biodirigido

Se obtuvieron 14 fracciones primarias (I-XIV) a partir de 30 g del extracto metanólico. El análisis de los perfiles químicos de fracciones secundarias por CLAR-DAD (200 y 400 nm), permitió evidenciar que poseían una alta complejidad metabólica, y en consecuencia se requería realizar fraccionamientos terciarios. Las fracciones IV-XII mostraron los mayores rendimientos (**Cuadro 1**), por lo cual fueron elegidas para evaluar su efecto fitotóxico sobre la longitud de raíz de las semillas de prueba a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ y su efecto inhibitorio sobre el crecimiento del micelio en los hongos fitopatógenos *R. solani*, *Pestalotiopsis* sp. y de los oomicetos *P. aphanidermatum* y *P. capsici*, a una concentración de prueba de 250 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados se muestran en las **Figuras 3 y 4**.

En la **Figura 3**, se observa que el efecto fitotóxico sobre las plantas modelo se concentró en las fracciones IV a VIII, y que la especie más sensible fue *P. miliaceum* (41 a 66% de inhibición). Las fracciones primarias V y VII, se seleccionaron para continuar con el aislamiento de compuestos bioactivos teniendo en cuenta la cantidad disponible para realizar su fraccionamiento secundario.

La fracción V (3.28 g), tuvo su mayor efecto fitotóxico sobre las semillas de *T. pratense* (39%) y *P. miliaceum* (40%). La fracción VII (2.39 g), provocó un efecto inhibitorio significativo sobre todas las semillas de prueba (32%-52%).

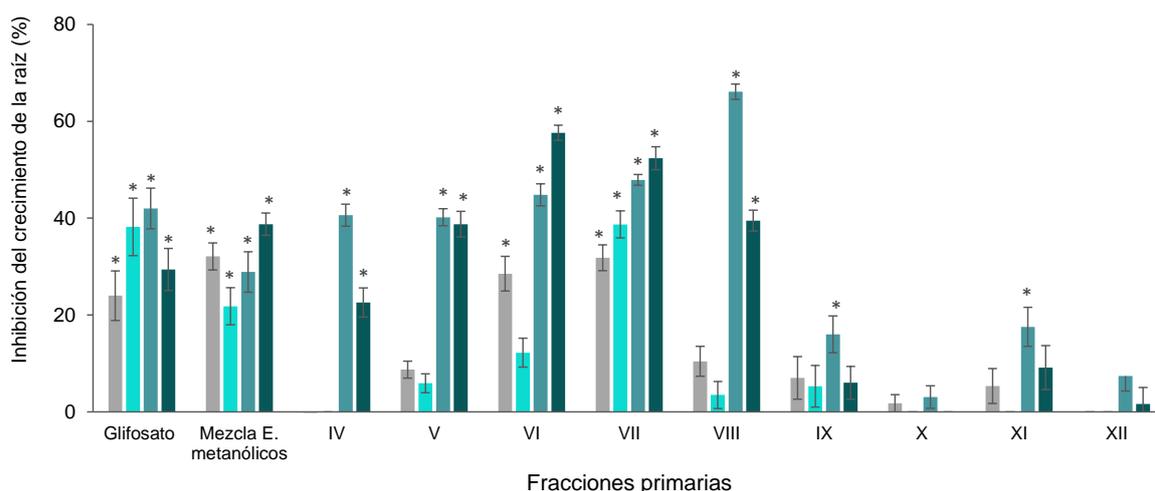


Figura 1. Efecto fitotóxico de las fracciones primarias, sobre el crecimiento de la raíz de semillas modelo, \blacksquare *M. sativa*, \blacksquare *A. hypochondriacus*, \blacksquare *P. miliaceum*, \blacksquare *T. pratense*. Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar ($n=4$). *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo, según Tukey HSD ($p<0.05$). Muestras evaluadas a 200 mg/L.

En la **Figura 4** se observa el efecto de las fracciones primarias IV-XII sobre el crecimiento del micelio de cuatro microorganismos fitopatógenos blanco. En general, los oomicetos *P. aphanidermatum* y *P. capsici* fueron los microorganismos más sensibles a los tratamientos, inhibiendo su crecimiento en un intervalo de 40 a 83%. Además, se observó que para el hongo

R. solani, solo las fracciones IV a VI presentaron un efecto inhibitorio significativo (26-46%). La fracción V, generó un efecto inhibitorio significativo sobre todos los microorganismos evaluados (37%-68%). Por otra parte, la fracción VII presentó inhibición significativa sobre los oomicetos *P. aphanidermatum* (83%), y *P. capsici* (69%).

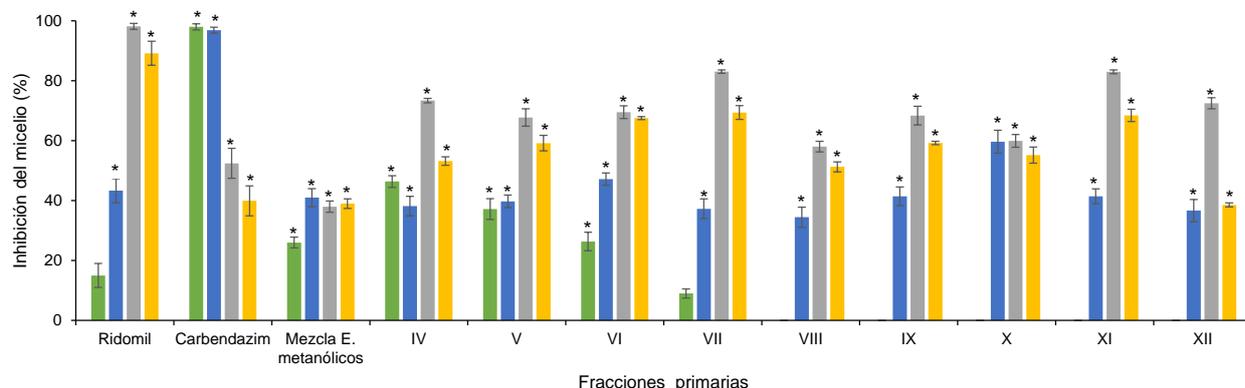


Figura 2. Efecto antifúngico y antioomiceto de las fracciones primarias, sobre el crecimiento del micelio de microorganismos fitopatógenos \blacksquare *R. solani*, \blacksquare *Pestalotiopsis* sp., \blacksquare *P. aphanidermatum*, \blacksquare *P. capsici*. Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar ($n=4$). *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo, según Tukey HSD ($p<0.05$). Muestras evaluadas a 250 mg/L

3. Identificación, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios

El estudio químico biodirigido del extracto metanólico derivado del cultivo de los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 en distintos medios de crecimiento, permitió la identificación de cinco metabolitos secundarios: la **5-(3R)-carboximeleina** (3.8 mg), los **ácidos benzoico** y **fenilacético**, la **xilaricina** (3.9 mg) y la **estachilina-D** (6.0 mg).

3.1 Identificación de los ácidos benzoico y fenilacético

Los ácidos benzoico (10.3 min, 12%) y fenilacético (11.9 min, 72%) se identificaron, mediante CG-EM, como los componentes mayoritarios en la fracción colectada entre 6.5 y 7.4 min de la fracción secundaria V9 (< 1 mg). El perfil cromatográfico se muestra en la **Figura 5** y los porcentajes de área y la comparación entre los índices de retención lineal experimentales con los reportados en la literatura se muestran en el **Cuadro 9**.

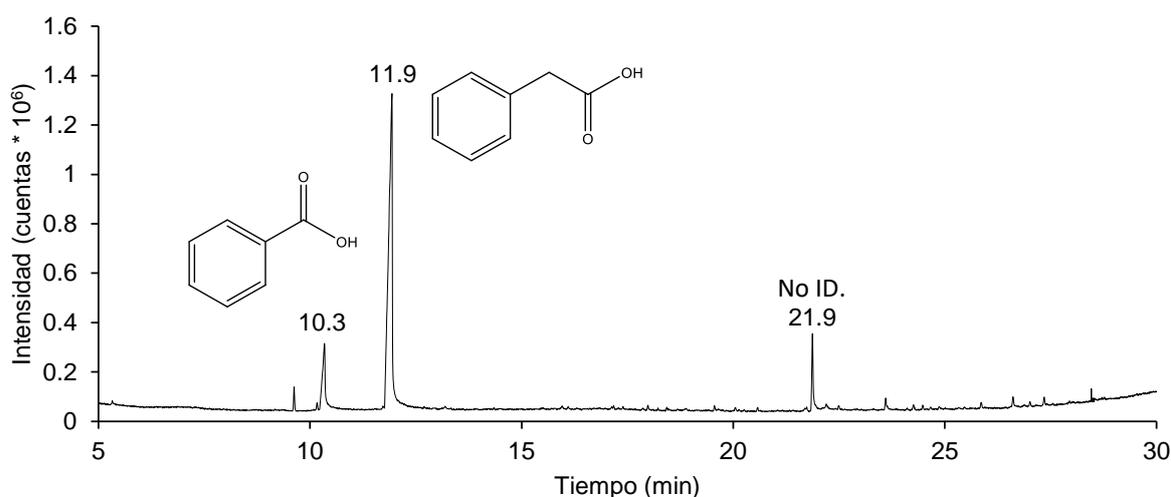


Figura 3. Perfil cromatográfico por CG-EM y composición química del pico colectado entre 6.5-7.5 min, obtenido a partir de la fracción secundaria V_9.

En el espectro de masas por IE del **ácido benzoico** se observó el ion molecular a m/z 222 $[M]^+$, además de los picos de m/z 105 $[M-OH]^+$, característico de los ácidos carboxílicos y de m/z 77 $[M-OH-CO]^+$ confirmando la existencia del anillo aromático, junto al ion de m/z 51. Este espectro

de masas, al igual que el índice de retención lineal del compuesto, coincidió con el reportado en la base de datos del NIST (51) y de Adams (52).

Cuadro 9. Composición química por CG-EM del pico colectado entre 6.5-7.5 min, aislado a partir de la fracción secundaria V_9.

Compuesto	t _R (min)	Índices de retención lineales		Área (%)
		Calculado	Literatura	
Ácido benzoico	10.3	1161	1162	12.1
Ácido fenilacético	11.9	1250	1252	71.9
No identificado	21.9	1928	-	6.6

El **ácido benzoico** es un compuesto aromático cuya biosíntesis se encuentra ligada a la degradación del ácido cinámico, generado en microorganismos y plantas a través de la ruta del ácido siquímico (53). Ha sido aislado previamente de algunos endófitos como *Phomopsis liquadambari* (54) y *Cladosporium cladosporioides* (55). A la fecha no existen reportes de su aislamiento a partir de hongos del género *Xylaria*. Este metabolito cumple un papel importante en la relación endófito-hospedera al actuar como elicitador en la producción de algunos metabolitos secundarios de importancia farmacéutica como el taxol, y además, se encuentra involucrado en la defensa de las plantas contra hongos fitopatógenos (56). De igual manera, se ha relacionado su presencia en plantas con alteraciones en; la absorción de minerales, el contenido de clorofila, el proceso fotosintético y la distribución de carbohidratos (55). También, actúa sobre bacterias y hongos impidiendo la eliminación de especies reactivas de oxígeno, y ha sido detectado en altas concentraciones en las raíces de algunas plantas luego de procesos infecciosos (57). Además, se ha demostrado su efecto alelopático sobre la germinación de semillas de *Betula platy*, *Pennisetum americanum* y *Arabidopsis thaliana* (55). Actualmente, es usado como conservante de origen natural en algunos alimentos debido a su inhibición sobre el crecimiento de algunos hongos y bacterias (58).

Por otra parte, en el espectro de masas por IE del **ácido fenilacético**, se observó el ion molecular de m/z 136 [M]^{•+}. La pérdida del grupo carbonilo generó el ion pico base con la estabilidad característica para el ion tropilio de m/z 91 [M-45]⁺, posteriormente se observaron los iones diagnósticos característicos de la fragmentación de este ion en m/z 65 y 39. El patrón de fragmentación observado para el ácido fenilacético coincidió con el espectro de masas, IE, reportado en la base de datos del NIST (59) y de Adams (52).

Este compuesto se produce a partir de la fenilalanina, a través de la ruta del ácido siquímico y es precursor de compuestos como el ácido indolacético y el ácido salicílico (53,60). Se produce ampliamente a partir de plantas vasculares y no vasculares, y tiene un rol importante en el desarrollo de la planta y en la elongación de raíces (61). Además, se encuentra asociado a la resistencia sistémica de las plantas (62). El ácido fenilacético también ha sido aislado a partir de los hongos *F. oxysporum* (63) y *R. solani* (60). En el estudio realizado por Kachlicki *et al.* (63), se demostró su efecto inhibitorio sobre el crecimiento en las raíces de *Brassica napus* y *Pisium sativum*. También, está comprobado su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de algunas especies fúngicas como *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum* (62).

3.2 Aislamiento y caracterización de la 5-carboxi-(3R)-meleina

La **5-carboxi-(3R)-meleina** (10 mg) se caracterizó mediante el análisis de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C (700 y 175 MHz, CDCl₃), y los experimentos COSY, HMBC, HSQC y NOESY. Los datos obtenidos coincidieron con los reportados en la literatura por Klaikey *et al.* (64). En el **Cuadro 10**, se describen los desplazamientos químicos observados.

Las meleinas son compuestos derivados de la ruta del acetato mevalonato (53) y se encuentran ampliamente distribuidas en los hongos del género *Xylaria*. La **5-carboxi-(3R)-meleina** ha sido aislada, previamente, a partir de diferentes hongos endófitos pertenecientes a este género, entre los que se encuentran: *X. nigripes* (65), *X. cubensis* (64), y *Xylarias* sp. obtenidas a partir de diferentes hospedadoras como *Azadirachta indica* (66), *Vitis labrusca* (67) y *Bisboecklera microcephala* (68). Dentro de su potencial biológico, se ha explorado la actividad antimicrobiana sobre los patógenos humanos *Staphylococcus aureus*, *T. rubrum*, y *Candida albicans*, sobre los cuales presentó concentraciones inhibitorias mínimas superiores a 128 µg/mL (68). En otro estudio realizado por Chinworrungsee *et al.* (69), evaluaron la actividad antimalárica sobre el parásito *Plasmodium falciparum* y observaron una actividad inhibitoria moderada. A la fecha, no existen reportes de su actividad fitotóxica y de su efecto sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, lo cual abre el panorama para estudiar su potencial como producto de interés agroquímico.

3.3 Aislamiento y caracterización de la xilaricina

La **xilaricina** (3.9 mg) se caracterizó a través del análisis de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C, (700 y 175 MHz, CDCl₃), y los experimentos COSY, HMBC, HSQC y NOESY. Los datos obtenidos coincidieron con los reportados en la literatura por Rukachaisirikul *et al* (70), los desplazamientos químicos y la estructura propuesta para este compuesto se observan en el **Cuadro 10**. La estructura propuesta se confirmó por difracción de rayos X.

La **xilaricina** se encuentra clasificada en el grupo de las citocalasinas derivadas de la leucina (71). Estos metabolitos secundarios se biosintetizan principalmente a través de la ruta del acetato mevalonato (72) y se encuentran ampliamente relacionados con los hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Zygosporium*, *Phoma*, *Metarhizum*, *Chaetomium*, *Rosellinia*, *Ascochyta*, *Hypoxyton*, y *Phomopsis* (71). Las citocalasinas son conocidas por poseer una gran variedad estructural y un amplio rango de actividades biológicas. Principalmente se ha demostrado su actividad citotóxica, anticancerígena, antibiótica, antifúngica, antiparasitaria, antiviral, entre otras (71). Diversos estudios han demostrado que estas moléculas también exhiben propiedades fitotóxicas (73–75), por lo cual son consideradas candidatos potenciales para el control de malezas (71).

Es importante destacar que, en la literatura solo se reporta un trabajo previo a la presente investigación, realizado por Rukachaisirikul *et al* en 2009 (70), en el cual se aisló y caracterizó a la **xilaricina** a partir del cultivo del hongo de origen marino *Xylaria* sp. PSUF100, obtenido de un coral del género *Anella*. Además, se evaluó su actividad sobre *S. aureus*, obteniendo una concentración inhibitoria mínima de 200 µg/mL.

3.4 Aislamiento y caracterización de la estachilina-D

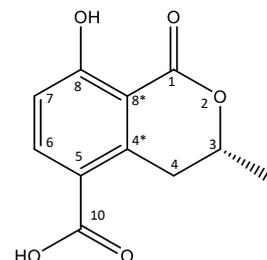
La caracterización de la **estachilina-D** (6.0 mg) se realizó a partir del análisis de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C (700 y 175 MHz, CDCl₃), los datos obtenidos se describen en el **cuadro 10**. La masa molecular del compuesto (238 uma), se determinó a partir del análisis del espectro de masas obtenido a través de DART en modo positivo, en el cual se observó el ion en *m/z* 221, correspondiente al ión protonado del producto de deshidratación. Los datos espectrométricos y espectroscópicos adquiridos para este compuesto coincidieron con los reportados previamente en la literatura (76). Cabe destacar que, este informe corresponde al segundo reporte del aislamiento de la estachilina-D y al primero de aislamiento a partir de un hongo perteneciente al género *Xylaria*. Este derivado del ácido fenilacético y fue aislado por primera vez en 2011 por Almeida *et al.* (76) a partir del hongo *Stachylidium* sp. obtenido de una esponja marina. A la fecha no se ha reportado ninguna actividad biológica asociada a este compuesto.

Cuadro 10. Desplazamientos químicos observados por RMN (^1H , ^{13}C , 700 y 175 MHz, CDCl_3) para los compuestos aislados a partir de la mezcla de extractos metanólicos obtenidos diferentes medios de cultivo de los hongos endófitos *Xylaria* sp. 24 y 25.

5-Carboxi-(*R*)-meleina

^1H RMN (700 MHz, CDCl_3): δ 1.58 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-9), 3.07 (1H, dd, $J = 17.9, 11.8$ Hz, H-4a), 3.93, (1H, dd, $J = 17.8, 3.2$ Hz, H-4b), 4.69 (1H, m, H-3), 6.98 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-7), 8.23 (1H, d, $J = 9$ Hz, H-6), 11.94 (1H, s, OH-8) (64).

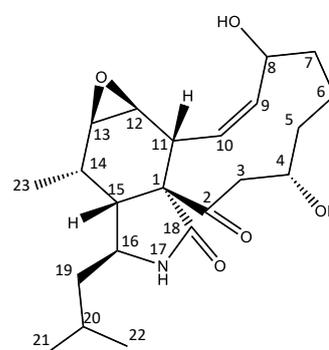
^{13}C RMN (175 MHz, CDCl_3): δ 20.8 (C-9), 32.7 (C-4), 75.5 (C-3), 109.1 (C-8*), 116.5 (C-7), 117.3 (C-5), 139.2 (C-6), 144.5 (C-4*), 166.2 (C-8), 169.2 (C-10), 170.0 (C-1) (64).



Xilaricina

^1H RMN (700 MHz, CDCl_3): δ 0.92 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-22), 0.93 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-21), 1.04 (1H, m, H-6a), 1.19 (1H, m, H-7a), 1.19 (2H, m, H-19), 1.28 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-23), 1.36 (1H, m, H-5a), 1.59 (1H, m, H-20), 1.66 (1H, m, H-6b), 1.71 (1H, m, H-5b), 1.76 (1H, m, H-14), 2.05 (1H, m, H-7b), 2.07 (1H, dd, $J = 18.6, 4.8$ Hz, H-3a), 2.15 (1H, dd, $J = 10.2, 5.9$ Hz, H-11), 2.61 (1H, dd, $J = 6.0, 3.0$ Hz, H-15), 2.86 (1H, t, $J = 5.1$ Hz, H-13), 3.09 (1H, t, $J = 5.1$ Hz, H-12), 3.47 (1H, td, $J = 9.3, 4.4$ Hz, H-16), 4.00 (1H, dd, $J = 18.6, 7.4$ Hz, 3b) 4.07 (1H, dt, $J = 10.2, 4.9$ Hz, H-8), 4.18 (1H, m, H-4), 5.31 (1H, dd, $J = 15.4, 10.2$ Hz, H-9), 6.5 (1H, dd, $J = 15.4, 10.2$ Hz, H-10), 6.71 (1H, s, NH-17) (70).

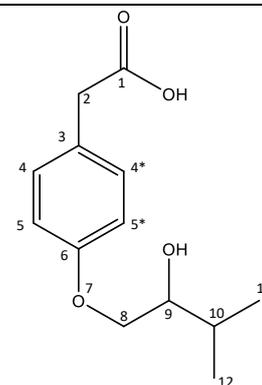
^{13}C RMN (175 MHz, CDCl_3): δ 15.53 (C-23), 16.36 (C-6), 21.61 (C-21), 23.58 (C-22), 25.18 (C-20), 34.01 (C-14), 34.15 (C-7), 34.33 (C-5), 44.7 (C-3), 48.84 (C-19), 49.68 (C-15), 49.85 (C-11) 50.58 (C-16), 54.1 (C-12), 54.6 (C-13), 64.88 (C-1), 66.75 (C-4), 75.76 (C-8), 129.29 (C-10), 136.95 (C-9), 174.52 (C-18), 210.54 (C-2) (70).



Estachilina-D

^1H RMN (700 MHz, CDCl_3): δ 0.98 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-12), 1.03 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-11), 1.87 (1H, m, H-10), 3.58 (2H, s, H-2), 3.72 (1H, ddd, $J = 7.7, 6.2, 2.9$ Hz, H-9), 3.88 (1H, dd, $J = 9.3, 7.7$ Hz, H-8a), 4.02 (1H, dd, $J = 9.3, 2.9$ Hz, H-8b), 6.87 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-4), 7.19 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5) (76).

^{13}C RMN (175 MHz, CDCl_3): δ 18.4 (C-12), 19.1 (C-11), 31.2 (C-10), 40.4 (C-2), 70.91 (C-8), 75.2 (C-9), 115.1 (C-4), 126.4 (C-3), 130.8 (C-5), 158.3 (C-6), 176.9 (C-1) (76).



VI. CONCLUSIONES

Los rendimientos de extracción de los metabolitos secundarios biosintetizados por los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 cultivados en diferentes medios, fueron significativamente mayores en los medios sólidos respecto al medio líquido. Los cultivos en cereal de avena tuvieron un rendimiento aproximado de 40 mg/g de medio y los de arroz 10 mg/g de medio.

Los extractos obtenidos a partir de los cultivos en medios sólidos de los endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, tuvieron una mayor proporción de metabolitos secundarios de naturaleza poco polar (35-56%) frente a los extractos obtenidos a partir de medios líquidos (5-28%).

El análisis PCA realizado a partir de los perfiles químicos de los extractos metanólicos de los diferentes medios de cultivos, permitió establecer que el cambio en el perfil cromatográfico (a 210 nm) fue mayor al variar el medio de cultivo de los hongos endófitos que al cambiar la cepa cultivada, lo cual permitió proponer a los endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 como dos posibles morfotipos.

En la evaluación del potencial fitotóxico de los extractos se observó que el proceso fisiológico más inhibido fue el crecimiento de la raíz, seguido de la respiración de las plántulas. Además, no se observó un efecto significativo sobre la germinación de las mismas.

Los valores de CI_{50} permitieron determinar que la maleza más sensible a los extractos metanólicos fue *Trifolium pratense* (479 $\mu\text{g/mL}$), además, de los fitopatógenos *P. aphanidermatum* (310 $\mu\text{g/mL}$) y *P. capsici* (300 $\mu\text{g/mL}$).

De manera general se observó, que los extractos de naturaleza polar obtenidos a partir de los diferentes medios de cultivo poseen un efecto inhibitorio mayor que los extractos hexánicos, sobre el crecimiento de los organismos blanco. En el análisis PCA construido a partir de los resultados de bioactividad se logró representar dicha tendencia de manera gráfica, además, se observó que los cultivos en medio de arroz favorecieron la producción de metabolitos secundarios con efecto inhibitorio sobre malezas, mientras que los cultivos en medio CPD favorecieron la producción de metabolitos con efecto inhibitorio sobre hongos y oomicetos.

El fraccionamiento químico biodirigido del extracto metanólico, permitió el aislamiento de tres metabolitos secundarios conocidos: la **xilaricina** (3.9 mg), la **estachilina-D** (6.0 mg) y la **5-carboxi-(3R)-meleina** (10.0 mg), cuyas estructuras químicas fueron determinadas a partir sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas. Además, se identificaron los metabolitos **ácido fenilacético** y **ácido benzoico** por CG-EM.

Finalmente, en este trabajo se describe por primera vez el aislamiento y la caracterización de los compuestos **estachilina-D** y **xilaricina**, a partir de hongos endófitos de origen terrestre. Además, consiste en el primer trabajo en el cual se obtuvo la **estachilina-D** a partir de un hongo perteneciente al género *Xylaria*.

VII. PERSPECTIVAS

- Determinar la identidad taxonómica de los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 mediante métodos moleculares, con el fin de establecer si pertenecen a la misma especie.
- Establecer la actividad fitotóxica, antifúngica y antioomiceto de la fracción volátil producida por los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25 debido a la presencia de los ácidos benzoico y fenilacético.
- Optimizar el proceso de cultivo de los hongos endófitos Gse24 y Gse25, en los medios CPD y arroz, con el fin de incrementar la actividad biológica sobre plagas a nivel de extracto.
- Evaluar el efecto fitotóxico, antifúngico y antioomiceto de los metabolitos secundarios aislados e identificados a partir de los extractos obtenidos de los diferentes cultivos de los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25, con el fin de determinar su potencial en el control de malezas, hongos y oomicetos con impacto negativo en la industria agrícola.
- Continuar el proceso de aislamiento, purificación y caracterización de metabolitos secundarios a partir de las demás fracciones secundarias que tuvieron actividad inhibitoria significativa sobre los organismos de prueba, con la finalidad de ampliar la caracterización química de los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos *Xylaria* sp. Gse24 y Gse25.
- Determinar mediante cromatografía líquida de alta resolución la concentración de los metabolitos secundarios aislados en las diferentes fracciones metanólicas, con el fin de establecer aquellas condiciones de cultivo que favorecen su biosíntesis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAO. The future of food and agriculture: trends and challenges. The future of food and agriculture: trends and challenges. 2017. 180 p.
2. Mayett-Moreno Y, Oglesby JML. Beyond food security: Challenges in food safety policies and governance along a heterogeneous agri-food chain and its effects on health measures and sustainable development in Mexico. *Sustain*. 2018;10(12).
3. FAO. Global agriculture towards 2050. High Lev Expert Forum-How to Feed world 2050 [Internet]. 2009;1-4. [citado el 20 de agosto de 2019]. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf
4. Luiselli F. C. Agricultura y alimentación en México. Evolución, desempeño y perspectivas. Editores SX, editor. Ciudad de México; 2017. 471 p.
5. INEGI. Producto Interno Bruto de México [Internet]. 2019. [citado el 22 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=5185>
6. INEGI. Uso de Suelo y Vegetación. Serie VI [Internet]. 2017. [citado el 12 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/temas/usuarios/default.html#Metadatos>
7. INEGI. Encuesta Nacional Agropecuaria [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/programas/ena/2017/>
8. Oerke EC. Crop losses to pests. *J Agric Sci*. 2006;144(1):31-43.
9. Kaur H, Garg H. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. En: *Pesticides - Toxic Aspects*. InTech; 2014.
10. FAO. Plaguicidas USO [Internet]. 2019. [citado el 22 de septiembre de 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>
11. Kim KH, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ*. 2017;575:525-35.
12. Popp J, Pető K, Nagy J. Pesticide productivity and food security. A review. *Agron Sustain Dev*. 2013;33(1):243-55.
13. Damalas CA, Eleftherohorinos IG. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;8(5):1402-19.
14. Pimentel D. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States In *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*. 2004;89-111.
15. Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO. Natural products in crop protection. *Bioorganic Med Chem [Internet]*. 2009;17(12):4022-34.
16. Villaverde JJ, Sandín-España P, Sevilla-Morán B, López-Gotí C, Alonso-Prados JL. Biopesticides from natural products: Current development, legislative framework, and future trends. *BioResources*. 2016;11(2):5618-40.
17. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech*. 2017;7(1).
18. Sparks TC, Hahn DR, Garizi N V. Natural products, their derivatives, mimics and synthetic equivalents: role in agrochemical discovery. *Pest Manag Sci*. 2017;73(4):700-15.
19. Masi M, Nocera P, Reveglia P, Cimmino A, Evidente A. Fungal metabolites antagonists towards plant pests and human pathogens: Structure-activity relationship studies. *Molecules*. 2018;23(4).
20. Westwood JH, Charudattan R, Duke SO, Fennimore SA, Marrone P, Slaughter DC, et al. Weed Management in 2050: Perspectives on the Future of Weed Science. *Weed Sci*. 2018;66(3):275-85.
21. Gao H, Li G, Lou HX. Structural diversity and biological activities of novel secondary metabolites from endophytes. *Molecules*. 2018;23(3).
22. Kusari S, Hertweck C, Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chem Biol [Internet]*. 2012;19(7):792-8.
23. Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *J Nat Prod*. 2004;67(2):257-68.
24. Schulz B, Haas S, Junker C, André N, Schobert M. Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Curr Sci*. 2015;109(1):39-45.
25. Kusari S, Spiteller M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Nat Prod Rep*. 2011;28(7):1203-7.
26. Li G, Lou HX. Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Med Res Rev*. 2018;38(4):1255-94.
27. Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*. 2002;3(7):619-27.
28. Rateb ME, Houssen WE, Harrison WTA, Deng H, Okoro CK, Asenjo JA, et al. Diverse metabolic profiles of a *Streptomyces* strain isolated from a hyper-arid environment. *J Nat Prod*. 2011;74(9):1965-71.
29. Calla. Metabolomics tools for natural product discovery. Roessner U, Dias DA, editores. Vol. 1055, *Methods in Molecular Biology*. 2013. 227-244 p.
30. Bernal FA, Delgado WA, Cuca LE. Fingerprint analysis of unfractionated Piper plant extracts by HPLC-UV-DAD coupled with chemometric methods. *J Chil Chem Soc*. 2012;57(3):1256-61.
31. Chacón S, González D. A new species of penzigoid xylaria (*Xylariaceae*) from the cloud forest in eastern Mexico revealed through morphological and phylogenetic analyses. *Botany*. 2019;97(7):381-9.
32. Petrini L. *Xylariaceous Fungi as Endophytes*. *Sydowia Ann Mycol Ser II*. 1985;38(3580):216-34.
33. Song F, Wu S-H, Zhai Y-Z, Xuan Q-C, Wang T. ChemInform Abstract: Secondary Metabolites from the Genus *Xylaria* and Their Bioactivities. *ChemInform*. 2014;45(30).
34. U'Ren JM, Miadlikowska J, Zimmerman NB, Lutzoni F, Stajich JE, Arnold AE. Contributions of North American endophytes to the phylogeny, ecology, and taxonomy of *Xylariaceae* (Sordariomycetes, Ascomycota). *Mol Phylogenet Evol*. 2016;98:210-32.
35. Macías-Rubalcava ML, Sánchez-Fernández RE. Secondary metabolites of endophytic *Xylaria* species with potential applications in medicine and agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017;33(1).
36. Sánchez-Fernández RE. Actividad antagónica, antifúngica y fitotóxica de hongos endófitos de *Gliricidia sepium* (Fabaceae): Identificación de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
37. García-Méndez MC, Macías-Rubalcava NA, Lappe-Oliveras P, Hernández-Ortega S, Macías-Rubalcava ML. Phytotoxic potential of secondary metabolites and semisynthetic compounds from endophytic fungus *xylaria feejeensis* strain SM3e-1b isolated from *sapium macrocarpum*. *J Agric Food Chem*. 2016;64(21):4255-63.
38. Aguilar-Ramírez E. Elucidación estructural de metabolitos secundarios bioactivos de *Paecilomyces* sp. Universidad Nacional Autónoma de México; 2019.
39. Elvira Sánchez-Fernández R, Lorena Sánchez-Ortiz B, Monserrat Sandoval-Espinosa YK, Ulloa-Benítez Á, Armendáriz-Guillén B, Claudia García-Méndez M, et al. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip*. 2013;16(2):132-46.
40. Villanueva Silva R. Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y antioomiceto de hongos endófitos con potencial antagónico aislados de *Mimosa affinis* Y *Sapium macrocarpum*. 2017.
41. Wang B, You J, King JB, Cai S, Park E, Powell DR, et al. Polyketide glycosides from *bionectria ochroleuca* inhibit *candida albicans* biofilm formation. *J Nat Prod*. 2014;77(10):2273-9.
42. Blahová E, Brandšterová E. Approaches in sample handling before HPLC analysis of complex matrices. *Chem Pap*. 2004;58(5):362-73.
43. Macías-Rubalcava ML, Ruiz-Velasco Sobrino ME, Meléndez-González C, Hernández-Ortega S. Naphthoquinone spiroketals and organic extracts from the endophytic fungus *edenia gomezpompae* as potential herbicides. *J Agric Food Chem*. 2014;62(16):3553-62.
44. Ulloa-Benítez, Medina-Romero YM, Sánchez-Fernández RE, Lappe-Oliveras P, Roque-Flores G, Duarte Lisci G, et al. Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile and semi-volatile organic compounds from the endophyte *Hypoxyylon anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia* (*Burseraceae*). *J Appl Microbiol*. 2016;121(2):380-400.
45. Macías-Rubalcava ML, Sánchez-Fernández RE, Roque-Flores G, Lappe-Oliveras P, Medina-Romero YM. Volatile organic compounds from *Hypoxyylon anthochroum* endophytic strains as postharvest mycofumigation alternative for cherry tomatoes. *Food Microbiol*. 2018;76: 363-73.
46. Sánchez-Fernández RE, Díaz D, Duarte G, Lappe-Oliveras P, Sánchez S, Macías-Rubalcava ML. Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2II1a: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum*.

- Microb Ecol. 2016;71(2):347–64.
47. Berestetskiy AO, Dalinova AA, Volosatova NS. Metabolite Profiles and Biological Activity of Extracts from *Alternaria sonchi* S-102 Culture Grown by Different Fermentation Methods. *Appl Biochem Microbiol.* 2019;55(3):284–93.
 48. Tsujimura M, Goto M, Tsuji M, Yamaji Y, Ashitani T, Kimura K ichi, et al. Isolation of diterpenoids from sugi wood-drying byproducts and their bioactivities. *J Wood Sci.* 2019;65(1).
 49. Bode HB, Walker M, Zeeck A. secondary metabolites by chemical screening, 42 cladospirones B to I from *Sphaeropsidales* sp. F-24'707 by variation of culture conditions. *European J Org Chem.* 2000;3185–93.
 50. VanderMolen KM, Raja HA, El-Elimat T, Oberlies NH. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express.* 2013;3(71):1–7.
 51. NIST. WebbookNIST - Benzoic acid [Internet]. Benzoic acid. 2018. [citado el 14 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=65-85-0>
 52. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4a ed. Biology Department Baylor University. 2017.
 53. Dewick PM. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition. 3a ed. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley and Sons; 2009. 1–539 p.
 54. Xie XG, Dai CC. Biodegradation of a model allelochemical cinnamic acid by a novel endophytic fungus *Phomopsis liquidambari*. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2015;104:498–507.
 55. Waqas M, Khan AL, Ali L, Kang SM, Kim YH, Lee JI. Seed germination-influencing bioactive secondary metabolites secreted by the endophyte *cladosporium cladosporioides* LWL5. *Molecules.* 2013;18(12):15519–30.
 56. Soliman SSM, Raizada MN. Interactions between co-habiting fungi elicit synthesis of Taxol from an endophytic fungus in host *Taxus* plants. *Front Microbiol.* 2013;4(JAN):1–14.
 57. Tadych M, Vorsa N, Wang Y, Bergen MS, Johnson-Cicalese J, Polashock JJ, et al. Interactions between cranberries and fungi: The proposed function of organic acids in virulence suppression of fruit rot fungi. *Front Microbiol.* 2015;6.
 58. Brul S, Coote P. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. Vol. 50, *International Journal of Food Microbiology.* 1999. p. 1–17.
 59. NIST. WebookNIST - Benzenacetic acid [Internet]. 2018 [citado el 14 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C103822&Mask=200>
 60. Kettout TA, Rahmania F. Identification par CG-SM de l'acide phénylacétique produit par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud. *Comptes Rendus - Biol.* 2010;333(11–12):808–13.
 61. Sugawara S, Mashiguchi K, Tanaka K, Hishiyama S, Sakai T, Hanada K, et al. Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants. *Plant Cell Physiol.* 2015;56(8):1641–54.
 62. Saravana Kumar P, Yuvaraj P, Gabriel Paulraj M, Ignacimuthu S, Abdullah Al-Dhabi N. Bio-prospecting of soil *Streptomyces* and its bioassay-guided isolation of microbial derived auxin with antifungal properties. *J Mycol Med.* 2018;28(3):462–8.
 63. Kachlicki P, Jędrzycka M. Phenylacetic acid and methyl p-hydroxyphenylacetate - Novel phytotoxins of *Fusarium oxysporum*. En: *Cereal Research Communications.* 1997. p. 853–5.
 64. Klaiklay S, Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, Phongpaichit S, Buatong J, Bussaban B. Metabolites from the mangrove-derived fungus *xylaria cubensis* PSU-MA34. *Arch Pharm Res.* 2012;35(7):1127–31.
 65. Huang C, Xiong J, Guan H Da, Wang CH, Lei X, Hu JF. Discovery, synthesis, biological evaluation and molecular docking study of (R)-5-methylmellein and its analogs as selective monoamine oxidase A inhibitors. *Bioorganic Med Chem.* 2019;27(10):2027–40.
 66. Wu SH, Chen YW, Miao CP. Secondary metabolites of endophytic fungus *Xylaria* sp. YC-10 of *Azadirachta indica*. *Chem Nat Compd.* noviembre de 2011;47(5):858–61.
 67. Ibrahim A, Sørensen D, Jenkins HA, McCarry BE, Sumarah MW. New diplosporin and agistatine derivatives produced by the fungal endophyte *Xylaria* sp. isolated from *Vitis labrusca*. *Phytochem Lett.* 2014;9(1):179–83.
 68. Sorres J, Nirma C, Touré S, Eparvier V, Stien D. Two new isopimarane diterpenoids from the endophytic fungus *Xylaria* sp. SNB-GTC2501. *Tetrahedron Lett.* 2015;56(31):4596–8.
 69. Chinworrungsee M, Kittakoop P, Isaka M, Rungrod A, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. Antimalarial halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2001;11(15):1965–9.
 70. Rukachaisirikul V, Khamthong N, Sukpondma Y, Pakawatchai C, Phongpaichit S, Sakayaroj J, et al. An [11]cytochalasin derivative from the marine-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-F100. *Chem Pharm Bull.* 2009;57(12):1409–11.
 71. Scherlach K, Boettger D, Remme N, Hertweck C. The chemistry and biology of cytochalasins. *Nat Prod Rep.* 2010;27(6):869–86.
 72. Skellam E. The biosynthesis of cytochalasins. Vol. 34, *Natural Product Reports.* Royal Society of Chemistry; 2017. p. 1252–63.
 73. Cimmino A, Andolfi A, Berestetskiy A, Evidente A. Production of phytotoxins by *Phoma exigua* var. *exigua*, a potential mycoherbicide against perennial thistles. *J Agric Food Chem.* 2008;56(15):6304–9.
 74. Berestetskiy A, Dmitriev A, Mitina G, Lisker I, Andolfi A, Evidente A. Nonenolides and cytochalasins with phytotoxic activity against *Cirsium arvense* and *Sonchus arvensis*: A structure-activity relationships study. *Phytochemistry.* 2008;69(4):953–60.
 75. Evidente A, Andolfi A, Vurro M, Zonno MC, Motta A. Cytochalasins Z4, Z5, and Z6, Three New 24-Oxa[14]cytochalasins Produced by *Phoma exigua* var. *heteromorpha*. *J Nat Prod.* 2003;66(12):1540–4.
 76. Almeida C, Part N, Bouhired S, Kehraus S, König GM. Stachylinines A-D from the sponge-derived fungus *stachylidium* sp. *J Nat Prod.* 2011;74(1):21–5.